



**Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Departamento de Ciência de Alimentos**

## **Caracterização Bioquímica da Peroxidase e da Polifenoloxidase de Açaí (*Euterpe oleracea*)**

**Elen Resende Santos**  
Engenheira de Alimentos

**Profa. Dra. Hélia Harumi Sato**  
Orientadora

### **PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Elen Resende Santos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de fevereiro de 2002.

Campinas, 26 de fevereiro de 2002

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Hélia Harumi Sato".

**Profa. Dra. Hélia Harumi Sato**  
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas  
Estado de São Paulo - Brasil  
2001

UNIDADE:	712
Nº CHAMADA:	
V:	
TOMBO:	48726
PROC.:	16-837102
C1:	<input type="checkbox"/>
C2:	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO:	R\$ 14,00
DATA:	01/05/02
Nº CPD:	

CM00167117-9

IB ID 235316

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Santos, Elen Resende  
Sa59c      Caracterização bioquímica da peroxidase e da  
polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*) / Elen Resende  
Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Hélia Harumi Sato  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.Peroxidase. 2.Açaí. 3.\*Polifenoloxidase 4.\*Inativação  
I.Sato, Hélia Harumi. II.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## BANCA EXAMINADORA

*Hélia Harumi Sato*

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
(Orientadora)

*Hilary C. de Menezes*

---

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes  
(Membro)

*Lúcia Regina Durrant*

---

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant  
(Membro)

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
(Suplente)

Campinas, de de 2002.

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

*Felizes nós, porque colocamos alto o  
sonho de nossas vidas!  
Deus trabalha acima de nossos sonhos!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por tudo.

A minha orientadora, pela confiança e compreensão.

Aos meus pais, Léa e José Clementino, pelo esforço sem medida, pelo amor e dedicação.

Aos meus irmãos Érico e Fabiano, e à minha família, pelo encorajamento.

Às professoras Gláucia Maria Pastore, Lúcia Regina Durrant e Hilary Castle de Menezes pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Antônio Sebastião Porto, pelo apoio e auxílio na leitura da tese.

Ao Projeto Universidades Renovadas que me motiva ser sonhadora.

À Lúcia Helena pelo interesse e pelo fornecimento de açaí.

Aos colegas no laboratório, Ana Maria, Beatriz, Carlos, Cláudio, Dora, Fabiana, Gisele, Heinz, Hermelinda, Ivanilton, Lillian, as duas Lucianas, Margarida, Massaharu, Marcelo, Roseli e Severino pela amizade e carinho.

À Ana Antônia de Paiva, pelo ótimo convívio e valiosa amizade.

Ao CNPQ pela bolsa durante dois anos.

A todas as pessoas que, com justiça, deveriam estar aqui mencionadas, mas não há tamanho espaço.

## LISTA DE ABREVIACOES

DEAE – celulose	Dietilaminoetil - celulose
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HTST	High Temperature Short Time
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
$K_M$	Constante de Michaelis-Mentem
PFO	Polifenoxidase
POD	Peroxidase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
$V_{max}$	Velocidade máxima

# ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE GERAL</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Açai</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Polifenoloxidase</b>	<b>6</b>
2.2.1. Características	6
2.2.2. Atividade de monofenolase	8
2.2.3. Atividade de difenolase	9
2.2.4. PFO e efeito do pH	10
2.2.5. PFO e efeito da temperatura	14
2.2.6. Substratos para PFO	16
2.2.7. Inibidores de PFO	17
2.2.8. Ensaio enzimático de PFO	20
<b>2.3. Peroxidase</b>	<b>23</b>
2.3.1. Características	23
2.3.2. Isoenzimas de peroxidase	27
2.3.3. POD e efeito do pH	28
2.3.4. POD e efeito de temperatura	32
2.3.5. Regeneração da POD	34
2.3.6. Substratos para peroxidase	35
2.3.7. Sais minerais e inibidores e seus efeitos na POD	36
2.3.8. Ensaio enzimático da POD	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Equipamentos</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Reagentes e resina</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Obtenção do extrato enzimático bruto</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Determinação da atividade enzimática</b>	<b>41</b>
3.4.1. Determinação da atividade da polifenoloxidase	41
3.4.2. Determinação da atividade da peroxidase	42
<b>3.5. Caracterização da polifenoloxidase bruta de açai</b>	<b>43</b>
3.5.1. Efeito da temperatura na atividade da polifenoloxidase	43
3.5.2. Efeito do pH na atividade da polifenoloxidase bruta	43
3.5.3. Efeito do pH na estabilidade da polifenoloxidase bruta	44
3.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da polifenoloxidase bruta	45
<b>3.6. Caracterização da peroxidase bruta de açai</b>	<b>45</b>
3.6.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta	45
3.6.2. Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta	46
3.6.3. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta	46
3.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta	47

<b>3.7. Purificação parcial da peroxidase de açaí</b>	<b>48</b>
3.7.1. Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio	48
3.7.2. Cromatografia da POD em coluna de DEAE-celulose	49
<b>3.8. Caracterização da POD parcialmente purificada</b>	<b>50</b>
3.8.1. Efeito da temperatura na atividade da POD parcialmente purificada	50
3.8.2. Efeito do pH na atividade da POD parcialmente purificada	50
3.8.3. Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada	51
3.8.4. Efeito da temperatura na POD da peroxidase parcialmente purificada	51
3.8.5. Efeito da concentração de substrato na atividade da POD parcialmente purificada	51
3.8.6. Efeito de sais minerais e inibidores na atividade da POD parcialmente purificada	52
3.8.7. Regeneração da atividade da POD parcialmente purificada	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Obtenção do extrato enzimático bruto de açaí</b>	<b>54</b>
<b>4.2. Caracterização da polifenoloxidase bruta de açaí</b>	<b>55</b>
4.2.1. Efeito da temperatura na atividade da PFO bruta	55
4.2.2. Efeito do pH na atividade da PFO bruta	56
4.2.3. Efeito do pH na estabilidade da PFO bruta	59
4.2.4. Efeito da temperatura na estabilidade da PFO bruta	61
<b>4.3. Caracterização da peroxidase bruta de açaí</b>	<b>64</b>
4.3.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta	64
4.3.2. Efeito do pH na atividade da POD bruta	66
4.3.3. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta	68
4.3.4. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta	69
<b>4.4. Purificação parcial da peroxidase de açaí</b>	<b>72</b>
4.4.1. Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio	72
4.4.2. Cromatografia da peroxidase em coluna de DEAE-celulose	73
<b>4.5. Caracterização da peroxidase parcialmente purificada de açaí</b>	<b>75</b>
4.5.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí	75
4.5.2. Efeito do pH na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí	77
4.5.3. Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada	78
4.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí	80
4.5.5. Efeito da concentração de substrato na atividade da POD parcialmente purificada de açaí	83
4.5.6. Efeito de sais minerais e de inibidores na atividade da POD parcialmente purificada de açaí	84
4.5.7. Regeneração da peroxidase parcialmente purificada	87
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO</b>	<b>93</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>94</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 01 – Características de polifenoloxidasas de frutas e vegetais _____	10
Tabela 02 – Características de peroxidases de frutas e vegetais _____	28
Tabela 03 – Purificação Parcial da Peroxidase de Açaí _____	74
Tabela 04 – Efeito de sais minerais na atividade da POD parcialmente purificada _____	86
Tabela 05 – Efeito da adição de inibidores na atividade da POD parcialmente purificada _____	87

