

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***Extração e Purificação de Peroxidase de Soja (Glycine
max) por Adsorção de Afinidade a Metal Imobilizado***

Kathia Assis de Sousa

Engenheira Industrial Química (FAENQUIL)

Prof^a Dr^a Telma Teixeira Franco

Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Abril/2001



2017841

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
So85e
C. Ex.
COMBO BC/ 46136
PROC. 16-392/01
C D
PREC# R\$11,00
DATA 17-08-01
N.º CPD

CM00158843-3

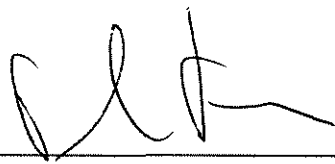
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

So85e Sousa, Kathia Assis de
Extração e purificação de peroxidase de soja (*Glycine max*) por adsorção de afinidade a metal imobilizado /
Kathia Assis de Sousa. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadora: Telma Teixeira Franco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.


1. Peroxidase. 2. Soja. 3. Cromatografia de
afinidade. 4. Proteínas - Purificação. I. Franco, Telma
Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado de *Kathia Assis de Sousa* em Engenharia Química.



Prof.ª Dr.ª Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado defendida por *Kathia Assis de Sousa* e aprovada em 23 de abril de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª Drª Telma Teixeira Franco

Orientadora



Profª Drª Meuris Gurgel Carlos da Silva

Membro Titular



Drª Maria Estela da Silva

Membro Titular

Drª Eliana Setsuko Kamimura

Membro Suplente

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai
Osni Viana de Sousa
pela eterna saudade*

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Telma Teixeira Franco pela orientação e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

À banca examinadora pela atenção, sugestões, correções para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Maria de Fátima, e minha irmã, Cinthia, por todo o incentivo e apoio nos momentos de dificuldade.

Ao Eduardo que sempre esteve ao meu lado contribuindo com muito amor e paciência.

Ao Everaldo que considero meu “co-orientador”.

À Eliana pelas sugestões e dicas valiosas no desenvolvimento do trabalho de purificação em coluna.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica Ana Paula, Luciana, Sérgio, Lisanne, Joseane, Ricardo, Aline, Cristiane Fozzatti, Lilian.

Aos amigos da Faculdade de Engenharia Química Layse, Lucilene, Édler, Mayra, Evelyn, Kelly, Jonatas, Cristiane e Fabiola.

Às novas amigas Sandra, Irene e Bellinha.

Aos amigos e parentes que não foram mencionados, mas que sempre estiveram presentes.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho..

À FAPESP pelo auxílio financeiro (processo n^o 99/05303-2).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
NOMENCLATURA	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 – Peroxidases	03
2.1.1 – Aplicações da Peroxidase	05
2.2 – Processos de Extração e Purificação da Peroxidase	06
2.3 – Cromatografia por Afinidade	08
2.4 – Cromatografia por Afinidade com Íon Metálico Imobilizado	09
2.4.1 – Interações entre Metais e Peroxidases	14
2.5 – Suportes Sólidos	14
2.5.1 – Chelating Sepharose Fast Flow	14
2.5.2 – Lewatit TP 207	16
2.6 – Teoria da Adsorção em Leito Empacotado	16
2.6.1 – Isotermas de Adsorção	16
2.6.1.1 – Isoterma de Langmuir	19
2.6.2 – Curvas de Ruptura (“Breakthrough Curves”)	22
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 – Materiais	26
3.2 – Extrato Bruto de Peroxidase da Casca da Soja	26

3.3 – Determinação da Atividade Enzimática da Peroxidase	27
3.4 – Determinação de Proteínas Totais	28
3.5 – Atividade Específica da Peroxidase ($AE_{\text{peroxidase}}$)	28
3.6 – Cinética da Extração da Peroxidase	28
3.7 – Determinação do pH Ótimo da Enzima	29
3.8 – Estabilidade da Enzima Frente a pH	29
3.9 – Determinação da Temperatura Ótima da Enzima	29
3.10 – Estabilidade da Enzima Frente à Temperatura	29
3.11 – Imobilização de Íons Cu^{2+} em Chelating Sepharose Fast Flow	30
3.12 – Cinética de Adsorção para o Sistema Peroxidase-CSFF-IDA- Cu^{2+}	30
3.13 – Influência do pH na adsorção da Peroxidase em CSFF-IDA- Cu^{2+}	31
3.14 – Isoterma de Adsorção	31
3.15 – Curvas de Ruptura (“Breakthrough Curves”)	32
3.16 – Purificação da Peroxidase do Extrato Bruto da Casca da Soja	33
3.17 – Adsorção em Batelada	35
3.18 – Eletroforese SDS-PAGE	35
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 – Caracterização da Enzima Frente a pH e Temperatura	39
4.2 – Cinética de Adsorção para o Sistema Peroxidase-CSFF-IDA- Cu^{2+}	43
4.3 – Influência do pH na adsorção da Peroxidase em CSFF-IDA- Cu^{2+}	44
4.4 – Isoterma de Adsorção	45
4.5 – Curvas de Ruptura	48
4.6 – Purificação da Peroxidase do Extrato Bruto da Casca da Soja	51
4.7 – Adsorção em Batelada	58
5 – CONCLUSÕES	62
6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	65
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Cromatografia por afinidade com ion metálico imobilizado – CAIMI.</i>	09
Figura 2:	<i>Sítio de ligação entre a proteína contendo histidina e o suporte sólido acoplado ao IDA-Cu²⁺.</i>	10
Figura 3:	<i>(a) Coordenação de ions metálicos com moléculas de água; (b) Complexo metálico; (c) Complexo metálico monodentado; (d) Quelato metálico.</i>	11
Figura 4:	<i>Disposição octaédrica de ligantes ao redor de um ion metálico central.</i>	12
Figura 5:	<i>Fórmula estrutural dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano.</i>	12
Figura 6:	<i>Estrutura parcial do adsorvente Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF).</i>	15
Figura 7:	<i>Isoterma de adsorção.</i>	17
Figura 8:	<i>Linearizações de Langmuir para calcular a capacidade máxima de adsorção, Q_m, e a constante de equilíbrio, K_D.</i>	21
Figura 9:	<i>(a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. “C_b” é a concentração de ruptura. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura (t_b).</i>	22
Figura 10:	<i>Influência do formato da curva de ruptura no desempenho de colunas de leito fixo.</i>	24
Figura 11:	<i>Sistema “Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC” utilizado para o estudo da adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja na coluna HR 5/5.</i>	33
Figura 12:	<i>Cinética da extração da peroxidase.</i>	38
Figura 13:	<i>pH ótimo de atividade de peroxidase.</i>	39
Figura 14:	<i>Estabilidade da peroxidase em tampão citrato-fosfato 0,05 M, em diferentes pHs.</i>	40
Figura 15:	<i>Estabilidade da peroxidase em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,01 M CuSO₄·5H₂O, em diferentes pHs.</i>	41
Figura 16:	<i>Temperatura ótima de atividade de peroxidase.</i>	42
Figura 17:	<i>Estabilidade da peroxidase em diferentes temperaturas.</i>	42
Figura 18:	<i>Cinética de adsorção para o sistema Peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺ em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0 à 25°C.</i>	43

Figura 19: <i>Isoterma de adsorção a 25°C em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 8,0.</i>	46
Figura 20: <i>Linearizações da isoterma de Langmuir.</i>	47
Figura 21: <i>Curvas de ruptura para a peroxidase do extrato bruto da casca da soja e proteínas totais.</i>	49
Figura 22: <i>Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 8,0 (primeiro ensaio).</i>	51
Figura 23: <i>Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 8,0 (segundo ensaio).</i>	53
Figura 24: <i>Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 6,0 (terceiro ensaio).</i>	55
Figura 25: <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.</i>	57
Figura 26: <i>Esquema simplificado para a extração e separação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja das proteínas contaminantes visando o aproveitamento do resíduo da indústria de soja.</i>	59
Figura 27: <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS para adsorção na resina Lewatit TP 207 em uma hora.</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	<i>Composição de aminoácidos, carboidratos e massa molar de peroxidases de diferentes origens.</i>	04
Tabela 2:	<i>Purificação de proteínas por adsorção (cromatografia) a metais imobilizados a suportes sólidos.</i>	13
Tabela 3:	<i>Atividade enzimática e proteínas totais nos diferentes lotes de casca da soja.</i>	37
Tabela 4:	<i>Caracterização da peroxidase EBCS frente a pH e temperatura com dados da literatura.</i>	43
Tabela 5:	<i>Estudo do pH na adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja e as proteínas contaminantes em CSFF-IDA-Cu²⁺ em tampão fosfato de sódio 0,1M à 25°C.</i>	44
Tabela 6:	<i>Valores das constantes Q_m e K_D para as diferentes peroxidases.</i>	48
Tabela 7:	<i>Capacidade máxima de adsorção da peroxidase e proteínas totais no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ e eficiência para as curvas de ruptura da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.</i>	50
Tabela 8:	<i>Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 8,0 (primeiro ensaio).</i>	52
Tabela 9:	<i>Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 8,0 (segundo ensaio).</i>	54
Tabela 10:	<i>Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 6,0 (terceiro ensaio).</i>	56
Tabela 11:	<i>Dados da literatura que comparam a massa molar de diferentes peroxidases de soja.</i>	58
Tabela 12:	<i>Comparação na eficiência da adsorção em batelada das resinas “Chelating Sepharose Fast Flow” e “Lewatit TP 207” em uma hora de adsorção.</i>	60

NOMENCLATURA

AE	<i>Atividade de Peroxidase</i>
AE_{peroxidase}	<i>Atividade Específica da Peroxidase</i>
BSA	<i>Proteína Albumina do Soro Bovino</i>
CAIMI	<i>Cromatografia de Afinidade com Íons Metálicos Imobilizados</i>
Ceval	<i>Ceval Alimentos S.A.</i>
CSFF	<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>
CSFF-IDA-Cu²⁺	<i>Complexo Chelating Sepharose Fast Flow-Ácido Iminodiacético-Cobre</i>
Da / kDa	<i>Dalton / kilodalton</i>
EBCS	<i>Extrato Bruto da Casca da Soja</i>
EDTA	<i>Ácido Etilenodinitrilotetracético Sal Dissódico</i>
FL/FS	<i>Razão entre a Fase Líquida e a Fase Sólida</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
IDA	<i>Ácido Iminodiacético</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
K_D	<i>Constante de Dissociação do Complexo Peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺</i>
Nd	<i>Não determinado</i>
PEG	<i>Polietilenoglicol</i>
PF	<i>Fator de Purificação</i>
PT	<i>Proteínas Totais</i>
Q	<i>Capacidade de Adsorção no gel CSFF</i>
Q_m	<i>Capacidade Máxima de Adsorção no gel CSFF</i>
R	<i>Rendimento</i>
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
SDFA	<i>Sistema de Duas Fases Aquosas</i>
U	<i>Unidade de Atividade Enzimática</i>

RESUMO

Foram investigadas estabilidade frente a pH e temperatura e condições ótimas da enzima peroxidase do extrato bruto da casca da soja (*Glycine max*). Foi verificada a afinidade entre a enzima e íons cobre imobilizados no gel “Chelating Sepharose Fast Flow” (CSFF) e também foi estudado o efeito do pH sobre a adsorção desta enzima. Foram construídas isotermas de adsorção para a peroxidase do extrato bruto de casca da soja e para as peroxidases padrão de soja e de nabo (horseradish), para verificar a capacidade máxima de adsorção do complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ para estas enzimas. Curvas de ruptura para a peroxidase do caldo bruto de casca da soja foram construídas para estudar a eficiência do complexo na adsorção da enzima. A purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja foi estudada na coluna HR 5/5 empacotada com o complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ equilibrado com tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 6,0.

Foi verificado que a peroxidase do extrato bruto da casca da soja apresentou condições ótimas de atividade a pH 4,5, mostrou-se estável por três horas em temperaturas entre 1 e 55°C. Foi observado que a adsorção mais seletiva da peroxidase do extrato bruto de casca da soja se deu a pH 6,0, quando 51% da enzima foi retida após dez minutos de contato entre a peroxidase e o complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ a 25°C em tampão fosfato de sódio 0,1M. A adsorção das peroxidases da casca da soja, padrão comercial de nabo e padrão comercial de soja no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ obedeceu ao modelo proposto por Langmuir. Com a construção das curvas de ruptura foi verificado que a pH 6,0 houve a melhor seletividade na separação da atividade de peroxidase, quando 96,9% de atividade foi recuperada. Na adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja na coluna HR 5/5 empacotada com CSFF-IDA-Cu²⁺ a pH 6,0, foi obtido um fator de purificação de 5,9 vezes com um rendimento de 83,4%.

Palavras-chave: *Peroxidase; Soja; Glycine max; Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado; Downstream Processing.*

ABSTRACT

The conditions for the soybean hull peroxidase activity were investigated for pH and temperature. It was observed that the best pH for maximum activity was at 4.5, however the activity was only 5% reduced at pH values 5.0 and 5.5 and was 20% reduced for pH's between 6.0 and 7.0 and 45% reduced at pH 8.0. It was stable at this pH interval for four hours period, however, it lost 20% activity at pH 4.5 after one hour incubation. Best temperature for the enzyme active was 55 °C and it was stable from 1 to 55 °C for at least three hours.

The affinity between the soybean hull peroxidase and copper ions immobilized in a solid matrix was investigated. The maximum capacity of the CSFF-IDA-Cu²⁺ to interact with the enzyme was calculated by plotting the concentrations of the proxidase found in the liquid phase in equilibrium with the peroxidase concentrations found in the solid phase (isotherms). Breakthrough curves were built to study the efficiency of CSFF-IDA-Cu²⁺ bed to adsorb the peroxidase of soybean hull and also two standards peroxidases commercially available from soybean and from horseradish. The effect of pH on the adsorption of the enzyme was also investigated and it was observed that the most selective adsorption of the soybean hull peroxidase was at pH 6.0. Purification of the soybean hull peroxidase was studied in the column HR 5/5 packed with the complex CSFF-IDA-Cu²⁺ in 100 mM phosphate buffer at pH 6.0. The adsorption of the soybean hull peroxidase, soybean and horseradish peroxidases by the CSFF-IDA-Cu²⁺ was observed to follow Langmuir model. The final peroxidase purified by the process developed in this work showed that the specific activity of the enzyme was about 5.9 fold higher than that of crude extract and the yield was about 83.4%.

Keywords: *Peroxidase; Soybean; Glycine max; Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography; Downstream Processing.*

1 - INTRODUÇÃO

As peroxidases são heme-proteínas que tem como função biossíntese de parede celular, defesa e outros processos oxidativos que usa peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons. A semente de soja é uma fonte abundante de peroxidase e estão sendo desenvolvidas tecnologias utilizando peroxidase de soja como uma alternativa econômica para técnicas de oxidação química incluindo branqueamento de polpa e papel, tratamento de águas residuárias industriais, remediação de solos e sínteses orgânicas (VIERLING e WILCOX, 1996).

Parte substancial do custo de obtenção de produtos de origem biotecnológica é resultante dos processos de extração e purificação ("Downstream-Processing"). A cromatografia por afinidade tornou-se um importante método para a purificação de moléculas biologicamente ativas. Um grande número de proteínas foi assim purificadas sendo as enzimas, a maior categoria dessas macromoléculas. De acordo com COLLINS *et al.* (1997) os primeiros trabalhos descrevendo esta modalidade de cromatografia datam de 1959, empregando anticorpo anti-haptenos, possibilitando o emprego da cromatografia de afinidade na purificação de tirosinase. No entanto, foi no início da década de 60 que esse tipo de cromatografia teve um grande impulso, passando a ser amplamente empregada como método de purificação de macromoléculas.

Cromatografia por Afinidade com Íon Metálico Imobilizado (CAIMI) ou Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) é um versátil procedimento de separação que explora diferenças na afinidade exibida em muitos biopolímeros por íons metálicos. A técnica envolve a quelação do íon metálico em um suporte sólido, onde a superfície foi quimicamente modificada com ligantes polidentados. O ligante com o íon

metálico quelado tem um potencial de coordenação com grupos doadores de elétrons residentes na superfície de interação de proteínas (CHAOUK e HEARN, 1999).

Diversos pesquisadores têm usado o complexo ácido iminodiacético-cobre (IDA-Cu²⁺) como um ligante covalentemente preso a um suporte, para recuperar e purificar diversas enzimas em cromatografia que possuem afinidade por este metal. Um fator importante na interação proteína-metal é a acessibilidade dos resíduos de histidina expostos na superfície da proteína (PORATH *et al.*, 1975; WUENSHELL *et al.*, 1990; ARNOLD, 1991; BIRKENMEIER *et al.*, 1991).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP vem desenvolvendo pesquisas em processos não-convencionais de purificação de proteínas e/ou enzimas e na redução do número de etapas operacionais. SILVA e FRANCO (2000) extraíram e purificaram a peroxidase de soja por partição líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (SDFa), utilizando o complexo IDA-Cu²⁺ acoplado a polietilenoglicol (PEG).

O objetivo deste trabalho foi extrair e purificar a enzima peroxidase do extrato bruto da casca da soja (*Glycine max*) utilizando a adsorção de afinidade em um suporte sólido com íon cobre imobilizado, visando reduzir o número de etapas da purificação eliminando material interferente e desenvolvendo a reciclagem do suporte sólido.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Peroxidases

Peroxidase, doador: hidrogênio-peróxido oxidoredutase EC 1.11.1.7, pertence a uma classe de proteínas que tem como função oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio (CHEN e VIERLING, 2000; DURÁN e ESPOSITO, 2000). Possuem uma variedade de funções biossintéticas e degradativas usando peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons (GLIZEN *et al.*, 1999). Estas enzimas são encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados (DAWSON, 1988).

A peroxidase tem sido extensivamente estudada em plantas e tem sido implicada em uma variedade de processos fisiológicos incluindo biossíntese de lignina, polimerização, cicatrização de ferimentos (CHEN e VIERLING, 2000). É a enzima mais freqüentemente usada na produção de kits de imunoenálises e em medidas colorimétricas do peróxido de hidrogênio.

De acordo com CHEN e VIERLING (2000) a família de peroxidases de soja consiste em aproximadamente vinte isoenzimas.

GILLIKIN e GRAHAM (1991) relataram a existência de uma única isoenzima na casca da semente de soja com uma alta estabilidade térmica até a baixo pH (McELDOON *et al.*, 1995). Os autores concluíram, através de experimentos de impressão em tecido, que a atividade de peroxidase na casca da semente de soja é 99 vezes maior que a observada no cotilédone da semente em peso seco. Foi verificado por estes autores que a relativa facilidade em isolar esta isoenzima foi devido ao fato da casca da semente de soja madura

não conter uma variedade de complexos de proteínas solúveis. Além disso, a peroxidase representa uma porção significativa do total de proteínas solúveis da casca da semente. Baseado em dados de purificação foi sugerido que a casca da semente de soja poderia representar uma das mais ricas fontes de uma única isoenzima peroxidase já descrita em plantas.

Poucas peroxidases têm a estrutura da cadeia de seus carboidratos analisada em detalhes. A peroxidase da casca da semente da soja, uma glicoproteína com ponto isoelétrico 4,1, foi encontrada em quantidades substanciais no bioproduto da indústria de soja (GILLIKIN e GRAHAM, 1991) com um teor de carboidratos ligados à enzima de 18,2% (GRAY *et al.*, 1996).

A peroxidase de nabo (horseradish peroxidase) é bem conhecida por ser uma glicoproteína (WELINDER, 1985), com o conteúdo de carboidratos, em alguns casos, de 17% da massa molar da peroxidase. Novas peroxidases de plantas têm sido isoladas e caracterizadas e geralmente são também glicosiladas (McMANUS e ASHFORD, 1997). A lactoperoxidase proveniente do soro de leite também apresenta quantidades substanciais de carboidratos (STEFANO *et al.*, 1994).

A Tabela 1 descreve a composição de algumas peroxidases.

Tabela 1: Composição de aminoácidos, carboidratos e massa molar de peroxidases de diferentes origens.

PEROXIDASE	AMINOÁCIDOS	CARBOIDRATOS (%)	MASSA MOLAR (DA)	REFERÊNCIA
<i>Peroxidase de soja</i>	4 Histidinas 9 Cisteínas 1 Triptofano	18,2%	37.000	GRAY <i>et al.</i> (1996); SESSA e ANDERSSON (1981)
<i>Peroxidase de nabo</i>	2 Histidinas 8 Cisteínas 1 Triptofano	5,0% 17,0%	40.000	Enzyme Handbook (1994)
<i>Lactoperoxidase</i>	15 Histidinas 16 Cisteínas 16 Triptofanos	8,0%	82.000	STEFANO <i>et al.</i> (1994); DUNFORD e STILLMAN (1976)

2.1.1 – Aplicações da Peroxidase

A principal função da enzima peroxidase é oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio com consumo de peróxido de hidrogênio ou oxigênio molecular em reações de oxidação (VIERLING e WILCOX, 1996).

Peroxidase é a enzima mais frequentemente utilizada em imunoenaios enzimáticos (MIRANDA *et al.*, 1995) e em diagnósticos médicos (MIRANDA e CASONE, 1994). É usada na determinação enzimática de pequenas quantidades de glicose, especialmente para pessoas que sofrem de diabetes (LOBARZEWSKI e GINALSKA, 1995).

De acordo com EGOROV e GAZARYAN (1993), a peroxidase também pode ser empregada nos biossensores (RUZGAS *et al.*, 1996; ROSATTO *et al.*, 1999), na transformação química de medicamentos, na fabricação de produtos químicos, na degradação de compostos aromáticos e no controle do meio ambiente (GANJIDUST *et al.*, 1996).

POKORA (1995) relatou o uso de peroxidases em processos de síntese de diversos intermediários químicos, como a resina fenólica isenta de formaldeído. Outra importante classe de materiais produzidos por reações catalisadas por peroxidase em solventes orgânicos são as aminas poliaromáticas e os polifenóis (AKKARA *et al.*, 1999). A peroxidase de soja pode ser usada para clareamento de papel, substituindo oxidantes químicos para oxidar anilina no processo de produção de polianilina e quando microencapsulada, a peroxidase de soja é liberada produzindo um papel-carbono, com uma mudança de cor, sem as manchas deixadas pelo carbono.

HELLER e VREEKE (1998) produziram um biossensor eletroquímico com uma peroxidase termoestável derivada da soja, capaz de medir peróxido de hidrogênio em temperaturas em torno de 37°C em ambientes biológicos.

KIM *et al.* (1998) produziram polifenóis usando a peroxidase da casca da soja como biocatalisador (sensores de metais) para determinar a presença de íons metálicos específicos em soluções aquosas em concentrações menores que 10 mM.

WRIGHT e NICELL (1999) usaram a peroxidase de soja para remoção de fenóis e

outros compostos aromáticos de águas residuárias industriais. Foi obtida uma remoção máxima de 99,7% de compostos aromáticos e fenóis em pH 6,0 usando 3,3 U/mL de atividade peroxidásica.

KINSLEY e NICELL (2000) usaram a peroxidase de soja para catalisar a polimerização de compostos fenólicos presentes em águas residuárias industriais. Foi testado o uso do polietilenoglicol para aumentar a vida catalítica da enzima. Reações lineares foram encontradas entre a quantidade de fenol tratado (de 1 a 10 mM), doses ótimas de peroxidase de soja e polietilenoglicol (de massa molar 3.500) requerendo uma remoção de fenóis maior que 95%.

MUNIR e DORDICK (2000) usaram a peroxidase de soja para catalisar reações de halogenação. A peroxidase de soja mostrou-se como um efetivo catalisador da brominação do álcool veracil em derivados do 6-Bromo.

As vantagens do uso da peroxidase de soja além das tecnologias oxidativas, incluem disponibilidade, baixo custo, maior reatividade, baixa produção de co-produtos, e uma habilidade de oxidar completamente compostos orgânicos em dióxido de carbono, água e sais (VIERLING e WILCOX, 1996).

