



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

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES
DE *Moringa oleifera* L E SEU POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DE
CORANTES TÊXTEIS**

FORTALEZA

2017

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE
Moringa oleifera L E SEU POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
TÊXTEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

FORTALEZA

2017

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)

- A449p Almeida, Marina Gabrielle Guimarães de.
Purificação e caracterização de uma peroxidase de raízes de *Moringa oleifera* L. e seu potencial na degradação de corantes têxteis / Marina Gabrielle Guimarães de Almeida. – 2017.
84 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.
1. Peroxidase. 2. *Moringa oleifera*. 3. Corantes têxteis. I. Título.

CDD 572

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE
Moringa oleifera L E SEU POTENCIAL NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
TÊXTEIS

Tese ou 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.

Aprovada em: 30/05/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

A Deus.

Aos meus pais Marcos e Angelina.

Ao meu esposo Eduardo.

E a toda família LabTox.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me mostrado os caminhos certos a serem traçados. Obrigada por sempre caminhar ao meu lado principalmente nos momentos de aflição. Agradeço pela força diária concedida para seguir em frente e não perder a esperança.

Aos meus pais, Marcos e Angelina, por serem meu exemplo, por me apoiarem, por primarem pela minha educação e pelos conselhos dados durante esta jornada. Amo vocês!!! Aos meus avós, Severo e Inocência, meu tio Biu e minha tia Eliezita (*in memoriam*) por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Às minhas irmãs, Aline e Lívia, pelo bom exemplo, por todo apoio e amor. Ao meu cunhado Felipe e à minha cunhada Naynara, pelo carinho. Ao meu esposo Eduardo, por ter escolhido trilhar essa pequena passagem na terra ao meu lado. Agradeço por me fazer sorrir, por me tratar bem, por me apoiar nas minhas decisões. Quero ao seu lado permanecer até o fim!

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas críticas e sugestões.

À minha queridíssima orientadora Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa que me recebeu de braços abertos. Sou grata pela confiança, dedicação e contribuição na minha formação.

À Dra. Ilka Maria Vasconcelos, minha mãe científica, agradeço imensamente por todos ensinamentos, por acreditar em mim e também por chamar minha atenção quando necessário.

Ao Dr. José Tadeu de Abreu Oliveira, pelas sugestões e dicas para o desenvolvimento deste trabalho e disponibilidade do seu laboratório.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, obrigada por todos os ensinamentos repassados ao longo desses anos.

Aos meus eternos amigos da Biotecnologia, Camila Tauane, Acrísio Bastos, Roberta Laiz e Roberta Cristiane pelos momentos de descontração e pelo laço forte de amizade que se criou.

Aos estudantes do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, Handerson, Rodolpho, Ana Lídia, Ivna, Dhel, Pedro e, em especial, meu amigo Thiago Fernandes pela ajuda e disposição em momentos que precisei.

À Família LabTox, que tenho muito respeito e carinho, Mariana Reis, Paulo Carvalho (melhor nutricionista), Tiago Deiveson, Tarcymara Garcia, Nadine Salgueiro, Yara Dias, Pâmella, Halisson, Larissa, Bruno, Patrícia e Mayara por compartilhar as bancadas e pelo apoio no dia-a-dia.

Em especial ao meu companheiro de labuta, Dr. Lucas Dias, que nunca me negou ajuda, sábados, domingos e feriados. Quando eu precisei sempre esteve comigo. Obrigada amigoooo pelos ensinamentos, pelos incentivos após experimentos frustrados e pela paciência de escutar minhas histórias.

À melhor Pós-Doc, Dra. Helen Costa, que se tornou uma pessoa muito importante para mim, obrigada por todos os ensinamentos, pelas dicas, pelos puxões de orelha e pela valiosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga Ana Paula, que mora no meu coração e, apesar das brincadeiras, eu tenho muito a agradecer a Deus por tê-la como amiga.

Ao Me. João Xavier, pela “mãozinha” na hora das coletas de sementes de moringa, muito obrigada!

À minha IC e amiga Amanda que me ajudou bastante na parte do plantio, que suou o jaleco (literalmente) comigo na casa de vegetação e sentiu na pele o trabalho árduo de trabalhar com plantio, além da paciência de falar com as plantinhas para que elas se sentissem melhor e crescessem mais rápido! Agradeço também meu IC número 2, João Neto, que não aguentou o rojão até o fim, mas me ajudou muito durante um ano.

Às queridas Dra. Lady Clarissa, Dra. Mirella Pereira, Dra. Adelina Braga e Dra. Janne Keilla, para sempre obrigada por todo o apoio de vocês.

Muito obrigada a todos, vocês são amigos que eu vou levar para todo sempre!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Universidade Federal do Ceará - Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), (Coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos) e Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (Coordenação do Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira).

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

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.

Confie em Deus como se tudo dependesse Dele.

Trabalhe como se tudo dependesse de você.

RESUMO

As peroxidases são oxidoreduases que catalisam uma variedade de reações tais como a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por uma variedade de fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos. As peroxidases de plantas da classe III (EC 1.11.1.7) são enzimas bem caracterizadas e relacionadas com papéis fisiológicos tais como lignificação, suberização, catabolismo de auxina, cicatrização de feridas e defesa de plantas. Esse trabalho teve como foco a purificação e caracterização de uma peroxidase de raízes de *Moringa oleifera* (denominada *MoPOX*), bem como a avaliação de sua capacidade de degradar corantes têxteis. *MoPOX* foi purificada através de cromatografia de DEAE-Sephacel e Superdex 75, apresentando uma massa molecular aparente de 45,6 kDa e um pI de 9,4. O pH e a temperatura ótimos para a atividade de *MoPOX* foram 5,2 e 70 °C, respectivamente. *MoPOX* manteve pelo menos 80% da sua atividade catalítica após incubação a 70 °C durante 60 min, mostrando ser altamente termoestável. As constantes catalíticas de *MoPOX* mostraram sua alta afinidade para os substratos guaiacol e peróxido de hidrogênio. Além disso, essa enzima pode oxidar outros substratos tais como o-dianididina, eugenol e ABTS. A atividade catalítica de *MoPOX* foi diminuída na presença de ditioneitol. Em contraste, Na⁺ e Ca²⁺ aumentaram ligeiramente sua atividade enzimática. *MoPOX* purificada (0,15, 0,03 ou 0,015 mg/mL) foi capaz de degradar diferentes tipos de corantes têxteis (10, 25, 50 ou 100 mg/L), sendo Remazol® Blue RGB, Remazol® Navy RGB e Telon® Turquesa M- 5G 85% os corantes mais suscetíveis. Para estes compostos, as taxas de descoloração variaram de 15 a 90%, dependendo da concentração de corante, concentração de enzima e tempo de exposição. *MoPOX* é a primeira peroxidase purificada de raízes de *M. oleifera*. Sua alta termoestabilidade, além da capacidade de degradar diferentes tipos de corantes têxteis, torna esta enzima uma molécula com potencial de aplicação em estratégias para a biodegradação de compostos tóxicos.

Palavras-chaves: Peroxidase. *Moringa oleifera*. Corantes têxteis.

ABSTRACT

Peroxidases are oxidoreductases that catalyze a variety of reactions such as reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxidation of a variety of organic and inorganic compounds. These enzymes are widely distributed in nature, being produced by a variety of sources including plants, animals, and microorganisms. Class III plant peroxidases (EC 1.11.1.7) are enzymes well characterized and related to physiological events such as lignification, suberization, auxin catabolism, wound healing and plant defense. A peroxidase from roots of *Moringa oleifera* (named *MoPOX*) was purified, characterized, and its ability to degrade textile dyes was evaluated. *MoPOX* was purified by DEAE-Sephacel and Superdex 75, presented an apparent molecular mass of 45.6 kDa and a pI of 9.4. The optimum pH and temperature for *MoPOX* activity are 5.2 and 70 °C, respectively. *MoPOX* maintained at least 80% of its catalytic activity after incubation at 70 °C for 60 min, showing to be high thermostable. *MoPOX* catalytic constants showed its high affinity for guaiacol and hydrogen peroxide substrates. In addition, it can oxidize other substrates such as o-dianidisdine, eugenol and ABTS. The catalytic activity *MoPOX* was decreased in the presence of dithiotreitol. In contrast, Na^+ and Ca^{2+} slightly enhanced the *MoPOX* enzymatic activity. Purified *MoPOX* (0.15, 0.03 or 0.015 mg/mL) was able to degrade different dyes (10, 25, 50 or 100 mg/L), being Remazol[®] Blue RGB, Remazol[®] Navy RGB and Telon[®] Turquoise M-5G 85% the most susceptible dyes. For these compounds, the decolorization rates varied from 15 to 90%, depending on the concentration dye, concentration of enzyme, and time of exposure. *MoPOX* is the first peroxidase purified from roots of *M. oleifera*. Its high thermostability, plus the ability to degrade different types of textile dyes makes this enzyme a potential molecule for application in strategies for biodegradation of hazardous compounds.

Keywords: Peroxidase. *Moringa oleifera*. Textile dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas envolvidas no processo têxtil	17
Figura 2 – <i>Moringa oleifera</i> Lamarck	26
Figura 3 – Fases da germinação de <i>Moringa oleifera</i> Lamarck	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos de tratamento de efluentes têxteis.....	20
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Indústria Têxtil	16
2.2	Corantes têxteis	18
2.3	Peroxidasas	22
2.4	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck	24
3	PERGUNTAS DE PARTIDA	29
4	HIPÓTESE	30
5	OBJETIVOS	31
5.1	Objetivo geral	31
5.2	Objetivos específicos	31
6	BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND REMOVAL TEXTILE DYE OF A CLASS III PEROXIDASE PURIFIED FROM <i>Moringa oleifera</i> ROOTS	32
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

As atividades industriais vêm provocando um aumento considerável da poluição ambiental, com destaque para a indústria de tingimento têxtil. Os efluentes oriundos dessa atividade são complexos e compostos principalmente por corantes, sais alcalinos, sais orgânicos e inorgânicos, ácidos e metais pesados (GHALY *et al.*, 2014).

Os corantes têxteis são compostos que vêm sendo utilizados há milhares de anos para tingir tecidos. As principais fontes naturais de corantes são as plantas, insetos, mariscos e líquens (FERREIRA, *et al.*, 2004). Entretanto, esses corantes naturais foram facilmente substituídos pelos corantes sintéticos. O primeiro corante sintético foi descoberto ao acaso pelo químico William Henry Perkin em 1856, o qual foi chamado de malveína. Esses corantes, em sua maioria, são formados por moléculas aromáticas estáveis, bastante difíceis de degradar, sendo capazes de resistir a luz, água, agentes oxidantes e ataques microbianos (SARATALE *et al.*, 2011).

Durante o processo de tingimento, entre 10 e 60% dos corantes reativos são perdidos e lançados no ambiente, gerando graves problemas ambientais, como a contaminação de rios, lagos e do próprio lençol freático, além de contaminação do solo (FARGAN *et al.*, 2014). Os corantes comprometem a transparência da água, impedindo a entrada de luz e prejudicando a fotossíntese das plantas aquáticas (SOUZA *et al.*, 2016). Isso gera um processo de eutrofização, onde há redução de oxigênio na água, crescimento de vegetais, acúmulo de matéria orgânica e, adicionalmente, prejuízos à cadeia alimentar. Estudos identificaram a presença de corantes em enguias amarelas, um bioindicador de substâncias tóxicas, garantindo a contaminação em altos níveis tróficos (BELPAIRE *et al.*, 2015).

Alguns métodos convencionais para tratamento e remoção de corantes possuem alguns inconvenientes como elevados custos, muitas vezes inacessíveis para indústrias de pequeno porte, o que dificulta o controle da poluição em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (KHANDARE *et al.*, 2013a). Além disso, a maioria dessas práticas possui limitações como a produção de lodo residual, transferência de contaminante de uma fase para outra e formação de subprodutos que levam à necessidade de implantação de tratamentos futuros (GHALY *et al.*, 2014, ROBINSON *et al.*, 2001). Nesse sentido, há vários estudos sendo realizados a fim de se desenvolver novas técnicas para a degradação desses compostos. Dentre essas técnicas, destacam-se os tratamentos enzimáticos.

Várias oxidoredutases das plantas têm sido apontadas como moléculas promissoras no que se refere a degradação de corantes. Enzimas como a lenhina peroxidase, lacase, tirosinase, azo redutase, veratril álcool oxidase, riboflavina redutase e diclorofenolindofenol redutase são conhecidas como enzimas chave em processos de quebra de estruturas complexas de corantes (KHANDARE; GOVINDWAR, 2015). A macrófita aquática *Alternanthera philoxeroides*, por exemplo, foi capaz de degradar corantes graças ao envolvimento de suas oxiredutases (RANE, *et al.*, 2015).

Peroxidases são oxidoredutases encontradas em diferentes organismos como bactérias, fungos, plantas e animais. Representam uma família de heme proteínas que atuam oxidando uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, utilizando como doador de elétrons o peróxido de hidrogênio. Essas enzimas estão muito relacionadas ao estresse oxidativo enfrentado por plantas como consequência do metabolismo aeróbico bem como pelas condições de estresse tais como o estresse hídrico, salino, infecção por patógenos e alguns herbicidas como a atrazina, (ERINLE *et al.*, 2016). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em decorrência desses estresses leva à produção de peroxidases que têm como função a minimização dos danos causados por esses compostos. Alguns estudos apontam que as peroxidases vegetais da classe III apresentam potencial na remoção de corantes recalcitrantes oriundos das etapas de tingimento da indústria têxtil (GOVINDWAR; KAGALKAR, 2010).

Diante do potencial biotecnológico das peroxidases vegetais no que se refere à degradação de compostos orgânicos como corantes têxteis, o presente trabalho teve como foco o isolamento de uma peroxidase a partir de raízes de *Moringa oleífera*. Esta espécie é bastante adaptada às condições climáticas do Brasil, particularmente do estado do Ceará, sendo conhecida pela capacidade de clarificar águas tornando-as adequadas ao uso pela população (SHINOMOL *et al.*, 2016). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram que plântulas de *M. oleífera* apresentaram alta atividade peroxidásica em raízes em comparação às folhas. Esse dado corrobora com os obtidos por Shank e colaboradores (2013) que avaliaram os teores de peroxidase em folhas, caules e raízes de plântulas de *M. oleífera* produzidas *in vitro* e observaram que os extratos das raízes apresentaram maior teor de peroxidase. Após o isolamento, a peroxidase foi caracterizada em relação a aspectos moleculares e cinéticos, além de ter sido avaliada frente à sua capacidade de degradar diferentes classes de corantes têxteis.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

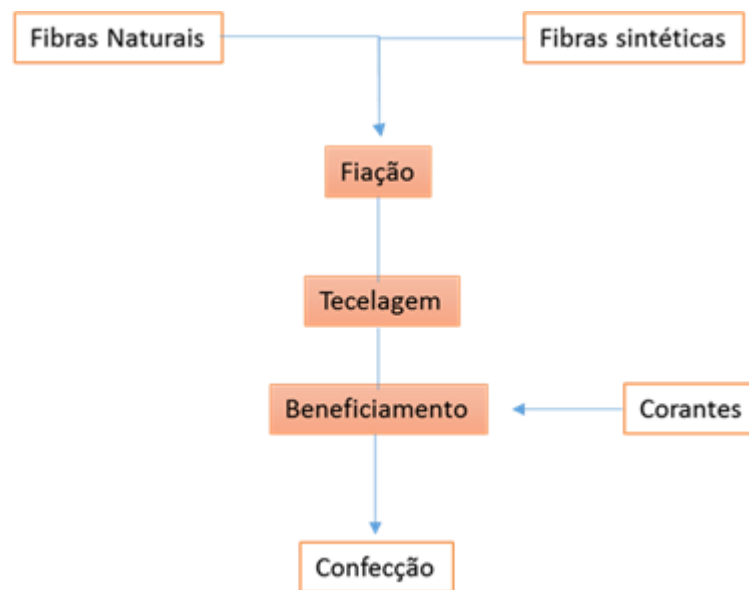
2.1 Indústria Têxtil

A revolução industrial ocorreu entre o final do século XVIII e o início do século XIX na Inglaterra, e se espalhou rapidamente por toda a Europa e América do Norte. A expansão da atividade industrial, desde então, tem levado à geração de empregos, além de o padrão e a qualidade de vida. Dentre as principais atividades industriais, podemos destacar a indústria têxtil, com uma demanda dos produtos gerados aumentando rapidamente junto com o crescimento exponencial da população mundial no século 21 (HEYMANN, 2011; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). O Brasil se destaca no setor, sendo o quinto maior produtor têxtil do mundo com uma produção de 1,8 milhão de toneladas de tecidos e um faturamento estimado em US\$ 39,3 bilhões, sendo investidos US\$ 869 milhões (ABIT, 2016).