## Índice de Figuras

Figura 01 – Árvore de açaí com frutos verde e maduro.	3
Figura 02 – Frutos de açaí maduros.	4
Figura 03 – Equipamento para extração de polpa de açaí	5
Figura 04 – Frutos de açaí após maceração	5
Figura 05 – Ilustração da ação da polifenoloxidase.	6
Figura 06 – Ilustração da ação da peroxidase.	24
Figura 07 – Efeito da temperatura na atividade da PFO bruta de açaí.	56
Figura 08 – Efeito do pH na atividade da PFO bruta de açaí.	57
Figura 09 – Efeito do pH na estabilidade da PFO bruta de açaí.	60
Figura 10a – Efeito da temperatura na estabilidade da PFO bruta.	62
Figura 10b – Inativação térmica da PFO bruta de açaí.	62
Figura 11 – Efeito da temperatura na atividade da POD bruta de açaí.	65
Figura 12 – Efeito do pH na atividade da POD bruta do açaí.	67
Figura 13 – Efeito do pH na estabilidade da POD bruta de açaí.	69
Figura 14a – Efeito da temperatura na estabilidade da POD bruta.	70
Figura 14b – Inativação térmica da POD bruta de açaí.	71
Figura 15 – Eluição da peroxidase em coluna de DEAE-celulose	74
Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade da POD parcialmente purificada de açaí.	76
Figura 17 – Efeito do pH na atividade da POD parcialmente purificada	77
Figura 18 – Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí.	79
Figura 19a – Efeito da temperatura na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí.	81
Figura 19b – Efeito da temperatura na estabilidade da POD Parcialmente Purificada de Açaí	81
Figura 20a – Determinação dos parâmetros cinéticos da atividade de POD para o substrato guaiacol	83
Figura 20b – Determinação dos parâmetros cinéticos de atividade da POD para o substrato p-fenilenodiamina	84
Figura 21a – Estudo da capacidade de regeneração da POD parcialmente purificada de açaí após tratamento térmico a 80°C.	89
Figura 21b – Estudo da capacidade de regeneração da POD parcialmente purificada de açaí após tratamento térmico a 90°C.	89

## RESUMO

O açaí é um fruto de palmeira, de coloração violeta escuro, e é usado para extração de polpa e suco. Durante o armazenamento ou transporte, os mesmos podem perder sua coloração, tornando-se marrom. A polpa de açaí apresentou alta atividade de peroxidase (POD) e baixa atividade de polifenoloxidase (PFO). Neste trabalho, foram estudadas as características bioquímicas das preparações brutas de POD e PFO da polpa de açaí. Foram estudadas as características bioquímicas e os efeitos de sais e de inibidores e do tratamento térmico na inativação da POD parcialmente purificada.

A PFO da preparação bruta de açaí apresentou atividade ótima em pH 6,0 e na faixa de 40 – 45°C, e se mostrou mais instável em pH ácido ou levemente ácido. No estudo da estabilidade da enzima em diferentes valores de pH, detectou-se vários picos de maior estabilidade da enzima indicando a presença de mais de uma isoenzima na preparação bruta. Após 10 minutos de tratamento a 30, 40, 50 e 70°C a atividade enzimática residual foi de 80, 30, 15 e 5%, respectivamente. A completa inativação ocorreu após 2 minutos de tratamento térmico em ebulição (97°C).

A POD do extrato bruto da polpa de açaí apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a 45°C e mostrou alta estabilidade térmica, mantendo cerca de 50% da atividade inicial após 60 minutos de tratamento a 70°C. A peroxidase mostrou-se estável em ampla faixa de pH, mantendo mais que 50% da atividade inicial após 24 horas de incubação a 5°C na faixa de pH 2,6 a 10,0.

A POD da polpa de açaí foi parcialmente purificada por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e cromatografia em DEAE-celulose. A POD parcialmente purificada apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a 35°C e mostrou-se estável termicamente, retendo 56% da sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento a 70°C. A enzima foi inativada após 3 minutos de tratamento em ebulição (97°C). Verificou-se regeneração parcial da atividade da POD parcialmente purificada após tratamento térmico durante 1 a 5 minutos a 80 e 90°C. Esta enzima mostrou-se estável em ampla faixa de pH, retendo mais de 55% de sua atividade máxima na faixa de pH 2,6 a 10,0 após 24 horas de incubação a 5°C. Foram observados picos de maior estabilidade de pH, indicando a presença de diferentes isoenzimas na preparação parcialmente purificada da POD.

Os parâmetros cinéticos da POD parcialmente purificada foram estudados e os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  da enzima para o substrato guaiacol foram respectivamente 3,9 mM e 52,5 U/min/mL, enquanto que para o substrato p-fenilenodiamina foram respectivamente 2,4 mM e 25,5 U/min/mL.

Os inibidores mais efetivos da POD parcialmente purificada foram  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio. Na presença desses inibidores, na concentração final de 10,0 mM, a peroxidase parcialmente purificada de açaí foi praticamente inativada.

Os sais  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  e  $\text{CuSO}_4$ , na concentração final de 1,0 mM, inibiram parcialmente a POD parcialmente purificada de açaí, sendo obtido

respectivamente 61,3 e 84,8% de atividade residual. Os sais KCl, MnSO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub> , na concentração final de 10,0 mM, inibiram cerca de 25 a 30% a atividade desta enzima, sendo obtido respectivamente atividade residual de 75,7 , 71,9 e 68,2%. Os sais NaCl, CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, na concentração final de 10,0 mM, inibiram mais que 50% a atividade da POD, sendo obtido atividade residual de 49,5, 37,1 e 23,2 %.

## **ABSTRACT**

Açaí is the purple-reddish fruit of a palm tree, and is used for the extraction of pulp and juice. Under storage or during transportation, the pulp and juice may lose their color and become brown. Açaí pulp has high peroxidase (POD) activity and low polyphenol oxidase (PPO) activity. In the present work the biochemical characteristics of peroxidase and polyphenol oxidase from açaí pulp were studied. The biochemical characteristics and effects of salt and inhibitors and thermal treatment on the inactivation of partially purified POD were studied.

The crude extract of PPO from açaí pulp showed maximum enzyme activity at pH 6.0 in the 40 – 45°C range, and was shown to be less stable at acid and slightly acid pH values. The presence of more than one isoenzyme of partially purified POD was indicated, due to the presence of different peaks in the pH stability test. After 10 minutes of thermal treatment at 30, 40, 50 and 70°C, the residual activity of PPO from açaí was 80, 30, 15 and 5%, respectively. Complete inactivation was reached after 2 minutes boiling (97°C).

The POD of the crude extract from açaí pulp showed maximum enzyme activity at pH 5.0 and 45°C, and showed good thermal stability, retaining approximately 50% of its initial activity after 60 minutes of treatment at 70°C. The POD was shown to be stable at a wide range of pH values, retaining 50% or more of its maximum activity after 24 hours of incubation at 5°C in the 2.6 – 10.0 pH range.