2.2 - Processos de Extração e Purificação da Peroxidase

Diferentes métodos tem sido descritos para extração e purificação de peroxidase, envolvendo principalmente cromatografia de troca iônica (SHANNON *et al.*, 1966), precipitação com sais (LASCU *et al.*, 1986), cromatografia de interação hidrofóbica (CHAVEZ e FLURKEY, 1984), cromatografia de afinidade usando concavalina A como ligante (BRATTAIN *et al.*, 1976), anticorpos monoclonais (ELLING *et al.*, 1991), complexo IDA-Cu²⁺ como um ligante covalentemente preso ao polietilenoglicol (SILVA e FRANCO, 2000) e separação por partição em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) (MIRANDA *et al.*, 1998).

SESSA e ANDERSSON (1981) purificaram a peroxidase de soja obtendo um aumento de 628 vezes no fator de purificação desta enzima, usando uma seqüência de procedimentos: fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel,

cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade e cromatografia hidrofóbica, obtendo um baixo rendimento de 4%.

Peroxidase de algas marrons foi purificada por partição em S DFA convencional (VILTER, 1990). Um sistema feito com 10% de PEG 1.550 e 15% de carbonato, pH 11,8, foi usado, obtendo-se um coeficiente de partição de 97 e um rendimento de 93%. De acordo com este autor, a inativação da peroxidase resultante do tratamento com carbonato de potássio a elevados pH foi revertida por troca de tampão.

GILLIKIN e GRAHAM (1991) extraíram e purificaram a peroxidase da casca da semente de soja usando sucessivas cromatografias: troca iônica, afinidade e filtração em gel, aumentando o fator de purificação para 41 vezes com um rendimento de 14%.

DALTON *et al.* (1996) extraíram e purificaram a ascorbato peroxidase de soja, aumentando o fator de purificação para 7,7 vezes, usando cromatografia de afinidade seguida por cromatografia de filtração em gel, obtendo um rendimento de 27%.

Um processo de purificação e extração da peroxidase de soja em um outro S DFA termossensível com Triton X-45, Triton X-100 e acetato de sódio a pH 5,5 foi desenvolvido por MIRANDA *et al.* (1998) com rendimento de 99% e fator de purificação de 6 vezes. Cromatografia de afinidade foi usada para purificar a enzima em uma segunda etapa, aumentando o fator de purificação para 41 vezes e com rendimento para 28% de peroxidase. A dissociação da enzima do complexo de afinidade foi executada com adição de uma fase salina (10% fosfato a pH 7,0).

LIU *et al.* (1999) extraíram e purificaram a peroxidase da casca da soja aumentando o fator de purificação de 57 vezes, usando uma seqüência de procedimentos: fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade e cromatografia de filtração em gel, obtendo um rendimento de 16,4%.

SILVA e FRANCO (2000) extraíram e purificaram a peroxidase de soja por partição em S DFA, utilizando o complexo IDA-Cu²⁺ acoplado a polietilenoglicol. Foi observado que a peroxidase foi fortemente particionada para a fase contendo cobre e que 64% da enzima praticamente pura podia ser purificada em apenas duas etapas. O aumento no fator de purificação obtido neste processo foi de 145 vezes.

2.3 - Cromatografia por Afinidade

Segundo COLLINS *et al.* (1997) a cromatografia por afinidade distingue-se dos outros métodos cromatográficos por basear-se nas propriedades funcionais das espécies que interagem: a substância a ser separada e a fase estacionária.

O princípio da cromatografia por afinidade é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos imobilizados a suportes sólidos.

Basicamente, a metodologia da cromatografia por afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo o ligante específico acoplado ao suporte sólido. As moléculas da amostra que não possuem apreciável afinidade pelo ligante passam pela coluna livremente, enquanto que as macromoléculas capazes de unirem-se a este são retidas na coluna.

A eluição das moléculas pode ser feita por alteração do pH e/ou força iônica do meio, que tornam o complexo molécula-ligante menos estável, levando à dissociação do mesmo, ou ainda pelo emprego de substâncias com maior afinidade pelo ligante do que a molécula que se deseja purificar.

O sucesso do emprego desse tipo de cromatografia depende da seleção adequada do suporte insolúvel ou matriz, do ligante específico, das condições de ligação entre ambos e das condições de retenção e eluição das moléculas em questão.

As enzimas purificadas através da cromatografia por afinidade podem ser divididas em duas categorias: a primeira compreende as enzimas de especificidade restrita, as quais são purificadas com auxílio de inibidores ou substratos; a segunda categoria compreende as enzimas que se acoplam a um ligante geral, isto é, um ligante comum para um grande número de proteínas.

2.4 - Cromatografia por Afinidade com Íon Metálico Imobilizado

A Cromatografia por Afinidade com Íon Metálico Imobilizado (CAIMI) ou Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) envolve a quelação do íon metálico em um suporte sólido, onde a superfície foi quimicamente modificada com ligantes polidentados.

De acordo com GABERC-POREKAR *et al.* (1999) esta técnica cromatográfica mostrou-se simples, altamente seletiva, econômica e viável para aumento de escala, capaz de separar em um único passo a proteína de interesse de outras proteínas e contaminantes biológicos.

A Figura 1 mostra um esquema simplificado da técnica de CAIMI.

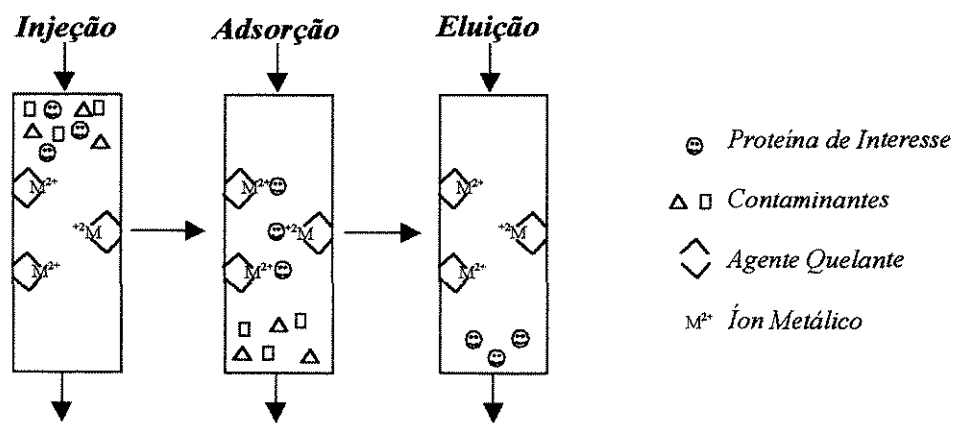


Figura 1: Cromatografia por afinidade com íon metálico imobilizado - CAIMI.

A cromatografia de afinidade usando metais imobilizados como ligantes foi introduzida por PORATH *et al.* (1975). É fundamentada na interação entre metais de transição quelados pelo ácido iminodiacético (IDA) e os grupos doadores de elétrons presentes na superfície da proteína, os quais são resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas (PESLIAKAS *et al.*, 1994; GABERC-POREKAR *et al.*, 1999).

Diversos pesquisadores tem usado o complexo IDA- Cu^{2+} como um ligante covalentemente preso a um suporte, para recuperar e purificar proteínas em cromatografia que possuem afinidade por este metal (PORATH *et al.*, 1975; WUENSHELL *et al.*, 1990;

ARNOLD, 1991; BIRKENMEIER *et al.*, 1991; SILVA e FRANCO, 2000). A Figura 2 representa o sítio de ligação de uma proteína contendo o aminoácido histidina que se acopla ao complexo sólido-IDA-Cu²⁺.

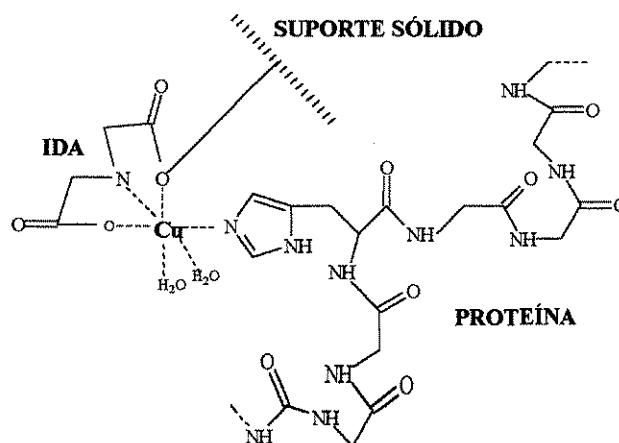


Figura 2: Sítio de ligação entre a proteína contendo histidina e o suporte sólido acoplado ao IDA-Cu²⁺.

Fonte: SILVA 1999.

Segundo SULKOWSKI (1985) os íons metálicos são altamente solvatados em uma solução aquosa como resultado da coordenação com moléculas de água (Figura 3). Neste processo o íon metálico pode ser considerado um ácido de Lewis (aceptor de par de elétrons) e a molécula de água como uma base de Lewis (doador de par de elétrons). A molécula de água pode ser substituída por uma base forte resultando em um complexo metálico (Figura 3b). O grupo combinado com o íon metálico é chamado ligante (átomo, ou grupo doador de elétrons). A substituição de um grupo doador de elétrons por outro é referida como troca de ligante, um átomo doador (N, S, O) com um par de elétrons livres constitui um ligante simples ou monodentado (Figura 3c). Quando dois ou mais átomos doadores estão presentes em uma molécula ligante, o ligante é polidentado e sua coordenação com o íon metálico resulta em um quelato metálico (Figura 3d). A ligação do íon metálico com o ligante é mais forte em um quelato metálico do que num complexo metálico (efeito quelato).

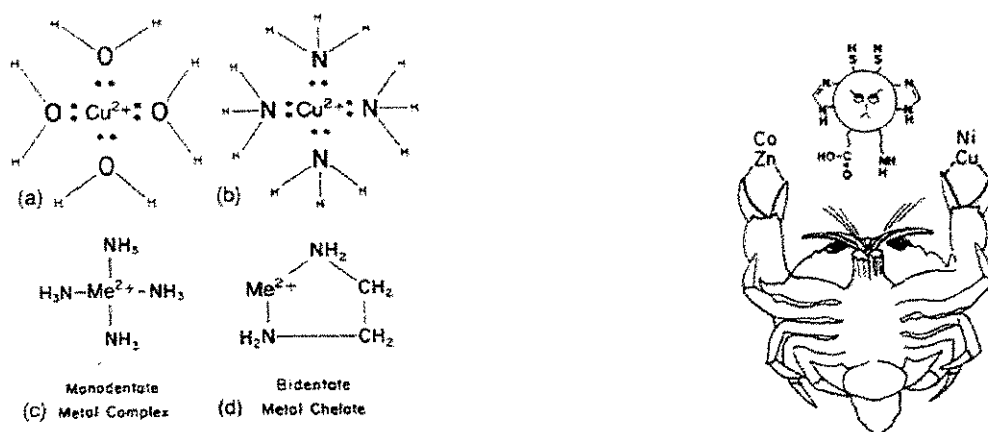


Figura 3: (a) Coordenação de íons metálicos com moléculas de água; (b) Complexo metálico; (c) Complexo metálico monodentado; (d) Quelato metálico. Fonte: SULKOWSKI (1985).

Aminoácidos formam quelatos estáveis com íons metálicos. Ambos grupos amino e carboxil dos aminoácidos participam na formação do quelato. Alguns aminoácidos (cisteína, histidina e triptofano) têm átomos doadores de elétrons em seus anéis. Peptídeos contendo resíduos de histidina formam compostos de coordenação muito mais estáveis com íons metálicos devido à participação do anel imidazol na quelação (SULKOWSKI, 1985).

Geralmente os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+} (metais de transição) são imobilizados em suportes, que são materiais modificados com um composto quelante tridentado (ácido iminodiacético – IDA), permitindo interações seletivas entre o complexo quelante- M^{2+} imobilizado com resíduos de histidina expostos na superfície da proteína. Deste modo a cromatografia de adsorção, seletivamente ocorre pelas propriedades da base doadora de Lewis pelo par de elétrons livres do nitrogênio ou pelos elétrons N- π do anel imidazol dos aminoácidos (CHUNG *et al.*, 1994; LABOUREAU *et al.*, 1996; KRONINA *et al.*, 1999).

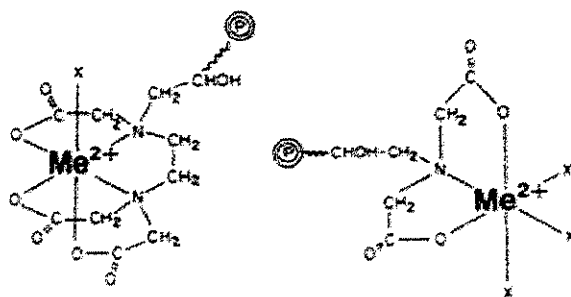


Figura 4: Disposição octaédrica de ligantes ao redor de um ion metálico central. Fonte: SULKOWSKI (1985).

De acordo com os autores PORATH *et al.* (1975), PORATH e OLIN (1983), PORATH (1985), PORATH (1988) e SUH e ARNOLD (1990) somente os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína podem ser considerados sítios primários da interação proteína-metal imobilizado. Estudos mais recentes mostraram que os resíduos de histidina disponíveis na superfície da biomolécula parecem ser os que irão formar o complexo metal-biomolécula mais estável (SULKOWSKI, 1985; PORATH, 1988; HEMDAN *et al.*, 1989; BELEW e PORATH, 1990; ZHAO *et al.*, 1991; MÜLLER *et al.*, 1998).

A Figura 5 representa a fórmula estrutural dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano.

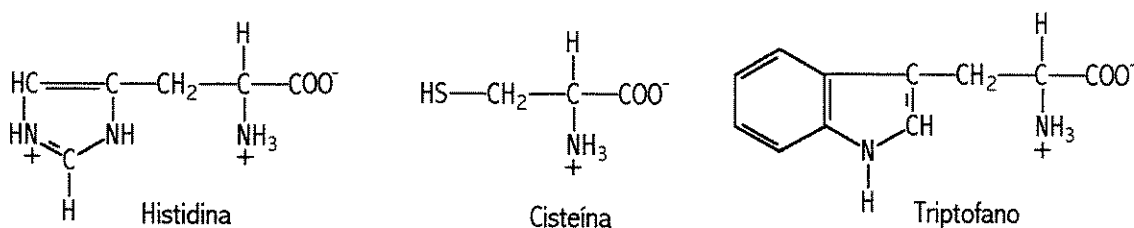


Figura 5: Fórmula estrutural dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano.

As principais vantagens do uso de metais como ligantes são:

- Podem ser reciclados diversas vezes com insignificante perda do comportamento;

- Elevada quantidade de metal imobilizado e conseqüente elevada capacidade para a proteína ser “atraída”;
- Relativa facilidade na eluição da proteína e regeneração do ligante;
- Baixo custo dos metais (ARNOLD, 1991);
- São estáveis na presença de diversos solventes e temperaturas;
- Sua interação com biomoléculas é específica e reversível (CHUNG *et al.*, 1994).

A Tabela 2 descreve alguns exemplos de proteínas purificadas por adsorção a metal imobilizado a suportes sólidos.

Tabela 2: Purificação de proteínas por adsorção (cromatografia) a metais imobilizados a suportes sólidos.

PROTEÍNA	METAL	REFERÊNCIA
<i>Proteínas do Plasma</i>	Fe ³⁺ , Ni ²⁺	PORATH e OLIN, 1983
<i>Fosfoproteínas</i>	Fe ³⁺	ANDERSSON e PORATH, 1986
<i>Lactato desidrogenase</i>	Fe ³⁺	CHAGA <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactoperoxidase</i>	Cu ²⁺	STEFANO <i>et al.</i> , 1994
<i>Colagenase</i>	Zn ²⁺	HARRIS e ANGEL, 1995
<i>Ascorbato Peroxidase de Soja</i>	Ni ²⁺	DALTON <i>et al.</i> , 1996
<i>Peptídeos Sintéticos</i>	Cu ²⁺	KRONINA <i>et al.</i> , 1999
<i>Dipeptidase</i>	Cu ²⁺	MAGBOUL e McSWEENEY, 1999(a)
<i>Fosfatase Ácida</i>	Cu ²⁺	MAGBOUL e McSWEENEY, 1999(b)
<i>Álcool Desidrogenase</i>	Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	WILLOUGHBY <i>et al.</i> , 1999
<i>β-Galactosidase</i>	Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺	CLEMMITT e CHASE, 2000(a)
<i>Glutatione-S-Transferase</i>	Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	CLEMMITT e CHASE, 2000(b)

2.4.1 - Interação entre Metais e Peroxidase

A interação direta de alguns metais como cálcio, cobre, zinco e manganês com a peroxidase é significativa nas propriedades e funções da enzima (BAKARDJIEVA *et al*, 1997). Foi verificado que o Ca^{2+} é um componente obrigatório da molécula de peroxidase contribuindo para a conformação próxima ao sítio ativo da enzima e à ligação heme (BARBER *et al*, 1995). A valência e raio iônico são suficientes para explicar os efeitos do metal na atividade total da peroxidase, mas para explicar os efeitos dos metais nas isoenzimas da peroxidase é necessário entender a preferência do ligante.

BAKARDJIEVA *et al.* (1997) usaram uma concentração final de cobre (CuSO_4) de $1,7 \times 10^{-4}$ M e mostraram que, à 20°C , a peroxidase de musgo apresenta perda de 6% da atividade, enquanto que à 60°C sofre perda de 29%.

TEISSEIRE e GUY (2000) estudaram as modificações na atividade de enzimas antioxidantes na presença de sulfato de cobre para determinar os efeitos da toxicidade do metal. Uma forte estimulação das atividades de guaiacol peroxidase e pirogallol peroxidase foram observadas com uma baixa concentração de cobre testada ($0,25 \mu\text{M}$). Quando a guaiacol peroxidase foi mantida em meio com alta concentração de CuSO_4 (5 a $10 \mu\text{M}$) foi observado um aumento de 240-280% em sua atividade, esta estimulação alcançou valores máximos entre 12 e 36 horas de exposição. A ascorbato peroxidase foi fracamente estimulada em baixa concentração de CuSO_4 e uma longa exposição conduziu à inibição de sua atividade acima de 40% depois de 96 horas de exposição em $1,6 \mu\text{M}$ de CuSO_4 .

2.5 – Suportes Sólidos

2.5.1 - Chelating Sepharose Fast Flow

Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF) é um material fabricado pela Amersham Pharmacia Biotech e tem a capacidade de reter seletivamente proteínas com histidina exposta quando um íon metálico adequado está imobilizado. Resíduos expostos de cisteína

e triptofano também podem estar envolvidos na ligação com o íon metálico imobilizado, mas a contribuição para a ligação é muito menor que a contribuição dos resíduos expostos de histidina. A força de ligação é afetada pelo pH do tampão e pelo íon metálico selecionado.

CSFF contém grupos do ácido iminodiacético acoplados a Sepharose Fast Flow (agarose com 6% de ligações cruzadas), por ligações éteres estáveis via um braço espaçador de sete carbonos (Figura 6).

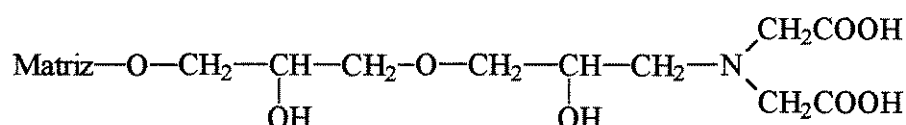


Figura 6: Estrutura parcial do adsorvente Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF).

CSFF é um adsorvente estável que pode ser usado com pH na faixa de 2 a 14. A capacidade de íons metálicos está entre 22 a 30 $\mu\text{moles M}^{2+}/\text{mL}$ de gel seco. A ligação dos íons metálicos na CSFF, usualmente ocorre na faixa de pH entre 5,5 a 8,5, e a ligação é muitas vezes mais forte nos pHs mais altos do intervalo (PHARMACIA).

Diversos autores usaram a CSFF para purificação de enzimas. WILLOUGHBY *et al.* (1999) purificaram a enzima álcool desidrogenase de levedura de pão clarificada usando um sistema de adsorção em leito empacotado com CSFF com os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , para determinar as condições ótimas de eluição da enzima usando EDTA e o íon que apresenta maior recuperação da enzima. As melhores condições obtidas em leito empacotado (íon Zn^{2+} e 5 mM de EDTA para a eluição) foram aplicadas em leito expandido empacotado com Streamline Chelating. O trabalho em leito expandido demonstrou que a enzima álcool desidrogenase foi eluída com uma recuperação de 80 a 100%, a qual foi reproduzida em cinco corridas consecutivas com um rigoroso procedimento de limpeza entre cada corrida.

MAGBOUL e McSWEENEY (1999(a)(b)) purificaram as enzimas dipeptidase e fosfatase ácida do *Lactobacillus curvatus* DPC2024. O adsorvente CSFF imobilizado com íons Cu^{2+} , foi usado como uma etapa na purificação das enzimas. Para a dipeptidase foi

obtido um fator de purificação de 72,6 vezes e um rendimento de 18,5% de atividade, e para a fosfatase ácida, um fator de purificação de 138,3 vezes e um rendimento de 32,2% de atividade.

2.5.2 – Lewatit TP 207

Lewatit TP 207 é um material fabricado pela Bayer AG, resina de poliestireno macroporosa (poros de 0,4 a 1,25 mm) de troca iônica fracamente ácida com grupos quelantes de ácido iminodiacético para a extração seletiva de cátions de metais pesados de soluções fracamente ácidas ou fracamente básicas. É um adsorvente estável que pode ser usado em intervalos de pH entre 1,5 a 9. A capacidade de íons metálicos está em 2,4 eq H⁺/L de resina (BAYER).

A Lewatit TP 207 tem uma boa estabilidade química e mecânica e é especialmente útil nas seguintes aplicações: remoção seletiva de traços de metais pesados de efluentes; concentração e extração de metais pesados de soluções hidrometalúrgicas, entre outras.

2.6 – Teoria da Adsorção em Leito Empacotado

2.6.1 - Isotermas de Adsorção

Segundo BURKERT (1998) nos processos de adsorção, a taxa que o soluto liga-se à superfície sólida deve exceder a taxa na qual o soluto deixa a superfície. Pode-se assumir que essas taxas são dependentes da concentração do soluto na solução e na superfície do sólido e curvas experimentais para determinar as constantes dessas relações são essenciais para predizer o comportamento de uma coluna de adsorção. Tais curvas são denominadas isotermas de adsorção. A isoterma de adsorção é uma parte essencial da modelagem da cinética de adsorção e, portanto, do projeto da coluna e sua eficiência.

Isotermas de adsorção típicas são mostradas na Figura 7, de acordo com BELTER *et al.* (1988). A abscissa dá a concentração do soluto na solução (C), usualmente em unidade de massa de soluto por volume de solução. A ordenada dá a capacidade de adsorção na superfície do adsorvente (Q), expressa como massa de adsorbato por volume de fase sólida do adsorvente. Uma isoterma côncava em relação à abscissa é favorável, e forte adsorção ocorre mesmo em soluções diluídas. Uma isoterma côncava em relação à ordenada é descrita como não-favorável.

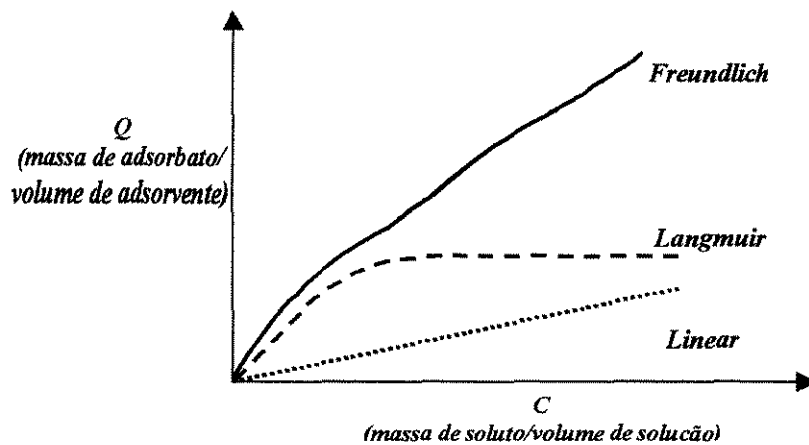


Figura 7: Isoterma de adsorção. “ C ” é a concentração de adsorbato na solução. “ Q ” é a capacidade de adsorção do adsorvente. Fonte: BELTER *et al.* (1988).

GOSLING *et al.* (1989) comentam que as equações mais usadas para descrever fenômenos de adsorção são as de Langmuir e de Freundlich.