O processo têxtil de produção de tecidos integra a produção de fibras naturais e sintéticas que, posteriormente, passará pelos processos de fiação, tecelagem e beneficiamento (IEL, 2000). As fibras chegam ao mercado em forma de filamentos contínuos ou cortados que são transformados em fios pelo processo de fiação. A segunda etapa, tecelagem, é quando os fios são entrelaçados para se transformarem em tecidos. Esses tecidos são encaminhados para o último processo, o de beneficiamento (branqueamento, tinturaria, estamparia, engomagem etc.) determinando ao produto final a cor, aspecto e características desejadas (FIGURA 1).

Durante todo seu processo, a indústria têxtil usa grandes quantidades de eletricidade, combustível, com as correspondentes emissões de gases de efeito estufa (GEE) (HASANBEIGI; PRICE, 2015). Além disso, este é um dos segmentos industriais que mais consome água doce (FARIAS *et al.*, 2017). Estimativas apontam que cerca de 600 milhões de m³ de água por segundo são consumidos pelo maior exportador têxtil no mundo, a Europa. De acordo com o cenário de crescimento econômico médio, estima-se que a demanda global de água seja de 1500 bilhões de m³ em 2030 (VAJNHANDL; VALH, 2014). Grande parte dessa água é usada nos setores de beneficiamento, após o tingimento para lavagem do excesso de corantes utilizados no processo de tingimento. Durante o processo de tingimento, apenas cerca de 85% dos corantes usados de fato colore os tecidos. Os 15% restantes são descartados como efluente da indústria. Do

Figura 1 – Etapas envolvidas no processo têxtil



Fonte: Própria autora.

total da água consumida na indústria, 60 a 70% são destinadas ao processo de lavagem (SALEN, 1998; FARIAS *et al.*, 2017). Um exemplo deste consumo é o que ocorre em Tirunpur, a principal cidade em produção têxtil da Índia. Quase 30 bilhões de litros de água são usados anualmente no processo de coloração de tecidos levando ao desperdício total de 87 bilhões de litros de água como efluente têxtil (ARAVIND *et al.*, 2016).

Em geral, os efluentes têxteis são altamente coloridos, ricos em metais, fenóis e outros compostos tóxicos resultantes dos vários produtos químicos utilizados na indústria têxtil (compostos inorgânicos, polímeros, produtos orgânicos como dispersantes, ácidos, bases, sais, detergentes, umectantes, oxidantes) (HU *et al.*, 2016; MORALI; UZAL; YETIS, 2016; CHEN, *et al.*, 2017). As águas destes efluentes apresentam portanto, altas demandas químicas e biológicas de oxigênio, alta condutividade e, normalmente, alta alcalinidade (KALYANI *et al.*, 2009).

Dentre os componentes dos efluentes, os corantes são um dos mais importantes, sendo facilmente detectados a olho nu. Estes compostos, devido a alta solubilidade na água, baixa taxa de degradação, alta toxicidade e natureza carcinogênica e mutagênica, ocasionam grandes impactos ambientais e efeitos danosos à saúde (BILAL *et al.*, 2016a, 2016b; PUNZI *et al.*, 2015). Portanto, esses compostos devem passar por etapas de tratamento eficientes a fim de garantir a sustentabilidade dos recursos hídricos, proteção da contaminação ao meio ambiente, evitando uma crise global de água doce no futuro (OZTURK, *et al.*, 2016).

2.2 Corantes têxteis

O uso dos corantes pelo homem tem mais de 4000 anos, existindo mais de 100.000 corantes comercialmente disponíveis (FERREIRA, 2004). Eles podem ser definidos como substâncias que ao serem utilizadas em um substrato, como tecido, alimento, couro, papel, madeira, entre outros, alteram, mesmo que por um tempo, qualquer estrutura cristalina das substâncias coloridas. Uma substância para ser considerada um corante deve apresentar algumas características como serem estáveis a luz e aos processos de lavagem e apresentar fixação uniforme com as fibras em todo o substrato (CHEQUER, *et al.*, 2013).

Os primeiros corantes usados para tingir substratos provinham de fontes naturais, provenientes de plantas e de insetos, em seguida, rapidamente estes corantes deram espaço para um processo de fabricação sintética (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI,

2011). Os corantes naturais, possuem uma melhor compatibilidade ambiental e biodegradabilidade, causam menos reações alérgicas e toxicidade ao corpo humano (REN, *et al.*, 2017). Porém, os corantes naturais têm sido largamente substituídos pelos corantes sintéticos, muitos deles considerados extremamente perigosos (KEMI, 2013). Os principais corantes sintéticos utilizados incluem os corantes azo, trifenilmetano, antraquinona, indigo e metano aromático (WANG *et al.*, 2017).

A estrutura química dos corantes utilizados para tingimento de fibras têxteis pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra. A forma de fixação do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes (GUARATINI; ZANONI, 1999).

Os corantes podem ser classificados segundo sua fixação, como por exemplo ácidos, diretos, à cuba, azoicos, dispersivos, de enxofre, pré-metalizados, branqueadores e reativos, sendo estes últimos os mais utilizados mundialmente. Já de acordo com sua estrutura química, eles podem ser classificados em antraquinonas, azos, ftalocianinas, triarilmetanos, nitrosos e índigos (YAGUB, *et al.*, 2014).

Quando liberados no ambiente, sem nenhum tratamento prévio, os efluentes têxteis contendo esses corantes podem impedir a penetração da luz solar nas camadas mais internas, afetando a atividade fotossintética na vida aquática e facilitando o processo de eutrofização. Além disso, como mencionado anteriormente, vários corantes sintéticos são tóxicos e mutagênicos devido à presença de metais, e estruturas aromáticas etc (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011; YAGUB, *et al.*, 2014). Corantes como o indigo e os azóicos, amplamente utilizados na indústria têxtil, são recalcitrantes (BALAN; MONTEIRO, 2001). Já os corantes reativos como a antraquinona apresentam uma elevada resistência biológica à biodegradação em condições aeróbicas (GHAZALIAN; GHASEMI; GHANDIN, 2017).

Mesmo com toda a problemática ambiental, a fabricação e o uso de corantes ainda é uma prática muito usual, pela fácil aplicação, baixo custo, resultados desejáveis e boa aceitação pelo mercado consumidor. Dessa maneira, diversas pesquisas são realizadas a fim de tratar estes efluentes contaminados e reduzir a concentração dos poluentes de forma que alcance os padrões especificados por leis ambientais, onde a quantidade de poluentes não se torne uma ameaça para saúde.

Não há um método único, totalmente eficaz para o tratamento de efluentes têxteis. Isso ocorre, provavelmente, por causa da diversidade de estruturas químicas e

complexidade desses compostos (TABELA 1). Diferentes técnicas, incluindo os métodos físicos, químicos e biológicos apresentam vantagens e também grandes inconvenientes (WANG *et al.*, 2017).

Dentre os processos físicos destacam-se a adsorção e filtração por membrana. O carvão ativado como adsorvente é o mais utilizado, mas é pouco eficaz na remoção de corantes reativos. Para esta classe de corantes é mais indicado a nanofiltração por membranas, porém elas precisam ser trocadas periodicamente já que possuem uma vida útil limitada. Os métodos químicos tais como coagulação/floculação consistem em neutralizar as cargas elétricas do material em suspensão através de coagulantes químicos (cloreto férrico ou sulfato de alumínio) seguida da agregação do coloide. Uma variação desse processo, o eletroquímico, consiste na passagem de corrente elétrica através de eletrodos resultando em diferentes reações químicas, onde há alta demanda de energia elétrica e consumo de reagentes químicos. Assim, os processos físico-químicos são considerados de alto custo além de produzirem uma grande quantidade de lodos residuais, fazendo com que seja necessária mais uma etapa de tratamento posterior (TURHAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017).

Os processos biológicos são mais utilizados por serem estáveis, terem baixo custo de implementação e serem eficientes. Microrganismos como bactérias, leveduras, algas e fungos são capazes de acumular e degradar diferentes poluentes, porém para corantes reativos não são tão eficientes, além de necessitarem de um pré-tratamento com temperatura e pH na faixa adequada (WAGHMODE *et al.*, 2012, YURTSEVER; CALIMLIOGLU; SAHINKAYA, 2017). Além disso, microrganismos anaeróbicos que degradam corantes produzem aminas aromáticas que também podem ser tóxicas e cancerígenas (MEYER, 1981). Assim, medidas alternativas com melhores resultados precisam ser estudadas e exploradas, buscando novas fontes mais econômicas e de menor impacto ambiental. Dentre essas estratégias, destacam-se as técnicas empregando enzimas.

As enzimas apresentam uma alta especificidade e eficiência na degradação de corantes recalcitrantes, difíceis de serem removidos. As técnicas envolvendo essas biomoléculas normalmente apresentam maior rapidez mesmo em condições drásticas

Tabela 1 – Métodos de tratamento de efluentes têxteis

Tecnologia	Método	Vantagem	Desvantagem
Coagulação/Floculação	Químico	Simples, economicamente viável	Alta produção de lamas residuais e problemas de eliminação
Biodegradação	Biológico	Economicamente atraente, tratamento aceitável	Processo lento, necessita da criação de um ambiente favorável, manutenção e necessidades nutricionais
Adsorção - carbonos ativados	Físico	O adsorvente mais eficaz, capacidade de produzir um efluente tratado de alta qualidade	Ineficaz contra corantes dispersos, regeneração é cara e resulta em perdas do adsorvente
Separação de membrana	Físico	Remove todos os tipos de corantes, Um efluente tratado de alta qualidade	Pressões elevadas, caro, incapazes para grandes volumes
Troca iônica	Químico	Regeneração eficaz	Não é eficaz para corantes dispersos
Oxidação	Químico	Processo rápido e eficiente	Alto custo de energia e necessita de produtos químicos
Biomassa	Biológico	Baixo custo operacional, boa eficiência, nenhum efeito tóxico nos microorganismos	Processo lento, o desempenho depende de alguns fatores externos (pH, sais)
Eletroquímico	Químico	Completa descoloração	Geração de lodo, alto custo, tempo de vida do eletrodo

Fonte: CRINI, 2006.

como amplas faixas de temperatura, pH, salinidade e altas concentrações do poluente, além de não dependerem das etapas de aclimação microbiana exigidas nos tratamentos biológicos convencionais (ANSARI *et al.*, 2011, HUSAIN; HUSAIN, 2012, RAO *et al.*, 2014).

Pelo menos seis classes de enzimas podem ser utilizadas nos tratamento de efluentes têxteis, dentre elas as oxidorredutases. Essas enzimas são capazes de degradar compostos poluentes, oxidando-os como substratos e reduzindo o oxigênio a água (ASGHER *et al.*, 2008). Dentro da classe das oxidorredutases podemos destacar as lacases e as peroxidases. Elas desempenham papéis importantes em muitos processos bioquímicos, tais como respostas ao estresse, eliminação xenobiótica, biossíntese da parede celular e outras (LIU *et al.*, 2017).

Lacases (EC 1.10.3.2) possuem quatro átomos de cobre ligados ao centro ativo e catalisam a oxidação de numerosos compostos aromáticos (principalmente fenóis). Também são capazes de catalisar a oxidação de outros polifenóis, aminas aromáticas, corantes fenólicos, clorofenóis, benzopirenos, organofosforados (DURÁN; ESPOSITO, 2000; CHEN *et al.*, 2002; DENIZLI *et al.*, 2005). Essas enzimas, portanto, podem ser utilizadas no tratamento de efluentes têxteis, oxidando os corantes ali presentes (LI *et al.*, 2017; TEERAPATSAKUL *et al.*, 2017). Já as peroxidases são enzimas produzidas por diferentes organismos como bactérias, fungos, animais e plantas. Há vários relatos na literatura acerca do potencial biotecnológico dessas enzimas no que se refere à degradação de compostos recalcitrantes incluindo os corantes têxteis (CHIONG, *et al.*, 2016).

2.3 Peroxidases

Peroxidases (EC 1.11.1.X) são oxidorredutases que catalisam uma variedade de reações tais como a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (BANSAL; KANWAR, 2013). Essas enzimas são encontradas em diferentes organismos como animais, plantas, bactérias e fungos, representando um grupo heterogêneo de proteínas (LAZZAROTTO; ZOLET; PINHEIRO, 2015). A maioria das peroxidases possui o ferro como grupo prostético e apresenta massa molecular variando de 30 a 150 kDa. Elas podem ser representadas por formas aniônicas e catiônicas, sendo estas últimas mais abundantes e mais ativas que as formas aniônicas (DICKO *et al.*, 2006).

Os membros das superfamílias de peroxidases foram divididas em três classes com base em suas relações filogenéticas: classe I, classe II e classe III. As peroxidases da classe I são as mais difundidas, estando presentes tanto em eucariotos como em procariotos (LAZZAROTTO; ZOLET; PINHEIRO, 2015). Essa classe é composta por peroxidases intracelulares como as ascorbato peroxidases (APx), catalase peroxidases (CP) e citocromo-c peroxidases (CcP). As peroxidases classe II compreendem as peroxidases secretadas de fungos, tais como as lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP). Já as peroxidases classe III representam aquelas encontradas em plantas (ZAMOCKY, 2004).

As peroxidases da classe III são consideradas proteínas apoplásticas, secretadas pela célula porém, apresentando isoformas vacuolares. As funções fisiológicas dessas enzimas estão associadas a mecanismos de defesa, metabolismo de auxinas e à biossíntese de polímeros da parede celular tais como suberina e lignina, os quais atuam como uma barreira física para estresses bióticos e abióticos (DUBROVSKAYA *et al.*, 2017). É sabido que essas enzimas são produzidas em maior quantidade como resposta a estresses abióticos e/ou bióticos a fim de evitar a produção excessiva de radicais livres (ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio) (MOLLER; JESEN; HANSSON, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

Com relação aos estresses abióticos ocasionados por compostos químicos, é sabido que as peroxidases desempenham um efeito protetor relacionado à oxidação de metabólitos fenólicos tóxicos e/ou substratos poliméricos como a lignina (GIANFREDA, 2015). Plantas submetidas ao estresse provocado pelo herbicida atrazina, por exemplo, apresentaram aumentos significativos de peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). A atrazina é conhecida por inibir o fotossistema II, bloqueando o transporte de elétrons o que pode ocasionar a necrose dos tecidos vegetais das espécies sensíveis a ela (ERINLE, *et al.*, 2016). Além disso, esse herbicida possui uma baixa solubilidade em água e apresenta grande recalcitrância quando presente nos solos podendo ser facilmente lixiviada (COLDEBELLA, *et al.*, 2016).

Várias peroxidases mostraram capacidade de degradação de corantes com elevada atividade específica e estabilidade no que se refere a variações de pH e temperatura. Peroxidases isoladas de *Momordica charantia*, *Glycine max*, *Brassica oleracea*, *Saccharum uvarum*, *Solanum tuberosum* e *Trichosanthes dioica* são exemplos de enzimas que se mostraram eficientes tanto na degradação de corantes azo como de corantes não

azo (SHAFFIQU *et al.*, 2002; KHAN; HUSAIN, 2007; JAMAL; PANDEY; QIDWAI, 2010).

As peroxidases classe III representam, portanto, um recurso facilmente disponível, de baixo custo e sustentável para o tratamento de efluentes contendo diferentes tipos de corantes incluindo os da indústria têxtil. Assim, o desenvolvimento de bioprocessos eficazes utilizando enzimas para o tratamento destes efluentes tem grande potencial para serem implantados, inclusive, em escala industrial.

2.4 *Moringa oleifera* Lamarck

Moringa oleifera é uma planta tropical de pequeno a médio porte, pertencente à família Moringaceae, única família de arbustos. A árvore possui um troco único e delgado, folhas bipinadas ou tripinadas, flores brancas, frutos compridos e sementes aladas para facilitar a propagação (FIGURA 2). A germinação desta espécie é rápida, a partir do quinto dia já ocorre a profusão da raiz primária e em aproximadamente vinte dias há expansão do epicótilo e o surgimento das primeiras folhas (FIGURA 3). Mais conhecida como moringa, essa espécie é nativa do Noroeste da Índia, sendo amplamente cultivada em áreas tropicais e subtropicais como Ásia, África e América do Sul (ANWAR *et al.*, 2007). No Brasil, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados de Maranhão, Piauí e Ceará (MATOS, 1998; CYSNE, 2006).

Muitas propriedades terapêuticas são atribuídas à moringa: bactericida, anticâncer, diurética, antipirética, analgésica, anti-inflamatória e hipoglicemiante (ANAND, *et al.*, 2015; GONZÁLEZ, *et al.*, 2017; MUHAMMAD; ASMAWI; KHAN, 2016; PAULA, *et al.*, 2016; DUBEY *et al.*, 2013). Além disso, seus frutos, folhas, flores e sementes são comestíveis, tornando-a uma alternativa para o combate à desnutrição, visto que apresentam uma grande quantidade de vitaminas, sais minerais e proteínas ricas em aminoácidos essenciais (WADHWA *et al.*, 2013). Seus frutos possuem 7 vezes mais vitamina C do que laranjas, 10 vezes mais vitamina A do que cenouras, 17 vezes mais cálcio do que o leite, 9 vezes mais proteínas do que iogurte, 15 vezes mais de potássio do que bananas e 25 vezes mais de ferro do que o espinafre (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016). Vários estudos mostram o grande potencial dessa espécie na melhoria nutricional de alimentos já consumidos pela população (OYEYINKA, OYEYINKA, 2016).