The POD from açai pulp was partially purified by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation and DEAE-cellulose chromatography. The partially purified POD showed maximum enzymatic activity at pH 5.0 and 35°C, and was shown to be thermally stable and retained 56% of its initial activity after 60 minutes at 70°C. The enzyme was inactivated after 3 minutes boiling (97°C). Partial regeneration of POD activity was detected after thermal treatment of the partially purified POD for 1 to 5 minutes at 80 and 90°C. This enzyme was shown to be stable at a wide range of pH values, retaining 55% or more of its maximum activity after 24 hours of incubation at 5°C in the 2.6 – 10.0 pH range. The presence of more than one isoenzyme of partially purified POD was indicated, due to the presence of different peaks in the pH stability test.

The kinetic parameters of the partially purified POD were studied, and the  $K_M$  and  $V_{MAX}$  values for POD using guaiacol were respectively, 3.9 mM and 52.5 U/min/mL. Using p-phenylenediamine, the  $K_M$  and  $V_{MAX}$  values were 2.4 mM and 25.5 U/min/mL, respectively.

Of the inhibitors tested, the most effective with respect to the partially purified POD were  $\beta$ -mercaptoethanol, ascorbic acid and sodium metabisulfite. The partially purified POD was almost inactivated in the presence of 10.0 mM of these inhibitors.

The salts  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  and  $\text{CuSO}_4$ , at a final concentration of 1.0 mM, slightly inhibited partially purified POD, the residual activities being 61.3 and 84.8%, respectively. The salts KCl,  $\text{MnSO}_4$  and  $\text{MgSO}_4$ , at a final concentration of 10.0 mM, inhibited from 25 to 30% of the POD activity, the

residual activities being 75.7, 71.9 and 68.2%, respectively. The salts NaCl, CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, at a final concentration of 10.0 mM, inhibited more than 50% of the POD activity, the residual activities being 49.5, 37.1 and 23.2 %.

## 1. INTRODUÇÃO

O açaí é um fruto de coloração violácea escuro produzido em cachos pela palmeira *Euterpe oleracea M.*, e é utilizado para obtenção de polpa e suco. Os frutos de açaí são utilizados como alimento e fonte de renda pelas populações rurais e camadas sociais urbanas mais desfavorecidas da região amazônica onde a palmeira é nativa. As folhas, o palmito e o tronco do açazeiro são também aproveitados pela população.

A polpa de açaí é consumida em grande quantidade, na região amazônica, na forma de sucos, sorvetes, refrescos e também engrossado com farinha de mandioca acompanhando carnes, peixes, arroz e feijão e outros alimentos. A polpa de açaí congelada tem alcançado um mercado crescente em todo o Brasil.

A coloração roxo-avermelhada da polpa de açaí pode sofrer alterações tomando-se marrom devido a deteriorações oxidativas. Isso resulta em perda de seu valor comercial.

Grande parte da plantação mundial de frutas e vegetais é perdida devido a danos pós-colheita. Uma das causas principais dessa perda é a modificação da coloração, que é devida tanto a formação quanto a degradação de compostos pigmentados por atividade enzimática endógena como a de PFO e POD.

As peroxidases estão envolvidas em alterações oxidativas do sabor, cor, aroma e qualidade nutricional de plantas. São amplamente distribuídas

nos tecidos animais, vegetais e em microrganismos e podem catalisar reações oxidativas e de hidroxilação. Geralmente possuem um requerimento específico de peróxido de hidrogênio. As peroxidases podem deteriorar frutas e vegetais mesmo a temperaturas muito baixas.

A PFO catalisa o escurecimento enzimático de frutas e vegetais, e em alguns casos também está envolvida na despigmentação, que se seguem a quaisquer danos sofridos pelas células, principalmente durante transporte e estocagem. O produto inicial da oxidação por PFO são quinonas, que rapidamente se condensam para produzir polímeros escuros relativamente insolúveis, as melaninas. Os fatores mais importantes que determinam a taxa de escurecimento enzimático de frutas e vegetais são a concentração tanto de PFO ativa quanto de compostos fenólicos presentes, o pH, a temperatura e a disponibilidade de  $O_2$  para o tecido.

Um entendimento dos detalhes do processo de escurecimento enzimático é necessário para controlá-lo e para se obter um produto final que seja aceitável pelo consumidor. Alguns produtos tropicais são difíceis de serem transportados para outros mercados sem que sofram nenhum tipo de dano físico. Desta forma, novos avanços precisam ser obtidos de modo que esses produtos estejam disponíveis para mercados mais distantes.

O presente trabalho visou a caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase da polpa de açaí. Foram estudadas as condições ótimas de atividade e estabilidade das preparações enzimáticas e o efeito de inibidores e tratamento térmico no controle das reações deteriorativas catalisadas pelas enzimas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*, M.) é uma planta típica das várzeas e margens dos rios da região amazônica (Figura 01) e é importante na proteção do solo em condições tropicais de grande pluviosidade (Silva, 1996).



Figura 01 – Árvore de açaí com frutos verde e maduro.

É uma palmeira de estipe delgado que pode atingir 25m de altura. Cresce em touceiras que apresentam de 3 a 25 palmeiras. Possui folhas grandes (até 2m de comprimento) de cor verde-escura, finamente recortadas em tiras. Apresenta flores pequenas, amarelas, que se agrupam em cachos pendentes e aparecem predominantemente de setembro a janeiro (Silva, 1996).

Os frutos aparecem em cachos geralmente de julho a dezembro, podendo estar presentes durante todo o ano, pois o período de frutificação varia muito e depende da sua localização, nas diferentes ilhas da região (Silva, 1996).



Figura 02 – Frutos de açai maduros.

Os açais possuem forma arredondada ou ovóide (Figura 02), rica polpa comestível, cuja espessura média é de 1 mm, e um caroço duro. Os frutos mudam de coloração verde para coloração violácea, quase negra, quando maduros (Silva, 1996). Sua polpa apresenta pH próximo da neutralidade e acidez variável conforme a época do ano (Poulet, 1998).

Do açai é extraído, por maceração (Figuras 03 e 04), o “vinho ou suco de açai”, que tem um grande mercado em toda região amazônica. É consumido também na forma de refrescos e sorvetes. Alcança um consumo entre 100 a 180 mil litros por dia só na cidade de Belém (Silva, 1996) e entre 27 a 34 mil dentro da aglomeração de Macapá (Poulet, 1998). Possui

elevado valor calórico e apresenta 2,37% de proteína e 5,96% de gordura (Silva, 1996).

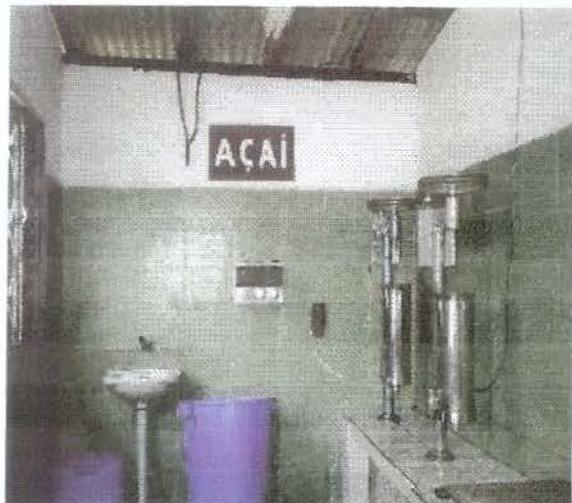


Figura 03 – Equipamento para extração de polpa de açaí



Figura 04 – Frutos de açaí após maceração

Atualmente os plantios racionais de açaizeiros são raros e vigora a exploração pelo sistema extrativista que, sendo feita de forma não racional, ilegal, desordenada e clandestina, dá lugar a sua destruição. Um grande desafio para os próximos anos é o aproveitamento comercial e lucrativo desta planta com bom senso na sua utilização. Devem ser elaborados métodos de seleção e plantio, visando sua preservação para o futuro (Silva, 1996).