A isoterma linear é dada por:

$$Q = k \cdot C \quad (1)$$

A isoterma de Freundlich descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides, hormônios, no entanto só é válida para soluções diluídas e não prediz a linearidade quando a concentração tende a zero. Devido à sua simplicidade, é uma das equações mais usadas para correlação de dados de adsorção (KAMIMURA, 2000). A Equação 2 descreve esta isoterma.

$$Q = k_f \cdot C^n \quad (2)$$

onde:

Q = capacidade de adsorção na fase sólida;

k_f = constante de equilíbrio de Freundlich;

C = concentração de adsorbato;

n = expoente, se 1 igual a linear, >1 convexa, <1 côncava.

GOSLING *et al.* (1989) mencionam que a isoterma de Langmuir foi inicialmente proposta para descrever a adsorção de gases sobre superfícies, mas pode ser aproximada para muitos sistemas, sendo bastante usada para descrever adsorção por afinidade e troca iônica de ions monovalentes. Esta isoterma considera um número finito de sítios ativos na superfície do sólido e a inexistência de interações soluto-soluto, resultando em uma monocamada de material adsorvido.

Segundo MOORE (1976) e ATKINS (1986) o modelo de Langmuir considera que a habilidade das partículas em ligar-se aos sítios da superfície independe do fato de sítios próximos estarem ou não ocupados.

A isoterma de Langmuir é expressa pela Equação 3.

$$Q = \frac{Q_m \cdot C}{K_D + C} \quad (3)$$

onde:

C = concentração de adsorbato;

Q = capacidade de adsorção na fase sólida;

Q_m = capacidade máxima de enzima que pode ser adsorvida na adsorvente;

K_D = constante de equilíbrio de Langmuir.

ATKINS (1986) comenta que a isoterma de Langmuir ignora a possibilidade que a camada inicial de material adsorvido possa agir como adsorvente. Caso contrário, pode-se esperar que a curva aumente indefinidamente, não tendendo à saturação. É o que propõe o modelo multicamadas de Brunauer, Emenet e Teller (Modelo BET).

2.6.1.1 – Isoterma de Langmuir

Considerando a ligação de uma proteína num único sítio de adsorção do ligante, tem-se uma reação da forma:



onde PL é o complexo formado entre a proteína e o ligante e k_A ($M^{-1}s^{-1}$) e k_D (s^{-1}) são as constantes de associação e dissociação do complexo PL, respectivamente.

As concentrações de proteína, do ligante e do complexo proteína-ligante são designados como C (mg/mL), $(Q_m - Q)$ e Q (mg/g ou mg/mL), respectivamente. Q_m é a capacidade máxima de adsorção do suporte.

Da Equação 4, obtém-se a seguinte equação da taxa de segunda ordem:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = k_A C(Q_m - Q) - k_D Q \quad (5)$$

Assumindo que o equilíbrio é rapidamente alcançado devido a rápida cinética de ligação entre a proteína e o ligante, tem-se:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = 0 \quad (6)$$

Então:

$$Q = \frac{K_D C Q_m}{1 + K_D C} \quad (7)$$

onde $K_D = k_D/k_A$ é a constante de dissociação do complexo PL. Q é a capacidade de adsorção do suporte em equilíbrio com C, a concentração de proteína em solução. A Equação 7 é conhecida como a Equação de Langmuir. Este modelo descreve o comportamento da adsorção de uma proteína pura.

Os parâmetros Q_m e K_D da Equação de Langmuir podem ser determinados a partir das linearizações da Equação 7.

$$\frac{1}{Q} = \frac{K_D}{Q_m} \frac{1}{C} + \frac{1}{Q_m} \quad (8)$$

$$\frac{C}{Q} = \frac{1}{Q_m} C + \frac{K_D}{Q_m} \quad (9)$$

$$\frac{Q}{C} = -\frac{1}{K_D} Q + \frac{Q_m}{K_D} \quad (10)$$

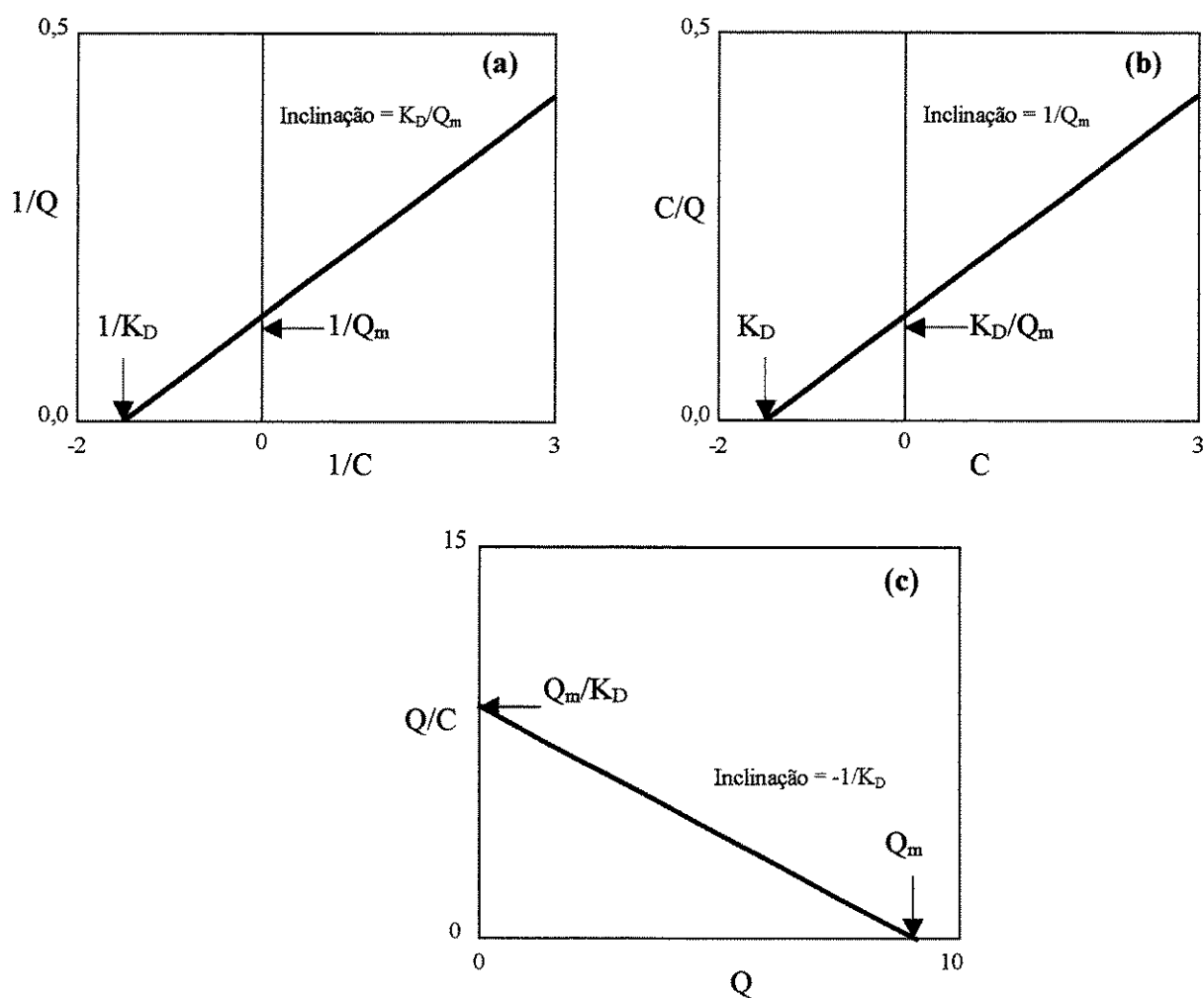


Figura 8: Linearizações de Langmuir para calcular a capacidade máxima de adsorção, Q_m e a constante de equilíbrio, K_D . (a) Equação 8, (b) Equação 9 e (c) Equação 10.

Para aplicar a isoterma de Langmuir algumas suposições devem ser consideradas:

- As moléculas são adsorvidas em sítios definidos e localizados;
- Cada sítio pode acomodar somente uma molécula (formação de uma monocamada);
- Não deve haver interação entre as moléculas adsorvidas.

De acordo com VUNNUM *et al.* (1998) diversos pesquisadores tem aplicado a isoterma de Langmuir para descrever sistemas CAIMI. Esses autores desenvolveram um modelo matemático para prever a adsorção não-linear de proteínas em sistemas CAIMI.

2.6.2 – Curvas de Ruptura (“Breakthrough Curves”)

Em colunas de leito empacotado, a adsorção do soluto no adsorvente pode ser descrita pelas curvas de ruptura, obtidas experimentalmente (BURKERT, 1998).

Neste experimento, é admitido que o soluto é aplicado à coluna com concentração constante, e o leito está sem material adsorvido. A concentração na saída da coluna é medida em função do tempo ou volume na saída da coluna, como mostrado esquematicamente na Figura 9. Esta concentração é inicialmente zero e permanece pequena por certo tempo, pois a maior parte do soluto é adsorvida. Em seguida, aumenta abruptamente, eventualmente atingido a concentração de alimentação. Quando este aumento brusco ocorre, ou ruptura, o fluxo é interrompido.

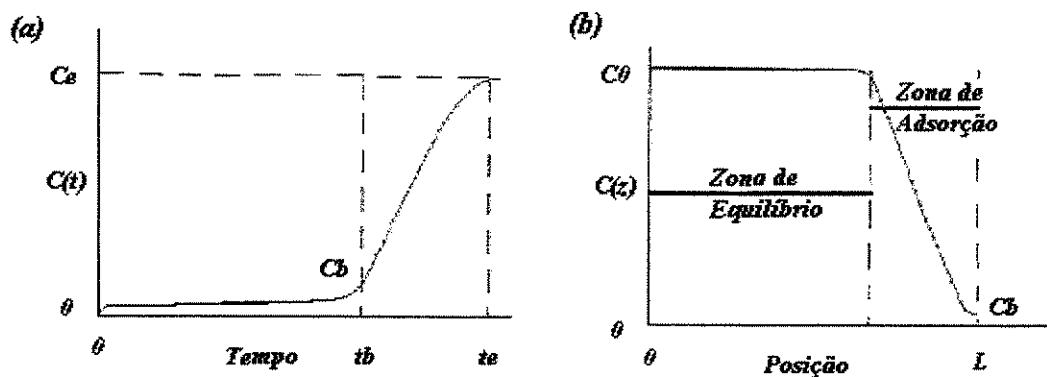


Figura 9: (a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. “ C_b ” é a concentração de ruptura. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura (t_b). Fonte: BELTER *et al.* (1988).

Para caracterizar esta curva, escolhe-se duas concentrações: a concentração de ruptura C_b , representa o máximo que se pode descartar; a concentração de exaustão C_e , correspondente à concentração no eluente quando o leito é julgado ineficaz. Essas duas

concentrações são arbitrárias, sugerindo-se C_b e C_e como 10 e 90% da concentração de alimentação (C_0), respectivamente.

Segundo FOUST *et al.* (1982) esta representação gráfica da concentração de saída em função do tempo é bastante semelhante à representação gráfica em pontos ao longo do leito, durante o ciclo de adsorção.

Na Figura 9b está representado o comportamento da concentração de soluto ao longo da coluna, no tempo de ruptura. A zona de equilíbrio é onde o leito está saturado. Esta zona existe de $Z=0$ a $Z=L(1-\Delta t/t_b)$, onde $\Delta t=t_e-t_b$. Na zona onde ocorre adsorção tem-se $L-\Delta t/t_b$, sendo que o soluto está sendo transferido da solução de alimentação para o adsorvente. Essa zona de transferência de massa move-se regularmente ao longo da coluna, mantendo o mesmo perfil.

A análise do processo é complexa, devido à adsorção não-linear instável, conseqüência da não-homogeneidade no leito fixo de partículas, este de difícil reprodutibilidade.

A influência da forma da curva de ruptura no desempenho da adsorção em leitos fixos é mostrada na Figura 10. A capacidade total dos leitos é a mesma em ambos os casos. As áreas hachuradas indicam a quantidade de adsorbato retido no leito para $C/C_0=0,1$, portanto, a capacidade da coluna utilizada. Observa-se que a curva “b”, com melhor desempenho, apresenta-se íngreme. Conforme FOUST *et al.* (1982) o coeficiente angular é uma função da velocidade de adsorção, sendo que um soluto que é adsorvido muito rapidamente resulta em uma curva quase vertical, aproximando-se de uma função degrau.

A capacidade máxima da coluna para uma dada concentração de entrada é igual à área acima da curva de ruptura e a quantidade de soluto remanescente no efluente é igual à área abaixo da curva. CHASE (1984) define a eficiência de adsorção como:

$$Eficiência = \frac{Quantidade\ de\ adsorbato\ retida\ pelo\ leito}{Quantidade\ de\ adsorbato\ aplicada\ no\ leito} \cdot 100 \quad (11)$$

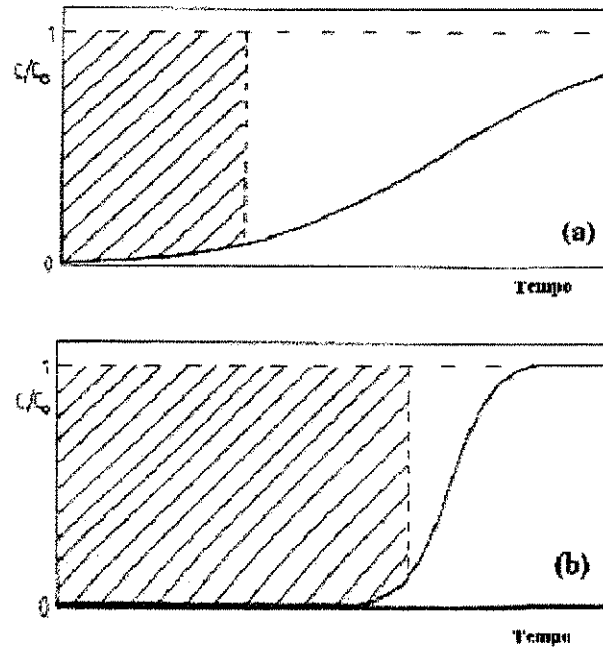


Figura 10: Influência do formato da curva de ruptura no desempenho de colunas de leito fixo. A área hachurada mostra a quantidade de adsorbato que seria adsorvido na coluna, se o carregamento terminasse quando C/C_0 atinge o valor de 0,1. (a) Tipo de curva obtida em coluna empacotada. (b) Curva com inclinação mais acentuada, obtida na mesma coluna, com alteração das condições operacionais. Fonte: CHASE (1984).

De acordo com CHASE (1984) é importante considerar os fatores que influenciam na forma e posição da curva de ruptura na análise da adsorção em leito empacotado para aumentar a eficiência. Estes fatores são:

- Fluxo baixo: aumenta o tempo que o adsorbato está em contato com o adsorvente;
- Alta concentração de adsorbato: assegura que a capacidade total do adsorvente é utilizada;
- Capacidade total do leito alta: a presença de muitos sítios de ligação resultará em muito adsorbato sendo retido pelo leito;
- Baixa densidade do ligante imobilizado: a densidade do ligante imobilizado é definida como a quantidade de ligante por unidade de volume de adsorvente estável. Se a capacidade total do leito foi mantida constante mas a densidade na qual o ligante está imobilizado é reduzida, o tamanho do leito aumenta proporcionalmente. Se o fluxo volumétrico permanece constante, o tempo de

residência do adsorbato no leito aumenta e então aumenta a retenção do adsorbato pelo leito.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Os reagentes e sais utilizados nos experimentos foram adquiridos conforme descrito a seguir: as cascas de soja da Ceval (Rio Grande do Sul), os sais padrão P.A. da Synth, a resina “Chelating Sepharose Fast Flow” e o kit de marcadores moleculares LMW da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia), a resina “Lewatit TP 207” da Bayer AG (Leverkusen, Alemanha), as peroxidases padrão de soja e de nabo (horseradish) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

3.2 - Extrato Bruto de Peroxidase da Casca da Soja

O extrato bruto de peroxidase da casca da soja foi preparado a partir de dois materiais: da casca da soja gentilmente cedida pela Ceval e da casca da soja fresca (retirada do grão horas antes da extração). Quinhentas gramas de casca de soja foram desengorduradas com 1000 mL de n-hexano, sob agitação magnética por uma hora à 4°C. A seguir o extrato foi filtrado para separação do n-hexano e gordura e as cascas foram secas ao ar por uma hora. As cascas foram pesadas novamente e foi adicionado 1000 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. A extração foi feita à 4°C por duas horas, a cada vinte minutos usou-se um pistilo para agitar a massa de casca e tampão. O extrato foi

centrifugado à 4°C por 10 minutos a 6.000g e filtrado em papel Whatman nº1. O sobrenadante foi mantido à 4°C.

A concentração do extrato bruto de peroxidase da casca da soja foi padronizada como a massa de casca pesada por volume de tampão usado para a extração da enzima.

3.3 - Determinação da Atividade Enzimática da Peroxidase

A atividade enzimática da peroxidase do extrato bruto da casca da soja foi determinada de acordo com BURDON e VAN KNIPPENBERG (1985) pelo seguinte método: foram adicionados a uma alíquota de 3000 µL de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 4,5, 100 µL de guaiacol 1% (v/v) alcoólico e 50 µL do extrato bruto de peroxidase da casca da soja. A reação foi iniciada pela adição de 40 µL de peróxido de hidrogênio 0,08 M, e a absorbância da solução foi medida no Espectrofotômetro GBC 911A à 436 nm, contra branco ar. Os valores de absorbância foram anotados por cinco minutos em intervalos de um minuto. A Equação 12 foi utilizada para cálculo:

$$AE = \frac{V}{v} \cdot \frac{I}{a \cdot b} \cdot A / \text{min} \quad (U/mL) \quad (12)$$

onde:

V = volume final;

v = volume da enzima adicionada;

A = absorbância/minuto;

a = coeficiente de extinção do produto (6,4 cm²/µmole);

b = caminho óptico.

Uma unidade de atividade de peroxidase (U) representa a quantidade de enzima catalisando a oxidação de 1 µmol de guaiacol em 1 minuto a 25°C (LIU *et al.*, 1999).

3.4 - Determinação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de SEDMAK e GROSSBERG (1977). Este método está fundamentado na reação colorimétrica entre os grupos aromáticos da proteína e o corante azul brilhante de Coomassie em meio ácido (BRADFORD, 1976). A técnica está descrita a seguir:

O corante azul brilhante de Coomassie G250 0,06% (p/v) foi diluído em HCl 2,2% (v/v). Esta solução foi agitada por duas horas e filtrada em papel Whatman nº1. O filtrado foi lido em espectrofotômetro à 465 nm e a absorbância deveria estar entre 1,3 e 1,5. Esta solução foi estocada em temperatura ambiente.

Construiu-se uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) com massas entre 20 e 140 µg.

3.5 - Atividade Específica da Peroxidase ($AE_{\text{peroxidase}}$)

A atividade específica da peroxidase do extrato bruto da casca da soja foi definida como a relação entre a atividade da enzima (U/mL) e a concentração total de proteínas (mg/mL) e foi expressa em U/mg de proteína (Equação 13).

$$AE_{\text{peroxidase}} = \frac{\text{Atividade Enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de Proteínas Totais (mg/mL)}} \quad (13)$$

3.6 – Cinética da Extração da Peroxidase

Foram pesadas dez gramas da casca da soja previamente desengorduradas com n-hexano (conforme descrito no item 3.1). Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. A extração foi feita à 4°C com agitação magnética por duas horas. A cada vinte minutos foram tiradas alíquotas de 1,5 mL do caldo, estas foram centrifugadas à

4°C por 10 minutos a 6000 g. No sobrenadante foi determinada a atividade de peroxidase realizada em duplicata.

3.7 – Determinação do pH Ótimo da Enzima

O pH ótimo da enzima foi investigado, usando tampão citrato-fosfato 0,05 M, na faixa de pH entre 4,0 e 8,0 a 25°C, para determinação da atividade enzimática.

3.8 – Estabilidade da Enzima Frente a pH

A estabilidade da peroxidase do extrato bruto da casca da soja frente a pH foi investigada a 25°C em tampão citrato-fosfato 0,05 M, na faixa de pH entre 4,5 e 8,5 e em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,01 M de sulfato de cobre, na faixa de pH entre 5,9 e 8,5 (intervalos de pH definidos a partir da aplicação em CAIMI, que recomenda o uso desta faixa de pH quando se trabalha com afinidade a metais). O caldo enzimático foi incubado nos diferentes tampões: no tampão citrato-fosfato, quatro horas de incubação e no tampão fosfato de sódio, oito horas de incubação. A medida da atividade enzimática foi feita em intervalos de uma hora.

3.9 – Determinação da Temperatura Ótima da Enzima

O estudo foi feito na faixa entre 20 a 55°C, em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 4,5. Foi usado um banho termostatizado para manter a temperatura desejada no interior da cubeta, onde acontece a reação.

3.10 - Estabilidade da Enzima Frente à Temperatura

Foi estudada a estabilidade da peroxidase do extrato bruto da casca da soja frente às temperaturas 1, 10, 22, 37, 46 e 55°C, em tampão citrato-fosfato 0,05 M a pH 4,5. A enzima foi incubada por três horas em cada temperatura. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados a 25°C em intervalos de uma hora.

3.11 – Imobilização de Íons Cu^{2+} em CSFF

A imobilização de íons Cu^{2+} no adsorvente Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF) foi feita usando a centrífuga JOAN MR-1812 para a lavagem da resina a 1200g. A resina foi lavada duas vezes com água destilada para remoção de etanol usado para estocagem e em seguida lavada duas vezes com solução de sulfato de cobre 0,1 M ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Novamente o material foi lavado com água destilada, cinco vezes, para remover o excesso de íons cobre e este equilibrado com tampão fosfato de sódio 0,1 M, no pH do ensaio, após duas lavagens.

Para a regeneração do adsorvente, de acordo com as instruções do fabricante, foi necessário lavá-lo dez vezes com solução de EDTA 0,05 M contendo 0,5 M NaCl, a seguir três vezes com água destilada e estocado em etanol 20% à 4°C.

3.12 – Cinética de Adsorção para o Sistema Peroxidase-CSFF-IDA- Cu^{2+}

A cinética de adsorção da enzima no complexo CSFF-IDA- Cu^{2+} , foi acompanhada por 60 minutos a 25°C, em frascos agitados a 180 rpm. Foi usado 1 mL de gel, 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 8,0 e 9,0 mL do caldo enzimático, de concentração 25 mg casca de soja/mL. As alíquotas coletadas a cada cinco minutos foram centrifugadas. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade enzimática.

A capacidade de adsorção (Q) do complexo para o sistema Peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺ foi dada pela Equação 14.

$$Q = \frac{v \cdot (AE_0 - AE^*)}{V_{ads}} \text{ (U/mL adsorvente)} \quad (14)$$

onde:

v = volume da fase líquida (mL);

AE_0 = atividade enzimática inicial (antes da adsorção) (U/mL);

AE^* = atividade enzimática no equilíbrio (U/mL);

V_{ads} = volume de adsorvente (U/mL).

3.13 – Influência do pH na Adsorção da Peroxidase em CSFF-IDA-Cu²⁺

Foi pesado em Ependorff de 2,0 mL, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg de CSFF-IDA-Cu²⁺ e foi adicionado 1,0 mL de extrato bruto de peroxidase da casca da soja em tampão fosfato de sódio, nos pHs 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5 a 25°C. Após dez minutos de agitação a 180 rpm, as amostras foram centrifugadas e foi determinado no sobrenadante atividade de peroxidase e proteínas totais.

3.14 - Isoterma de Adsorção

A isoterma para a adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, foi investigada em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 8,0.

Foram construídas isotermas para a peroxidase do extrato bruto da casca da soja, peroxidase de soja padrão e peroxidase de nabo padrão, as duas últimas obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Em tubos de Ependorff de 2,0 mL foram adicionados 0,5 mL de adsorvente e 1,0 mL do caldo de peroxidase.

Partindo do extrato bruto da casca da soja com concentração de 500 mg/mL, foram preparadas as concentrações iniciais de 25 até 250 mg de casca de soja/mL para a peroxidase da casca da soja. Para as peroxidases padrões, as concentrações iniciais variaram de:

- 25 até 250 µg/mL para a peroxidase de nabo Sigma;
- 4,2 até 25 µg/mL para a peroxidase de soja Sigma.