A resistência ao ataque de pragas e patógenos da *M. oleifera*, também é uma de suas características, uma vez que essa espécie é pouco afetada por insetos e outras doenças (RAMACHADRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Extratos de várias partes da planta apresentaram ação antifúngica contra *Basidiobolus haptosporus*, *Basidiobolus ranarum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (NWOSU; OKAFOR, 1995). Os extratos de suas raízes também tiveram ação contra nematoides que atacam tomateiros (*Meloidogyne incognita*) (HOAN; DAVIDE, 1979).

Outra utilização da espécie é no tratamento de águas superficiais por serem as sementes de moringa, um coagulante natural, capaz de reduzir a turbidez da água tornando-a apropriada ao consumo (BAPTISTA, *et al.*, 2017). Segundo Gassenschmidt e colaboradores (1995), a purificação da água é devido à presença de peptídeos catiônicos de massa molecular variando de 6,0 a 16,0 kDa e de ponto isoelétrico em torno de 10,0. Frações enriquecidas dessas proteínas coagulantes são altamente termoestáveis, mantendo a capacidade de aglutinar material em suspensão, além de agregar e inibir o crescimento de microrganismos como *Escherichia coli* e *Bacillus thurigiensis*, mesmo quando aquecidas a 96 °C, por 5 horas (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005).

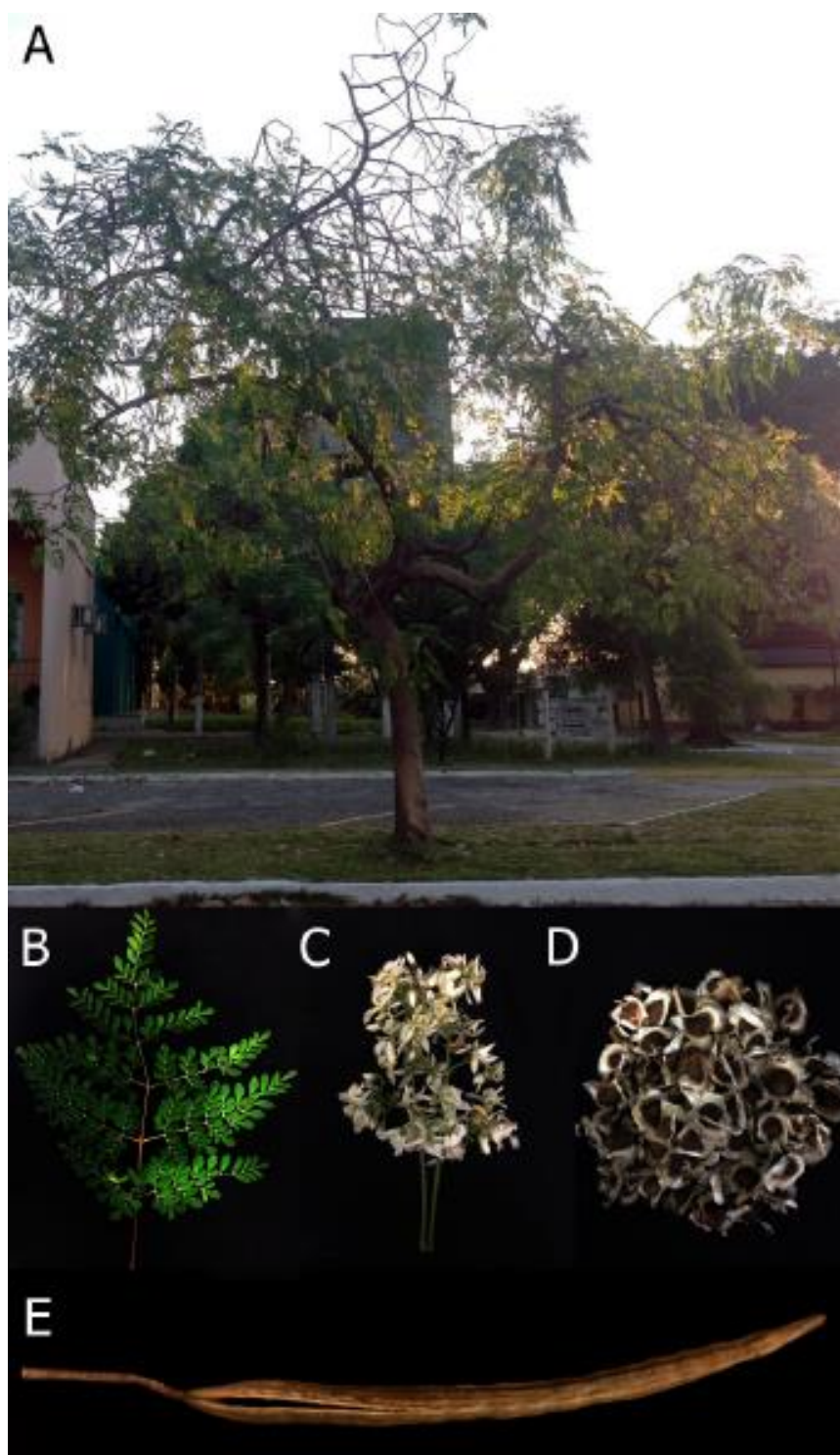
Também já tem sido relatada a capacidade da espécie em remover diferentes tipos de contaminantes da água (OLSEN, 1987). Por exemplo, extratos de sementes dessa espécie removeu 99% do corante do tipo azo Chicago Sky Blue 6B, um corante aniônico muito recalcitrante (HEREDIA; MARTIN, 2008). Em outro estudo, o extrato de sementes de moringa foi eficaz na remoção de 95% do corante Alizarin Violet 3R, antraquinônico, por um processo de coagulação (HEREDIA *et al.*, 2009). Sementes de moringa sem casca também foram eficazes na remoção do corante Acid Orange 7 (MARANDI; SEPEHR, 2011).

Os metais pesados são outros contaminantes encontrados nas águas que são prejudiciais à saúde e se acumulam na cadeia alimentar dos animais. Alguns estudos mostram que *M. oleifera* é capaz de remediar ambientes contaminados com metais como cádmio chumbo e arsênio (SHARMA, *et al.*, 2007; KUMARI *et al.*, 2006; ADELAJA, AMOO, ADERIBIGBE, 2011). Além das sementes, as cascas, raízes, folhas e vagens dessa espécie mostraram eficiência na remoção de íons metálicos de águas contaminadas, mostrando a versatilidade desta planta (SHINOMOL *et al.*, 2016). Amadi e Tane (2014) por exemplo, identificaram uma drástica redução na quantidade de metais pesados em solos submetidos a fitorremediação por *M. oleifera*, sendo observado o maior acúmulo

desses elementos nas raízes, o que demonstra a capacidade de fitoextração de metais por essa planta.

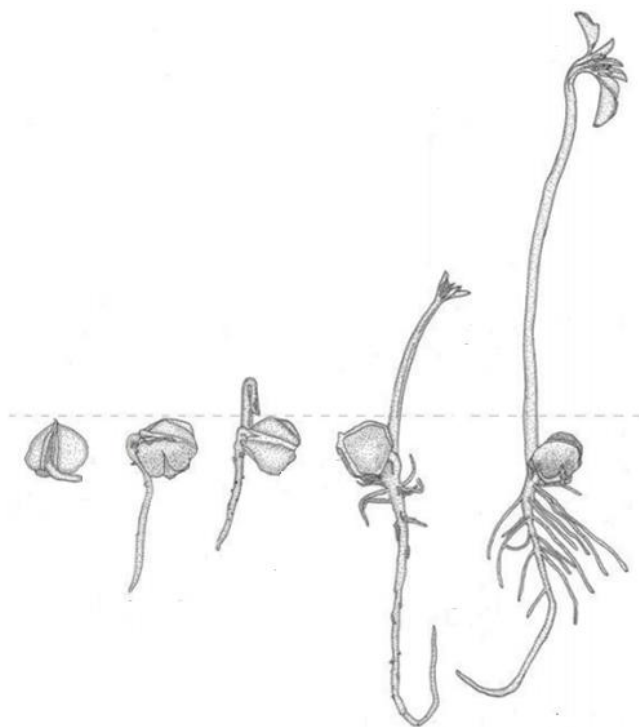
Dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que raízes de *M. oleifera* apresentavam uma considerável atividade peroxidásica quando comparada a outros órgãos da planta, como as folhas. Essa atividade era cerca de 200% maior, quando as plantas eram submetidas ao contato com o herbicida atrazina. Provavelmente, o estresse oxidativo ocasionado por esse composto foi capaz de induzir a produção dessas enzimas, já bem relatadas acerca de seu envolvimento nos eventos de redução de espécies reativas do oxigênio. Como mencionado anteriormente, peroxidases apresentam grande potencial biotecnológico na área ambiental devido à capacidade de degradar diferentes tipos de compostos xenobióticos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, a purificação e caracterização de, pelo menos, uma peroxidase de raízes de *M. oleifera* e, avaliar o potencial da proteína isolada na degradação de corantes têxteis.

Figura 2 – *Moringa oleifera* Lamarck



Fonte: PINTO, 2014. (A) Árvore *M. oleifera*; (B) Folhas; (C) Flor (D) Sementes aladas; (E) Fruto maduro.

Figura 3 – Fases da germinação de *Moringa oleifera* Lamarck



Fonte: RAMOS *et al.*, 2010 (com modificação).

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

- Sabendo que as peroxidases de raízes de *M. oleifera* são induzidas pela presença de atrazina, poderia esse herbicida ser utilizado como uma estratégia para o aumento do teor dessa(s) enzima(s) nesse órgão?
- Qual seria a estratégia experimental mais adequada para a extração e purificação de peroxidase(s) a partir de raízes de *Moringa oleifera*?
- A peroxidase purificada das raízes de *Moringa oleifera* teria a capacidade de degradar corantes têxteis?

4 HIPÓTESE

Raízes de *Moringa oleifera* representam uma fonte promissora de peroxidase(s), as quais podem apresentar potencial biotecnológico na degradação de compostos orgânicos de interesse ambiental incluindo os corantes têxteis.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o potencial de degradação de corantes têxteis de uma peroxidase de raízes de *Moringa oleífera*

5.2 Objetivos Específicos

- Definir as condições de extração de proteínas a partir de raízes de *Moringa oleífera*;
- Definir a concentração de atrazina necessária para a maior indução de peroxidase
- Purificar uma peroxidase de raízes de *Moringa oleífera*;
- Determinar as características bioquímicas da peroxidase purificada;
- Avaliar a capacidade da peroxidase em degradar diferentes tipos de corantes têxteis.

ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

Biochemical Characterization and removal textile dye of a class III peroxidase purified from *Moringa oleifera* roots

**Biochemical Characterization and removal textile dye of a class III peroxidase
purified from *Moringa oleifera* roots**

Marina G. G. Almeida, Helen P.S. Costa, Amanda M. A. Moura, José T. A. Oliveira¹,
Pedro F.N. Souza, Ilka M. Vasconcelos¹, Daniele O. B. Sousa^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, 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

Abstract

A class III peroxidase from *Moringa oleifera* roots (named *MoPOX*) was purified using DEAE-Sephacel and gel filtration chromatography on a Superdex® 75 column. *MoPOX* has an apparent molecular mass of 45.6 kDa and a pI of 9.4. The optimum pH and temperature for *MoPOX* were 5.2 and 70 °C, respectively. *MoPOX* maintained at least 80% of its catalytic activity after incubation at 70 °C for 60 min, showing to be high thermostable. *MoPOX* follows Michaelis-Menten kinetics with a high affinity for guaiacol and hydrogen peroxide. In addition, this enzyme present specificity for other substrates as *O*-dianisidine and eugenol. The catalytic activity of *MoPOX* was slightly increased in the presence of Ca²⁺ and Na⁺, and totally inhibited in the presence of DTT. Purified *MoPOX* (0.15, 0.03 or 0.015 mg/mL) degrades different dyes (10, 25, 50 or 100 mg/L), such as Remazol® Blue RGB, Remazol® Navy RGB and Telon® Turquoise M-5G 85%. For these compounds, the decolorization rates varied from 15 to 90%, depending on the concentration of dye, enzyme, and time of exposure. *MoPOX* is the first peroxidase purified from roots of *M. oleifera* that show the ability to degrade different types of textile dyes, which turn this enzyme a potential molecule for application in strategies for biodegradation of hazardous compounds.

Keywords: Peroxidase, *Moringa oleifera*, textile dyes

1.0 Introduction

Peroxidases (EC 1.11.1.7) are oxidoreductases that catalyze a variety of reactions such as reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxidation of a variety of organic and inorganic compounds (Bansal and Kanwar, 2013). These enzymes are widely distributed in nature, being produced by a variety of sources including plants, animals, and microorganisms. Based on the homologies in amino acid sequences, peroxidases have been classified as: (i) Class I include the intracellular enzymes found in plant, bacteria and yeast (ascorbate peroxidase, catalase peroxidase etc.); (ii) Class II are fungal extracellular peroxidases (manganese and lignin-peroxidase); and Class III (EC 1.11.1.7) are plant secretory-peroxidases (Hiraga *et al.*, 2001). Physiological functions of plant peroxidases are related to defense mechanisms, auxin metabolism, and biosynthesis of the cell-wall polymers performing the function of a physical barrier against biotic and abiotic stress factors (Shigeto and Tsutsumi, 2016).

Plant peroxidases are known to exhibit broad substrate specificity such as aromatic compounds and synthetic compounds (Dubrovskaya *et al.*, 2016). Because of this, these enzymes have potential for biotransformation of organic compounds, removal of phenolics and aromatic amines from polluted water and water-miscible organic solvents. The abilities of peroxidases for decolorization of synthetic dyes from contaminated water and industrial effluents have also been reported (Kalsoon, Bhatti and Asgher 2015).

Textile dye manufacturing and processing industry liberate huge volumes of effluents to the ecosphere (Khandare and Govindwar 2015). Synthetic dyes are recalcitrant molecules that constitute the main residue found in the effluent of the textile dying industry (Dellamatrice *et al.*, 2017). It has been estimated that the losses of

colorants to the environment can reach 10-50% (Mansour *et al.*, 2012). These compounds may decrease the dissemination of daylight, reducing the overall rate of photosynthesis of algae and other aquatic vegetation, the gas solubility, and esthetic merit of contaminated water (Kalsoon *et al.*, 2015). Furthermore, some dyes and their breakdown products are highly toxic, carcinogenic and mutagenic to living organisms (Xu *et al.*, 2007; Chequer *et al.*, 2013).

Various chemical, physical and biological techniques have been applied to remove dyes from industrial wastewater prior to their release into the aquatic environment. All of them present advantages, but also disadvantages, such as high cost, use of environmentally hazardous chemical substance, generation of large amounts of sludge, and long time for complete dye mineralization (Kalsoon *et al.*, 2015). Biotreatment offers a cheaper and environmentally friendlier alternative for colour removal, but presents some inconveniences such as the susceptibility for toxic dyes and other substances present in the effluent. Therefore, in cases where there is limitation of organism growth, isolated enzymes systems are preferred (Chacko and Subramaniam 2011).

Enzymatic treatments have attracted much attention as cost effective and environment friendly technique for detoxification of dye-contaminated industrial effluents. The high specificity of enzymes enables targeted recalcitrant pollutants in wastewater to be removed by precipitation or transformation them into innocuous products. Enzymatic treatment processes can occur at extreme pollutant concentrations and over wide ranges of temperatures, pH and salinity (Chiong *et al.*, 2016). Moreover, these treatments are considered fast because are not dependent of microbial acclimatization (Husain, 2010). Peroxidases are enzymes that have been correlated with the decolorization of dyes. The enzyme horseradish peroxidase (HRP), for example, is a

versatile enzyme effective in the removal of a wide spectrum of aromatic compounds (phenols, biphenols, anilines) and in the degradation and precipitation of important industrial azo dyes (Sekuljica *et al.*, 2015; Bilal *et al.*, 2016; Janovic *et al.*, 2017). However, the high cost of commercial HRP has led recent research efforts towards discovering cheaper sources of plant peroxidases for the treatment of dye effluents (Chiong *et al.*, 2016).

Moringa oleifera is a tree native to India that grows at tropics and subtropics of Africa, Asia, and Americas. Almost every part of the plant can be used as food or with medical and therapeutic purposes (Anwar *et al.*, 2007). Moreover, *M. oleifera* is very effective natural agent used for water treatment (Kansal and Kumari, 2014). Preliminary data obtained by our research group showed that roots of *M. oleifera* present a high peroxidase activity. In the present study, we reported the purification and characterization of a new peroxidase from roots of *M. oleifera*. We also investigated the potential of this enzyme in the degradation of different classes of textile dyes.