## 2.2. Polifenoloxidase

### 2.2.1. Características

A PFO é uma enzima que contém íon cobre e é também conhecida como catecol oxidase, catecolase, difenol oxidase, *o*-difenolase, fenolase e tirosinase. Dois tipos de reação são catalisadas pela PFO (Figura 05), ambas usando oxigênio molecular: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis, pela atividade de monofenolase ou cresolase (EC 1.14.18.1), e a oxidação de *o*-difenóis, pela atividade de difenolase ou catecolase (EC 1.10.3.2), (Martinez e Whitaker, 1995).

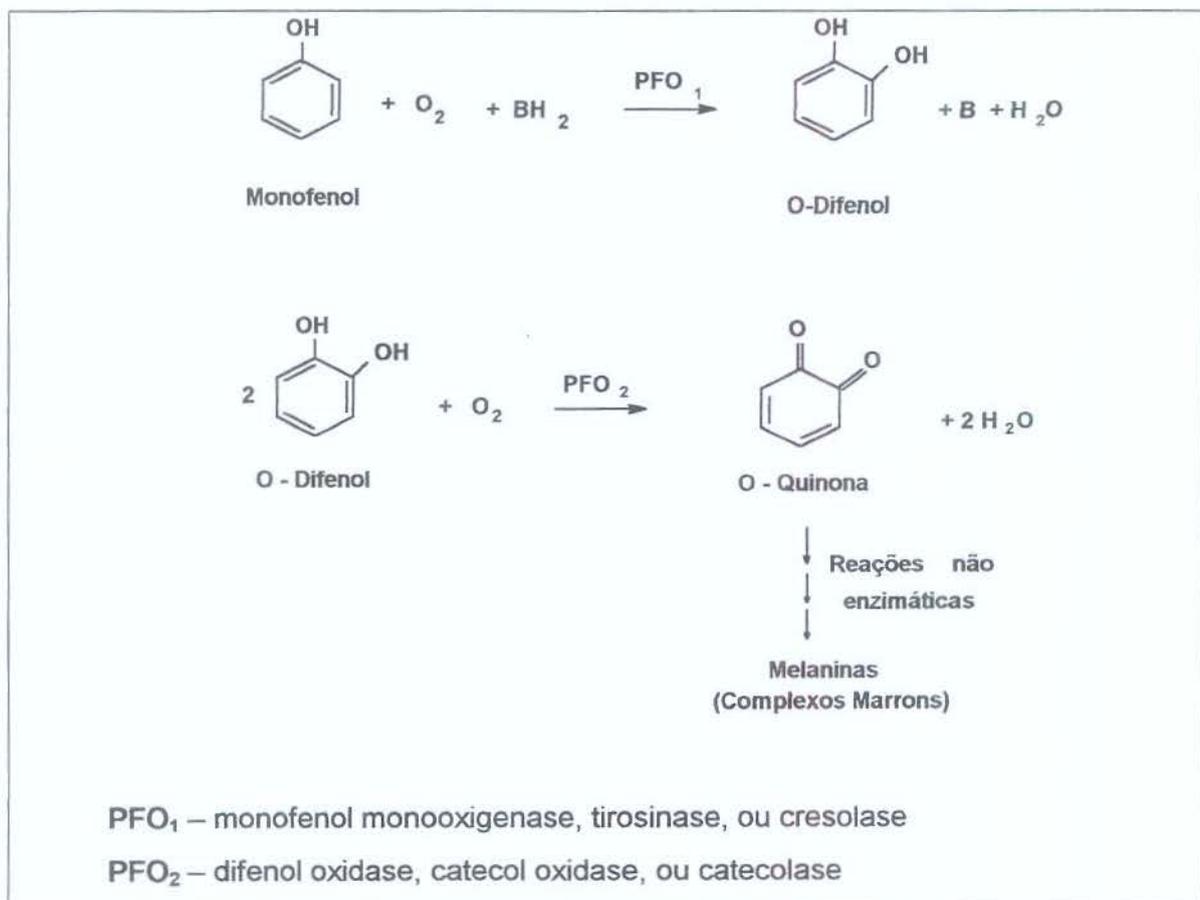


Figura 05 – Ilustração da ação da polifenoloxidase.

Até o presente momento todas as polifenoloxidasas estudadas possuem a atividade de catecolase, mas nem todas podem hidroxilar monofenóis (Martinez e Whitaker, 1995).

A PFO está presente em algumas bactérias e fungos, na maioria das plantas, em alguns artrópodes e em todos os mamíferos. Em todos os casos essa enzima está associada à pigmentação escura no organismo, e parece ter uma função protetora (Mayer e Harel, 1991). Contribui para se acreditar nessa função protetora o fato de que, apesar de o metabolismo de fenóis não ser particularmente afetado pelas infecções da planta, palmeiras resistentes acumulam teores fenólicos significativamente superiores aos de plantas sensíveis. Esses compostos podem contribuir para a defesa da palmeira, uma vez que a insolubilização de fenóis nas paredes celulares reforçam sua rigidez e as tornam mais resistentes aos parasitas (Zioti et al., 1998). Outro fato que sugere fortemente a relação entre a PFO e mecanismos de defesa da planta contra doenças é o de que quando insetos comem as folhas, algumas estruturas são rompidas e a PFO fica livre para reagir com polifenóis formando polímeros escuros. Esses polímeros obstruem a boca dos insetos. Como resultado o ataque por insetos é inibido (Murata et al., 1995).

O fato de a PFO não ser encontrada em muitas bactérias, em algumas plantas e em albinos sugere que ela não tenha um papel vital no metabolismo, assim é possível estudar suas funções *in vivo* trabalhando com mutantes (Martinez e Whitaker, 1995).

Em plantas, são conhecidas tanto PFO solúvel quanto PFO ionicamente ligada à membrana. Técnicas histoquímicas revelaram que a enzima está predominantemente localizada em membranas tilacóides de cloroplastos. O gene da PFO é traduzido no citoplasma, a pro-PFO formada é então transportada para o cloroplasto onde é clivada, dando origem a sua forma ativa (Martinez e Whitaker, 1995).

Em tecidos vivos, o substrato fenólico e a enzima estão separados dentro das células, com a extração, ou outro tratamento que danifique a célula, a enzima e o substrato entram em contato permitindo que a reação ocorra rapidamente. As *o*-quinonas formadas durante a oxidação são altamente reativas e normalmente reagem com outras quinonas, aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando mudanças estruturais e funcionais, diminuindo o valor nutritivo dos produtos (Escribano et al., 1997).

A PFO, além do seu papel no escurecimento enzimático, também catalisa a degradação de antocianinas, diminuindo a intensidade de sua cor. As antocianinas sozinhas não são substrato para essa enzima, mas podem ser oxidadas na presença de fenóis ou ácido clorogênico (Siddiq et al., 1994).