Os Ependorffs foram imobilizados na horizontal em uma placa de agitação com fita adesiva, e o ensaio foi realizado a 25°C, com agitação de 250 rpm por 20 minutos. Após este tempo alíquotas foram retiradas e centrifugadas por 5 minutos, no sobrenadante foi determinada a atividade de peroxidase. Todos os ensaios foram feitos em duplicata e usados os valores médios na construção dos gráficos.

3.15 – Curvas de Ruptura (“Breakthrough Curves”)

As curvas de ruptura foram construídas em coluna cromatográfica HR 5/5 da Pharmacia no sistema “Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC” (Figura 11). Neste método de operação em coluna empacotada a amostra é alimentada continuamente na coluna até que a capacidade máxima da coluna seja esgotada e o adsorbato comece a aparecer na saída da coluna. A concentração de adsorbato na saída da coluna varia em função do tempo e é conhecida como curva de ruptura (“breakthrough curve”).

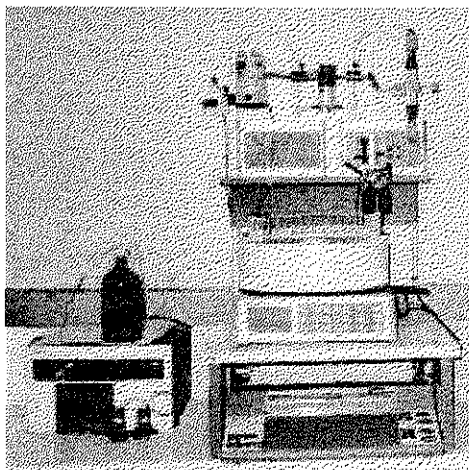


Figura 11: Sistema “Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC” utilizado para o estudo da adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja na coluna HR 5/5.

O extrato bruto da casca da soja centrifugado e filtrado em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, foi aplicado na coluna empacotada com $1,0\ \text{mL}$ do adsorvente CSFF-IDA- Cu^{2+} até a saturação ($C/C_0=1$) com um fluxo de $0,2\ \text{mL}/\text{min}$. Foram coletadas amostras de $1,0\ \text{mL}$ para a quantificação, através da determinação de atividade enzimática e proteínas totais para o acompanhamento da etapa de adsorção até atingir a saturação da coluna. Foram testados os pHs 6,0, 7,0 e 8,0 na construção das curvas.

A eficiência de recuperação do soluto foi calculada através da Equação 11.

3.16 – Purificação da Peroxidase do Extrato Bruto da Casca da Soja

A purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja foi realizada em coluna cromatográfica HR 5/5 da Pharmacia empacotada com $1,0\ \text{mL}$ do adsorvente CSFF-IDA- Cu^{2+} no sistema “Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC” (Figura 11), com um fluxo de $0,2\ \text{mL}/\text{min}$.

Foram realizados três diferentes ensaios usando a mesma seqüência de procedimentos: O leito foi equilibrado com tampão A em dez volumes de coluna. Foram aplicados quinze volumes de coluna de extrato bruto de peroxidase da casca da soja centrifugado e filtrado em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ (no primeiro ensaio foram usados vinte e

cinco volumes de extrato bruto). Depois a coluna foi lavada com vinte e três volumes de coluna de tampão A (no primeiro ensaio foram usados dez volumes de coluna de tampão A na lavagem), em seguida foi iniciada a eluição com vinte volumes de coluna de tampão B. Foram coletadas amostras de 1,0 mL para a determinação de atividade enzimática e proteínas totais para o acompanhamento das etapas de adsorção, lavagem e eluição.

Primeiro Ensaio:

Tampão A: tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0;

Tampão B: tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 contendo 10 mM EDTA;

Foram aplicados 25 mL de extrato bruto com 80,3 U de atividade de peroxidase e 24,7 mg de proteínas totais, preparados a partir de 6,3 g de casca de soja.

Segundo Ensaio:

Tampão A: tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0;

Tampão B: tampão acetato 0,05 M, pH 4,5 contendo 50 mM EDTA;

Foram aplicados 15 mL de extrato bruto com 59,3 U de atividade de peroxidase e 11,5 mg de proteínas totais, preparados a partir de 1,5 g de casca de soja.

Terceiro Ensaio:

Tampão A: tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0;

Tampão B: tampão acetato 0,05 M, pH 4,5 contendo 50 mM EDTA;

Foram aplicados 15 mL de extrato bruto com 71,7 U de atividade de peroxidase e 8,4 mg de proteínas totais, preparados a partir de 1,5 g de casca de soja.

O fator de purificação (PF) foi definido como a relação entre a atividade específica da peroxidase depois de uma etapa de purificação e a atividade específica inicial do extrato (desde o extrato bruto de peroxidase ou desde a etapa de purificação) (FROUND, 1995; SILVA *et al.*, 1997) (Equação 15).

$$PF = \frac{AE_{\text{peroxidase}} \text{ determinada etapa}}{AE_{\text{peroxidase}} \text{ inicial}} \quad (15)$$

O rendimento (R) foi definido como a relação entre a atividade de peroxidase obtida após o processo de extração e a atividade total de peroxidase adicionada ao sistema (Equação 16).

$$R(\%) = \frac{\text{Atividade de peroxidase na fase}}{\text{Atividade total de peroxidase adicionada ao sistema}} \quad (16)$$

3.17 – Adsorção em Batelada

Foram realizados ensaios de adsorção em batelada visando a aplicação industrial. Foram usadas as resinas “Chelating Sepharose Fast Flow” e “Lewatit TP 207” com íons cobre imobilizados, para verificar a eficiência da adsorção.

A adsorção foi acompanhada por uma hora a 25°C, em frascos agitados a 200 rpm. Em frascos de Erlenmeyer foram adicionados à uma alíquota 1,5 mL de resina equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1M nos pH 6,0 e 8,0, 12,0 mL de extrato bruto de peroxidase da casca da soja com concentração de 0,1 g casca de soja por mL de tampão de extração, com 56,1 U de atividade de peroxidase e 9,57 mg de proteínas totais. Após 60 minutos de agitação as alíquotas foram centrifugadas por cinco minutos a 6.000 g. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade enzimática e proteínas totais. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.18 – Eletroforese SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi executada em um gel de separação homogêneo 12% (LAEMMLI, 1970; ANDREWS,

1986). Os padrões de massa molar usados foram fosforilase b (97 KDa), albumina do soro bovino (66 KDa), albumina de ovo (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor tripsina de soja (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa).

A eletroforese foi desenvolvida por 210 minutos a voltagem de 60 V até as proteínas atingirem o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada para 100 V no equipamento Mini-Protean da Bio-Rad de acordo com as instruções do fornecedor.

A coloração dos géis foi realizada em 12 horas com solução de Azul de Coomassie R250 0,1% (p/v) em 40% de metanol e 10% ácido acético (v/v) (ANDREWS, 1986). A solução descorante usada foi de 10% ácido acético e 40% metanol (v/v).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram feitas várias extrações de peroxidase com diferentes lotes de casca de soja nas condições ótimas de pH e temperatura. Foi observado uma variação na atividade enzimática dependendo da concentração da casca da soja no extrato, do lote da casca da semente de soja usado e das condições de armazenamento da casca. A Tabela 3 descreve a variação na atividade enzimática e nas proteínas totais presentes nos diferentes lotes de casca da soja.

Tabela 3: Atividade enzimática e proteínas totais nos diferentes lotes de casca da soja.

FONTE DE PEROXIDASE	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA		PROTEÍNAS TOTAIS	ATIVIDADE ESPECÍFICA
	g casca/mL tampão	U/mL	U/g casca	mg/mL	U/mg
<i>Casca da Soja Fresca</i>	0,1	26,7	5.330	Nd	Nd
<i>Casca da Soja Ceval (Lote março/2000)</i>	0,5	36,4	1.480	2,0	17,9
<i>Casca da Soja Ceval (Lote dezembro/2000)</i>	0,5	18,8	750	3,7	5,1

Nd = não determinado.

Quando a peroxidase foi extraída da casca da semente de soja descascada no laboratório, foi obtida a concentração de atividade de peroxidase de 26,7 U/mL com uma concentração de 0,1 g de casca de soja por mL de tampão de extração. Para obtenção de

36,4 U/mL de atividade de peroxidase na casca de soja Ceval foi necessário aumentar 80% a concentração do extrato, ou seja, 0,5 g de casca de soja por mL de tampão de extração. Isto significa que quanto mais fresca estiver a casca da semente de soja, maior será a atividade de peroxidase neste extrato. As condições de transporte, tempo e local de armazenamento do lote de casca de soja podem estar interferindo diretamente na atividade de peroxidase da casca da soja.

Para verificar se a peroxidase do extrato bruto da casca da soja é solúvel em meio aquoso, foi acompanhada a cinética da extração da enzima. A Figura 12 representa a cinética da extração da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em duas horas.

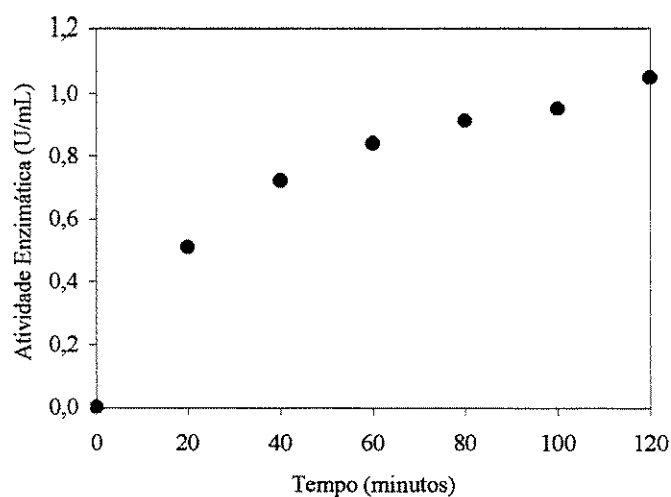


Figura 12: Cinética da extração da peroxidase.

Através da Figura 12 podemos verificar que maiores tempos de extração melhoraram a extração da enzima tendendo ao equilíbrio, indicando que a peroxidase do extrato bruto da casca da soja é solúvel em meio aquoso. GILLIKIN e GRAHAM (1991) relataram que a peroxidase do extrato bruto da casca da soja representa uma porção significativa do total de proteínas solúveis da casca da semente de soja.

4.1 – Caracterização da Enzima Frente a pH e Temperatura

A peroxidase do extrato bruto da casca da soja apresentou máxima atividade de peroxidase a pH 4,5 (Figura 13). Não houve redução significativa na atividade de peroxidase no intervalo de pH entre 5,0 e 6,0. Foi observada uma redução na atividade inferior a 20% para pH entre 6,0 e 7,0 e para o pH 8,0 foi verificada uma redução de 45% na atividade de peroxidase.

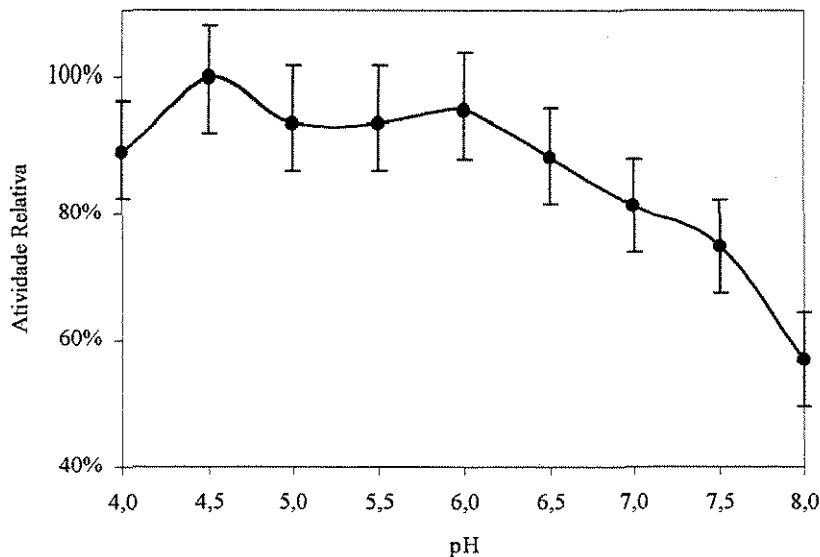


Figura 13: pH ótimo de atividade de peroxidase.

Todas as leituras, para cada pH, foram realizadas em duplicata e foi utilizado para a confecção do gráfico o valor médio das duplicatas com um desvio padrão de 0,7 U/mL (equivalente a 7,4%). Quando as duplicatas apresentavam valores duvidosos o teste era repetido para ser obtido um valor mais confiável, sempre usando o valor médio para se tirar qualquer conclusão.

A estabilidade da peroxidase do extrato bruto da casca da soja no intervalo de pH entre 4,5 e 8,5 foi investigada em tampão citrato-fosfato 0,05 M (Figura 14), e no intervalo de 5,9 a 8,5 em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,01 M de sulfato de cobre

(Figura 15). As amostras foram pré-incubadas nestes pHs por quatro horas, no tampão citrato-fosfato, e oito horas, no tampão fosfato de sódio, e a seguir teve o pH reajustado a 4,5 (pH ótimo) para fazer o ensaio de atividade enzimática.

A Figura 14 mostra que a peroxidase do extrato bruto da casca da soja é estável por até quatro horas em intervalos de pH entre 5,5 e 8,5, não importando o tempo em que foi pré-incubada. Entretanto, foi observada uma redução significativa de 20% na primeira hora de incubação a pH 4,5 (pH ótimo de sua atividade), a qual decresceu quase que linearmente com o tempo de incubação.

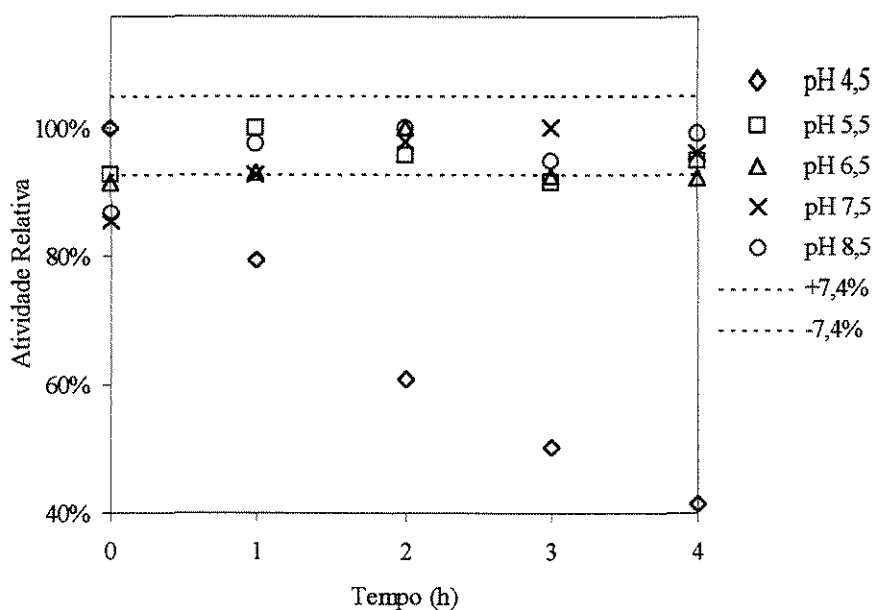


Figura 14: Estabilidade da peroxidase em tampão citrato-fosfato 0,05 M, em diferentes pHs.

A estabilidade da peroxidase na presença de sal de cobre foi investigada com o objetivo de verificar sua resistência em condições de um possível processo industrial. Assim, quando o caldo foi pré-incubado na faixa de pH de 5,9 e 8,5, em tampão contendo sulfato de cobre por oito horas, a atividade enzimática foi preservada na faixa de pH entre 5,9 e 7,3 e no pH 8,5 a atividade permaneceu estável por até seis horas (Figura 15).

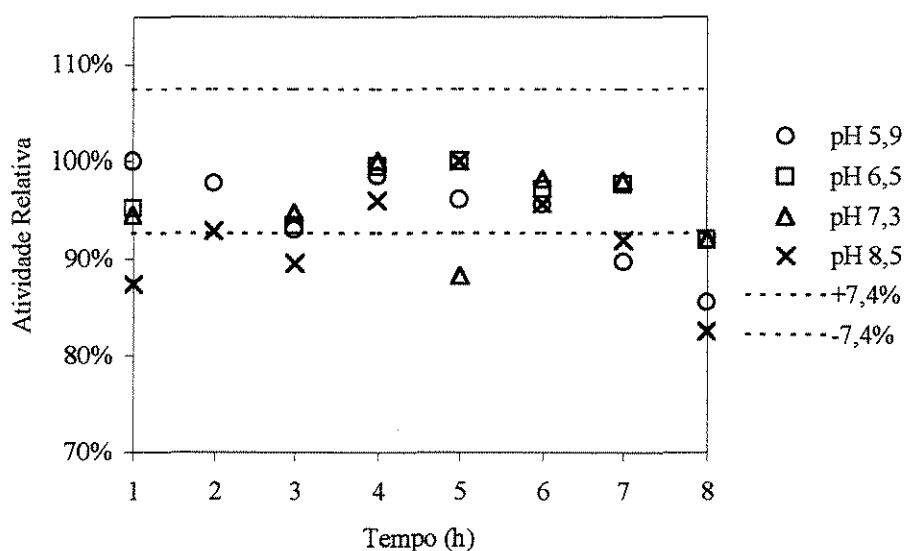


Figura 15: Estabilidade da peroxidase em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,01 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, em diferentes pHs.

Para fazer o estudo de temperatura ótima de atividade peroxidásica usou-se um banho termostático para manter estável a temperatura no interior da cubeta do espectrofotômetro, pode-se afirmar que a peroxidase do extrato bruto da casca da soja apresentou uma temperatura ótima entre 40° e 55°C (Figura 16) e manteve-se estável frente às temperaturas de 1°, 10°, 22°, 37°C, 46° e 55°C por até duas horas (Figura 17).

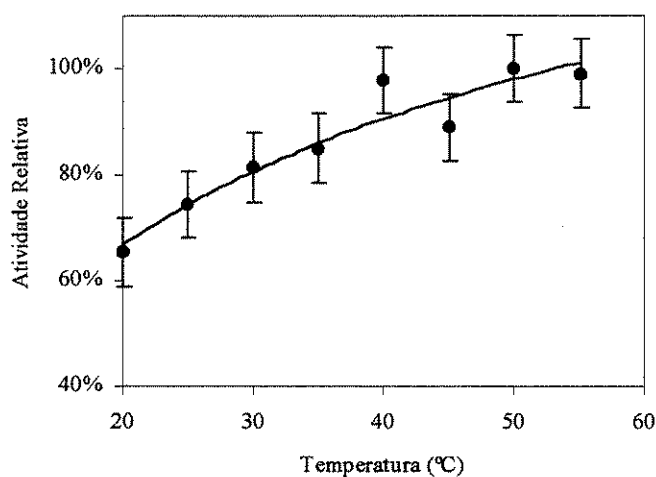


Figura 16: Temperatura ótima de atividade de peroxidase.

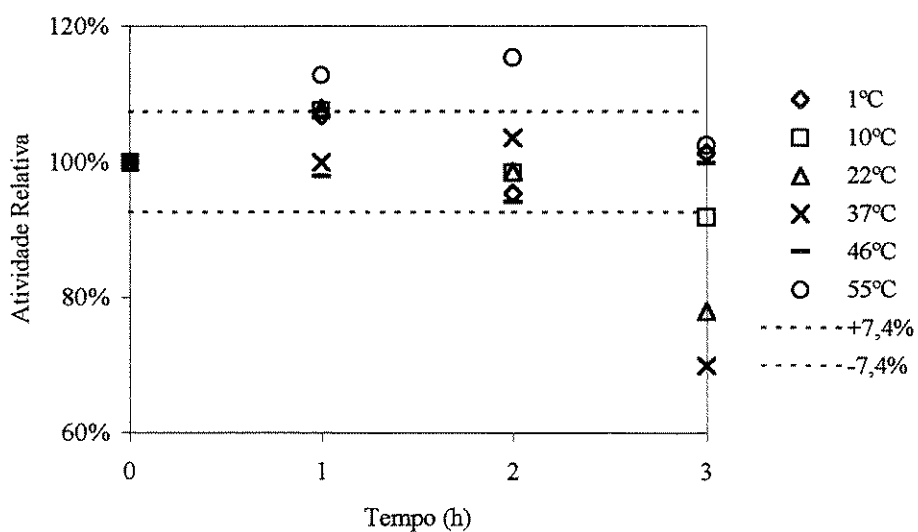


Figura 17: Estabilidade da peroxidase em diferentes temperaturas.

Foi observado na Figura 16 uma tendência de aumento de atividade com o aumento da temperatura de incubação, ou seja, em temperaturas maiores que 55°C. A Figura 17 indica que à 55°C a peroxidase do extrato bruto da casca da soja foi de 115% em duas horas, indicando que nesta temperatura a sua atividade foi máxima.

A Tabela 4 compara trabalhos que realizaram estudos de caracterização de diferentes peroxidases de soja frente a pH e temperatura.

Tabela 4: Caracterização da peroxidase EBCS frente a pH e temperatura com dados da literatura.

FORTE DE PEROXIDASE	pH ÓTIMO	pH DE ESTABILIDADE	TEMPERATURA ÓTIMA	TEMPERATURA DE ESTABILIDADE	REFERÊNCIAS
Grão de Soja	5,5	4,6 – 6,7	40° C	55° C	SESSA e ANDERSSON (1981)
Casca da Soja	4,6	2,5 – 11,5	45° C	Nd	LIU <i>et al.</i> (1999)
Casca da Soja	4,5	5,5 – 8,5	55° C	1° – 55° C	Este trabalho

Nd = não determinado.

4.2 - Cinética de Adsorção do Sistema Peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺

O tempo necessário para a peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorver no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, foi investigado em até 60 minutos. A Figura 18 representa a cinética em 60 minutos, podendo ser observado que nos primeiros dez minutos de contato entre peroxidase e o complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, os sítios para interação foram ocupados, em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 8,0, tampão que houve a melhor seletividade entre a adsorção de atividade de peroxidase e proteínas totais, a 25 °C.

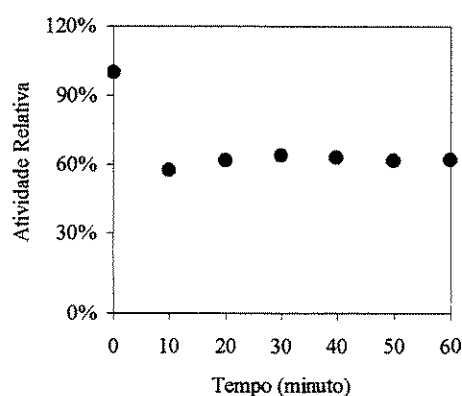


Figura 18: Cinética de Adsorção para o sistema Peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺ em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0 à 25°C.

Através do estudo cinético, foi possível verificar que existe a formação do complexo entre a peroxidase do extrato bruto da casca da soja e o sistema CSFF-IDA-Cu²⁺, apesar da elevada contaminação por outras proteínas.

4.3 – Influência do pH na Adsorção da Peroxidase em CSFF-IDA-Cu²⁺

Foi estudada a influência do pH na adsorção da enzima e das proteínas contaminantes presentes no extrato de soja pelo complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Tabela 5).

Tabela 5: Estudo do pH na adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja e as proteínas contaminantes em CSFF-IDA-Cu²⁺ em tampão fosfato de sódio 0,1M à 25°C.

pH	QUANTIDADE ADSORVIDA (%)	
	PEROXIDASE	PROTEÍNAS TOTAIS
6,0	51,4	> 100,0
7,0	27,1	83,0
7,5	13,4	64,2
8,0	41,1	43,1
8,5	17,5	40,6

Em pH 6,0 foi observado que embora todas as proteínas presentes no extrato bruto de peroxidase da casca da soja tenham sido adsorvido no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, a adsorção da peroxidase também foi favorecida com 51% de adsorção da enzima presente no extrato (máxima adsorção da peroxidase). Em pH 7,0 e 7,5, 83 e 64% das proteínas contaminantes foram adsorvidas pela CSFF-IDA-Cu²⁺ e no pH iguais a 8,0 e 8,5, 43 e 41% das proteínas foram adsorvidas, respectivamente. Entretanto, a adsorção da peroxidase não decresceu diretamente com o aumento do pH, no pH 8,0 a adsorção foi de 41%. O pH 6,0 foi considerado ideal para a ligação da enzima. É importante escolher valores de pH em que

a adsorção seletiva de peroxidase ocorra, em detrimento das demais proteínas contaminantes.