2.0 Materials and Methods

2.1 Chemicals

DEAE-Sephacel, Superdex® 75, molecular mass markers were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Guaiacol, dithiothreitol (DTT), o-dianisidine, eugenol, ascorbic acid, NADH, 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt (ABTS), aminoantipyrine, syringaldazine and tryptophan were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, USA). Textile dyes were gently provided by the company DyStar. All other chemicals were of analytical grade for biochemical use.

2.2 Plant material and growth conditions

Moringa oleifera seeds were harvested, at 65 days after anthesis from trees naturally growing at the Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brazil. The seeds with no cracks or other injuries, were surface sterilized with 0.2% active chlorine (hypochlorite) for 5 min, rinsed exhaustively with and soaked in distilled water for 1 h and germinated in Germtest paper humidified with MilliQ grade water. The seeds were kept near 100% relative humidity in the dark for 8 days. After this period, the seedlings were transferred to 2.0 L plastic pots (three per pot) containing 1.5 L distilled water and dilutes (10 x) Hoagland nutritive solution. These plants were kept in a greenhouse for 30 days under natural conditions of a semiarid region of Brazil, with day/night, temperatures of $31.0 \pm 3.0^\circ \text{C}/26.0 \pm 0.8^\circ \text{C}$, respectively and $80.0 \pm 7.9\%$ relative humidity, with periodic exchanges of nutritive solution.

Previous data obtained by our research group showed that *M. oleifera* plants treated with the herbicide atrazine presented higher levels of peroxidase in their roots when compared with no treated plants. Thus, before the beginning of the processes of

extraction and purification, the plants were treated with this herbicide at three concentrations (0.02, 0.2 and 2.0 mg/L) in different time (0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h) intervals aiming to evaluate which one induced a higher level of peroxidase. The concentration of 0.2 mg of atrazine per liter at a contact time of 1 h were chosen. In the next stage, germinated seeds were transferred to pots containing 1.5 L of atrazine solution (0.2 mg/L). After 1 hour, the plants were collected, weighted and immediately frozen using liquid nitrogen (N₂). Then, the roots were stored at -80 °C for later analysis.

2.3 Extraction procedures

M. oleifera roots (70 g) were harvested and ground in liquid N₂ with mortar and pestle. After the N₂ had evaporated away, the frozen powder was immediately brought into contact with 0.1 M sodium acetate buffer (1:3 w/v) at pH 5.2 and was subjected to moderate stirring for 2 h, at 4 °C. The crude extract was filtered and centrifuged at 15.000 x g at 4 °C for 20 min, and the supernatant was dialyzed (12 kDa molecular weight cutoff membrane) against distilled water for 24 h and designated as the soluble protein extract (SPE). The SPE was concentrated by freeze-drying and used for further purification.

2.4 Purification of *M. oleifera* root peroxidase (MoPOX)

The lyophilized soluble protein extract (SPE) from *M. oleifera* roots was resuspended in 0.1 M sodium acetate, pH 5.2, centrifuged (10.000 x g at 4 °C for 10 min) and the supernatant (155.2 mgP) applied in a DEAE-Sephacel column (20.0 x 1.5 cm) previously equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.2). The column was washed with equilibration buffer. Retained proteins were eluted with the same buffer containing 0.5 M NaCl. For both retained and non-retained proteins fractions of 2 mL were collected, flow 1 mL/min. Absorbances at 280 nm, SDS-PAGE electrophoresis

(Laemmli, 1970) and peroxidase activity were monitored (Urbanek *et al.*, 1991). The eluted fractions containing peroxidase activity were named D2, pooled and used for subsequent steps.

The fraction D2 (6.9 mgP) obtained from the DEAE-Sephacel (20.0 x 1.5 cm) chromatography presenting a high peroxidase activity and, in addition, a low number of protein bands, was loaded onto a Superdex® 75 (60.0 x 1.6 cm) column, previously equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.2). Absorbances at 280 nm, and peroxidase activity were monitored (Urbanek *et al.*, 1991). The purified peroxidase, named *MoPOX*, was subjected to further analysis.

2.5 Protein quantification

Protein at each step of the purification procedure was determined according to the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith *et al.*, 1985) or following the method described by Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as the standard.

2.6 Peroxidase activity

Colorimetric assays were performed according to Urbanek, Kuzniak-Gebarowska and Herka, (1991) using guaiacol and H₂O₂ as substrates. Aliquots of 0.02 mL of the samples were added to a solution composed of 0.5 mL 60 mM H₂O₂, 0.5 mL 20 mM guaiacol, and 0.980 mL 50 mM Na-acetate buffer, pH 5.2. Reaction was conducted for incubation 10 min at 30 °C and absorbances were taken at 480 nm in 30-second intervals up to 3 min, express in UA/mgP.

2.7 Protein profile analysis by SDS–PAGE Electrophoresis

Protein profile of extracts and chromatography eluted fractions were analyzed by denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% (w/v) polyacrylamide gels (8.5 x 8.0 cm) as previously described (Laemmli, 1970). Samples were dissolved in the sample buffer, boiled (98 °C) for 5 min in a water bath, centrifuged (12,500 x g, 10 min, 4 °C) and the supernatants loaded on the gel. Electrophoresis run at 20 mA, 150 V and 10 W for 45 min. Phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactoalbumin (14.4 kDa) were used as protein markers. The protein bands were visualized after staining with blue silver (Candiano *et al.* 2004).

2.8 Glycoprotein nature

The glycoprotein nature of the *MoPOX* was investigated by periodic acid-Schiff (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) staining as described by Zacharius *et al.* 1969. Samples of the purified enzyme (10 μ g) were applied onto an electrophoresis (SDS-PAGE) as mentioned previously. After this, the gel was fixed in 7.5% (v/v) acetic acid solution for 2 h, immersed in 0.2% (v/v) periodic acid solution at 4 °C, for 45 min, followed by immersion in the Schiff reagent at 4 °C, for 45 min. Then, the gel was immersed in a 0.5% (w/v) potassium metabisulfite solution prepared in 0.05 M HCl for the investigation of glycoprotein nature.

2.9 Carbohydrate content

The carbohydrate content of *MoPOX* was estimated by the method of Dubois *et al.* (1956) using galactose as standard. To 50 μ L of *MoPOX* (1 mg/mL), 30 μ L of phenol 5% (v/v) and 150 μ L of concentrated sulfuric acid 37% were added. The mixture was stirred and left at 98°C for 5 min. Readings were taken at 490 nm. The carbohydrate

content was estimated based on a calibration curve built with different concentrations of galactose. The value is expressed in percentage (%) of carbohydrate per protein mass.

2.10 Isoelectric point (pI)

MoPOX (50 µg) was solubilized in a solution of 7 M urea and 2 M thiourea. A polyacrylamide gel strip with immobilized pH gradient, 11 cm, pH 4-11 was placed into contact with 0.25 mL of rehydration buffer (8 M urea, 2% [w/v] CHAPS, 0.3% [w/v] dithiothreitol [DTT] and 0.001% [w/v] bromophenol blue) and *MoPOX* (50 µg) for 16 h at 20 °C. Isoelectric focusing (IEF) was performed using a Multiphor II Electrophoresis System (Pharmacia Biotech) at 20 °C using the following schedule: 500 V for 30 min; 3000 V for 6 h and 9500 V for 2 h. After IEF, the strip was stained with blue silver (Candiano *et al.* 2004) and analyzed using Marker II software (Amersham Bioscience®).

2.11 Kinetic parameters

The K_m and V_{max} values of the *M. oleifera* root peroxidase were estimated, using the guaiacol and H_2O_2 as substrates, from the Lineweaver–Burk plots. The reactions took place at 30 °C. The enzyme activity was measured at 480 nm for different concentrations (0.0015 – 0.10 M) of guaiacol while the H_2O_2 concentration was constant (0.06 M), and for different concentrations (0.00011 – 0.06 M) of H_2O_2 while guaiacol concentration was constant (0.02 M).

2.12 Optimum pH

The optimum pH value for the peroxidase activity of *MoPOX* (0.21 µg) was evaluated by assaying enzyme activity using the following buffers: 0.1 M glycine- HCl, pH 2.6; 0.1 M sodium acetate, pH 4.0 and 5.2; 0.1 M sodium phosphate, pH 6.0 and pH

7.0; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 M glycine-NaOH, pH 9.0 and 0.1 M sodium borate pH 10.0. The peroxidase assay conditions were similar to that previously described.

2.13 Optimum temperature and heat stability

The optimum temperature value for the peroxidase activity of *MoPOX* (0.21 μg) was evaluated using guaiacol and H_2O_2 as the substrates at temperatures of 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C at pH 5.2. The heat stability was also evaluated using guaiacol and H_2O_2 as the substrates and incubating the enzyme at 30, 60, 70 and 80 °C for 10, 20, 30 and 60 min in 0.1 M sodium acetate, pH 5.2. After heating, the enzyme solutions were cooled and residual peroxidase activity was immediately evaluated under standard assays conditions.

2.14 Effect of metal ions on peroxidase activity

The effect of the metal ions on the enzymatic activity of *MoPOX* was done adding to the reaction mixture NaCl, MnCl_2 , MgCl_2 or CaCl_2 at the following concentrations: 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 and 0.50 M. The *MoPOX* (0.21 μg) activity was measured according to the procedure described previously.

2.15 Effect of inhibitors on peroxidase activity

Inhibitory effect of different compounds (dithiothreitol, SDS, azide or EDTA) on *MoPOX* activity was determined by combining reaction mixture containing guaiacol (20 mM) as substrate, *MoPOX* (0.21 μg), inhibitor (1 mM) and 60 mM H_2O_2 in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.2). The peroxidase activity was measured according to the procedure described previously.

2.16 Determination of substrate specificity

The specificity of *MoPOX* (0.21 µg) was tested using some compounds as substrate in substitution to guaiacol: ABST [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)], *o*-dianisidine, eugenol, ascorbic acid, NADH (nicotinamide adenine dinucleotide), aminoantipyrine, syringaldazine, coomassie brilliant blue, tryptophan and tyrosine. These compounds were used at a final concentration of 20 mM dissolved in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2 plus 60 mM H₂O₂ (Johri *et al.*, 2005). The specific activity was described as an increase in absorbance over time, with exception of ascorbic acid, for which the decrease in the absorbance represented the activity.

2.17 Decolorization of dyes

Dyes Remazol[®] Blue RGB (RB), Remazol[®] Navy RGB (RN), Levafix[®] Orange E-3 GA (LO), Telon[®] Turquoise M-5G 85% (TT), Astrazon[®] Yellow 5GL 200% (AY), and Astrazon[®] Red FBL (AR) in the concentrations of 10, 25, 50 and 100 mg/L, were subjected to decolorization assay to analyze if these serve as reducing substrates to *MoPOX*.

Microtitration plates wells were added of 0.001 M hydrogen peroxide, 0.05 M sodium acetate, pH 5.2, and buffered dye solution under the conditions described above. Then, *MoPOX* was added in the concentrations of 0.15, 0.03 and 0.015 mg/mL. The assay was done using a microplate spectrophotometer (Epoch, Biotek) at the maximum wavelength of each substrate: RB (595 nm), RN (600 nm), LO (490 nm), TT (610 nm), AY (555 nm), AR (725 nm). The measures were done at the periods of 0, 1, 6, 12, 24 and 48 h of incubation. Percent dye decolorization was calculated as follows:

$$\% \text{ decolorization} = \frac{\text{Abs}_{\text{initial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{initial}}} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{initial}}$

3.0 Results and Discussion

3.1 Effect of atrazine on peroxidase activity

It's known that some biotic and abiotic stress may alter the arsenal and content of some proteins in plants (War *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2016). Data obtained by our research group, for example, showed that *M. oleifera* plants treated with the herbicide atrazine presented higher levels of some enzymes related to oxidative stress when compared with no treated plants. Among these enzymes, there are peroxidases. Therefore, with these results we chose pre-treat *M. oleifera* plants with atrazine to increase the peroxidase content of roots before to adopt an extraction and purification protocols. For this, the best concentration (0.02, 0.2 and 2.0 mg/L) and time of contact (0, 1, 6, 12, 24, 48 h) with atrazine were tested. Figure 1 shows that the maximum induction (200.3% relative to controls) of peroxidase was observed at a concentration of 0.2 mg/L and an exposure time of 1 h.

Atrazine is a photosynthetic herbicide that blocks the flow of electron through photosystem II, and thus blocks the transfer of excitation energy from chlorophyll to the photosystem I reaction center (Alla and Hassan, 2006). Consequently, an oxidative stress is formed leading to production of reactive oxygen species (ROS) which may lead to damage in biomacromolecules such lipid, protein and DNA. The most important mechanism used by plants to prevent the effects of these ROS is through ROS scavenging. Antioxidants enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase

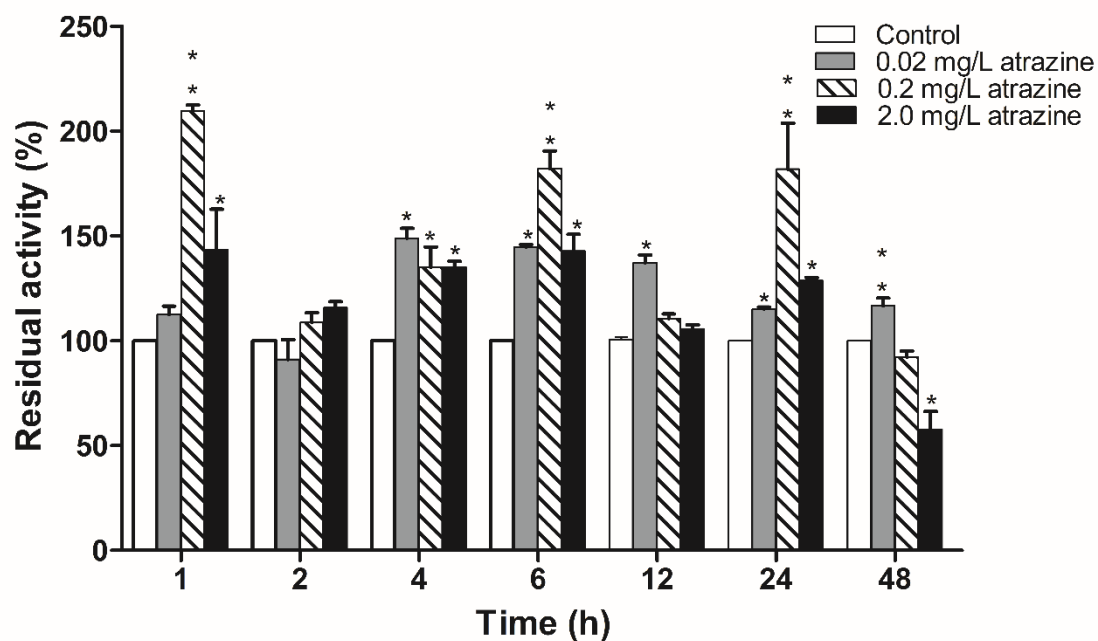


Figure 1 - Effect of atrazine on the content of root peroxidases. *Moringa oleifera* plants were treated with different concentrations of atrazine (0.02, 0.2 and 2.0 mg/L), and different time intervals (0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h). Control: Distilled water and dilutes (10 x) Hoagland nutritive solution.

(CAT) and peroxidases are important in the removal of ROS, and normally are induced when plants are under an oxidative stress (Jiang *et al.*, 2016). In the present work, the contact of *M. oleifera* roots with atrazine, probably, caused an oxidative stress that was responsible for a significant increase of peroxidase levels in this tissue.

3.2 Purification of MoPOX

The crude extract obtained from *M. oleifera* roots (specific activity 23.55 UA/mg of protein) was submitted to dialysis (12 kDa cut off) with the objective of remove salts, carbohydrates and low molecular weight molecules. The dialysate exhibiting a specific peroxidase activity of 261.4 UA/mg of protein was further concentrated by freeze drying, then solubilized at a minimum volume of 0.1 M sodium acetate, pH 5.2 and applied in an anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel) at a flow of 60 mL/h. Peroxidase was distributed into two peaks: one of them obtained from non-retained pooled fractions (213 UA/mg of protein) while the other, eluted with the 0.1 M sodium acetate, pH 5.2, containing 0.5 M NaCl (Figure 2A). Because the retained fractions presented a low number of electrophoresis band besides a high peroxidase activity (278 UA/mg of protein), we chose it to proceed with the purification process (data not shown). Thus, this fraction was loaded onto a molecular exclusion chromatography, and it was obtained two peaks. The first one (S1) corresponding to a molecular mass of 66.1 kDa with no peroxidase activity and the other (S2) with a mass of 45.6 kDa and a specific activity of 2109.1 UA/mg of protein (Table 1). After this final purification step, 89.56 fold was achieved with a yield of 0.13%. The purified fraction S2, named *MoPOX*, shows one band under non-denaturing conditions (Figure 2B).