### **2.2.2. Atividade de monofenolase**

Escribano et al., (1997) estudaram a PFO de beterraba. A atividade de monofenolase foi medida utilizando-se L-tiramina. Uma fase lag foi observada até o aparecimento do primeiro produto estável, o dopaminocromo. Nesse mesmo estudo demonstrou-se que é obtido menor

período lag em pH 5,5. Observou-se ainda que um aumento na concentração da enzima provoca uma diminuição da fase lag e essa é dependente do substrato, sendo que esse parâmetro tende para um valor máximo. Desde que a fase lag é o tempo requerido para se atingir a concentração de *o*-difenóis no *steady state*, a adição de *o*-difenóis ao meio de reação para ensaio enzimático diminui a fase lag. Com aumento na concentração de dopamina nota-se uma diminuição na fase lag, até que a partir de uma certa concentração ocorre um aumento repentino na atividade, obtendo-se valores nulos ou até negativos de fase lag. Os valores de  $K_m$  (mM) para as enzimas solúveis e ligadas à membrana são praticamente iguais, a eficiência catalítica ( $V_m/K_m \text{ min}^{-1}$ ) entretanto é praticamente o dobro para a enzima ligada.

### **2.2.3. Atividade de difenolase**

A atividade de difenolase envolve a oxidação de dois *o*-difenóis a dois *o*-quinonas com a redução concomitante de quatro elétrons do  $O_2$ , o que forma duas moléculas de água.

Quando um difenol não cíclico, como por exemplo 4-metil catecol, é usado tanto o acúmulo do produto quinona, quanto o decréscimo na concentração de oxigênio são lineares com o tempo e não há período lag. Quando se utiliza um difenol cíclico, como por exemplo L- DOPA, o decréscimo em oxigênio é linear a qualquer pH, mas o aparecimento da quinona cíclica é dependente do pH. Em pH 7,0 a curva é linear. Em pH menor que 6,0 existe fase lag, que é independente das concentrações de enzima e substrato usados. O aparecimento dessa fase lag em pH baixo

indica a presença de um intermediário químico (*o*-DOPAquinona-H<sup>+</sup>). Entretanto, em pH muito ácido (pH < 5,0), uma via alternativa de hidroxilação que envolve a formação de *p*-dopaquinona (com a adição de água ao anel quinona) torna-se mais importante (Sánchez-Ferrer et al., 1995).

#### 2.2.4. PFO e efeito do pH

O pH é um dos fatores determinantes na expressão da atividade enzimática. A maioria das polifenoloxidasas de frutas e vegetais apresentam atividade ótima em pH levemente ácido ou próximo a neutralidade (Vámos-Vigyázó, 1981). A Tabela 01 ilustra a faixa de pH ótimo de atividade e estabilidade de PFO de algumas frutas e vegetais.

**Tabela 01 – Características de polifenoloxidasas de frutas e vegetais**

Fonte	Nome Científico	pH ótimo	pH de estabilidade	T. ótima	T. de estabilidade	Referência
Alho	<i>Allium</i> sp.	7,5	—	—	Não há perda de atividade após 40°C/30 min	Arslan et al. (1997)
Ameixa	—	—	—	20°C	Inativação completa após 68°C/20 min	Siddiq et al. (1994)
Cogumelo	<i>Agaricus bisporus</i>	7,0	4 - 9	—	Não há perda de atividade após 45°C/10 min. Acima de 70°C não há atividade residual.	McCord e Kilara (1983)
Damasco	<i>Prunus armeniaca</i> L.	8,5	—	—	50% de inativação após 60°C/47min ou 80°C/16min.	Arslan et al. (1998)
Maçã Amasya	<i>Malus sylvestris</i> Miller	6,6 a 9,0	—	15 a 70°C	—	Oktay et al. (1995)

Maçã Fuji	<i>Malus pumila</i>	4,0	6 - 8	—	Houve perda de 25% de atividade após tratamento a 30°C/5 min e inativação completa a 50°C.	Murata et al. (1992)
Manga Haden	<i>Mangifera indica</i>	5,6- 6,0	—	—	50% de inativação após tratamento a 80°C/4min ou tratamento a 85°C/2,1min.	Park et al. (1980)
Palmito	<i>Acanthophoenix rubra</i>	5,2	3 - 8	30°C	50% de inibição após tratamento a 70°C/18 min ou tratamento a 80°C/2,5 min e 90% de inibição após tratamento a 90°C/3 min.	Robert et al. (1995)
Palmito	<i>Euterpe edulis M.</i>	7,0	4 - 9	—	25% de perda de atividade após tratamento a 30°C/20 min e cerca de 48% de perda de atividade após tratamento a 75°C/5 min.	Bernhardt et al. (1978)
Palmito	<i>Euterpe edulis M.</i>	5,6	5 - 8	30°C	A enzima mostrou-se estável entre 50 e 60°C e foi inativada a 75°C	Lourenço et al. (1990)
Pêra Yali	<i>Pyrus bretschneideri</i>	7,0	—	—	Tratamento a 30°C/30 min não causou perda na atividade, acima de 40°C observou-se perda da atividade enzimática.	Zhou e Feng (1991)
Pinha	<i>Annona squamosa L.</i>	6,5	6 - 8	20°C	Estável de 10 a 30°C por 1 hora. Inativada rapidamente acima de 50°C	Lima (1999)
Repolho	<i>Brassica oleracea L.</i>	7,6	5 - 11	40°C	Apresentou 40% de atividade residual após tratamento a 100°C/10 min	Fujita et al. (1995)
Uva Airen	<i>Vitis vinifera</i>	7,5	—	45 - 55°C	—	Valero et al. (1988)

Mayer e Harel (1979) relataram que o valor de pH ótimo de atividade da PFO varia com a fonte da enzima, com o substrato fenólico, com a pureza da enzima e também com o tipo de tampão.

A PFO de cogumelo (*Agaricus bisporus*) mostrou-se estável quando uma solução da enzima (0,33mg/mL) foi mantida em tampão fosfato de potássio 0,005M com valores de pH variando de 4,0 a 9,0 por 10 minutos a 25°C. A atividade residual foi testada em tampão fosfato de potássio 0,5M, pH 6,5 a 25°C. Em pH inferior a 3,5, nas mesmas condições, a enzima foi inativada (McCord e Kilara, 1983).

No caso de uva Airen, a medida da atividade de catecolase em função do pH apresentou uma faixa de máximo entre 3,5 e 4,5 e uma queda marcante na atividade acima de pH 4,5. Já a medida da atividade de cresolase mostrou uma atividade crescente de 3,5 a 7,5 sem atingir um valor máximo bem definido (Valero et al., 1988).

Lourenço et al. (1990) testaram a estabilidade da PFO de palmito (*Euterpe edulis*) em tampão McIlvaine com valores de pH variando de 3,0 a 8,0. Utilizaram a enzima em uma concentração de 0,11mg/mL, ácido clorogênico como substrato, e incubaram a 30°C por 3 horas. A enzima mostrou-se estável entre o intervalo de pH 5,0 a 8,0. Em todos os ensaios a atividade resultante foi medida em pH 5,6 a 30°C. Entre os valores de pH 4,0 e 5,0 houve uma perda de atividade de 50%. Os autores também testaram a atividade da enzima nos substratos ácido clorogênico, catequina, ácido caféico, 4-metilcatecol e no catecol, utilizando tampão McIlvaine

contendo KCl 0,3M. A PFO de palmito apresentou atividade ótima sobre catecol em pH 6,6.