4.4 - Isotermas de Adsorção

Isotermas de adsorção são usadas para representar o equilíbrio entre as concentrações do soluto adsorvido sobre a superfície do sólido e as concentrações do soluto em solução. No equilíbrio, a taxa de soluto que está sendo adsorvido na superfície sólida é igual à taxa de soluto que deixa a superfície (BURKERT, 1998). A isoterma indica a quantidade de adsorvente requerida e a sensibilidade do processo de adsorção quanto à concentração do soluto.

A Figura 19 representa a adsorção das diferentes peroxidases no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ e a Figura 20 apresenta as linearizações da equação de Langmuir.

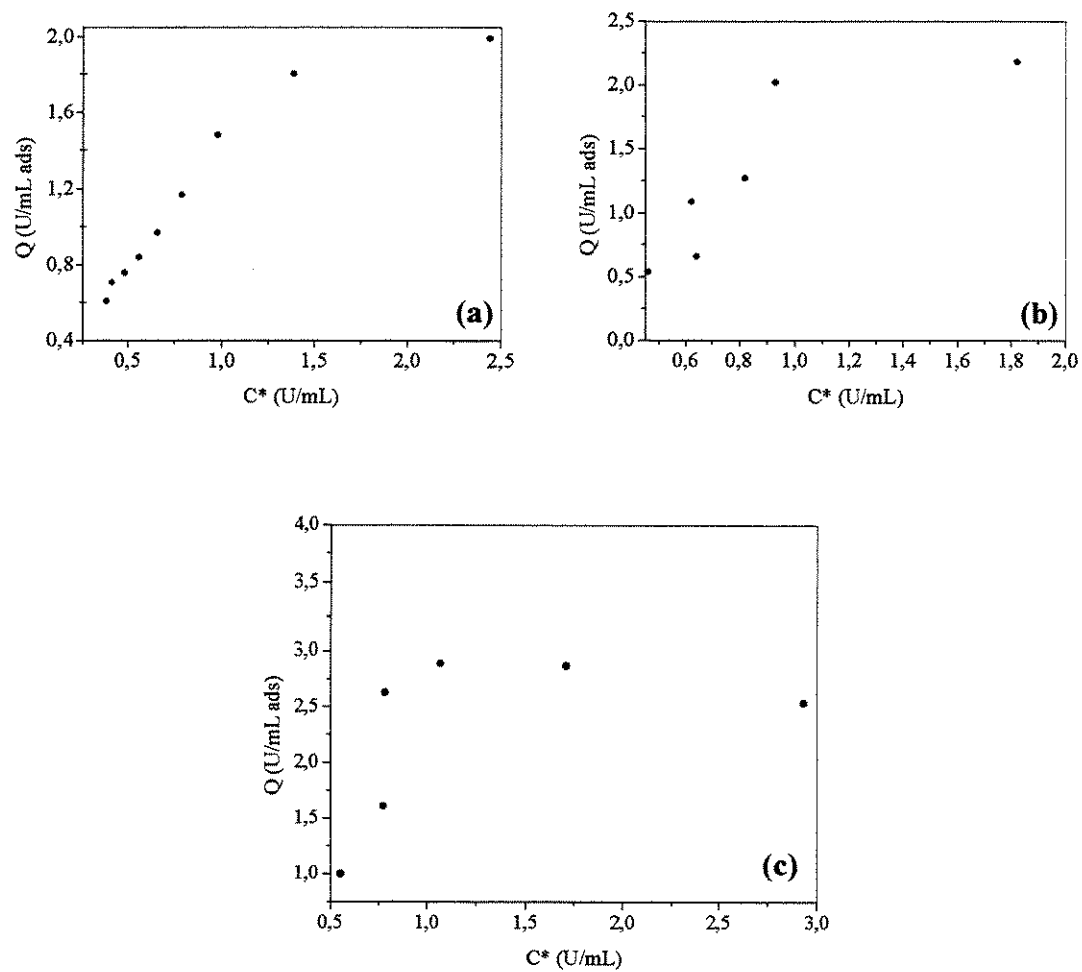


Figura 19: Isoterma de adsorção a 25°C em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 8,0: (a) peroxidase do extrato bruto da casca da soja; (b) peroxidase padrão de nabo; (c) peroxidase padrão de soja.

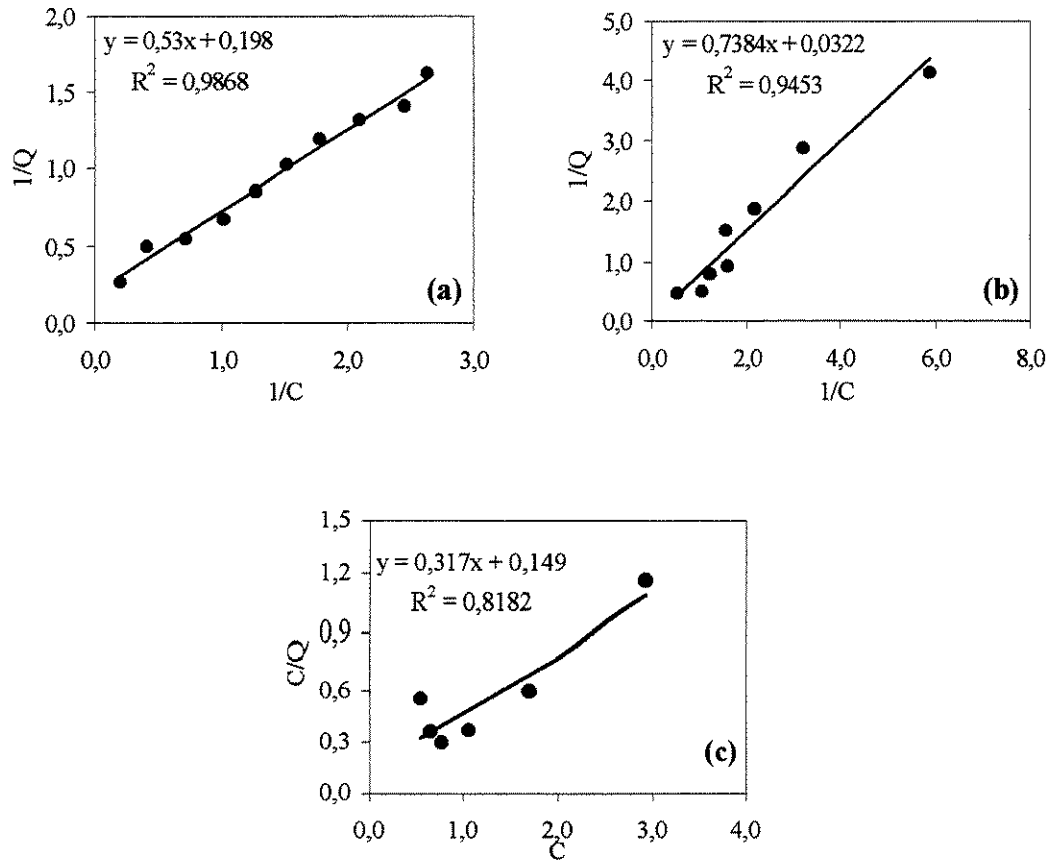


Figura 20: Linearizações da isoterma de Langmuir: Equação 8 para (a) peroxidase do extrato bruto da casca da soja e (b) peroxidase padrão de nabo e Equação 9 para (c) peroxidase padrão de soja.

Foi observado que a adsorção das três diferentes peroxidases no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, tem uma tendência a seguir o modelo proposto por Langmuir (Equação 7).

Os dados da regressão linear (Figura 20) seguindo a linearização da Equação de Langmuir (Equações 8 e 9) nos forneceu o valor estimado da capacidade máxima de peroxidase adsorvida no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Q_m) e a inclinação da reta nos forneceu o valor estimado da constante de dissociação (K_D) do complexo peroxidase-CSFF-IDA-Cu²⁺ conforme descreve a Tabela 6.

Tabela 6: Valores das constantes Q_m e K_D para as diferentes peroxidases.

Fonte de Peroxidase	Q_m (U/mL ads)	K_D (U/mL)
Extrato Bruto da Casca da Soja	5,1	2,7
Nabo Padrão	31,1	22,9
Soja Padrão	3,2	0,5

O valor de K_D , constante de dissociação que descreve o equilíbrio da reação de adsorção, mostrou que o complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ possui afinidade pela peroxidase do extrato bruto da casca da soja. Os valores da constante K_D ($K_D = k_D/k_A$) descritos na Tabela 6, indicam que a constante de dissociação do complexo k_D pode ser maior que a constante de associação do complexo k_A . Isto ocorre devido à adsorção de proteínas contaminantes presentes no extrato bruto de enzima estar interferindo na adsorção específica da peroxidase.

SILVA e FRANCO (2000) relataram que a peroxidase de soja comercializada como padrão apresentava mais impurezas que a peroxidase de soja purificada por partição em sistema de duas fases aquosas formado por PEG-IDA-Cu²⁺/fosfato. Eles observaram em gel de eletroforese SDS-PAGE a existência de cinco bandas protéicas na peroxidase de soja padrão e apenas três bandas no produto purificado em uma única etapa extrativa.

4.5 – Curvas de Ruptura

Foram construídas curvas de rupturas para a peroxidase do extrato bruto da casca da soja em diferentes pHs para calcular a eficiência da adsorção no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Figura 21).

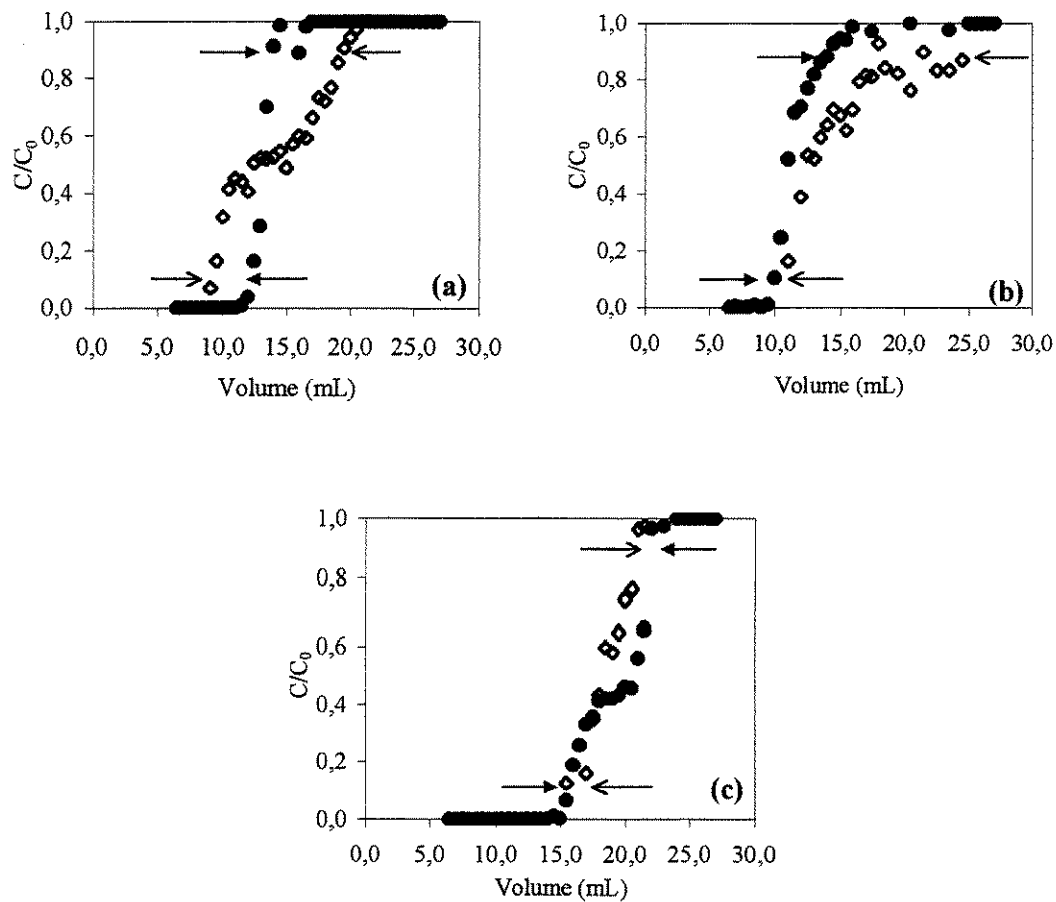


Figura 21: Curvas de ruptura para (●) atividade de peroxidase no extrato bruto da casca da soja e (◊) proteínas totais: (a) pH 6,0; (b) pH 7,0 e (c) pH 8,0.

Foi observado na Figura 21a, que a melhor separação entre a peroxidase do extrato bruto da casca da soja e as proteínas contaminantes em pH 6,0 ocorreu com aproximadamente 10 mL do extrato bruto a 10% da ruptura. No pH 7,0 (Figura 21b) foi observado que a separação deu-se somente quando foi atingido 50% de ruptura (12 mL de extrato bruto), onde as proteínas contaminantes foram mais fortemente retidas (foram necessários 25 mL de extrato bruto para atingir a ruptura). Na Figura 21c, em pH 8,0, observou-se que a melhor separação ocorreu quando 40% da ruptura foi atingida (17 mL de extrato bruto), foi verificado na curva de atividade enzimática em 40% de ruptura uma separação que pode indicar a presença de uma isoenzima.

Segundo JOHNSON *et al.* (1996) sob condições ácidas (pH entre 5,0 e 6,0), a formação do complexo proteína-ligante IDA-Cu²⁺ pode ser limitada exclusivamente aos

aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína. Em contraste, sob condições básicas, proteínas que não possuem o aminoácido histidina na superfície parecem particionar fortemente para o suporte em pH maiores que 7,5, indicando a contribuição adicional dos outros grupos de coordenação proteína-metal, principalmente aminas da superfície (aminas terciárias e/ou aminoácidos lisina) na retenção das proteínas em condições básicas.

A Tabela 7 descreve a capacidade máxima de adsorção em coluna empacotada com 1,0 mL do complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ e a eficiência de recuperação do soluto que foi calculada através da Equação 11 (página 23).

Tabela 7: Capacidade máxima de adsorção da peroxidase e proteínas totais no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ e eficiência para as curvas de ruptura da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.

		Q_m	EFICIÊNCIA DE
		EM 1,0 mL ADSORVENTE	RECUPERAÇÃO DO SOLUTO
pH 6,0	Atividade Enzimática	7,1 U	96,9%
	Proteínas Totais	2,5 mg	67,9%
pH 7,0	Atividade Enzimática	5,2 U	91,1%
	Proteínas Totais	2,3 mg	60,9%
pH 8,0	Atividade Enzimática	6,9 U	82,1%
	Proteínas Totais	1,9 mg	95,3%

Os dados da Tabela 7 mostram que a pH 6,0 foi obtida a melhor separação entre a atividade enzimática e as proteínas totais, com uma eficiência de 96,9% na recuperação da atividade enzimática contra 67,9% de eficiência para as proteínas totais. A pH 7,0, a eficiência da recuperação diminuiu para 91,1% para atividade enzimática e 60,9% para as proteínas totais, e o perfil das curvas (Figura 21b) mostrou que a recuperação não foi significativa. Já a pH 8,0, a separação foi mais eficiente para as proteínas totais, 95,3%, enquanto para a atividade enzimática foi obtido 82,0% de eficiência.

4.6 – Purificação da Peroxidase do Extrato Bruto da Casca da Soja

Foram investigadas três diferentes condições para a purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em coluna de leito empacotado com o complexo CSFF-IDA- Cu^{2+} .

A Figura 22 representa o cromatograma obtido na purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja. Foram aplicados 25 mL de extrato bruto com 80,3 U de atividade de peroxidase e 24,7 mg de proteínas totais, preparados a partir de 6,3 g de casca de soja, 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 8,0 na etapa de lavagem e foi usado como eluente para a dessorção o tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 8,0 com 10 mM de EDTA (primeiro ensaio).

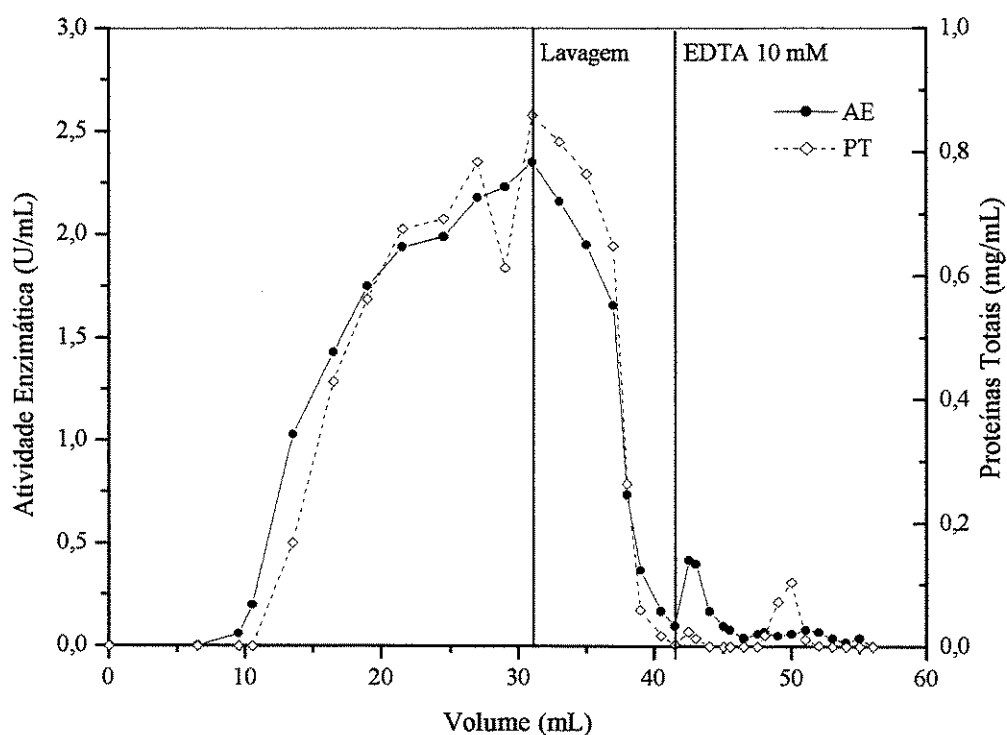


Figura 22: Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 8,0 (primeiro ensaio).

A Tabela 8 apresenta o fator de purificação e o rendimento obtido no primeiro ensaio de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.

Tabela 8: Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 8,0 (primeiro ensaio).

	VOLUME (mL)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U)	PROTEÍNA (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	FATOR DE PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO (%)
Carga	25	80,3	24,7	3,3	1	100,0
*Capacidade	----	6,9	1,9	3,6	----	----
Lavagem	10	----	----	----	----	----
Eluição	23	1,0	0,05	22,4	6,2	14,6

* Capacidade de adsorção da peroxidase no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Tabela 7), usada para calcular o fator de purificação e rendimento.

Foi verificado que a peroxidase não foi fortemente adsorvida no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, somente 1,0 U de atividade de peroxidase foi recuperada quando a eluição foi iniciada.

A capacidade máxima de adsorção da peroxidase no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Q_m) na coluna HR 5/5 empacotada com 1,0 mL de adsorvente foi de 6,9 U de peroxidase (Tabela 7) e em batelada foi de 5,1 U de peroxidase (Tabela 6). Como foi aplicado na coluna um grande volume de enzima (80,3 U), grande parte desta enzima não foi adsorvida por não haver sítio de interação suficiente. Como na etapa de eluição recuperou-se 1,0 U, considerando a capacidade máxima de adsorção em coluna, foi alcançado um rendimento de 14,6% e um fator de purificação de 6,2 vezes.

A Figura 23 representa o cromatograma obtido na purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja. Foram aplicados 15 mL de extrato bruto de peroxidase da casca da soja com 59,3 U de atividade de peroxidase e 11,5 mg de proteínas totais, preparados a partir de 1,5 g de casca de soja., 24 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0 na etapa de lavagem e foi usado como eluente para a dessorção 50 mM de EDTA em pH 4,5 (pH ótimo da peroxidase) (segundo ensaio).

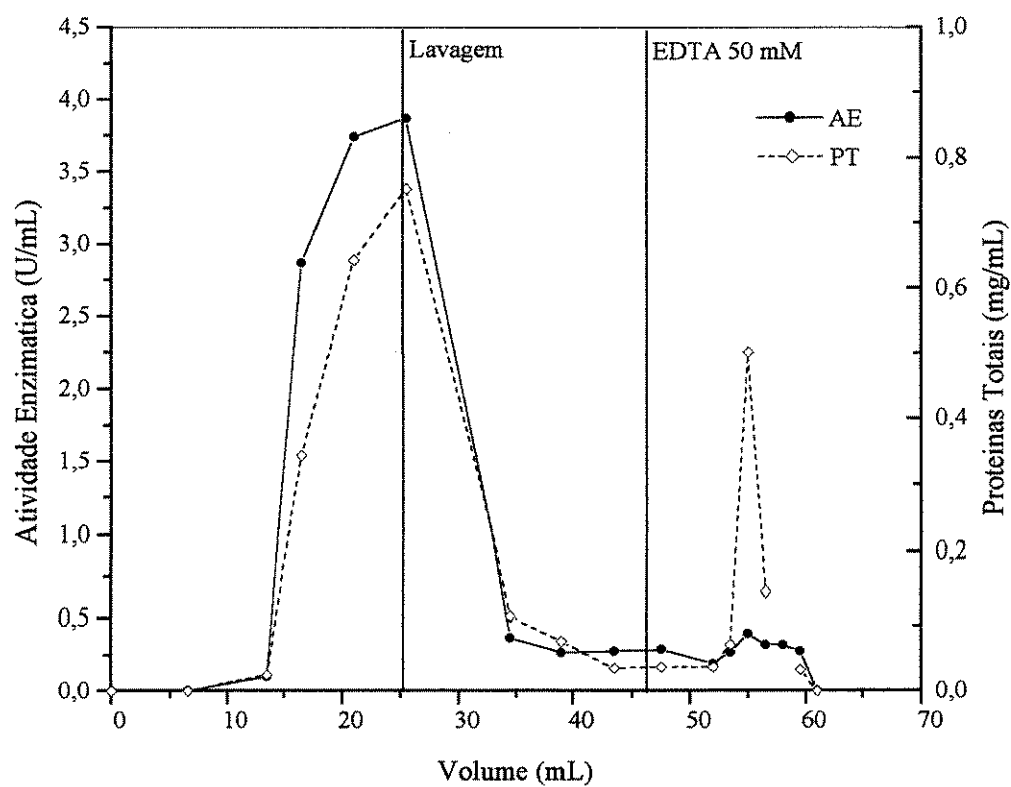


Figura 23: Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 8,0 (segundo ensaio).

A Tabela 9 apresenta o fator de purificação e o rendimento obtidos no segundo ensaio de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.

Tabela 9: Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 8,0 (segundo ensaio).

	VOLUME (mL)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U)	PROTEÍNA (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	FATOR DE PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO (%)
Carga	15	59,3	11,5	5,2	1	100,0
*Capacidade	-----	6,9	1,9	3,6	-----	-----
Lavagem	24	-----	-----	-----	-----	-----
Eluição	20	3,1	1,2	2,5	0,7	45,1
**Eluição	-----	5,2	1,2	4,3	0,8	75,3

* Capacidade de adsorção da peroxidase no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Tabela 7), usada para calcular o fator de purificação e rendimento. ** Atividade eluída considerando a estabilidade da peroxidase no pH 4,5, em duas horas de eluição foi perdida 40% da atividade de peroxidase.

Quando a eluição foi feita usando tampão com 50 mM EDTA foi observado que na etapa de eluição houve a presença de dois picos sendo um pico de proteínas e um de peroxidase indicando que uma adsorção preferencial das proteínas contaminantes pode ter ocorrido nestas condições de ensaio. Foram recuperadas 3,1 U de atividade de peroxidase quando a eluição foi iniciada.