3.3 Molecular weight and purity

The molecular weight and purity of *MoPOX* was also analyzed by SDS-PAGE. As mentioned previously, after the molecular exclusion chromatography (Superdex), a single band was detected for *MoPOX* corresponding to a Mr of 45.6 kDa (Figure 2B). *MoPOX* was subjected to reducing (2-mercaptoethanol or dithiothreitol) SDS-PAGE, and again a single band was detected, confirming the monomeric nature of *MoPOX* like most plant peroxidases (data not shown) (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2011; Diao *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2017). In comparison to other molecular weights of purified plant peroxidases, *MoPOX* was similar to those of *M. oleifera* leaves (43 kDa) (Kathun *et al.*, 2012), *Jatropha curcas* leaves (48 kDa) (Cai *et al.*, 2012), and *Brassica rapa* roots (45 kDa) (Dalal and Gupta, 2010).

3.4 Glycoprotein nature and carbohydrate content

Because many class III peroxidases have been characterized as glycoprotein, the presence of carbohydrate in *MoPOX* was investigated. After staining by periodate-Schiff's reagent on SDS-PAGE, *MoPOX* exhibited a pink color, characteristic of glycoproteins (Figure 2B - insert). According to the phenol-sulfuric acid reaction, the carbohydrate content was 3.4%, which is less than that found in other species such as *Vanilla planifolia* (15.0%), *Viscum angulatum* (12.6%) and *Brassica rapa* (18.0%) (Das Sharma, Mishra, 2011; Márquez *et al.*, 2008; Duarte-Vazquez *et al.*, 2003). However, this value was similar to that of a peroxidase of wheat germ (4.1%) (Converso and Fernández, 1995).

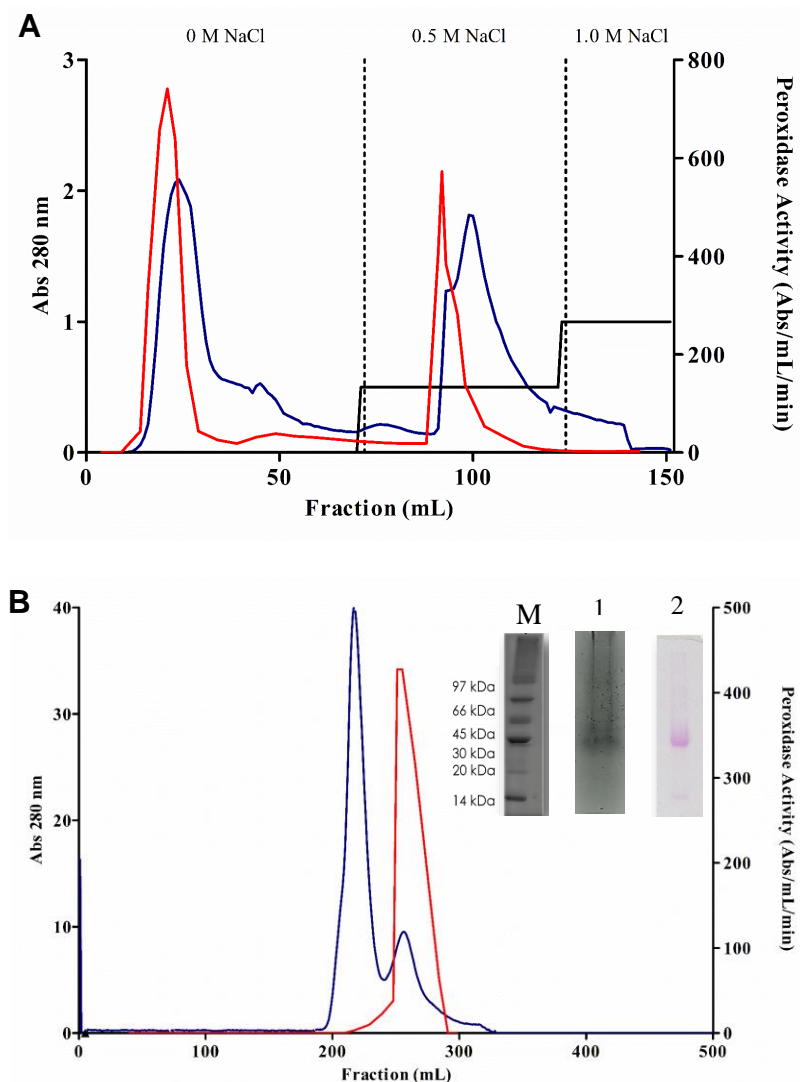


Figure 2 - Chromatographic steps for the purification of *MoPOX*. **A**) Ion-exchange chromatography of root proteins on DEAE-Sephacel (20.0 x 1.5 cm) column previously equilibrated with 0.1 M Na-acetate buffer, pH 5.2. The retained proteins were eluted with 0.5 and 1.0 M NaCl. **B**) Exclusion size chromatography of D2 on Superdex® 75 (60.0 x 1.6 cm) column previously equilibrated with 0.1 M Na-acetate buffer, pH 5.2. A red line denotes the peroxidase activity of the eluted proteins. Insert: SDS-PAGE of the purified peroxidase obtained during the purification steps of *MoPOX*. Lane M – Molecular weight markers; 1 – *MoPOX*; 2 – stained with Schiff's reagent.

Table 1 – Purification steps of a peroxidase from *M. oleifera* roots.

Step	Total protein ^a (mg)	Total activity ^b (UA)	Specific activity (UA mg ⁻¹)	Yield ^c (%)	Purification ^d (fold)
SPE ^e	13.80 ± 0.90	325.66 ± 4.80	23.55 ± 0.22	100	1
DEAE-Sephacel	0.34 ± 0.03	94.62 ± 8.50	278.00 ± 0.4	2.46	11.82
Sephadex-75	0.02 ± 0.00	36.46 ± 2.31	2109.09 ± 0.51	0.13	89.56

^a The total amount of protein recovered from 70 g of *M. oleifera* roots

^b One unit of peroxidase activity (UA) was defined as the change of an absorbance unit per min at 470 nm.

^c The recovery of protein at each purification step (SPE, 100%).

^d Purification index is calculated as the ratio between the specific activity obtained at each purification step and that of the SPE taken as 1.0.

^e SPE – Soluble protein extract.

3.5 Isoelectric point

The isoelectric focusing of *MoPOX* showed a single band corresponding a pI of 9.4, confirming the cationic nature of the enzyme (data not shown). Some basic peroxidases are related in plants such as those of *Euphorbia cotinifolia* latex (pI 8.1) and *Viscum angulatum* tissues (pI 9.6) (Kumar *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2011). However, many others present anionic characteristics (Sakharov, 2004; Oliveira *et al.*, 2017). In fact, in all fruits and vegetables peroxidases seem to occur in a wide range of isoenzyme forms with pI values varying from approximately 3.5 to 10.0 (Khan and Robinson, 1994; Kvaratskhelia *et al.*, 1997, Dubrovskaya *et al.*, 2017). In the present work, for example, it was observed that *M. oleifera* roots have, at least, one anionic and one cationic peroxidase since in the ion exchange chromatography it was observed that both the non retained and the retained fraction presented peroxidase activity (Figure 2A).

3.6 Kinetic parameters

MoPOX exhibited a characteristic Michaelis-Menten kinetics for both guaiacol and H₂O₂ substrates (Figure 3). In order to determine the specificity of the enzyme toward these substrates, kinetic parameters (V_{\max} and K_m) were determined by Lineweaver-Burk plots. Effect of guaiacol on the peroxidase activity was determined by varying the concentration of guaiacol while keeping a fixed concentration of H₂O₂ or the opposite. *MoPOX* presented K_m values of 0.01 and 0.09 mM for guaiacol and H₂O₂ substrates, respectively, and V_{\max} values of 2,500 UA. mL⁻¹. min⁻¹ for guaiacol and 1,429 UA. mL⁻¹. min⁻¹ for H₂O₂. The very low K_m values obtained in the present work suggest that, for both substrates, *MoPOX* exhibits high affinity, being this specificity even higher for guaiacol. Comparison of these data with those reported by several authors confirm the

high specificity of *MoPOX*. For example, a peroxidase from *Brassica rapa* roots presents K_m values of 4.09 and 12.49 mM for guaiacol and H_2O_2 , respectively (Kalin *et al.*, 2014). For peroxidase of *Marsdenia megalantha* latex, Oliveira *et al.* (2017) reported a K_m of 0.6 and 4.3 mM, respectively, for these same substrates. A peroxidase purified from leaves of *M. oleifera*, the same plant species of the present study, presents a K_m of 0.23 mM for guaiacol showing to be, at least 20 times less specific than *MoPOX* in relation to this substrate. However, other plant peroxidases exhibit lower K_m values in comparison with *MoPOX*, such as the peroxidase from *Sorghum bicolor* roots that presents a K_m of 0.045 mM for H_2O_2 (Basha and Rao, 2017). Catalytic activities of peroxidases vary depending upon the chemical structure, nature and composition of the substrates. The K_m values, for the same substrate, may even change depending upon sources e.g. for the same pair of substrates (Sisecioglu *et al.*, 2010).

3.7 pH optimum

MoPOX showed optimum activity at the pH 5.2 using guaiacol as substrate (Figure 4A). Under extreme pH (basic or acidic side) there was a decrease in its enzymatic activity. Plant peroxidases present different optimums pH, which vary from 3.6 to 8.0. Comparisons with some peroxidases that use guaiacol as donor of H show a similarity with our data. For example, a root peroxidase from *Brassica napus* L., peroxidases from latex of *Marsdenia megalantha* and peroxidases from beans of *Vanilla planifolia* present maximum enzymatic activity between pH 5.0 and 6.0 (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2017). pH is an important parameter in the enzyme activity as it changes the ionization states of amino acid side chains can modify the conformation of the active site, enzyme-substrate binding or reaction catalysis (Di Russo *et al.*, 2012).

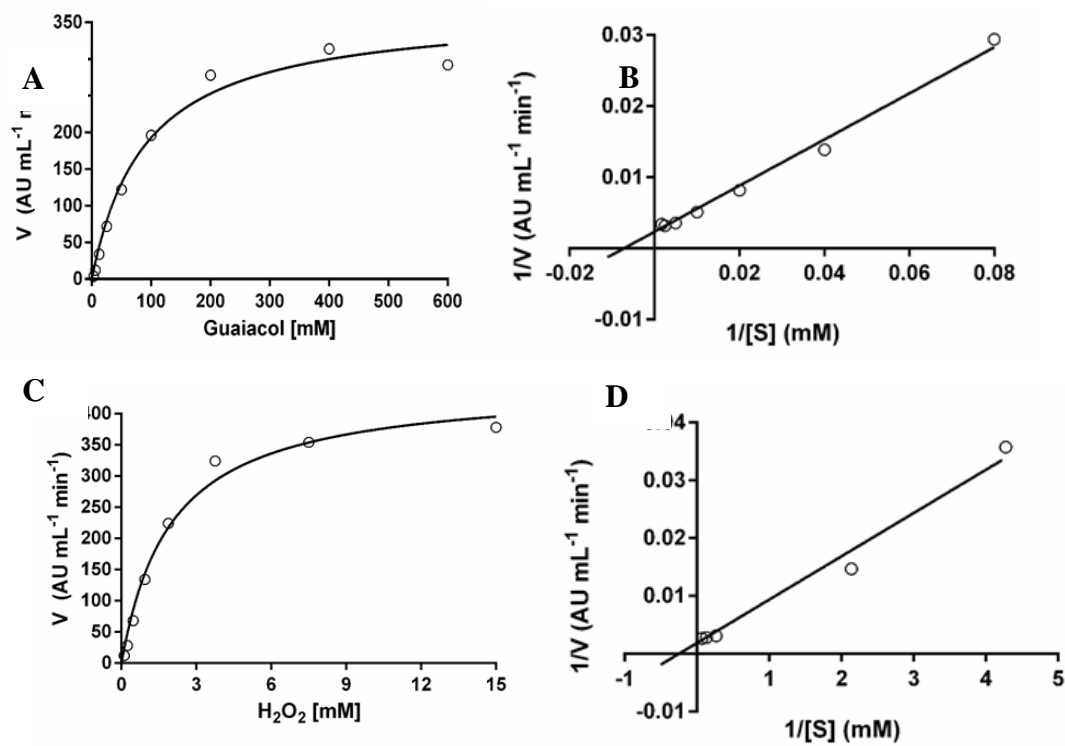


Figure 3 - Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots demonstrating the relationship of *MoPOX* activity in the presence of different concentrations of guaiacol (A and B) and H₂O₂ (C and D).

3.8 Optimum temperature and thermal stability

To determine the optimum temperature of *MoPOX*, the activity measurements were performed at the optimum pH (5.2) and temperature ranging from 30 to 100 °C, assessed by 10 °C increments. Figure 4B shows that *MoPOX* presented a maximum activity in the band 60-90°C. In a second set of assays, the thermal stability of *MoPOX* was investigated (Figure 4C). The protein maintained at least 80% of its activity after incubation at 70 °C for 60 min and about 50% even at 80 °C for 60 min, showing to be highly thermostable. This result is similar to that observed for VanPrx, a thermostable peroxidase from *Viscum angulatum* that retained ~80% of the activity after incubation at 65 °C for 10 min (Das *et al.*, 2011). Different plant peroxidases present optimum activity in different applications in bioremediation strategies (Regalado *et al.*, 2004). In the case of *MoPOX*, temperature may not be a limitation as this enzyme showed a high thermostability, as mentioned above.

3.9 Effect of metal ions

Figure 5A shows the effects of metal ions (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) on the catalytic activity of *MoPOX*, determined at pH 5.2. Mg^{2+} and Mn^{2+} had no effect on *MoPOX* activity. However, Na^+ and Ca^{2+} increased the catalytic activity around 30% at the concentration of 0.5 M, indicating their potential role as cofactor. Metal cations may act as activators or inhibitors of peroxidase activity. For example, a peroxidase from roots of *Zea mays* (pmPOX2) had its activity reduced in the presence of Ca^{2+} (Mika and Luthje, 2003), while a peroxidase from roots of *Glycine max* showed increase around 42% of activity in the presence of CaCl_2 (Vianello *et al.*, 1997). In general, Na^+ ions cause an inhibition of peroxidase activity (Diao *et al.*, 2014; Al-

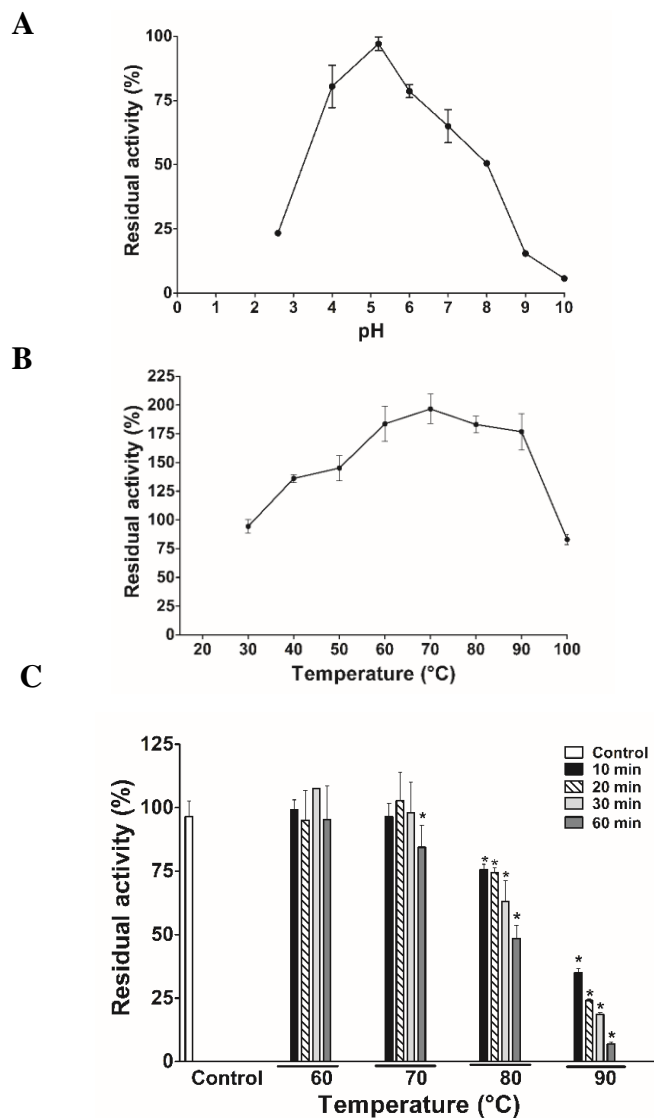


Figure 4. Optimal pH (A), optimal temperature, and thermal stability (C) of *MoPOX*. The optimal pH was tested by assaying enzyme activity in pH buffers ranging from 2.6 to 10.0. The optimal temperature was measured at different temperatures (30-100 °C) in 0.05 M Na-acetate buffer (pH 5.2) and using guaiacol as the substrate. Thermal stability was evaluated first incubating *MoPOX* for 0-60 min under 60, 70, 80 and 90 °C, then the residual activity was measured using guaiacol as substrate. Each point represents the mean of three biological replicates (\pm SD). The asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$) compared to the specific activity under the standard conditions (first bar, peroxidase activity at pH 5.2 and 30°C for 10 min).