Zhou e Feng (1991) estudaram a PFO de pêra, e utilizando o catecol, o valor máximo de atividade encontrado foi em pH 7,0. Esses autores também concluíram que o valor ótimo de pH para atividade de PFO varia com a fonte da enzima e com o substrato, numa faixa relativamente ampla

Robert et al. (1995) verificaram que a PFO de palmito (*Acanthophoenix rubra*) apresentou atividade ótima em pH 5,2 usando os substratos 4-metilcatecol e pirogalol.

A incubação de PFO de alface por 15 horas a 25°C em tampões acetato e fosfato com valores de pH variando entre 3,5 a 8,0 forneceu resultados diferentes para presença ou ausência de SDS 0,66mM no meio de reação. Na ausência de SDS a atividade enzimática não foi modificada, mas na presença de SDS a enzima foi inativada em valores de pH inferiores a 5,0. A atividade foi medida em pH 4,4 a 25°C (Chazarra et al., 1996).

A PFO de “blueberry” apresenta atividade ótima em pH 4,0, que é muito próximo do seu suco, 3,1 (Kader et al., 1997).

A PFO de abacaxi apresentou atividade ótima numa faixa de pH de 6,0 e 7,0. Verificou-se rápida perda de atividade para valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0 (Das et al., 1997).

A PFO de alho (*Allium sp*) apresentou atividade máxima em pH 7,5, com o substrato catecol (Arslan et al., 1997).

No estudo do efeito do pH na atividade da PFO de damasco, utilizando faixa de pH 3,5 a 10,0 e catecol como substrato, foi encontrada atividade ótima em pH 8,5. Ao contrário do esperado a PFO de damasco mostrou maior atividade em pH alcalino que em pH neutro ou próximo da neutralidade para o substrato catecol (Arslan et al., 1998).

### **2.2.5. PFO e efeito da temperatura**

O efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da PFO de fontes diversas tem sido bastante estudado. A Tabela 01 ilustra a temperatura ótima de atividade e estabilidade da PFO de algumas frutas e vegetais.

A catecolase de uva Airen apresentou estabilidade na faixa de 25 a 45°C. Acima de 45°C a atividade diminuiu rapidamente com o aumento da temperatura. Ocorreu uma perda de 50% da atividade inicial da enzima quando a mesma foi mantida a 65°C por 20 minutos. A inativação total foi obtida após 15 minutos de tratamento a 75°C (Valero et al., 1988).

A PFO de pêra Yali foi inativada após aquecimento em temperaturas superiores a 40°C. Quanto maior a temperatura, mais rapidamente a atividade enzimática foi perdida, mas um aquecimento a 30°C por 30 minutos não resultou em perda da atividade da enzima. Os tempos

requeridos para 50% de inativação a 65 e 70°C foram respectivamente 30 e 6 minutos. Foi verificado que a estabilidade térmica da PFO de pêra estava relacionada com o estágio de maturação da fruta e se mostrou dependente do pH (Zhou e Feng, 1991).

A PFO purificada de maçã mostrou-se termosensível. Quando submetida a um tratamento brando de 30°C por 5 minutos sua atividade foi reduzida para 75%, e a perda total da atividade foi verificada a 50°C. A enzima bruta também mostrou-se sensível ao tratamento térmico. O tratamento da enzima bruta a 30°C durante 30 minutos diminuiu a atividade para 60% da atividade inicial (Murata et al., 1992).

Siddiq et al. (1994) estudaram a PFO de ameixa e encontraram a atividade ótima a 20°C.

A PFO de alho (*Allium sp*) mostrou-se estável após tratamento térmico em temperaturas inferiores a 40°C. O aquecimento desta enzima durante 30 minutos a 40°C não causou perda significativa da atividade enzimática com os substratos DL-dopa e catecol (Arslan et al., 1997). Os autores relataram que a estabilidade da PFO do alho ao tratamento térmico estava relacionado com o estágio de maturação da planta e em alguns casos foi dependente do pH. As diferentes formas moleculares da PFO do alho apresentaram diferentes termoestabilidades.

Arslan et al. (1998) verificaram que o aquecimento da PFO de damasco por 40 minutos a 40°C não causou perda significativa da atividade

enzimática. O tempo requerido para perda de 50% da atividade a 60 e 80°C foi 47 e 16 minutos respectivamente.

#### **2.2.6. Substratos para PFO**

Diversos substratos têm sido testados para se caracterizar as atividades de mono e difenolase de PFO.

O valor obtido de  $K_M$  para 4-metil-catecol para a catecolase de uva Airen foi de 9,5mM. Para cresolase um valor de  $K_M$  aparente obtido para p-cresol foi de 0,35mM. Foi observado um aumento da fase lag com o aumento da concentração de substrato (Valero et al., 1988).

Apenas catecol, DL-dopa, pirogalol e ácido clorogênico puderam ser oxidados pela enzima envolvida no escurecimento enzimático de pêra Yali, e os valores de  $K_M$  foram respectivamente 5,5, 8,9, 2,6 e 1,5mM; o que faz do ácido clorogênico o melhor substrato testado. A enzima não apresentou atividade sobre monofenóis, resorcinol, hidroquinol, L-tirosina e floroglucinol. Isso sugere que ela não tenha atividade de cresolase e lacase, sendo uma *o*-difenoloxidase (Zhou e Feng, 1991).

O substrato ideal para a ácido clorogênico oxidase de maçã foi o ácido clorogênico, pouca atividade foi observada para outros *o*-difenóis. A oxidação do ácido cafeico, que possui parte da estrutura do ácido clorogênico, foi apenas 17% da oxidação do ácido clorogênico. O valor de  $K_M$  para o ácido clorogênico foi de 122 $\mu$ M (Murata et al., 1992).

A PFO de alho apresentou valores de  $K_M$  para catecol e DL-dopa de 25 e 33mM respectivamente. Para a determinação da especificidade de substrato foram testados o-dihidroxifenóis e monohidroxifenóis. Catecol e DL-dopa foram oxidados, mas L-tirosina (monohidroxifenol) não, sugerindo que a enzima seja uma difenoloxidase (Arslan et al., 1997).

A PFO de abacaxi apresentou maior atividade sobre catecol ( $K_M = 1,1 \times 10^{-5} M$ , atividade específica = 17643 unidades/mg de proteína). Foi constatado que a enzima não apresenta atividade sobre monofenóis, sugerindo a ausência de atividade cresolase. A enzima mostrou baixa atividade com o ácido clorogênico (11% da atividade com o catecol) e catequina (25% da atividade com o catecol) (Das et al., 1997).

A enzima envolvida no escurecimento enzimático de damasco apresentou maior atividade para catecol ( $K_M = 6,6 \text{ mM}$ ), seguido por L-dopa ( $K_M = 12,5 \text{ mM}$ ) e ácido gálico ( $K_M = 20 \text{ mM}$ ). L-tirosina e resorcinol foram também testados, porém não sofreram oxidação, evidenciando que a enzima não tem atividade sobre monofenóis (Arslan et al., 1998).