A capacidade máxima de adsorção da peroxidase no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Q_m) na coluna HR 5/5 empacotada com 1,0 mL de adsorvente foi de 6,9 U de peroxidase (Tabela 7). Foram aplicados na coluna 59,3 U de atividade de peroxidase que não foi totalmente adsorvida por não haver sítio de interação suficiente. Como na etapa de eluição recuperou-se 3,1 U, considerando a capacidade máxima de adsorção em coluna, foi alcançado um rendimento de 45,1%. Considerando a perda de atividade da peroxidase decorrente da estabilidade da enzima frente ao pH 4,5 (pH do tampão usado na etapa de eluição) pode-se verificar que em duas horas a perda de atividade fica em torno de 40%, então a atividade eluída seria de 5,2 U e o rendimento seria de 75,3%.

A Figura 24 representa o cromatograma obtido na purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja. Foram aplicados 15 mL de extrato bruto com 71,7 U de atividade de peroxidase e 8,4 mg de proteínas totais, preparados a partir de 1,5 g de casca de soja, 23 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0 na etapa de lavagem e foi usado

como eluente para a dessorção 50 mM de EDTA em pH 4,5 (pH ótimo da peroxidase) (terceiro ensaio).

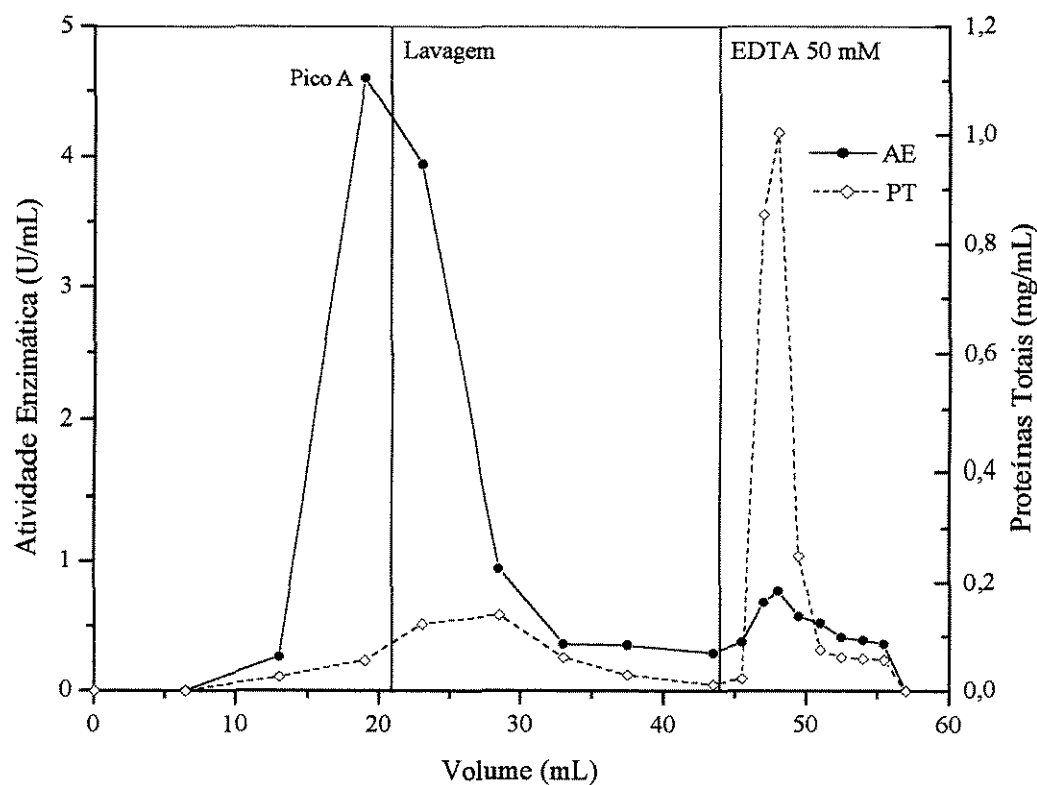


Figura 24: Cromatograma de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja em pH 6,0 (terceiro ensaio).

A Tabela 10 representa o fator de purificação e o rendimento obtido no terceiro ensaio de purificação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.

Tabela 10: Rendimento e fator de purificação para a dessorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja adsorvida em CSFF-IDA-Cu²⁺ em pH 6,0 (terceiro ensaio).

	VOLUME (mL)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U)	PROTEÍNA (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	FATOR DE PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO (%)
<i>Carga</i>	15	71,7	8,4	13,9	1	100,0
<i>*Capacidade</i>	-----	7,1	2,5	2,8	-----	-----
<i>Pico A</i>	13	59,8	0,73	82,1	5,9	83,4
<i>Lavagem</i>	23	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Eluição</i>	20	6,2	3,4	1,8	0,65	87,2
<i>**Eluição</i>	-----	10,3	3,4	3,1	0,22	145,0

* Capacidade de adsorção da peroxidase no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ (Tabela 8), usada para calcular o fator de purificação e rendimento. ** Atividade eluída considerando a estabilidade da peroxidase no pH 4,5, em duas horas de eluição foi perdida 40% da atividade de peroxidase.

O cromatograma apresentado na Figura 24, indica que as proteínas contaminantes presentes no extrato bruto da casca da soja foram preferencialmente e fortemente adsorvidas em pH 6,0, enquanto que a peroxidase alvo adsorveu fracamente sendo eluída na etapa de lavagem (Pico A, Figura 24), onde foram recuperadas 59,8 U de atividade de peroxidase com um rendimento de 83,4%.

Quando a eluição foi feita usando tampão com 50 mM EDTA foi observado que na etapa de eluição houve a presença de um pico de proteínas ou de uma isoenzima peroxidase. Pode ter ocorrido uma adsorção preferencial das proteínas contaminantes nestas condições de ensaio. Foram recuperadas 6,2 U de atividade de peroxidase quando a eluição foi iniciada. Considerando a capacidade máxima de adsorção em coluna neste pH de 7,1 U (Tabela 7), foi alcançado um rendimento de 87,2%. Considerando a perda de atividade da peroxidase decorrente da estabilidade da enzima frente ao pH 4,5 (pH do tampão usado na etapa de eluição) pode-se verificar que em duas horas a perda de atividade fica em torno de 40%, então a atividade eluída seria de 10,3 U e o rendimento seria de 145,0%.

Foi observado que quando a adsorção da peroxidase do extrato bruto da casca da soja deu-se a pH 6,0, houve uma adsorção seletiva das proteínas contaminantes com máxima separação entre estas proteínas e a peroxidase alvo.

A Figura 25 apresenta o gel de eletroforese SDS-PAGE onde foram aplicadas as amostras correspondentes ao pico de proteína da Figura 23 e do Pico A da Figura 24.

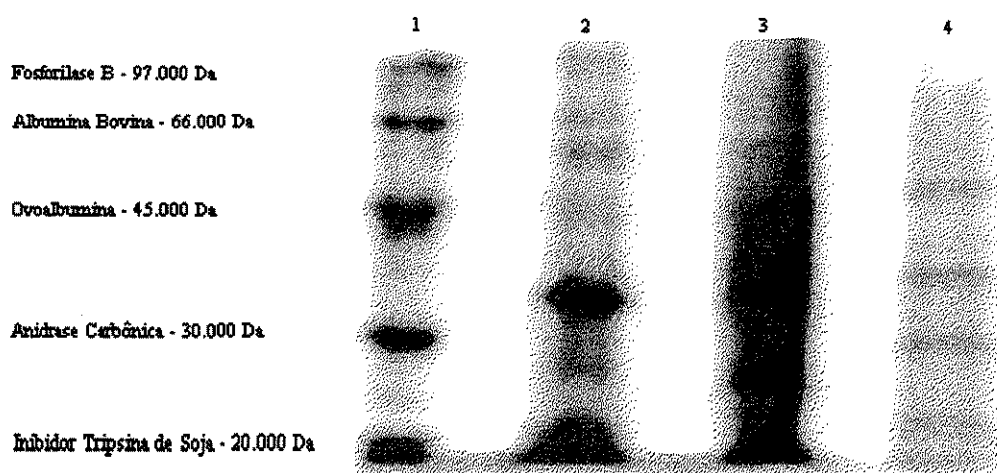


Figura 25: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS. 1) Padrões de marcadores moleculares (Da); 2) Pico A na adsorção em pH 6,0 (Figura 24); 3) Extrato bruto de peroxidase da casca da soja; 4) Pico de proteínas na adsorção em pH 8,0 (Figura 23).

Quando a adsorção foi realizada em pH 6,0 (coluna 2 da Figura 25), foi observada uma banda bem concentrada de proteína, com massa molar equivalente a 35,5 kDa, valor este que quando comparado com dados da literatura (Tabela 11) pode-se concluir que esta pode ser a peroxidase alvo. Entretanto no processo de adsorção a pH 8,0 (coluna 4 da Figura 25), pode ser verificado que a intensidade da banda protéica era menor que no pH 6,0.

A Tabela 11 compara os valores da massa molar de diferentes peroxidases de soja determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.

Tabela 11: Dados da literatura que comparam a massa molar de diferentes peroxidases de soja.

FONTE DE PEROXIDASE	MASSA MOLAR (kDa)	REFERÊNCIA
<i>Grão de Soja</i>	37,0	SESSA e ANDERSSON (1981)
<i>Casca da Soja</i>	37,0	GILLIKIN e GRAHAM (1996)
<i>Casca da Soja</i>	37,0	GRAY <i>et al.</i> (1996)
<i>Casca da Soja</i>	38,0	LIU <i>et al.</i> (1999)

4.7 – Adsorção em Batelada

Com o objetivo de desenvolver um processo industrial visando a obtenção da peroxidase purificada, partindo do resíduo mais abundante da indústria de óleo de soja, a casca da semente, um esquema experimental simplificado foi desenvolvido e aplicado para separação entre as proteínas contaminantes e a peroxidase do extrato bruto da casca da soja (Figura 26).

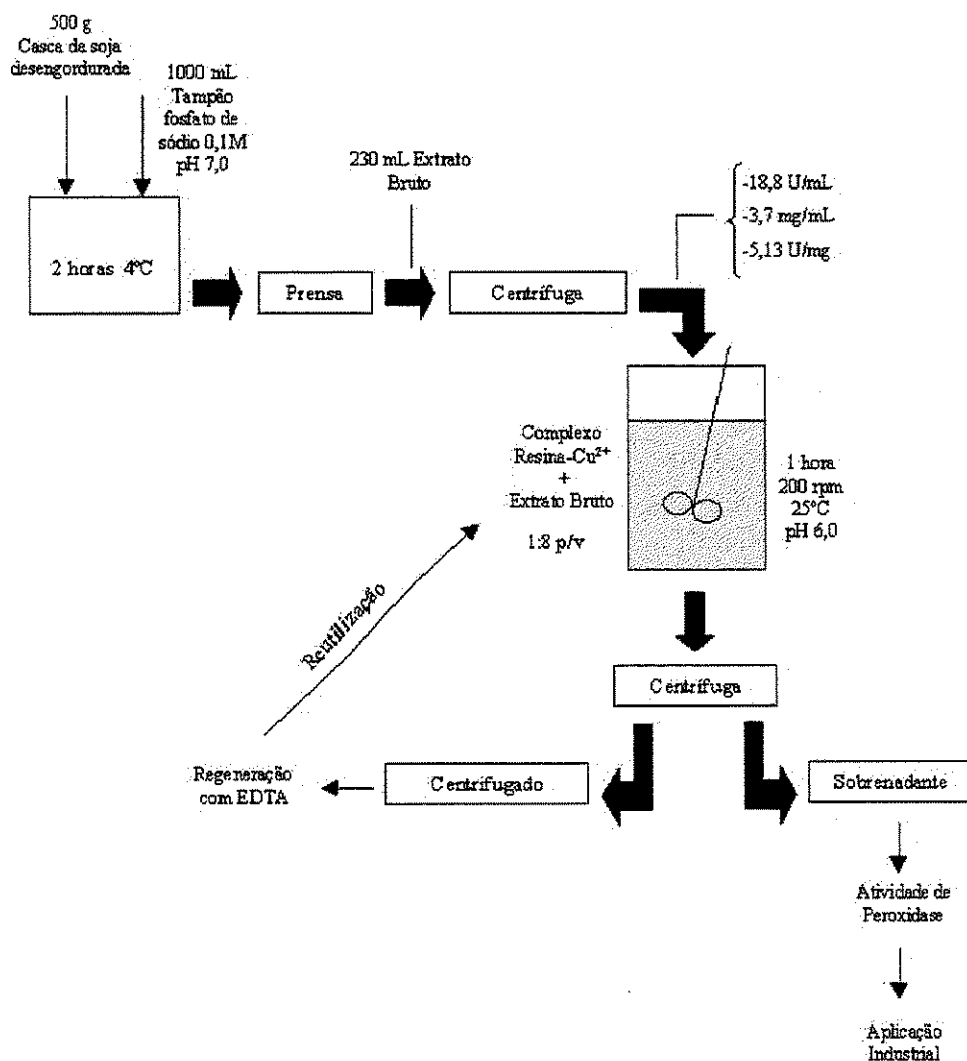


Figura 26: Esquema simplificado para a extração e separação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja das proteínas contaminantes visando o aproveitamento do resíduo da indústria de soja.

Foram testadas duas diferentes resinas, “Chelating Sepharose Fast Flow – Amersham Pharmacia Biotech” e “Lewatit TP 207 - Bayer”, para a separação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja das proteínas contaminantes. A Tabela 12 compara a eficiência das diferentes resinas para a adsorção seletiva da peroxidase do extrato bruto da casca da soja.

Tabela 12: Comparação na eficiência da adsorção em batelada das resinas “Chelating Sepharose Fast Flow” e “Lewatit TP 207” em uma hora de adsorção.

		ATIVIDADE ENZIMÁTICA					PROTEÍNAS TOTAIS					SELETIVIDADE (FL/FS) _{AE} / (FL/FS) _{PT}
		APLICADO (U)	ABSORVIDO (U)	% FASE SÓLIDA	% FASE LÍQUIDA	(FL/FS) _{AE}	APLICADO (mg)	ABSORVIDO (mg)	% FASE SÓLIDA	% FASE LÍQUIDA	(FL/FS) _{PT}	
<i>pH 6,0</i>	<i>CSFF</i>	56,1	6,0	10,7	89,3	8,4	9,6	6,9	72,4	27,6	0,4	21,0
	<i>Lewatit</i>	56,1	6,2	11,1	88,9	8,0	9,6	4,1	43,2	56,8	1,3	6,2
<i>pH 8,0</i>	<i>CSFF</i>	56,1	4,4	7,9	92,1	11,7	9,6	4,6	48,8	51,2	1,1	10,6
	<i>Lewatit</i>	56,1	3,9	7,1	92,9	13,1	9,6	1,0	10,2	89,8	8,8	1,5

Foi verificado na Tabela 12 que em pH 6,0 a separação entre a peroxidase do EBCS das proteínas contaminantes foi mais efetiva quando foi usada a resina “Chelating Sepharose Fast Flow”, quando foi obtida uma relação de porcentagem adsorvida na fase líquida pela porcentagem adsorvida na fase sólida, de 8,4 para a peroxidase contra 0,4 para as proteínas totais, indicando um aumento na atividade específica da peroxidase do EBCS de 21 vezes. Isto mostra que as proteínas contaminantes foram preferencialmente retidas na fase sólida e a peroxidase alvo permaneceu no sobrenadante. Em pH 8,0 a resina “Chelating Sepharose Fast Flow” também foi eficiente na retenção das proteínas contaminantes, obtendo-se uma razão entre porcentagens de 11,7, o alto valor indica a presença da peroxidase alvo no sobrenadante contra 1,1 para as proteínas contaminantes, indicando um aumento na atividade específica da peroxidase do EBCS de 10 vezes.

Em gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 27) foram investigados os sobrenadantes das adsorções na resina Lewatit TP 207 nos pHs 6,0 e 8,0.

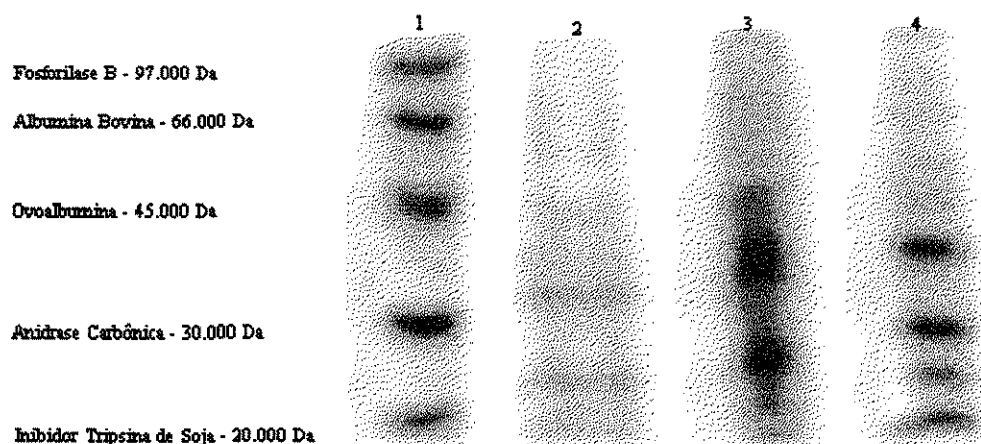


Figura 27: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS para adsorção na resina Lewatit TP 207 em uma hora. 1) Padrões de marcadores moleculares; 2) Adsorção em pH 6,0; 3) Extrato bruto de peroxidase da casca da soja; 4) Adsorção em pH 8,0.

Pode ser observado que na adsorção em pH 6,0 (coluna 2) as bandas protéicas estão menos intensas que na adsorção em pH 8,0 (coluna 4). Isso significa que a adsorção em pH 6,0 usando a resina Lewatit TP 207 foi mais efetiva que no pH 8,0. A Tabela 12 mostra que na adsorção da peroxidase do EBCS na resina Lewatit TP 207 em pH 6,0, houve um aumento de 6 vezes na atividade específica da peroxidase, contra 1,5 vezes na adsorção nesta resina em pH 8,0.

Apesar da resina macroporosa Lewatit TP 207 ser mais econômica (US\$ 200/Litro de resina), quando comparada com a resina microporosa Chelating Sepharose Fast Flow (US\$ 2000/Litro de resina), na etapa de imobilização dos íons cobre na Lewatit TP 207 e na etapa de regeneração, para reutilização da resina foram consumidas enormes quantidades de sulfato de cobre (para a imobilização) e de solução de EDTA (para a regeneração), devido a elevada capacidade iônica da resina, o que a torna inviável para ser usada em escala industrial.

Já para a resina “Chelating Sepharose Fast Flow”, tanto na etapa de separação da peroxidase do extrato bruto da casca da soja, quanto nas etapas de imobilização e regeneração da resina, foram necessários pouco tempo e volume de soluções para que a resina pudesse ser reutilizada.

5 - CONCLUSÕES

No desenvolvimento deste projeto de dissertação de mestrado foi possível concluir que:

- O teor de atividade de peroxidase no EBCS varia conforme o lote de casca de soja, tempo e condições e armazenamento das cascas da soja e a concentração do extrato bruto. Foram obtidas 26,7 U/mL de atividade de peroxidase no EBCS fresca (5.300 U/g casca) e 36,4 U/mL de atividade de peroxidase no EBCS Ceval (1.500 U/g casca).
- A peroxidase do EBCS é facilmente solubilizada em meio aquoso, em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 7,0.
- A peroxidase do EBCS apresentou condições ótimas de atividade a pH 4,5 e mostrou estabilidade entre os pHs 5,5 e 8,5. A enzima permaneceu estável entre 1 e 55°C por três horas.
- Foi possível observar que existe a afinidade entre a peroxidase do EBCS e o complexo CSFF-IDA-Cu²⁺, verificada através do estudo cinético da adsorção da enzima no complexo.
- O pH do meio interferiu fortemente na adsorção da peroxidase do EBCS. Foi observado que a pH 8,0 ocorreu à adsorção mais seletiva da enzima em detrimento das proteínas contaminantes. A adsorção máxima de enzima foi de 51% em pH 6,0.
- A adsorção das peroxidases do EBCS, padrão de nabo e padrão de soja no complexo CSFF-IDA-Cu²⁺ seguiu o modelo proposto por Langmuir onde as capacidades máximas de adsorção obtidas foram de 5,1, 31,1 e 3,2 U/mL de

adsorvente, e as constantes de dissociação do complexo Peroxidase-CSFF-IDA- Cu^{2+} foram de 2,7, 22,9 e 0,5 U/mL, respectivamente.

- A curva de ruptura para a peroxidase do EBCS apresentou-se íngreme em pH 6,0, onde foi obtida melhor condição de separação entre atividade, 96,9% de atividade recuperada, e proteínas totais, 67,9% de recuperação. Em pH 8,0 verificou-se que as proteínas totais foram 95,3% recuperadas contra 82% de atividade recuperada. Já em pH 7,0 a inclinação da curva não apresentou uma boa separação, sendo este pH considerado o que permitiu pior separação entre a peroxidase e as proteínas contaminantes.
- A purificação da peroxidase do EBCS foi realizada em tampão pH 6,0 e a na etapa de dessorção foi usado como eluente tampão em pH 4,5 contendo 50 mM de EDTA. Na etapa de adsorção na coluna, foi verificada que houve uma separação seletiva entre a atividade de peroxidase e as proteínas totais com um fator de purificação de 5,9 vezes com 83,4% de rendimento. Na etapa de eluição foi obtido um rendimento de 87,2% para a peroxidase da casca da soja. Quando foi considerada a perda de atividade da enzima no pH 4,5, devido à estabilidade neste pH, foi obtido um rendimento de 145,0%.
- A melhor condição para a purificação da peroxidase do EBCS deu-se quando a adsorção foi realizada em pH 6,0 (terceiro ensaio), onde as proteínas contaminantes foram preferencialmente adsorvidas e a atividade de peroxidase foi eluída ainda na etapa de adsorção (83,4% de rendimento), com utilização da resina de modo “inverso” do usual, ou seja, com a adsorção dos contaminantes ao invés da peroxidase alvo.
- Na adsorção da peroxidase do EBCS na resina CSFF em batelada foi obtida uma razão entre a atividade de peroxidase na fase líquida (sobrenadante) pela atividade de peroxidase na fase sólida (adsorvida) de 8,4 contra 0,4 para as proteínas totais em pH 6,0, com um aumento na atividade específica da peroxidase do EBCS de 21,0 vezes no sobrenadante. Em pH 8,0, para a atividade de peroxidase foi obtida uma razão entre fases de 11,7 e de 1,1 para as proteínas totais, o que forneceu um aumento na atividade específica da peroxidase do EBCS de 10,6 vezes. Os dados mostraram que apesar da adsorção preferencial das proteínas contaminantes houve a

separação entre estas proteínas e a peroxidase alvo, que permaneceu na fase líquida (sobrenadante).

6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

As sugestões para os trabalhos futuros envolvendo a peroxidase do extrato bruto da casca da soja são:

- Verificar a afinidade da peroxidase do EBCS pelos metais Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} imobilizados no complexo CSFF-IDA;
- Na etapa de dessorção da peroxidase do EBCS adsorvida no complexo CSFF-IDA- Cu^{2+} , usar como eluente tampão em pH 5,5 (neste pH a peroxidase apresentou estabilidade por até quatro horas) contendo EDTA;
- Explorar melhor a utilização da resina Lewatit TP-207, com menor concentração de metal imobilizado;
- Utilizar as resinas “Streamline Chelating – Amershan Pharmacia Biotech” e “Lewatit TP 207 – Bayer” para a adsorção da peroxidase do EBCS em leito expandido, usando os metais Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} imobilizados nas matrizes.
- Avaliar inventário de parâmetros para possível investigação do “Scale-up”.
- Utilizar superfície de resposta para fazer a modelagem estatística.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKARA, J.A., AYYGARI, M.S.R., BRUNO, F.F. Enzymatic Synthesis and Modification of Polymers in Nonaqueous Solvents. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.2, p.67-73, 1999.

ANDERSSON, L., PORATH, J. Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe^{3+}) Affinity Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.154, p.250-254, 1986.