Senaidy and Ismael, 2009; Ajila and Rao, 2009). However, as observed for *MoPOX*, Na^+ acted as an activator of this enzyme.

temperature ranges and their thermal stabilities are variable, depending on their amino acid composition and three-dimensional conformation (Kalsoom *et al.*, 2015). It is known that the low thermostability of most plant peroxidase is a limiting factor for their

3.10 Effect of inhibitors

The influence of some chemicals on the purified *MoPOX* is reported in Figure 5B. All compounds were tested in the concentration of 1 mM. Sodium dodecyl sulfate (SDS) and ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) did not affect *MoPOX* activity. Azide, a sequester of heme groups, inhibited the peroxidase activity of *MoPOX* in 23%, indicating the importance of Fe in the action of the enzyme. Sensitivity to this inhibitor is common a large number of heme catalyzed reactions. For example, azide reduced by 80% the activity of PO-2, a peroxidase from roots of sorghum, and by 90%, a cationic peroxidase of *Viscum andulatum* tissues (Dubrovskaya *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2011). However, for a peroxidase from *Vigna radiata* roots, azide reduced just by 48% the peroxidase activity (Basha and Rao, 2016). This peroxidase, did not suffer inhibition of EDTA, as well as *MoPOX*. By contrast, with these inhibitors, *MoPOX* was completely inhibited by DTT. It is possible that intramolecular disulfide bonds contribute to stabilization of protein structure and consequently to the maintenance of its catalytic activity.

3.11 Substrate specificity

The specific activity of *MoPOX* towards other substrates as H donors is shown in Figure 6. There was no difference between the rates of oxidation of guaiacol and

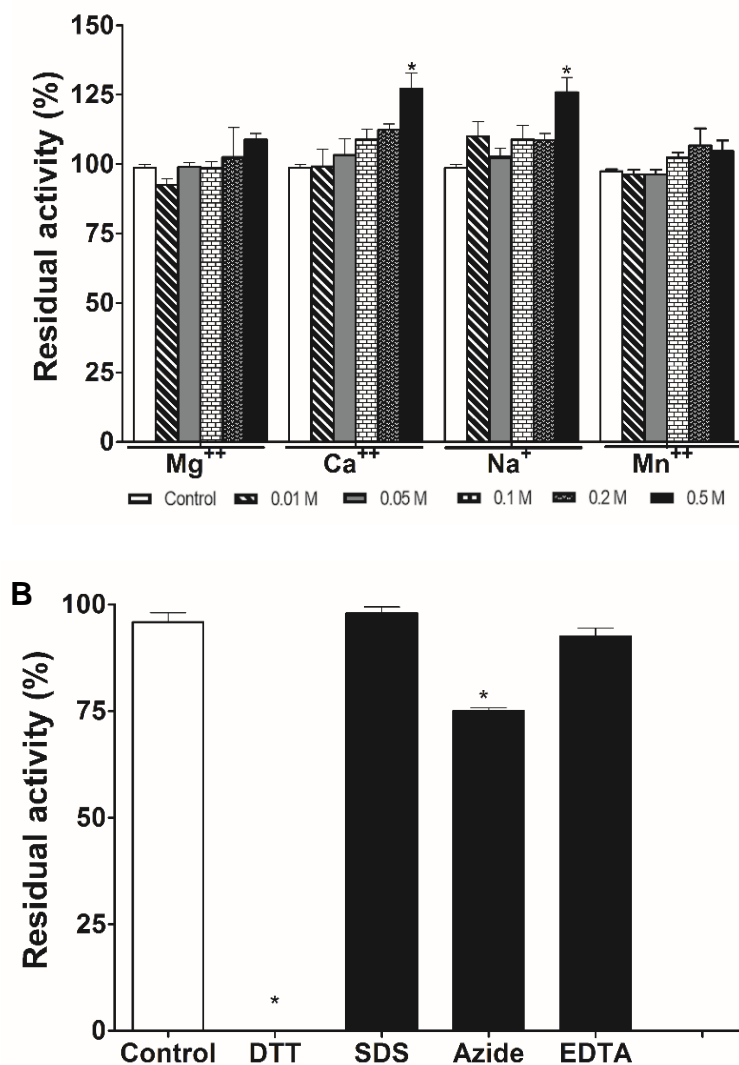


Figure 5 - Effect of metal ions and peroxidase inhibitors on *MoPOX* activity. (A) Activity measurements were calculated adding to the reaction mixture NaCl, MnCl₂, MgCl₂ or CaCl₂ at the following concentrations: 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 and 0.50 M. Control: enzymatic assay performed with 50 mM sodium acetate, pH 5.2. (B) Each peroxidase inhibitor was tested at 1 mM. Control: enzymatic assay performed without the peroxidase inhibitors. The asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$) compared to the specific activity under the standard conditions.

o- dianisidine by *MoPOX*, being these two compounds the best substrates for the enzyme. In comparison with guaiacol, the degree of oxidation of ABTS and eugenol were 27% and 42%, respectively. In the presence of ascorbic acid, tyrosine, coomassie brilliant blue, tryptophan, aminoantipyrine, NADH and syringaldazine there was no detectable *MoPOX* activity (Figure 6).

Similarly to *MoPOX*, guaiacol and o-dianisidine were the best substrates for a peroxidase from *M. oleifera* leaves, and for a peroxidase from *Marsdenia megalantha* latex (Kathun *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). Some reports show that eugenol, an allyl chain-substituted guaiacol, can be oxidized by some peroxidases resulting in the formation of cytotoxicity products (Rojas-Reyes *et al.*, 2014; Anita *et al.*, 2015). *MoPOX* utilized eugenol as substrate presenting 42% of the peroxidase activity obtained when guaiacol was used as substrate. ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) is the main substrate for many plant peroxidases (Nadaroglu *et al.*, 2013; Rojas-Reyes *et al.*, 2014; Dubrovskaya *et al.*, 2017). However, as mentioned previously, for *MoPOX* its relative oxidation was just 27% of the activity presented by guaiacol.

One way of distinguishing ascorbate and guaiacol peroxidases is to compare the relative enzymatic activities for guaiacol and ascorbate oxidation, since the use of ascorbic acid by the class III peroxidases is not common (Kvaratskhelia *et al.*, 1997). However, this method might lead to confounding APX activity with POX activity because POX reactions can use ascorbate as the electron acceptor, just as APX, and that some APXs show rather high affinity to guaiacol and similar phenolic substrates (Doorn and Ketsa, 2014). In the present study, the rates of oxidation of these compounds by *MoPOX* was very different since no oxidation of ascorbic acid occurred, being this behavior, therefore, characteristic of POX enzymes. A peroxidase from *Withania*

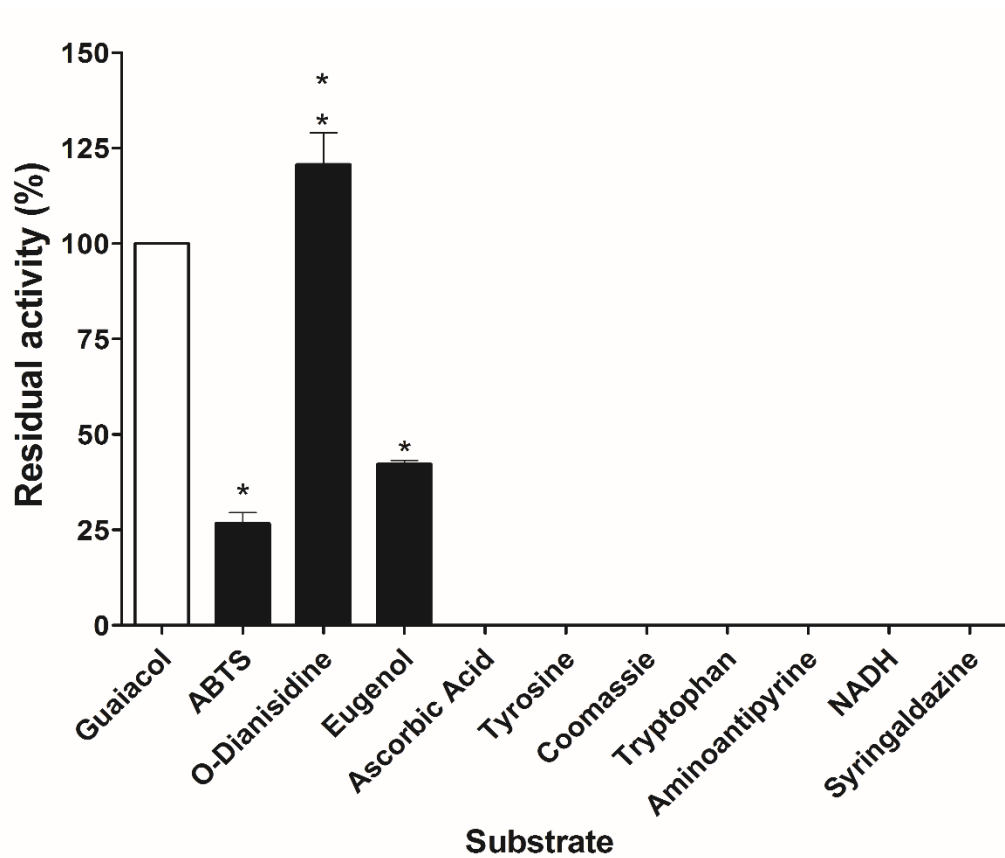


Figure 6 - Substrate specificity of *MoPOX*. Each substrate was used at a final concentration of 20 mM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group. Control: peroxidase activity assay using guaiacol as substrate.

somnifera readily catalyzed the oxidation of phenolic substrate like guaiacol and o-dianisidine but not ascorbic acid (Johri *et al.*, 2005).

Some peroxidases are related with the catalysis of the last step in the synthesis of lignin. The oxidation of syringaldazine, a lignin monomer analog, by a particular peroxidase was suggested to be indicative of its involvement in the synthesis of lignin. As mentioned before, *MoPOX* did not present peroxidase activity in the presence of syringaldazine, suggesting that it is not related with this metabolic role. However, there must be a confluent information from kinetic, structural and gene expression studies for involving an enzyme in a specific metabolic step (Lewis and Yamamoto, 1990).

In summary, *MoPOX* presented specific activity for four substrates decreased in the order of guaiacol \cong o-dianisidine > eugenol > ABTS. The ability of *MoPOX* to interact with different substrates revealed its potentials for industrial application such as industrial effluents detoxification.

3.12 Decolorization of dyes

The ability of *MoPOX* to decolorize industrial textile dyes was tested at the optimum pH of the enzyme (pH 5.2), in the presence of 1 mM hydrogen peroxide, and at room temperature (25°C). The degradation rates were monitored at time intervals of 0, 1, 6, 12, 24 and 48 h. Purified *MoPOX* decolorized different dyes at various extents tested from different classes. In general, Remazol[®] Blue RGB (RB), Remazol[®] Navy RGB (RN), and Telon[®] Turquoise M-5G 85% (TT) were the most susceptible dyes to degradation by *MoPOX*. The Levafix[®] Orange E-3 GA (LO), Astrazon[®] Yellow 5GL 200% (AY), and Astrazon[®] Red FBL (AR) dyes were slightly degraded even when they were tested in lower concentrations (10 and 25 mg/L) and with the highest concentration

of *MoPOX* (0.15 mg/mL). Figure 7 shows the decolorization rates (%) of the most susceptible dyes by purified *MoPOX* (0.15, 0.03 and 0.015 mg/mL). It was observed that RN dye, at a concentration of 50 mg/L and after 48 h of incubation with *MoPOX* (0.15 mg/mL), was degraded almost 30% (Figure 7A). Under the same conditions, the degradation was 15.3%, for a dye concentration of 100 mg/L (Figure 7B). In relation to RB (50 mg/L), 64.1% of the dye was decolorized after 48 h of exposition with *MoPOX* at the concentration of 0.15 mg/mL (Figure 7C). It should be noted that already in the time of 6 h of incubation, the degradation percentage was almost 60%. In a higher concentration of RB dye (100 mg/L) the degradation rate was 73.2% (Figure 7 D). The results were still more promising for the TT dye (50 mg/L), since its decolorization rates, after 48 h of incubation with the enzyme (0.015, 0.03 and 0.15 mg/mL), were 86.6, 91.1, and 89.2%, respectively (Figure 7E). Using a double concentration of this dye (100 mg/L), the decolorization rates remained high (78.2, 80.2 and 77.1%) for the same *MoPOX* concentrations (0.015, 0.03 and 0.15 mg/mL), respectively.

The different decolorization rates observed in the present study may be explained by the structural diversity of the dyes. These compounds contain different chromophores, attached to aromatic rings imparting the color of the dye. Several of these functional groups are present on aromatic ring in ortho or para positions, which could accelerate or reduce the decolorization rate or, inhibit completely the decolorization process. Besides the chemical structure, the degradation rates of a specific dye are dependent on environmental conditions (pH, temperature, dye concentration), enzymatic specificity, enzymatic concentration etc. The Remazol dyes, for example, are industrially used compounds that present a complex structure containing at least one aromatic group. Because this complexity, their degradation rates

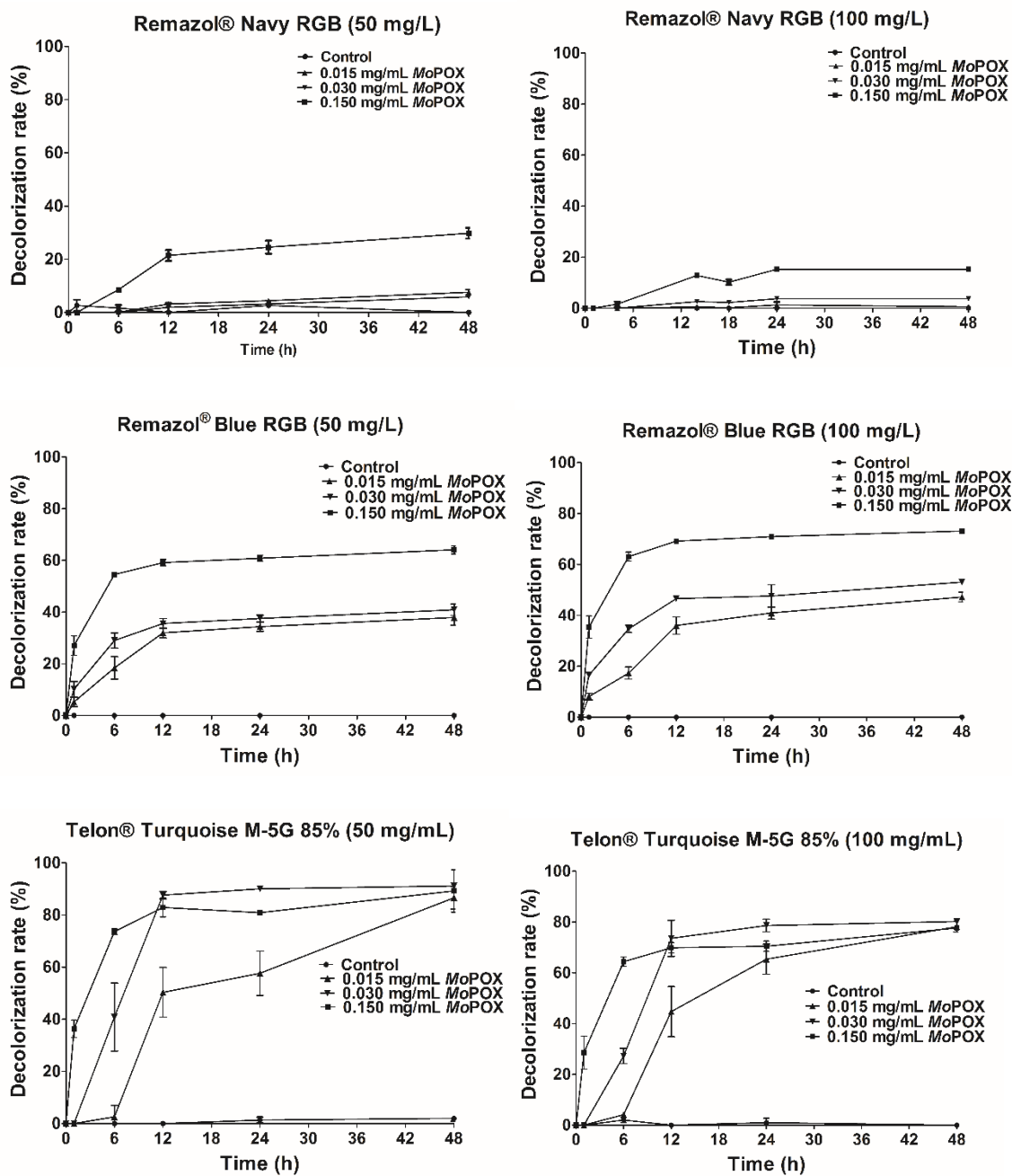


Figure 7 – Time course of decolorization of textile dyes by *MoPOX*. Control: 50 mM sodium acetate, pH 5.2 containing 1 mM H₂O₂ and textile dye (Remazol® Blue RGB, Remazol® Navy RGB or Telon® Turquoise M-5G 85% at a concentration of 50 or 100 mg/L).

are variable between different enzymes. Souza *et al.*, 2007 observed that horseradish peroxidase was able to degrade 59% of Remazol Turquoise Blue G 133%. However, a soybean peroxidase degraded more than 95% of the same dye (Marchis *et al.*, 2011). A low degradation rate (3.3 to 8.7%) was observed for the acid Telon[®] Turquoise dye by a free polyphenol oxidase from *Cydonia oblonga* leaves (Arabaci and Usluoglu, 2014). Nevertheless, in the present work it was shown that *MoPOX* was able to degrade more than 90% of this dye. As mentioned previously, many factors can affect the success of an enzyme in degrade a specific dye or a mixture of them. Thus, the best conditions must be defined in each specific case.