### **2.2.7. Inibidores de PFO**

Diversos métodos de controle do escurecimento enzimático de frutas e vegetais têm sido descritos na literatura.

A inativação térmica da enzima é realizada em alguns casos, por exemplo no tratamento de uvas escuras antes da vinificação. Contudo, o emprego de temperaturas altas pode produzir coloração indesejável e/ou *off-flavour*, bem como mudanças indesejáveis na textura (Martinez e Whitaker, 1995).

Polifenóis podem ser removidos dos sucos de frutas por  $\beta$ -ciclodextrinas e polivinilpirrolidona ou polietilenoglicol insolúveis, no entanto, eles são caros e nem sempre disponíveis em países tropicais (Martinez e Whitaker, 1995).

O emprego de ácido benzóico e seus derivados também tem sido utilizados. O composto 4-hexilresorcinol é efetivo na inibição de pontos pretos em camarão e também inibe a PFO de cogumelos. Mas, não é efetivo em uva e só previne parcialmente o escurecimento em maçã, quando comparado com bissulfito e ascorbato (Martinez e Whitaker, 1995).

Um outro fator, o pH, influencia a atividade de PFO. O ajuste do pH com ácidos cítrico, málico e fumárico a pH 4,0 ou mais baixo têm sido usado para controlar o escurecimento em sucos e frutas em pedaços, sem haver perda sensível no sabor. A baixa atividade da PFO em pH menor que 4,0 deve ser devida a uma ligação menos firme do cobre do sítio ativo da enzima (Martinez e Whitaker, 1995).

Como o oxigênio é requerido na iniciação da reação de escurecimento, o uso de embalagens não permeáveis ao oxigênio, de atmosfera modificada (com O<sub>2</sub> sendo substituído por N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>), bem como

a exclusão de O<sub>2</sub> de sucos e vinhos pelo engarrafamento sob N<sub>2</sub>, auxiliam na prevenção do escurecimento (Martinez e Whitaker, 1995).

O uso de agentes redutores é até agora o método de controle mais efetivo. Estudos com cogumelo revelaram que ascorbato, bissulfito e compostos tiol possuem efeito direto na inativação da PFO e ainda têm a habilidade de reduzir benzoquinonas a o-dihidroxifenóis. Industrialmente se usa o composto sulfito reduzido, que em contato com oxigênio produz bissulfito que é liberado em câmaras de atmosfera controlada nas quais se acondicionam frutas em pedaços. Mais atualmente, entretanto, o uso de bissulfito tem sido regulamentado e sofrido maior controle pelo fato de causar reações alérgicas em muitos indivíduos. O uso de ascorbato é também uma alternativa viável pois sendo uma vitamina, aumenta o valor nutricional do alimento, além de muitas frutas e vegetais já o possuírem naturalmente (Martinez e Whitaker, 1995).

O emprego de combinações de compostos inibidores têm sido também testado. Por exemplo a solução contendo 1% de ascorbato, 0,2% de citrato e 5mM L-cisteína é eficaz no controle do escurecimento de maçã. A solução contendo 1% de ascorbato e 0,2% de citrato estabiliza a cor de frutas frescas como pêsego, damasco e kiwi (Senesi e Pastine, 1996).

O aminoácido L-cisteína tem dois efeitos como inibidor da PFO. Primeiro, aumenta a fase lag de atividade da PFO e, segundo, combina com quinona e impede a formação de melanina. Além disso, aumenta a atividade de protease que pode degradar a fenolase e então contribuir na

inibição. A L-cisteína tem uma vantagem que é ser seguro (Siddiq et al., 1994).

Há ainda trabalhos com inibidores não convencionais da enzima. Foi reportado que o mel contém um peptídeo de 600kD que exerce um efeito inibitório na atividade de PFO. Pedacos de maçã imersos em solução de mel não apresentaram escurecimento e o suco de uva adicionado de mel apresentou menor escurecimento que o não adicionado. Em soluções modelo a taxa de escurecimento foi inversamente proporcional à adição de mel (Oszmianski e Lee, 1990).

Outra forma não convencional de inibir a enzima PFO é o uso de campos de altos pulsos elétricos, onde a força do campo, o comprimento e a forma do pulso desempenham papéis importantes. Com esse método há uma redução de 30 a 40% na atividade da enzima, provavelmente por um desarranjo tridimensional da proteína (Ho et al., 1997).

#### **2.2.8. Ensaio enzimático de PFO**

A atividade de PFO de frutas e vegetais tem sido determinada por diversos métodos utilizando diferentes substratos.

Flurkey e Jen (1978) estudaram a PFO de pêssego e definiram 1,0 unidade de atividade de PFO como sendo o aumento de 0,1 unidade de absorbância por minuto a 420 nm. Foram obtidas 900 U/g de extrato bruto.

Zhou e Feng (1991) mediram a atividade da PFO de pêra utilizando 0,1 mL da enzima, 1,9 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 6,8 e 1 mL de catecol como substrato. A mudança na absorvância foi monitorada a 398nm e uma unidade de atividade foi definida como sendo o aumento de 0,001 na absorvância/min.

Oktaç et al. (1995) determinaram a atividade de PFO de maçã utilizando 2,9 mL de solução catecol 0,01M em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e 0,1 mL de solução enzimática. O aumento de absorvância foi medido a 420nm e uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima que provocou um aumento de 0,001 na absorvância/min. A atividade enzimática obtida, utilizando-se o catecol como substrato, foi de 1.187 unidades/mL do extrato enzimático.

Das et al. (1997) determinaram a atividade da PFO de abacaxi utilizando o substrato catecol. A mistura de reação utilizada foi 2,6mL de tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5, 0,3 mL de catecol e 0,1mL do extrato enzimático. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima que provocou um aumento de 0,001 na absorvância a 420 nm/min. Foram obtidas 14.933 U/100g amostra.

Arslan et al. (1998) determinaram a atividade de PFO de damasco utilizando 2,8 mL de substrato catecol em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, e 0,2 mL da enzima. O aumento na absorvância foi acompanhado a 420nm. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima que provocou um aumento de 0,001 na absorvância/min a 25°C.

Lima (1999) estudou a PFO de pinha e determinou a atividade da enzima como descrito por Oktay et al. (1995). Foi obtido 8.999.333 U de PFO/100 g de polpa.

## 2.3. Peroxidase

### 2.3.1. Características

As peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7.) são um grupo de oxidoredutases amplamente distribuídas no reino vegetal. São também encontradas nos tecidos animais, leucócitos e no leite. A POD de origem vegetal mais estudada é a de raiz forte (*horseradish*) (Vámos-Vigyázó, 1981).

A POD está associada a mudanças deteriorativas no *flavour* de vegetais estocados e é largamente utilizada como índice de branqueamento em tratamentos térmicos devido a sua resistência à inativação térmica (Burnette, 1977; Khan e Robinson, 1993; López-Serrano e Ros Barceló, 1997). É também capaz de atuar em condições adversas de temperatura e umidade. Pode agir mesmo em temperaturas abaixo de zero e em condições de umidade muito baixas. A POD parece ser importante do ponto de vista nutricional e na alteração da coloração de frutas e vegetais (Richardson e Hyslop, 1985).

A Figura 06 ilustra a reação de detecção da POD, utilizando-se guaiacol como doador de hidrogênio e peróxido de hidrogênio como aceptor de hidrogênio.