ANDREWS, A.T. Eletrophoresis. 2º Ed. Oxford Press, Oxford, Inglaterra. 1986. 350p.

ARNOLD, F. Metal-Affinity Separations: a New Dimension in Protein Processing. **Bio/Technology**, v.9, p.151-156, 1991.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 3. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1986. 857 p.

BAKARDJEVA, N.T., CHRISTOVA, N.V, NENKOVA, R. Effect of Calcium and Copper Ions and Some Aminoacids on the Activity and Thermosensitivity of Mosses Peroxidase and Catalase. **Plant Peroxidase Newsletter**, v.10, p.35-41, 1997.

BARBER, K., MARTIN, M.J.R., SHAW, G.S., VAN HUYSTEE, R.B. Structural Influence of Calcium on the Heme Cavity of the Cationic Peanut Peroxidase as Determined by ¹H-NMR Spectroscopy. **Europ. J. Biochemistry**, v.232, p.825-833, 1995.

BAYER AG. Lewatit TP 207 – Product Information.

BELEW, M., PORATH, J. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Effect of Solute Structure, Ligand Density and Salt Concentration on the Retention of Peptides. **Journal of Chromatography**, v.516, n.2, p.333-354, 1990.

BELTER, P.A., CUSSLER, E.L., HU, W. **Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368p.

BIRKENMEIER, G., VIJAYALAKSHMI, M.A., STIGBRAND, T., KOPPERSCHALÄGER, G. Immobilized Metal Ion Affinity Partitioning, a Method Combining Metal-Protein Interaction and Partitioning of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chromatography**, v.539, p.267-277, 1991.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRATTAIN, M.G., MARKS, M.E., PRETLOW II, T.G. The Purification of Horseradish Peroxidase by Affinity Chromatography on Sepharose-Bound Concanavalin A. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.346-352, 1976.

- BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. **Practice and Theory of Enzyme Immunoassays**. Reading: TJISSEN, P. New York: Elsevier, 1985. Cap.10: Properties and Preparation of Enzymes Used in Enzyme-Immunoassays, p.173.
- BURKERT, C.A.V. Estudo Experimental e Teórico da Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leio Fixo. Campinas, SP. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- CHAGA, G., ANDERSSON, L., PORATH, J. Purification and Determination of the Binding Site of Lactate Dehydrogenase from Chicken Breast Muscle on Immobilized Ferric Ions. **Journal of Chromatography**, v.627, p.163-172, 1992.
- CHAOUK, H., HEARN, M.T.W. New Ligand, N-(2-pyridylmethyl)aminoacetate, for Use in the Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography Separation of Proteins. **Journal of Chromatography A**, v.852, p.105-115, 1999.
- CHASE, H.A. Affinity Separations Utilising Immobilised Monoclonal Antibodies – A New Tool for the Biochemical Engineer. **Chemical Engineering Science**, v.39, n.7/8, p.1099-1125, 1984.
- CHAVEZ, C., FLURKEY, W.H. Biospecific Adsorption of Peroxidase. **Journal of Chromatography**, v.298, p.169-171, 1984.
- CHEN, H., VIERLING, R.A. Molecular Cloning and Characterization of Soybean Peroxidase Gene Families. **Plant Science**, v.150, p.129-137, 2000.
- CHUNG, B.H., BAILEY, D., ARNOLD, F.H. Metal Affinity Partitioning. **Methods in Enzymology**, v.228, p.167-179, 1994.

CLEMMITT, R.H., CHASE, H.A. Facilitated Downstream Processing of a Histidine-Tagged Protein from Unclarified *E. coli* Homogenates Using Immobilized Metal Affinity Expanded-Bed Adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.2, p.206-216, 2000(a).

CLEMMITT, R.H., CHASE, H.A. Immobilized Metal Affinity Chromatography of β -galactosidase from Unclarified *Escherichia coli* Homogenates Using Expanded Bed Adsorption. **Journal of Chromatography A**, v.74, p.27-46, 2000(b).

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7.ed. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1997.

DALTON, D.A., CASTILHO, L.D., KAHN, M.L., JOYNER, S.L., CHATFIELD, J.M. Heterologous Expression and Characterization of Soybean Cytosolic Ascorbate Peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.328, n.1, p.1-8, 1996.

DAWSON, J.H. Probing Structure-Function Relations in Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases. **Science**, v.240, p.433-439, 1988.

DUNFORD H.B., STILLMAN J.S. On the Function and Mechanism of Action of Peroxidases. **Coordin. Chem. Rev.**, v.19, p.187-250, 1976.

DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidases-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, p.83-99, 2000.

EGOROV, A.M., GAZARYAN, I.G. Peroxidase Biotechnology and Application in Russia and the Former Soviet Union (FSU). **Plant Peroxidase Newsletter**, v.2, p.1-5, 1993.

ELLING, L., KULA, M.-R., HADAS, E., KATCHALSKI-KATZIR, E. Partition of Free and Monoclonal-Antibody-Bound Horseradish Peroxidase in a Two-Phase Aqueous Polymer System – Novel Procedure for the Determination of the Apparent Binding Constant of Monoclonal Antibody to Horseradish Peroxidase. **Analytical Biochemistry**, v.192, p.74-77, 1991.

ENZYME HANDBOOK. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994.

FOUST, A.S., WENZEL, L.A., CLUMP, C.W., MAUS, L., ANDERSEN, L.B. **Princípios das Operações Unitárias**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 670p.

FROUND, S.J. Example purifications. HARRIS, E.L.V., ANGAL, S. **Protein Purification Applications**. A practical approach, Oxford: IRL Press, 1995. p.113-128.

GABERC-POREKAR, V., MENART, V., JEVSEVAR, S., VIDENSEK, A., STALC. A. Histidines in Affinity Tags and Surface Clusters for Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography of Trimeric Tumor Necrosis Factor α . **Journal of Chromatography A**, v.852, p.117-128, 1999.

GANJIDOUST, H., TATSUMI, K., WADA, S., KAWASE, M. Role of Peroxidase and Chitosan in Removing Chlorophenols from Aqueous Solution. **Wat. Sci. Tech.**, v.34, n.10, p.151-159, 1996.

GUZEN, M., MILLER, S.S., BOWMAN, L., BATCHELOR, A.K., BOUTILIER, K., MIKI, B.L.A. Localization of Peroxidase mRNAs in Soybean Seeds by *in situ* Hybridization. **Plant Molecular Biology**, v.41, p.57-63, 1999.

GILLIKIN, J.W., GRAHAM, J.S. Purification and Developmental Analysis of the Major Anionic Peroxidase from the Seed Coat of *Glycine max*. **Plant Physiol.**, v.96, p.214-220, 1991.

GOSLING, I.S., COOK, D., FRY, M.D.M. The Role of Adsorption Isotherms in the Design of Chromatographic Separations for Downstream Processing. **Chemical Engineering Research & Design**, v.67, n.3, p.232-242, 1989.

GRAY, J.S.S., YANG, B.Y., HULL, S.R., VENZKE, D.P., MONTGOMERY, R. The Glycans of Soybean Peroxidase. **Glycobiology**, v.6, p.23-32, 1996.

HELLER, A., VREEKE, M.S. Soybean Peroxidase Electrochemical Sensor. **Abstracts of Biosensors & Bioelectronics**, v.13, n.1, 1998.

HEMDAN, E.S., ZHAO, Y., SULKOWSKI, E., PORATH, J. Surface Topography of Histidine Residues: a Facile Probe by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.86, p.1811-1815, 1989.

JOHNSON, R.D., TODD, R.J., ARNOLD, F.H. Multipoint Binding in Metal-Affinity Chromatography II. Effect of pH and Imidazole on Chromatographic Retention of Engineered Histidine-Containing Cytochromes *c*. **Journal of Chromatography A**, v.725, p.225-235, 1996.

KAMIMURA, E.S. Modelagem e Simulação do Processo de Purificação de Lipase por Cromatografia de Afinidade. Campinas, SP. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 2000.

- KIM, J., WU, X., HERMAN, R., DORDICK, J.S. Enzymatically Generated Polyphenols as Array-Based Metal-Ion Sensors. **Analytica Chimica Acta**, v.370, p.251-258, 1998.
- KINSLEY, C., NICELL, J.A. Treatment of Aqueous Phenol with Soybean Peroxidase in the Presence of Polyethylene Glycol. **Bioresource Technology**, v.73, p.139-146, 2000.
- KRONINA, V.V., WIRTH, H., HEARN, M.T.W. Characterization by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatographic Procedures of the Binding Behaviour of Several Synthetic Peptides Designed to have High Affinity for Cu(II) Ions. **Journal of Chromatography A**, v.852, p.261-272, 1999.
- LABOUREAU, E., CAPIOD, J.C., DESSAINT, C., PRIN, L., VIJAYALAKSHMI, M.A. Study of Human Cord Blood Lymphocytes by Immobilized Metal Ion Affinity Partitioning. **Journal of Chromatography B**, v.680, p.189-195, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LASCU, I., ABRUDAN, I., MURESAN, L., PRESECAN, E., VONICA, A., PROINOV, I. Salting-Out Chromatography on Unsubstituted Sepharose Cl-6B as a Convenient Method for Purifying Proteins from Dilute Crude Extracts – Application to Horseradish Peroxidase. **Journal of Chromatography**, v.357, p.436-439, 1986.
- LIU, W., FANG, J., ZHU, W., GAO, P. Isolation, Purification and Properties of the Peroxidase from the Hull of *Glycine max* var HH2. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.779-785, 1999.

- LOBARZEWSKI, J., GINALSKA, G. Industrial Use of Soluble or Immobilized Plant Peroxidases. **Plant Peroxidase Newsletter**, v.6, p.3-9, 1995.
- MAGBOUL, A.A.A., McSWEENEY, P.L.H. Purification and Characterization of a Dipeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **Food Chemistry**, v.67, p.233-240, 1999(a).
- MAGBOUL, A.A.A., McSWEENEY, P.L.H. Purification and Properties of an Acid Phosphatase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **International Dairy Journal**, v.9, p.849-855, 1999(b).
- McELDOON, J.M., POKORA, A.R., DORDICK, J.S. Lignin Peroxidase-Type Activity of Soybean Peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.359-365, 1995.
- McMANUS, M.T., ASHFORD, D.A. Glycosilation of plant peroxidases. **Plant Peroxidase Newsletter**, v.10, p.12-19, 1997.
- MIRANDA, M.V., CASCONO O. Partition Behavior of Horseradish Peroxidase Isoenzymes in Aqueous Two-Phase Poly(ethyleneglycol)/phosphate Systems. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.4, p.275-280, 1994.
- MIRANDA, M.V., LAHORE, H.M.F., CASCONO, O. Horseradish Peroxidase Extraction and Purification by Aqueous Two-Phase Partition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.53, n.2, p.147-154, 1995.
- MIRANDA, M.V., FERNÁNDEZ-LAHOE, H.M., DOBRECKY, J., CASCONO, O. The Extrative Purification of Peroxidase from Plant Raw Materials in Aqueous Two-Phase Systems. **Acta Biotechnology**, v.18, n.3, p.179-188, 1998.

MOORE, W.J. **Físico Química**. São Paulo: Edgard Blücher, v.2, 1976. 866p.

MÜLLER, K.M., ARNDT, K.M., BAUER, K., PLÜCKTHUN, A. Tandem Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography/Immunoaffinity Purification of His-tagged Proteins – Evaluation of Two Anti-His-Tag Monoclonal Antibodies. **Analytical Biochemistry**, v.259, p.54-61, 1998.

MUNIR, I.Z., DORDICK, J.S. Soybean Peroxidase as an Effective Bromination Catalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.337-341, 2000.

PESLIAKAS, H., ZUTAUTA, V., BASKEVICIUTE, B. Immobilized Metal-Ion Affinity Partitioning of NAD⁺ - Dependent Dehydrogenases in Poly(ethylene glycol) - Dextran Two-Phase Systems. **Journal of Chromatography A**, v.678, n.1, p.25-34, 1994.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY Affinity Chromatography-Principles and Methods – (codigo: 18-1022-29), Guide 1.

POKORA, A.R. Soybean Peroxidase as an Industrial Catalyst. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.209, p.154-155, 1995.

PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. **Nature**, v.258, p.598-599, 1975.

PORATH, J., OLIN, B. Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. **Biochemistry**, v.22, p.1621-1630, 1983.

PORATH, J., TSCHESCHE, H. **Modern Methods in Protein Chemistry**. Berlin: Walter de Gryter, 1985.

PORATH, J. IMAC – Immobilized Metal Ion Affinity Based Chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v.7, n.7, p.254-259, 1988.

ROSATTO, S.S., KUBOTA, L.T., NETO, G.O. Biosensor for Phenol Based on the Direct Electron Transfer Blocking of Peroxidase Immobilising on Silica-Titanium. **Analytica Chimica Acta**, v.390, p.65-72, 1999.

RUZGAS, T., CSÖREGI, E., EMNEUS, J., GORTON, L. MARKO-VARGA, G. Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application. **Analytica Chimica Acta**, v.330, p.123-128, 1996.

SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, 1977.

SESSA, D.J., ANDERSSON, R.L. Soybean Peroxidases: Purification and Some Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, n.5, p.960-965, 1981.

SHANNON, L.M., KAY, E., LEW, J.Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. I. Isolation and Physical Properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v.241, n.9, p.2166-2171, 1966.

SILVA, M.E., PELLOGIA, C., PIZA, F.A.T., FRANCO, T.T. Purification of Three Different Microbial β -galactosidases by Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.219-223, 1997.

SILVA, M.E. Recuperação e Isolamento de Enzimas por Partição de Bioafinidade em Sistemas de Duas Fases Aquosas. Campinas, SP. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1999.

SILVA, M.E., FRANCO, T.T. Purification of Soybean Peroxidase (*Glycine max*) by Metal Affinity Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.287-294, 2000.

STEFANO, G., PIZZUTO, P., SCIANCALEPORE, V. Recupero della lattoperossidasi dal siero acido con la cromatografia di affinità al rame immobilizzato. **Industrie Alimentari**, v.23, p.387-389, 1994.

SUH, S.S., ARNOLD, F.H. A mathematical Model for Metal Affinity Protein Partitioning. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.682-690, 1990.

SULKOWSKI, E. Purification of Proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.1, p.1-7, 1985.

TEISSEIRE, H., GUY, V. Cooper-Induced Changes in Antioxidant Enzymes Activities in Fronds of Duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v.153, p.65-72, 2000.

VIERLING, R.A., WILCOX, J.R. Microplate Assay for Soybean Seed Coat Peroxidase Activity. **Seed Sci. & Technol.**, v.24, p.485-494, 1996.

VILTER, H. Aqueous Two-Phase Extraction of Plant Enzymes from Sources Containing Large Amounts of Tannins and Anionic Mucilages. **Bioseparation**, v.1, n.3-4, p.283-292, 1990.

VUNNUM, S., NATARAJAN, V., GALLANT, S., CRAMER, S. Nonlinear Multicomponent Gradient Chromatography in Metal Affinity Systems. **Separation Science and Technology**, v.33, n.16, p.2465-2489, 1998.

ZHAO, Y.-J., SULKOWSKI, E., PORATH, J. Surface Topography of Histidine Residues in Lysozymes. **European Journal of Biochemistry**, v.202, p.1115-1119, 1991.

WELINDER, K.G. Plant Peroxidases. Their Primary, Secondary and Tertiary Structures, and Relation to Cytochrome C Peroxidase. **European Journal Biochemistry**, v.151, p.497-504, 1985.

WILLOUGHBY, N.A., KIRSCHNER, T., SMITH, M.P., HJORTH, R., TITCHENER-HOOKER, N.J. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography Purification of Alcohol Dehydrogenase from Baker's Yeast Using as Expanded Bed Adsorption System. **Journal of Chromatography A**, v.840, p.194-204, 1999.

WRIGHT, H., NICELL, J.A. Characterization of Soybean Peroxidase for the Treatment of Aqueous Phenols. **Bioresource Technology**, v.70, p.69-79, 1999.

WUENSCHHELL, G.E., NARANJO, E., ARNOLD, F.H. Aqueous Two-Phase Metal Affinity Extraction of Heme Proteins. **Bioprocess Engineering**, v.5, p.199-202, 1990.

8 - ANEXOS

ANEXO 1

“Extração e purificação de peroxidase de soja (Glycine max) por metaloafinidade”

Trabalho apresentado no 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC 99

Realizado de 06 a 08 de outubro de 1999, Rio de Janeiro/RJ.

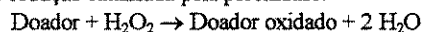
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE DE SOJA (*Glycine max*) POR METALOAFINIDADE

Maria Estela da Silva, Kathia Assis de Sousa; Telma Teixeira Franco

Laboratório de Engenharia Bioquímica- FEQ - Faculdade de Engenharia Química
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas - Cx Postal 6066 - 13081-970 - Campinas
E-mail: franco@feq.unicamp.br

Palavras-chave: Peroxidase; Soja; *Glycine max*; Afinidade por Metal; downstream-processing

Peroxidasas (doador: hidrogênio-peróxido oxidoreductase EC 1.11.1.7) são heme-enzimas que possuem uma variedade de funções biosintéticas e degradativas usando peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons. Estas enzimas são encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados (DAWSON, 1988). O esquema abaixo exemplifica a reação de oxido-redução catalisada pela peroxidase.



Peroxidase é a enzima mais frequentemente utilizada em imunoenaios enzimáticos e em diagnósticos médicos (MIRANDA *et al.*, 1995). É usada na determinação enzimática de pequenas quantidades de glicose, especialmente para pessoas que sofrem de diabetes. De acordo com diversos autores, a peroxidase também pode ser empregada em biosensores, transformação química de medicamentos, na fabricação de produtos químicos, na degradação de compostos aromáticos, no controle do meio ambiente e em processos de síntese de diversos intermediários químicos, como a resina fenólica isenta de formaldeído. Outra importante classe de materiais produzidos por reações catalisadas por peroxidase em solventes orgânicos são as aminas poliaromáticas e os polifenóis (AKKARA *et al.*, 1999). A peroxidase de soja pode ser usada nos seguintes processos: como substituto para íons cloreto no clareamento de papel; substituindo oxidantes químicos para oxidar anilina, na produção de polianilina; quando microencapsulada, a peroxidase de soja é liberada produzindo um papel-carbono, com uma mudança de cor, sem as manchas deixadas pelo carbono, na degradação de compostos aromáticos e controle ambiental (EGOROV & GAZARYAN, 1993).

O objetivo deste trabalho é o de comparar a extração da peroxidase de extrato bruto de soja (*Glycine max*) por dois processos: por partição em sistema de duas fases aquosas (SDFA) utilizando metalo-ligante (FRANCO *et al.*, 1997) e por adsorção a suporte sólido contendo o metal cobre imobilizado.

O processo de extração e purificação da peroxidase em SDFA de afinidade constou de duas etapas: o primeiro sistema era composto de 14% de polietilenoglicol 4000 e 8% de sulfato de sódio, com concentrações crescentes de PEG-Cobre-IDA (metal complexado ao polímero acoplado ao ácido iminodiácético) substituindo o PEG simples. Na segunda etapa, a interação entre a peroxidase e o metalo-ligante foi revertida pela adição de 10% de fosfato à fase polimérica. Foi observado que o melhor sistema de purificação da peroxidase foi o empregando 10% de PEG-Cobre-IDA, 4% PEG 4000 simples e 8%

de sulfato de sódio (primeira etapa). Na segunda etapa, o melhor sistema foi aquele composto pela fase polimérica coletada da primeira etapa na presença de 10% de fosfato. O rendimento obtido foi de 64% da enzima na fase salina, com aumento do fator de purificação de 145. Foi observado por eletroforese (SDS-PAGE) que a peroxidase de soja purificada pelo processo desenvolvido em nosso laboratório é mais pura do que a enzima comercial padrão (Figura 1).

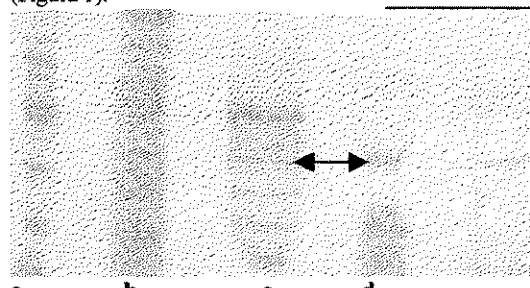


Fig.1 Eletroforese (SDS-PAGE). a) marcadores: fosforilase b (94kDa), BSA (67kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30 kDa), Inib. Trips.Soja (20 kDa), lactalbumina (14,4 kDa); b) extrato bruto de soja; c) padrão comercial de peroxidase de soja; d) peroxidase extraída pelo presente processo; e) fase inferior do SDFA

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP pela bolsa concedida à Maria Estela da Silva e à Kathia Assis de Sousa.

Referências Bibliográficas

1. DAWSON, J.H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*, 240:433-439, 1988.
2. MIRANDA, M.V.; LAHORE, H.M.F.; CASCONI, O. Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.53, n.2, p.147-154, 1995.
3. AKKARA, J.A.; AYYGARI, M.S.R.; BRUNO, F.F. Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents. *Trends in Biotechnology*, v.17, n.2, p.67-73, 1999.
4. EGOROV, A.M. & GAZARYAN, I.G. Peroxidase biotechnology and application in Russia and the former Soviet Union (FSU). *Plant Peroxidase Newsletter*, 2:1-5, 1993.
5. FRANCO, T.T; GALAEV, I; KAUL,R; MATTIASSON,B. Purification of lactate dehydrogenase by aqueous two phase systems using a thermosensitive polymer. *Biotech. Letters*. 4(11) 1997.

ANEXO 2

“Extração e purificação de peroxidase de soja (Glycine max) por adsorção de afinidade a metal imobilizado”

Trabalho apresentado no 1º Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química –
1º EPFEQ

Realizado de 25 a 26 de outubro de 1999, Campinas/SP.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE DE SOJA (*Glycine max*) POR ADSORÇÃO DE AFINIDADE A METAL IMOBILIZADO

Kathia Assis de Sousa; Telma Teixeira Franco
kathia@feq.unicamp.br
LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica

Peroxidasas (doador: hidrogênio-peróxido oxidoreductase EC 1.11.1.7) são heme-enzimas que possuem uma variedade de funções biosintéticas e degradativas usando peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons. Estas enzimas são encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados. O esquema abaixo exemplifica a reação de óxido-redução catalisada pela peroxidase.



Peroxidase é a enzima mais freqüentemente utilizada em imunoenaios enzimáticos em diagnósticos médicos. É usada na determinação enzimática de pequenas quantidades de glicose, especialmente para pessoas que sofrem de diabetes. De acordo com diversos autores, a peroxidase também pode ser empregada em biosensores, transformação química de medicamentos, na fabricação de produtos químicos, na degradação de compostos aromáticos, no controle do meio ambiente e em processos de síntese de diversos intermediários químicos, como a resina fenólica isenta de formaldeído. Outra importante classe de materiais produzidos por reações catalisadas por peroxidase em solventes orgânicos são as aminas poliaromáticas e os polifenóis. A peroxidase de soja pode ser usada nos seguintes processos: como substituto para íons cloreto no clareamento de papel; substituindo oxidantes químicos para oxidar anilina, a peroxidase pode ser usada no processo de produção de polianilina; quando microencapsulada, a peroxidase de soja é liberada produzindo um papel-carbono, com uma mudança de cor, sem as manchas deixadas pelo carbono. A aplicação da peroxidase se dá também em análises imunoquímicas, biosensores, degradação de compostos aromáticos e controle ambiental.

O objetivo deste trabalho é extrair e purificar a peroxidase de extrato bruto de soja (*Glycine max*) por adsorção a suporte sólido contendo o metal cobre imobilizado. Objetiva-se desenvolver um processo de adsorção da enzima ao metal cobre, imobilizado ao suporte "Chelating Sepharose". Serão construídas isotermas de adsorção e curvas de ruptura para a peroxidase e a dessorção será realizada em três formas: 1) gradiente ascendente de concentração de cloreto de sódio, 2) gradiente com EDTA e 3) gradiente descendente de pH, para desestabilizar a interação entre a enzima e o metal. Portanto, pretende-se desenvolver a reciclagem do suporte sólido contendo o metal imobilizado para reutilização potencial da matriz, alcançando rendimento e fator de purificação mais elevados e a redução do custo.