4 Conclusions

This is the first report of a peroxidase isolated from *M. oleifera* roots. *MoPOX*, a class III peroxidase, proved to be thermostable as it maintained at least 50% of its catalytic activity at the temperature of 80 °C for 60 min. In addition, *MoPOX* was able to degrade the Remazol[®] Blue RGB, Remazol[®] Navy RGB, and Telon[®] Turquoise M-5G 85% at rates between 15 and 90% depending on concentration of dye and enzyme. These results show the biotechnological potential for decolorization of textile dyes present in industrial effluents. However, additional investigations could be carried out to improve the decolorization process, including immobilization of the enzyme and its application for real industrial substrate decolorization.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Council for Advanced Professional Training (CAPES).

References

- Ajila, C.M., Rao, U.J.S.P., 2009. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *J Mol Catal B: Enzym* 60, 36-44.
- Alla M.M., Hassan N.M., 2006. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiol Biochem*, 44, 202–210.
- Al-Senaïdy, A.M., Ismael, M.A., Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi J Biol Sci*, 18, 293-298.
- Anita, Y., Sundowo, A. Puspa, D.N.L. Euis, F., Mulyani, H., Risdian, C., Banjarnahor, S., Hanafi, M., Enade, P.I., 2015. Biotransformation of eugenol to dehydroeugenol catalyzed by *Brassica juncea* peroxidase and its cytotoxicity activities. *Procedia Chem*. 16, 265 – 271.
- Anwar F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H., 2007. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* 21, 17–25.
- Arabaci, G., Usluoglu, A., 2014. The enzymatic decolorization of textile dyes by the immobilized polyphenol oxidase from quince leaves. *Sci World J*, 2004, 1-5.
- Bansal, N., Kanwar, S.S., 2013. Peroxidase(s) in Environment Protection. *The Sci World J*. 2013, p. 1-9.
- Basha, A.S., Rao U.J.S.P., 2017. Purification and characterization of peroxidase from sprouted green gram (*Vigna radiata*) roots and removal of phenol and p-chlorophenol by immobilized peroxidase. *J Sci Food Agric*. 2016, 1-12.
- Bilal, M., Asghera, M., Shahida, M., Bhattib, H.N., 2016. Characteristic features and dye degrading capability of agar–agar gel immobilized manganese peroxidase. *Int J Biol Macromol*. 86,728–740.

- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72,248-254.
- Cai, F., Yang, C.O., Duan, P., Gao, S., Xu, Y., Chen, F., 2012. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *J Mol Catal B: Enzym.* 77,59– 66.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25,1327-1333.
- Chacko, J. T., Subramaniam, K., 2011. Enzymatic Degradation of Azo Dyes –A Review. *Int J Environ Sci.* 1, 6.
- Chequer, F.M.D.; Oliveira, G.A.R.; Ferraz, E.R.A.; Cardoso, J.C.; Zanoni, M.V.B.; Oliveira, D.P., 2013. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. In: GUNAY, D.M. *Eco Friendly Textile Dyeing and Finishing.*, In Tech.
- Chiong, T.; Lau, S.Y.; Lek, Z.H.; Koh, B.Y.; Danquaha, M.K., 2016. Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. *J Environ Chem Eng.* 4, 2500-2509.
- Converso, D. A., Fernandez, M. E., 1995. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochemistry* 40, 1341–1345.
- Dalal, S., Gupta, M. N., 2010. Purification and Characterization of a Peroxidase Isozyme from Indian Turnip Roots. *J Agric Food Chem.* 58, 5545–5552.
- Das, M. K., Sharma, R. S., Mishra, V., 2011. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 71,63–70.

- Dellamatrice, P. M., Silva-Stenico, M. E., Moraesc, L. A. B., Fiore, M. F., Monteiro, R. T., 2017. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Braz J Microbiol.* 48, 25-31.
- Di Russo, N. V., Estrin, D. A., Martí, M. A., Roitberg, A. E., 2012. pH-dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pK_a: The case of Nitrophorin. *PLoS Comput Biol.* 8, p. 1 – 9.
- Diao, M., Ayékoué, B.N., Dibala, C. I., Dabonné, S., Dicko, M. H., 2014. Purification and characterization of sweet potato (*Ipomoea Batatas*) peroxidase. *J Anim Plant Sci.* 22,3419 3432.
- Doorn, G.V., Ketsa, S., 2014. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase Wouter. *Postharvest Biol. Technol.* 95,64–69.
- Duarte-Vazquez, M. A., Garcia-Almendarez, B. E., Regalo, C., Whitaker, J. R. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. Var. Purple Top White Globe) Roots. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4450-4456.
- Duarte-Vazquez, M. A., Whitaker, J. R., Rojo-Dominguez, A., Garcia-Almendarez, B. E., Regalo, C., 2003. Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J Agric Food Chem.* 13, 5096-102.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28,350-356.
- Dubrovskaya, E., Pozdnyakova, N., Golubev, S., Muratova, A., Grinev, V., Bondarenkova, A., Turkovskaya, O., 2017. Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: Catalytic properties and involvement in PAH degradation. *Chemosphere* 169,224-232.

- Dubrovskaya, E.V., Pozdnyakova, N.P., Grinev, V.S., Muratova, A. Yu., Golubev, S.N., Bondarenkova, A.D., Turkovskaya, O.V., 2016. Dominant form of cationic peroxidase from sorghum roots. *Russ. J. Plant. Physiol.* 63, 218-228.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42, 462-468.
- Husain, Q., 2010. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 9,117–140.
- Janovic, B. S., Collins, A. R., Vujcic, Z. M., Vujcic, M. T., 2017. Acidic horseradish peroxidase activity abolishes genotoxicity of common dyes. *J Hazard Mater* 321, 576–585.
- Jiang, G., Yin, D., Zhao, J., Chen, H., Guo, L., Zhu, L., Zhai, W., 2016. The rice thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase OsAPX8 functions in tolerance to bacterial blight. *Sci Rep.* 17, 6-26104.
- Johri, S., Jamwal, U., Rasool, S., Kumar, A., Verma, V., Qazi, G. N., 2005. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. *Plant Sci* 169,1014-1021.
- Kalin, R., Atasever, A., Ozdemir, H., 2014. Single-step purification of peroxidase by 4 aminobenzohydrazide from *Turkish blackradish* and Turnip roots. *Food Chem* 150, 335–340.
- Kalsoom, U., Bhatti, H. N., Asgher, M., 2015. Characterization of plant peroxidases and their potential for degradation of dyes: a review. *Appl Biochem Biotechnol* 176, 1529–1550.
- Kansal, S. K., Kumari, A., 2014. Potential of *M. oleifera* for the treatment of water and wastewater. *Chem Rev* 114, 4993-5010.

- Khan, A.A., Robinson, D.S., 1994. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chem.* 49,407-410.
- Khandare, R.V., Govindwar, S.P., 2015. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnol Adv*, 33,1697–1714.
- Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M. R., Pervin, F., Absar, N., Rosma, A., 2012. Purification and characterization of peroxidase from *Moringa oleifera* L. leaves. *Bioresources* 7, 3237-3251.
- Kumar, P., Kamle, M., Singh, J., 2011. Biochemical characterization of *Santalum album* (Chandan) leaf peroxidase. *Physiol Mol Biol Plants*. 17, 153–159.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., Thorneley, R.N.F., 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol*. 114,1237-1245.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E., 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 41,455-96.
- Mansour, H. B., Houas, I., Montassar, F., Ghedira, K., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L., 2012. Alteration of in vitro and acute in vivo toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation. *Environ Sci Pollut R*, 19, 2634–2643.
- Marchis, T., Avetta, P., Bianco-Prevot, A., Fabbri, D., Viscardi, G., Laurenti, E., 2011. Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. *J Inorg Biochem* 105, 321-327.

- Marquez, O., Waliszewskia, K. N., Oliarta, R. M., Padio, V. T., 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *Lebensm. Wiss. Technol.* 41,1372–1379.
- Mika, A., Luthje, S., 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol* 132,1489–1498.
- Nadaroglu, H., Celebi, N., Demir, N., Demir, Y., 2013. Purification and characterization of a plant peroxidase from rocket (*Eruca vesicaria* sbsp. *Sativa*) (Mill.) (syn. *E. sativa*) and effects of some chemicals on peroxidase activity. *Afr. J. Agric. Res.* 8, 2520-2528.
- Oliveira, H. P., Silva, R. G. G., Oliveira, J. T. A., Sousa, D. O. B., Pereira, m. L., Souza, P. F. N., Soares, A. A., Gomes, V. M. G., Moreira, A. C. O. M., Moreno, F. B. M. B., Vasconcelos, I. M., 2017. A novel peroxidase purified from *Marsdenia megalantha* latex inhibits phytopathogenic fungi mediated by cell membrane permeabilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 96,743–753.
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., Duarte-Vázquez, M. A., 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 3:243–256.
- Rojas-Reves, J.O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Matinez C.C., Waliszewskia, K.N., Uscangaa, M.G.A., 2014. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). *J Sci Food Agric* 94, 1844-,1853.
- Sakharov, I. Y., 2004. Palm tree peroxidase. *Biochemistry.* 69,823-9.
- Sekuljica, N.Z., Prlainovic, N.Z., Stefanovic, A.B., Zuza, M.G., Cickaric, D.Z., Mijin, D. Z., Knezevic-Jugovic Z. D., 2015. Decolorization of anthraquinonic dyes from textile

- effluent using horseradish peroxidase: optimization and kinetic study. *Scientific World Journal*. 2015, 371625.
- Shigeto, J., Tsutsumi, Y., 2016. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol.* 209, 1395-402.
- Şişecioglu, M., Gülçin, I., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M.H., Kayal, H.B., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Med. Plants Res.* 4,1187-1196.
- Smith, P.K, Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150,76-85.
- Souza, S. M. A. G. U., Forgiarini, E., Souza, A. A. U. 2007. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP) *J Hazard Mater*, 147, 1073–1078.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K., 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinera* polygalacturonase. *Acta Physiol Plant* 13,43-50.
- Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G., Macri F., 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *J Plant Physiol.* 150, 573–577.
- War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y., *Phytochemistry*, S., 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal Behav.* 6, 1787–1792.
- Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2007. Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. *Appl Microbiol Biot*, 76, 719–726.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woodlock, J.J., 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem.* 30,148-152.

7 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de uma peroxidase isolada de raízes de *M. oleifera*. *MoPOX*, uma peroxidase da classe III. Esta se mostrou termoestável, mantendo-se pelo menos 50% da sua atividade catalítica à temperatura de 80 °C durante 60 min. Além disso, *MoPOX* foi capaz de degradar o Remazol® Blue RGB, o Remazol® Navy RGB e o Telon® Turquoise M-5G 85% a taxas entre 15 e 90%, dependendo da concentração de corante e enzima. Estes resultados mostram o potencial biotecnológico para a descoloração de corantes têxteis presentes em efluentes industriais. No entanto, investigações adicionais podem ser realizadas para melhorar o processo de descoloração, incluindo a imobilização da enzima.

REFERÊNCIAS

ABIT, 2016. Disponível em: < <http://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

ADELAJA, O.A.; AMOO, I.A; ADERIBIGBE, A.D. Biosorption of Lead (II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* pods. **Archives of Applied Science Research**, Indonesia, v. 3, p. 50-60, 2011. Disponível em: <<http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/biosorption-of-lead-ii-ions-from-aqueous-solution-using-moringa-oleifera-pods.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

AMADI, N; TANEE, F. B. G. Efficacy of *Moringa oleifera* as a phytoextraction plant in the remediation of heavy metals polluted soil. **African Journal of Plant Science**, Jharkhand, v. 8, p. 546-553, 2014. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1419951926_Amadi%20and%20Tanee.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

ANAND, K.; GENGAN, R. M.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. Agroforestry waste *Moringa oleifera* petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anti-cancer and catalytic activity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Korea, v. 21, p. 1105–1111, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X14002706>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

ANSARI, M. M.; SAHA, B.; MAZLOUM, S.; TAYLOR, K. E.; BEWTRA, J. K. B.; BISWAS, N. Soybean peroxidase applications in wastewater treatment. **Nova Science Publisher**, New York, p. 189–222, 2011. Disponível em: <https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=25978>. Acesso em: 05 mar. 2017.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*, a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 21, p. 17 - 25, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089328>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

ARAVIND, P.; SELVARAJ, H.; FERRO, S.; SUNDARAM, M. An integrated (electro- and bio-oxidation) approach for remediation of industrial wastewater containing azo dyes: Understanding the degradation mechanism and toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 318, p. 203-215, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389416306495>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

ASGHER, M.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, Baltimore, v. 19, p. 771–783, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18373237>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

BAFANA, A.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **NRC Research Press**, Canada, v. 19, p. 350-370, 2011. Disponível em:

<<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/a11-018#.WO2FHaL9nIU>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R.; Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, Austria, v. 89, p. 141–145, 2001.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165601003042>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

BANSAL, N.; KANWAR, S. S. Peroxidase(s) in Environment Protection. **The Scientific World Journal**, Italy, p. 9, 2013. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/714639/>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

BAPTISTA, A. T. A.; SILVA, M. O.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R.; VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S. Protein fractionation of seeds of *Moringa oleifera* Lam and its application in superficial water treatment. **Separation and Purification Technology**, Heverlee, v. 180, p. 114–124, 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586617305774>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

BELPAIRE, C.; REYNS, T.; GEERAERTS, C.; LOCO, J. V. Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla anguilla*. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 138, p. 784-791, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291760>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

BILAL, M., IQBAL, H.M.N., SHAH, S.Z.H., HU, H., WANG, W., ZHANG, X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, Belgium, v. 183, p. 836-842, 2016b. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479716307022>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

BILAL, M., IQBAL, M., HU, H., ZHANG, X. Mutagenicity and cytotoxicity assessment of biodegraded textile effluent by Ca-alginate encapsulated manganese peroxidase. **Biochemical Engineering Journal**, USA, v. 109, p. 153–161, 2016a.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X16300201>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

BILAL, M.; ASGHERA, M.; SHAHIDA, M.; BHATTIB, H. N. Characteristic features and dye degrading capability of agar–agar gel immobilized manganese peroxidase.

International Journal of Biological Macromolecules, Colorado, v. 86, p.728–740, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301630143X>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

CHEN, K.; LIN, Y.; CHEN, W.; LIU, Y. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Georgia, v. 31, p. 490-497, 2002. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902001485>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

CHEN, L.; WANG, L.; WU, X.; DING, X. A process-level water conservation and pollution control performance evaluation tool of cleaner production technology in textile industry. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v.143, p. 1137-1143, 2017. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652616320546>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

CHEQUER, F. M. D.; OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. In: GUNAY, D. M. **Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing**. Croatia, In Tech; 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/53659>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

CHIONG, T.; LAU, S. Y.; LEK, Z. H.; KOH, B. Y.; DANQUAHA, M. K. Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Cyprus, v. 4, p. 2500-2509, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343716301609>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

COLDEBELLA, P. F.; KLEN, M. R. F.; NISHI, L.; VALVERDE, C.; CAVALCATI, E. B.; SANTOS, A. A.; BERGAMASCO, R. Potential Effect of Chemical and Thermal Treatment on the Kinetics, Equilibrium, and Thermodynamic Studies for Atrazine Biosorption by the *Moringa oleifera* Pods. **The Canadian Journal Of Chemical Engineering**, Canada, v. 9999, p. 1-13, 2016. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cjce.22756/epdf>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. **Bioresource Technology**, India, v. 97, p. 1061–1085, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993052>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

CYSNE, J. R. B. **Propagação in vitro de Moringa oleifera L.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; TÜZMEN, N.; ALSANCAK, G. Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleturotus sajor caju*. **Bioresource Technology**, India, v.96, p.59-62, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364081>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

DICKO, M. H.; GRUPPEN, H. HIHORST, R. VORAGEN A. G. VAN BERKEL, W. J. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. **The FEBS Journal**, Ireland, v. 273, p. 2293–2307, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650004>>. Acesso em: 01 abr. 2017.

DUBEY, D. K.; DORA, J.; KUMAR, A.; GULSAN, R. K. A multipurpose tree *Moringa oleifera*. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**,

India v. 12, p. 415-423, 2013. Disponível em: < <http://ijpcsonline.com/files/58-414.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

DUBROVSKAYA, E.; POZDNYAKOVA, N.; GOLUBEV, S.; MURATOVA, A.; GRINEV, V.; BONDARENKOVA, A.; TURKOVSKAYA, O. Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: Catalytic properties and involvement in PAH degradation. **Chemosphere**, Netherlands, v. 169, p. 224-232, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880920> >. Acesso em: 12 mar. 2017.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, Massachusetts, v. 28, p. 83-99, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337300001685>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

ERINLE, K. O.; JIANG, Z.; LI, M.; SU, G.; MA, B.; MA, Y.; ZHANG, Y. Oxidative stress response induced in an atrazine phytoremediating plant: Physiological responses of *Pennisetum glaucum* to high atrazine concentrations. **International Journal of Phytoremediation**, Carbondale, v. 18, p. 1187-1194, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27258006>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

FARIAS, S.; MAYER, D. A.; OLIVEIRA, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Enzymatic reuse of simulated dyeing process effluent using horseradish peroxidase. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Canada, v. 9999, 2017. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cjce.22805/abstract>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

FERREIRA, E. S. B.; HULME, A. N.; MACNAB, H.; QUYE, A. The natural constituents of historical textile dyes. **Chemical Society Reviews**, Canada, v. 33, p. 329-336, 2004. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2004/CS/b305697j#!divAbstract>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, Germany, v. 1243, p. 477-481, 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727523> >. Acesso em: 09 mar. 2017.

GHALY, A. E.; ANANTHASHANKAR, R.; ALHATTAB, M.; RAMAKRISHNAN, V. V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal Chemical Engineering Process Technology**, USA, v. 5, 2014. Disponível em: < <http://www.readcube.com/articles/10.4172/2157-7048.1000182>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

GHAZALIAN, E.; GHASEMIA, A. R.; AMANI-GHADIMB, A. R. Effect of gadollunium doping on visible light photocatalytic performance of Ag₃PO₄: Evaluation of activity in degradation of ananthraquinone dye and mechanism study. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Korea, v. 426, p. 257-270, 2017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116916305039>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

GHEBREMICHAEL, K.A.; GUNARATNA; K.R., HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, Netherlands, v. 39, p. 2338-2344, 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135405001612>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

GIANFREDA, L. Enzymes of importance to rhizosphere processes. **Journal Soil Science Plant Nutrition**, Temuco, v.15, p. 283-306, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162015000200002>. Acesso em: 12 mar. 2017.

GONZÁLEZ, C. L. M.; MARTÍNEZ, L.; ORTIZ, E. J. M.; TRUJANO, M. E. G.; CAMPOS, M. D.; MARTÍNEZ, R. V.; REVAL, I. D. *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, South Carolina, v. 87, p. 482–488, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216320984>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. **Food Science and Human Wellness**, USA, v. 5, p. 49–56, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453016300362>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

GOVINDWAR, S., KAGALKAR, A. Phytoremediation Technologies for the Removal of Textile Dyes: An Overview and Future Prospectus. **Nova Science Publishers**, India, 2010. Disponível em: <https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=16788>. Acesso em: 21 jan. 2017.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, Universidade de São Paulo, v. 23, n.1, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v23n1/2146.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

HASANBEIGI, A.; PRICE, L. A technical review of emerging technologies for energy and water efficiency and pollution reduction in the textile industry. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v. 95, p. 30-44, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261500205X>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

HEREDIA, J. B.; MARTÍN, J. S. Azo dye removal by *Moringa oleifera* seed extract coagulation. **Coloration Technology**, Wetherby, v. 124, p. 310–317, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-4408.2008.00158.x/full>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

HEREDIA, J. B.; MARTÍN, J. S.; REGALADO, A. D.; BUSTOS, C. J. Removal of Alizarin Violet 3R (anthraquinonic dye) from aqueous solutions by natural coagulants. **Journal of Hazardous Materials**, New York v. 170, p. 43–50, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481341>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

HEYMANN, E. Textile and Clothing Industry –Innovation and Internationalisation as Success Factors. **Deutsche Bank Research**, Frankfurt, 2011. Disponível em: <https://www.dbresearch.com/PROD/DBR_INTERNET_ENPROD/PROD0000000000275381/Textile_and_clothing_industry%3A_Innovation_and_inte.PDF>. Acesso em: 19 fev. 2017.

HOAN, L. T.; DAVIDE, R. G. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita*. **Philippine Agriculturist**, Filipinas, v. 62, p. 285-295, 1979. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=XB8006165>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

HU, E.; WU, X.; SHANG, S.; TAO, X.; JIANG, S.; GAN, L. Catalytic ozonation of simulated textile dyeing wastewater using mesoporous carbon aerogel supported copper oxide catalyst. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v. 20, p.4710–4718, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652615008604>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

HUSAIN, Q.; HUSAIN, M. Peroxidases as a potential tool for the decolorization and removal of synthetic dyes from polluted water. **Environmental Protection Strategies for Sustainable Development**, Netherlands, p. 453–498, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-1591-2_15>. Acesso em: 15 mar. 2017.

INSTITUTO EUVALDO LODI. Análise da eficiência economia e da competitividade da cadeia têxtil brasileira. (IEL, CNA e SEBRAE) Brasília, 480 p., 2000. Disponível em: < http://www.cna.org.br/Cadeias/Textil/Parte1_1_a_62.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2017.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; QIDWAI, T. Potential of peroxidase enzyme from *Trichosanthes dioica* to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Lund, v. 66, p. 177181, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117710001293>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

KALYANI, D. C.; TELKE, A. A.; DHANVE, R. S.; JADHAY, J. P. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 163,p. 735-742, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408010480>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

KEMI. Hazardous chemicals in textiles – report of a government assignment, The Swedish Chemical Agency, Report no. 3/13, 2013. Disponível em: <<https://www.kemi.se/global/rapporter/2013/rapport-3-13-textiles.pdf> >. Acesso em: 11 abr. 2017.

KHAN, A. A.; HUSAIN, Q. Potential of plant polyphenol oxidases in the decolorization and removal of textile and non-textile dyes. **Journal of Environmental Sciences**, Canada, v. 19, p. 396-402, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074207600667>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

KHANDARE, R. V.; GOVINDWAR, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, Rehovot, v. 33, p. 1697–1714, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300367>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

KHANDARE, R.; KABRA, A.; AWATE, A.; GOVINDWAR, S. Synergistic degradation of diazo dye Direct Red 5B by *Portulaca grandiflora* and *Pseudomonas putida*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Iran, v. 10, p. 1039–1050, 2013. Disponível em: <<https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/63487> >. Acesso em: 03 jan. 2017.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M.M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. **International Journal of Mineral Processing**, London, v. 78, p. 131-139, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301751605001262> >. Acesso em: 17 fev. 2017.

LAZZAROTTO, F.; ZOLET, A. C. T.; PINHEIRO, M. M. Revisiting the Non-Animal Peroxidase Superfamily. **Trends in Plant Science**, London, v. 20, n. 12, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26463217>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

LI, G.; NANDGAONKAR, A. G.; WANG, Q.; ZHANG, J.; KRAUSE, W. E.; WEI, Q.; LUCIA, L. A. Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. **Journal of Membrane Science**, Pennsylvania, v. 525, p. 89-98, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738816320142>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

LIU, X.; YUAN, Z.; WANG, J.; CUI, Y.; LIU, S.; MA, Y.; GU, L.; XU, S. Crystal structure and biochemical features of dye-decolorizing peroxidase YfeX from *Escherichia coli* O157 Asp143 and Arg232 play divergent roles toward different substrates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Germany, v. 484, p. 40-44, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28109884>>. Acesso em: 18 fev. 2017.

MARANDI, R.; SEPEHR, S.M.B. Removal of orange 7 dye from wastewater used by natural adsorbent of *Moringa oleifera* seeds. **American Journal of Environmental Engineering**, Siena, v. 1, p. 1-9, 2011. Disponível em: <<http://article.sapub.org/10.5923.j.ajee.20110101.01.html> >. Acesso em: 29 mar. 2017.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220 p.

MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorant, FEMS Symposium, v. 12, p. 371-385, 1981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652616309477>>. Acesso em: 04 mar. 2017.

MOLLER, I. M.; JESEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Los Angeles, v.58, p. 459-481, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288534>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

MORALI, E. K.; UZAL, N.; YETIS, U. Ozonation pre and post-treatment of denim textile mill effluents: Effect of cleaner production measures. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v.137, p. 1-9, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652616309477>>. Acesso em: 03 abr. 2017.

MUHAMMAD, H. I.; ASMAWI, M. Z.; KHAN, N. A. K. A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. In tropical and sub-tropical regions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Washington, v. 6, p. 896-902, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116301381>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

NWOSU, M. O.; OKAFOR, J. I. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. **Mycoses**, Germany, v. 38, p. 191-195, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531930>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

OLSEN, A. Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in Sudanese villages: effects on *Schistosoma mansoni cercariae*. **Water Research**, Netherlands, v. 21, p. 517-522, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135487900595>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

OYEYINKA, A. T.; OYEYINKA, S. A. *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. **Society of Agricultural Sciences**, Saudi Arabia, v. X, p. X, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658077X15301235>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

OZTURK, E.; KOSEOGLU, H.; KARABOVACI, M.; YIGIT, N. O.; YETIS, U.; KITIS, M. Minimization of water and chemical use in a cotton/polyester fabric dyeing textile mil. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v. 130, p. 92-102, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652616001293>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

PAULA, P. C.; OLIVEIRA, J.T.A.; SOUSA, D.O.B.; ALVES, B.G.T.; CARVALHO, A.F.F.U.; FRANCO, O.L.; VASCONCELOS, I. M. Insulin-like plant proteins as

potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. **New Biotechnology**, Cambridge, v. X, p. X, 2016. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27737801>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

PINTO, C.E.M. **Biossegurança alimentar da proteína antifúngica *mo-cbp3* de Sementes de *moringa oleifera* lam: uma candidata para o desenvolvimento de plantas transgênicas**. 2014. 27 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PUNZI, M., NILSSON, F., ANBALAGAN, A., SVENSSON, B.M., JÖNSSON, K., MATTIASSON, B., JONSTRUP, M. Combined anaerobic–ozonation process for treatment of textile wastewater: removal of acute toxicity and mutagenicity. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 292, p. 52–60, 2015. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781375>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

RAMACHANDRAN, D.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, Fullerton, v. 34, p. 276-283, 1980. Disponível em:
<https://www.jstor.org/stable/4254186?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 09 mar. 2017.

RAMOS, L. M.; COSTA, R. S.; MORO, F. V.; SILVA, R. C. **Comunicata Scientiae**, Brasil, v.12, p. 156-160, 2010. Disponível em:
<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/71984/2-s2.0-84863978660.pdf?sequence=1>> Acesso em : 19 mai. 2017.

RANE, N. R.; CHANDANSHINE, V.V.; WATHARKAR, A. D.; KHANDARE, R. V.; PATIL, T. S.; PAWAR, P. K.; GOVINDWAR, S. P. Phytoremediation of sulfonated Remazol Red dye and textile effluents by *Alternanthera philoxeroides*: An anatomical, enzymatic and pilot scale study. **Water Research**, Netherlands, v. 83, p. 271-281, 2015. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415300968>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

RAO, M. A.; SCELZA, R., ACEVEDO, F. DIEZ, M. C.; GIANFREDA, L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 107, p. 145-162, 2014. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653513017244>>. Acesso em 02 jan. 2017.

REN, Y.; GONG, J.; FU, R.; LI, Z.; YU, Z.; LOU, J.; WANG, F.; ZHANG, J. Dyeing and functional properties of polyester fabric dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. **Journal of Cleaner Production**, Czech Republic, v.148, p. 375-385, 2017. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652617301907>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; Remediation of Dyes in Textile Effluent: a critical review on current treatment technologies with a

proposed alternative. **Bioresource Technology**, India, v. 77, p. 247-255, 2001.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400000808>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

SALEN, V. O Tingimento Têxtil. Apostila de Tingimento. Associação Brasileira de Químicos e Coloristas Têxteis, v. 2, 1998.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P.

Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taiwan, v. 42, p. 138-157, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107010001094>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

SHAFFIQU, T. S.; ROY, J. J.; NAIR, R. A.; ABRAHAM, T. E. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Minnesota, v. 102-103, 2002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396133>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

SHANK, L. P.; RIYATHONG, T.; LEE, V. S.; DHEERANUPATTANA, S. Peroxidase Activity in Native and Callus Culture of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Medical and Bioengineering**, Kuwait, v. 2, n. 3, 2013. Disponível em: <

<http://www.jomb.org/uploadfile/2013/0826/20130826020905211.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

SHARMA, P.; KUMARI, P.; SRIVASTAVA, M. M.; SRIVASTAVA, S. Ternary biosorption studies of Cd(II), Cr(III) and Ni(II) on shelled *Moringa oleifera* seeds.

Bioresource Technology, Punjab, v. 98, p. 474-477, 2007. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405005985>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

SHINOMOL, G. K.; BHANU, R. K.; DEEPA, N.; POOJA, S. C.; ASHWINI, T. S.; SUCHANDRIMA, D. A Study on the Potential of Moringa Leaf and Bark Extract in Bioremediation of Heavy Metals from Water Collected from Various Lakes in Bangalore. **Procedia Environmental Sciences**, Netherlands, v. 35, p. 869 – 880, 2016.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029616301931>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. International Biodeterioration & Biodegradation Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes e A review.

International Biodeterioration & Biodegradation, Hong Kong, v. 114, p. 21-31, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830515001572>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

SOUZA, A. O.; CASTRO, A. H. S.; SILVA, N.; BRAGA, E. A. S.; MILLHOME, M. A. L. The discharge of efluentes and the contamination by toxic metals and organic matter in Bastiana lake, Ceará, Brazil. **Holos Environment**, Brazil, v. 7, p. 171-178, 2016.

Disponível em: <<http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/4352>>.

Acesso em: 21 jan. 2017.

TEERAPATSAKUL, C.; PARRA, R.; KESHAVARZ, T.; CHITRADON, L. Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Hong Kong, v. 120, p. 52-57, 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516307016>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

TURHAN, K.; DURUKAN, I.; OZTURKCAN, S. A.; TURGUT, Z. Decolorization of textile basic dye in aqueous solution by ozone. *Dyes and Pigments*, **Huddersfield**, v. 92, p. 897-901, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720811002117>>. Acesso em: 08 abr. 2017.

VAJNHANDL, S.; VALH, J. The status of water reuse in European textile sector.

Journal Environmental Management, Belgium, v. 141, p. 29–35, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714001492>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

WADHWA, S.; PANWAR, M. S.; SAINI, N.; RAWAT, S. S.; SINGHAL, S. A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. **Global Journal of Traditional Medicinal Systems**, China, v. 2, p. 1-13, 2013. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/281606179_A_review_on_commercial_traditional_uses_phytoconstituents_and_pharmacological_activity_of_Moringa_Oleifera>. Acesso em: 09 mar. 2017.

WAGHMODE, T. R.; KURADE, M. B.; KABRA, A. N.; GOVINDWAR, S. P.

Degradation of Remazol Red dye by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 leading to increased iron uptake in *Sorghum vulgare* and *Phaseolus mungo* from soil.

Biotechnology and Bioprocess Engineering, Korea, v.17, p. 117-126, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-011-0307-0>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

WANG, N., CHU, Y., WU, F., ZHAO, Z., XU, X. Decolorization and degradation of Congo red by a newly isolated white rot fungus, *Ceriporia lacerata*, from decayed mulberry branches. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Hong Kong, v. 117, p. 236-244, 2017. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051630926X>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Germany. 209, p. 172–184, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868614001389>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

YURTSEVER, A.; CALIMLIOGLU, B.; SAHINKAYA, E. Impact of SRT on the efficiency and microbial community of sequential anaerobic and aerobic membrane bioreactors for the treatment of textile industry wastewater. **Chemical Engineering Journal**, Northern Ireland, v.314, p. 378-387, 2017. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894716317442>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

ZAMOCKY, M. Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 271, p. 3297–3309, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15291807>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

ZHANG, F. Q.; WANG, Y. S.; LOU, Z. P.; DONG, J. D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, Amsterdam, v. 67, p. 44–50, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350601335X>>. Acesso em: 12 mar. 2017.