Palavras-chave: Peroxidase; Soja; Glycine max; Cromatografia de Afinidade por Metal.

ANEXO 3

“Extração e purificação de peroxidase da casca da soja (Glycine max)”

Trabalho apresentado no XIII Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM

Realizado de 07 a 10 de agosto de 2000, Teresópolis/RJ.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASE DA CASCA DA SOJA (GLYCINE MAX)

Kathia Assis De Sousa; Cristiane Fozzatti; Telma Teixeira Franco

Laboratório de Engenharia Bioquímica- FEQ - Faculdade de Engenharia Química
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas - Cx Postal 6066 – 13081-970 – Campinas/SP
E-mail: franco@feq.unicamp.br

RESUMO

Foi observado que a peroxidase da casca da soja (Glycine max) apresentou condições ótimas de atividade a pH 4,5 e temperatura entre 30 a 55°C, de estabilidade à temperaturas entre 10 e 55°C e não demonstrou sensibilidade ao congelamento. Em condições ótimas, a atividade enzimática foi de 5.330 U/g casca de soja. Foi desenvolvido um sistema de duas fases aquosas (SDFA) contendo polietilenoglicol (PEG) 4000, fosfato e diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl). Observou-se que no sistema com 9% (p/v) de NaCl, houve uma seletividade de 75 vezes e uma recuperação de 55% da enzima adicionada ao sistema, possibilitando uma boa separação entre a enzima e as proteínas contaminantes. Foi também estudada a afinidade da enzima por íons cobre (Cu²⁺) imobilizados no gel "Chelating Sepharose Fast Flow". Após cinco minutos de contato, verificou-se que 33% da enzima presente no caldo foi adsorvida reversivelmente em tampão fosfato de sódio, pH 8,0.

Palavras-chave: Peroxidase; Glycine max, Sistema de Duas Fases Aquosas; Metal-Afinidade.

INTRODUÇÃO

Peroxidasas (doador: peróxido de hidrogênio oxidorrredutase, EC 1.11.1.7), são enzimas que tem função de oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio através do consumo de peróxido de hidrogênio.

O esquema abaixo exemplifica a reação de óxido-redução catalisada por peroxidases.



Peroxidase é a enzima mais frequentemente usada na produção de kits de imunoanálises, nas medidas colorimétricas do peróxido de hidrogênio, também pode ser empregada nos biosensores, na transformação química de medicamentos, na fabricação de produtos químicos, na degradação de compostos aromáticos, no controle do meio ambiente e nos processos de síntese de diversos intermediários químicos. A peroxidase de soja pode ser usada como substituto para os íons cloreto no clareamento de papel e para os oxidantes químicos na oxidação de anilina no processo de produção de polianilina^{[8][12][13]}.

Já foram descritos diferentes métodos para extração e purificação de peroxidase de diferentes origens, envolvendo principalmente a cromatografia de troca iônica^[20], a precipitação com sais^[9], a cromatografia de interação hidrofóbica^[7], a cromatografia de afinidade usando concavalina A como ligante^[5] e anticorpos monoclonais^[8] e a separação por partição em sistemas de suas fases aquosas (SDFA)^[14].

Diversos pesquisadores tem usado o complexo ácido iminodiacético-cobre, IDA-Cu²⁺, como ligante covalentemente preso a um suporte, para recuperar e purificar diversas enzimas por cromatografia de afinidade por este metal. Um fator importante na interação proteína-metal é a acessibilidade dos resíduos de histidina expostos na superfície da proteína^{[2][3][16]}. Entretanto, este ligante pode ser covalentemente imobilizado a um polímero hidrossolúvel.

SILVA *et al.*^[21] extraíram e purificaram peroxidase de soja por partição em SDFA, utilizando IDA-cobre acoplado a polietilenoglicol. Foi observado que a peroxidase era fortemente particionada para a fase contendo cobre e que 64% da enzima praticamente pura podia ser recuperada em apenas duas etapas. O fator de purificação obtido neste processo foi de 145.

A Figura 1 apresenta o sítio de ligação de uma proteína contendo histidina que se acopla ao complexo sólido ou solúvel IDA-Cu²⁺.

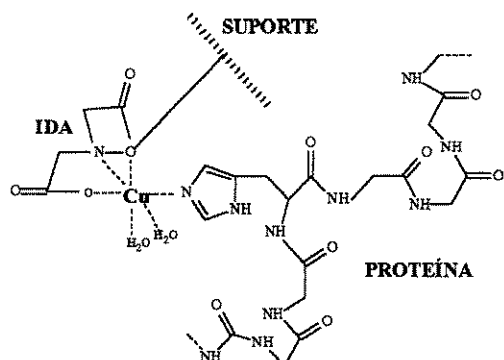


Figura 1: Sítio de ligação entre a proteína contendo histidina e o suporte (sólido ou solúvel) acoplado ao IDA-Cu²⁺.

A peroxidase de soja foi purificada^[16] com aumento de 628 vezes no fator de purificação, usando a seguinte seqüência de procedimentos: fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade e cromatografia hidrofóbica. Com esse procedimento obteve-se um baixo rendimento de 4%. Um novo trabalho de purificação da peroxidase da casca da soja^[10], usando a mesma seqüência de purificação, obteve-se o rendimento de 16,4% com aumento de atividade específica da peroxidase de 57 vezes.

Um processo de purificação e extração da peroxidase de soja num sistema de duas fases aquosas (SDFA) termossensível com Triton X-45, Triton X-100 e acetato de sódio a pH 5,5 foi desenvolvido^[11], cromatografia de afinidade foi usada para purificar a enzima em uma segunda etapa, aumentando o fator de purificação para 41 vezes e com rendimento para 28% de peroxidase. A dissociação da enzima do complexo de afinidade foi executada com a adição de uma fase salina (10% fosfato, pH 7,0).

Algumas proteínas foram purificadas por cromatografia de adsorção a metais imobilizados. Proteínas do plasma^[17], foram purificadas com o metais do grupo IIIA imobilizados na matriz. Para purificar a lactato desidrogenase^[6] e as fosfoproteínas^[1], foram usados íons Fe³⁺ e para a enzima colagenase^[15], foi usado íons Zn²⁺ imobilizados.

Portanto neste trabalho pretende-se investigar a purificação da peroxidase da casca da soja por partição em sistema de duas fases aquosas simples e por adsorção por metalo-afinidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato bruto de enzima

O extrato bruto de enzima foi preparado por trituração das cascas dos grãos de *Glycine max*. Dez gramas da casca dos grãos de soja foram

desengordurados com 100 mL de n-hexano, sob agitação magnética por 1 hora a 4°C. O n-hexano foi descartado e as cascas foram secadas por 30 minutos e pesadas. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 e em seguida mantendo-se a mistura sob agitação magnética por 1 hora a 4°C. Este caldo foi centrifugado a 246 g por 10 minutos. O sobrenadante foi mantido a 4°C.

Determinação da atividade enzimática da peroxidase

A determinação da atividade enzimática da peroxidase foi realizada pelo seguinte método^[22], em um tubo de ensaio foi adicionado 3 mL de tampão citrato fosfato 50 mM, pH 4,5, 100 µL de guaiacol 1% alcoólico (v/v) e 50 µL do caldo enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 40 µL de peróxido de hidrogênio 0,08 M, e a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro a 436 nm, contra branco ar. A absorbância foi anotada a cada minuto (até 5 minutos). A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo:

$$\frac{V}{v} \cdot \frac{1}{a \cdot b} \cdot \frac{A}{\text{min}} = \frac{3,19}{0,05 \cdot 6,4 \cdot 1} \cdot \frac{A}{\text{min}} = \frac{9,97 \cdot A}{\text{min}} \text{ U/mL}$$

Onde:

V = volume total;

v = volume da enzima adicionada;

A = absorbância;

a = coef. de extinção do produto (cm²/µmole);

b = via óptica.

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada através da reação colorimétrica entre os grupos aromáticos da proteína e o corante azul brilhante de Comassie em meio ácido (HCl 2,2% v/v)^[4], utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino.

pH ótimo

O pH ótimo da enzima foi investigado, usando tampão citrato fosfato 50 mM, na faixa de pH entre 2,0 e 9,0 a 25°C.

pH de estabilidade

A estabilidade da enzima foi estudada em tampão fosfato de sódio 50 mM contendo 10 mM de sulfato de cobre. Foram usados os pHs 5,9, 6,5, 7,3 e 8,5 a 25°C. O caldo enzimático foi incubado nos diferentes tampões por oito horas, e a medida da atividade enzimática foi feita em intervalos a uma hora.

Temperatura ótima

O estudo foi feito na faixa entre 20 e 80°C, em tampão citrato fosfato 50 mM, pH 4,5. Foi usado um banho termostaticado para manter a temperatura no interior da cubeta, onde acontece a reação, na temperatura desejada.

Temperatura de estabilidade

Foi estudada a estabilidade da enzima frente às temperaturas 10, 22, 37, 46 e 55°C, em tampão citrato fosfato 50 mM, pH 4,5. A enzima foi incubada por três horas em cada temperatura. O ensaio de atividade enzimática foi realizado a 25°C em intervalos de uma hora.

Teste de estabilidade após congelamento a -10°C

O caldo enzimático foi mantido a -10°C por 144 horas. O teste de atividade enzimática foi realizado a cada 24 horas, a 25°C.

Preparação do sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O SDFA foi preparado com Polietilenoglicol (PEG) 4000, fosfato de potássio ácido (KH_2PO_4) e básico (K_2HPO_4). O sistema foi preparado de forma a ter 20 g, onde 14% eram de PEG 4000, 10 e 11% de fosfato de potássio e o restante de caldo bruto da casca da soja. Adicionou-se NaCl em diferentes concentrações, e o sistema permaneceu sob agitação magnética até total homogeneização. O material foi transferido para tubos e a separação de fases foi acelerada na centrífuga, por 5 minutos.

A determinação dos parâmetros relacionados ao processo de separação em SDFA foram calculados de acordo com SILVA *et al.*^[21].

Cinética de adsorção para o sistema peroxidase-Chelating Sepharose Fast Flow

A cinética de adsorção da enzima no gel "Chelating Sepharose Fast Flow" (CSFF) com íons Cu^{2+} imobilizados, foi acompanhada por 20 minutos a 25°C, em frascos agitados a 180 rpm. Foi usado 1 mL de gel, 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0 e 9,0 mL do caldo enzimático, de concentração 25 mg casca de soja/mL. As alíquotas coletadas a cada cinco minutos foram centrifugadas. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade enzimática.

A capacidade de adsorção (q) do gel para o sistema era determinada:

$$q = \frac{v \cdot (AE_0 - AE^*)}{V_{\text{ads}}}$$

Onde:

v = volume total da amostra;

AE_0 = atividade enzimática inicial (antes da adsorção);

AE^* = atividade enzimática no equilíbrio;

V_{ads} = volume de adsorvente;

Isoterma de adsorção da peroxidase da casca da soja

A isoterma para o sistema Peroxidase-Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF), foi investigada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0. 9,0 mL de caldo enzimático com a concentração inicial de 8, 10, 13, 17, 20 e 25 mg de casca de soja/mL. Este material foi transferido para um erlenmeyer de 50 mL com tampa. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de uma solução tampão/adsorvente na proporção de 1:2 (v/v). O ensaio foi realizado a 25°C, com agitação a 180 rpm por 5 minutos. Após este tempo as alíquotas foram retiradas e centrifugadas, e a atividade peroxidásica foi determinada no sobrenadante.

A capacidade máxima (q_{max}) de adsorção para o sistema peroxidase-CSFF é calculada a partir da linearização do modelo proposto por Langmuir.

$$\frac{q}{C} = -\frac{1}{K_D} \cdot q + \frac{q_{\text{máx}}}{K_D}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estabilidade da enzima

A enzima apresentou maior atividade em pH 4,5 (Figura 2a) e temperatura ótima entre 30 e 55°C (Figura 2b). A estabilidade da peroxidase foi investigada com o objetivo de verificar sua resistência em condições de processo industrial. Assim, quando o caldo foi pré-incubado na faixa de pH de 5,9 a 8,5, em tampão contendo sulfato de cobre por 8 horas, a atividade enzimática foi totalmente preservada (Figura 2c).

A Figura 2d mostra que a peroxidase da casca da soja manteve-se estável frente à temperatura na faixa entre 10 e 55°C.

A Figura 2e representa a estabilidade da peroxidase da casca da soja depois de congelada, observou-se que a enzima não apresentou redução significativa na atividade enzimática depois de dias sendo congelada e descongelada.

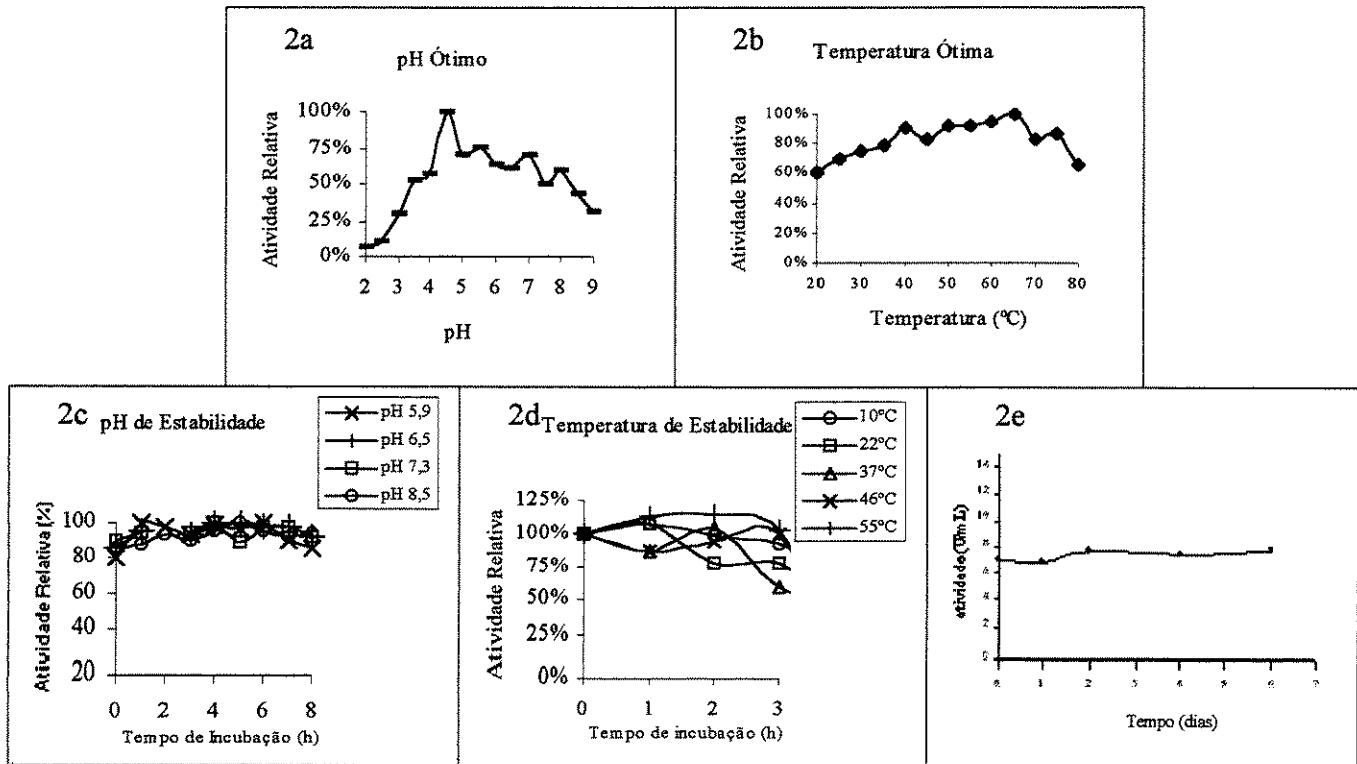


Figura 2: (a) pH ótimo, (b) temperatura ótima, (c) pH estabilidade, (d) temperatura de estabilidade e (e) estabilidade após dias de congelamento em freezer.

Sistema de duas fases aquosas para peroxidase

O sistema foi preparado com 10 g e com composição de 14% de polietilenoglicol (PEG) 4000, 10% de fosfato de potássio pH 6,0 e 76% de caldo. Após a separação de fases foram obtidos os volumes de 4,6 mL de fase superior e 3,4 mL de fase inferior. No entanto, o sistema com água (branco) não apresentou separação das fases. De acordo com a literatura^[18], isto ocorreu devido ao fato de o sistema estar situado na região monofásica. A fim de possibilitar a separação de fases, foi aumentada a porcentagem de sal no sistema, que passou a conter 14% de PEG 4000, 11% de fosfato de potássio e 75% de caldo.

Os volumes das fases foram: 6 mL de fase superior e 3 mL de fase inferior para o branco e 4 mL de fase superior e 5 mL de fase inferior para o sistema que continha o caldo enzimático.

Para quantificar a presença de enzimas e proteínas contaminantes nas fases superior e inferior foram calculadas atividade enzimática e proteínas totais para cada uma das fases. O resultado indicou que tanto a enzima como as proteínas contaminantes concentraram-se na fase inferior. Na tentativa de melhorar a seletividade do sistema, foi testada a influência do NaCl, acrescentando 3, 6 e 9% (p/v). Os resultados estão na Tabela 1.

Tabela 1: Efeito da porcentagem de NaCl sobre a seletividade do sistema com PEG 4000 e pH 6,0.

% NaCl	Vol. Fase Superior mL	Vol. Fase Inferior mL	R	K_{enzima}	$K_{proteina}$	Selet.	Recup. (%)
3	3,5	4,5	0,78	0,5	0,15	3,3	64,0
6	3,5	5,0	0,70	3,5	0,20	17,5	71,7
9	3,0	4,5	0,67	12,0	0,16	74,7	55,0

O sistema contendo 9% de NaCl apresentou uma melhor seletividade, combinando um elevado coeficiente de partição de enzima e um baixo coeficiente de partição de proteínas contaminantes. A seletividade deste sistema foi de 75 e com uma recuperação de 55% da enzima adicionada na fase superior. Desta forma, constatou-se que a peroxidase encontrava-se na fase superior, enquanto as proteínas contaminantes permaneciam na fase inferior.

Estes resultados indicam o potencial da purificação primária da peroxidase da casca da soja por SDF, os quais ainda podem ser maximizados por alteração na linha de amarração do diagrama de fases do sistema PEG 4000/fosfato/NaCl/Água. Uma segunda etapa de purificação seria necessário apenas no caso da exigência de elevada pureza da peroxidase, que poderia ser obtido por adsorção por metalo-afinidade no gel CSFF.

Cinética de adsorção do sistema peroxidase-Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF)

Como mostra a Figura 3, o tempo necessário para saturar a capacidade de adsorção do gel com caldo enzimático foi de 5 minutos. Através do estudo cinético, foi possível verificar que existe a formação do complexo entre a peroxidase da casca da soja e o gel com íons cobre imobilizados.

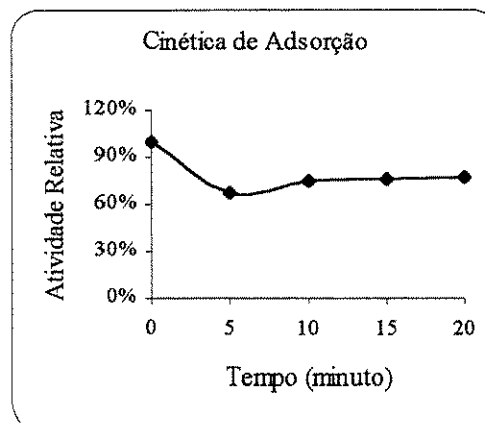


Figura 3: Cinética de Adsorção para o sistema Peroxidase-CSFF com íons Cu^{2+} imobilizados.

Isoterma de adsorção da peroxidase da casca da soja

Observa-se na Figura 4 que a adsorção da peroxidase tem uma tendência a seguir o modelo proposto por Langmuir. Os dados da regressão linear seguindo a equação de Langmuir nos fornece o valor da quantidade máxima (q_{max}) de peroxidase adsorvida de 11,4 U/mL de adsorvente. O valor da constante de equilíbrio (K) obtido foi de 14,3 mg de casca de soja/mL de adsorvente. O alto valor da constante de equilíbrio mostrou que o adsorvente possui pequena afinidade pela peroxidase da casca da soja, devido a adsorção de proteínas contaminantes presentes no caldo de casca de soja.

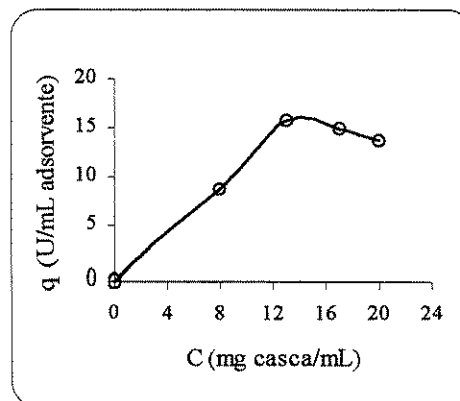


Figura 4: Isoterma de adsorção da peroxidase da casca da soja a 25°C para o sistema peroxidase-CSFF com íons Cu^{2+} imobilizados.

CONCLUSÃO

O estudo determinou algumas propriedades da peroxidase da casca da soja, tais como estabilidade frente a pH, temperatura e dois processos de purificação. Resultados muito satisfatórios foram obtidos em SDFa com PEG 4000 e 9% de NaCl, onde a elevada seletividade possibilitou uma boa separação entre enzima e proteínas contaminantes. Verificou-se que existe a afinidade entre a peroxidase da casca da soja e os íons cobre imobilizados ao estudar o potencial de purificação do gel "Chelating Sepharose Fast Flow" para esta enzima, em uma segunda etapa do processo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP e CNPq pelas bolsas de Mestrado e de IC concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1].ANDERSSON, L. and PORATH, J. *Anal. Biochem.*, 154: 250-254, 1986.
- [2].ARNOLD, F. *Bio/Technology*, 9: 151-156, 1991.
- [3].BIRKENMEIER, G. et al. *Journal of Chromatography*, 539:267-277, 1991.
- [4].BRADFORD, M.M. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.
- [5].BRATTAIN, M.G. et al. *Analytical Biochemistry*, 72: 346-352, 1976.
- [6].CHAGA, G. et al. *Journal of Chromatography*, 627: 163, 1992.
- [7].CHAVEZ, C. e FLURKEY, W.H. *Journal of Chromatography*, 298: 169-171, 1984.
- [8].EGOROV, A.M. e GAZARYAN, I.G. *Plant Peroxidase Newsletter*, 2: 1-5, 1993.
- [9].ELLING, L. et al. *Analytical Biochemistry*, 192: 74-77, 1991.
- [10]. LASCU, I. et al. *Journal of Chromatography*, 357: 436-439, 1986.
- [11]. LIU, W. et al. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 779-785, 1999.
- [12]. MIRANDA, M.V. e CASCONE O. *Biotechnology Techniques*, 8(4): 275-280, 1994.
- [13]. MIRANDA, M.V. et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(2): 147-154, 1995.
- [14]. MIRANDA, M.V. et al. *Acta Biotechnology*, 18(3): 179-188, 1998.
- [15]. HARRIS, E.L.V. e ANGEL, S. PERY, M. e KIRBY, H. Example Purification, In "Protein Purification Application", Ch. 7, Ed. IRL Press, Oxford, 1995.
- [16]. PORATH, J. et al. *Nature*, 258: 598-599, 1975.
- [17]. PORATH, J. e OLIN, B. *Biochemistry*, 22: 1621, 1983.
- [18]. RASHMI, K.R. et al. *Process Biochemistry*, 35: 43-48, 1999.
- [19]. SESSA, D.J. e ANDERSON, R.L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5): 960-965, 1981.
- [20]. SHANNON, L.M. et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(9): 2166-2171, 1966.
- [21]. SILVA, M.E. e FRANCO, T.T. *Journal of Chromatography*, julho, 2000.
- [22]. BURDON, R.H. e Van KNIPPENBERG, P.H. TJIJSEN, P. Properties and preparation of enzymes used in enzyme-immunoassays. In: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Elsevier, New York, Ch. 10, p. 173, 1985.