**Reação Geral :**



**Reação do Guaiacol :**

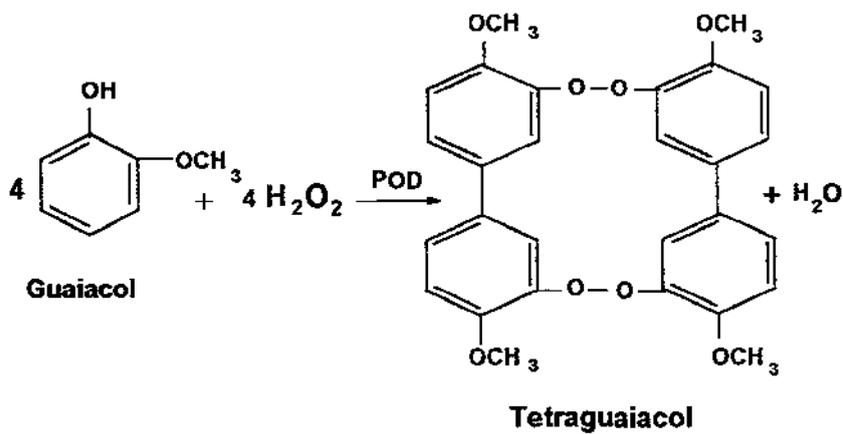
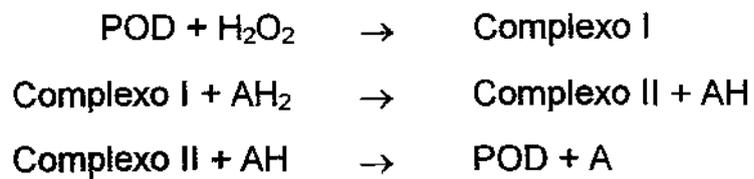


Figura 06 – Ilustração da ação da peroxidase.

O mecanismo de ação das peroxidases é o seguinte:



Sendo que o último passo da reação descrita acima é o limitante (Burnette, 1977).

A POD não é específica e pode catalisar a oxidação de um grande número de fenóis e compostos com anéis aromáticos que ocorrem naturalmente em tecidos de plantas (Burnette, 1977). Estas enzimas estão normalmente ligadas a atividades de oxidação que resultam em compostos coloridos, mas, podem promover várias reações de biodegradação, apresentando assim um alto grau de versatilidade que não é superado por nenhuma outra enzima (Burnette, 1977, Vamos-Vygyázó, 1981, Clemente, 1996).

As peroxidases estão também envolvidas na descoloração catalítica de antocianinas e outros pigmentos encontrados em plantas como cartamina (Khan e Robinson, 1993).

O papel da POD no ciclo de vida vegetal ainda não foi totalmente esclarecido. Levando-se em consideração os fatores que induzem sua biossíntese, concluiu-se que estresse fisiológico, danos físicos, infecções fúngicas ou virais introduzem mudanças nos padrões de isoenzimas das peroxidases (Vamos-Vygyázó, 1981). Sullivan e Anderson (1946), citados por Burnette (1977), sugerem que o papel metabólico das peroxidases é a oxidação de componentes tóxicos a produtos menos prejudiciais a célula. Muitos estresses ambientais resultam em produção elevada de espécies oxigênio ativos (AOS – Active Oxygen Species) em plantas, incluindo os radicais  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Liao et al., 1999).

As propriedades catalíticas das peroxidases têm sido extensivamente estudadas *in vitro* e acredita-se que elas estejam envolvidas na lignificação,

no metabolismo das auxinas e em um grande número de outras funções (Liao et al., 1999).

A POD apresenta ainda capacidade de promover ligações entre proteínas através da formação de resíduos de aminoácidos como a tirosina (Aeschbach et al., 1976). Essa capacidade levou ao uso da POD em ELISA, onde essa enzima tem aplicação em análise de microrganismos patogênicos (Chen e Chang, 1995), de toxinas (Chu e Fan, 1985), autenticidade de alimentos e mais ainda em análises clínicas na determinação de glicose por método enzimático (Anguita et al., 1997).

Algumas novas aplicações sugeridas para peroxidases incluem tratamento de esgotos contendo compostos fenólicos, síntese de vários químicos aromáticos e ainda remoção de peróxido de materiais diversos como alimentos e lixos industriais (Srinivas et al., 1999).

Srinivas et al. (1999) afirmam que raiz forte é a fonte mais empregada comercialmente para a produção de POD. No entanto, os próprios autores sugerem que outras fontes cultivadas, de modo especial as espécies recombinantes, podem prover peroxidases que exibam propriedades similares ou até mesmo melhores que a POD de raiz forte.

Uma grande limitação para o uso da POD em larga escala é o alto custo de produção dessa enzima. Custo esse que pode ser reduzido abaixando o custo de produção das fontes e/ou diminuindo os custos de purificação e recuperação da enzima (Srinivas et al., 1999).

### 2.3.2. Isoenzimas de peroxidase

Diversos autores têm detectado a presença de várias isoenzimas da POD em frutas e vegetais. Tanto as formas de peroxidases solúveis, quanto as ionicamente ligadas, isoladas de frutas e vegetais, apresentam isoenzimas (Moulding et al., 1987, Moulding et al., 1989; Khan e Robinson, 1993). Essas isoenzimas não somente apresentam diversidade de propriedades catalíticas, mas também diferentes valores de pH ótimo, diferentes pesos moleculares, variação de composição de aminoácidos e de conteúdo de carboidratos (Khan e Robinson, 1993).

O número de isoenzimas varia com a fonte da enzima. Sabe-se ainda que diferentes isoenzimas de uma mesma fonte apresentam mobilidades diferentes em eletroforese, pois apresentam diferença de cargas quando colocadas em campos elétricos, e também possuem diferentes termoestabilidades bem como capacidades de regeneração diversas (Khan e Robinson, 1993; Burnette, 1977). Além disso, sua atividade varia de acordo com a parte anatômica da qual foi extraída. Já foi observado que a atividade de peroxidases é maior em tecidos fisiologicamente mais ativos (Burnette, 1977).

O papel exato das isoformas de POD ainda não é claro devido a falta de informações da sua localização e da especificidade de substrato *in vivo* (Pomar et al., 1997).

Liao et al. (1999) estudaram a POD catiônica de uva (*Vitis pseudoreticulata*) e reportaram que esta enzima parece ser muito

importante na manutenção do nível de peroxidase quando a expressão e atividade de outras peroxidases é inibida devido ao acúmulo de sais inorgânicos em uma planta que esteja sob estresse salino. Entretanto, a expressão de peroxidases catiônicas sob condições de estresse não está ainda clara.

### 2.3.3. POD e efeito do pH

As peroxidases da maioria de frutas e vegetais apresentam atividade ótima na faixa de 5,0 a 6,0. A Tabela 02 ilustra a faixa de pH ótimo de atividade de POD de algumas frutas e vegetais.

**Tabela 02 – Características de peroxidases de frutas e vegetais**

Fonte	Nome Científico	pH ótimo	pH de estabilidade	T. ótima	T. de estabilidade	Referência
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i> L. Merrill	4,2	–	–	–	Beaudreau e Yasunobu (1966)
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i> L. Merrill	–	–	–	A fração solúvel da polpa perde cerca de 70% da atividade após 60°C/420seg e perde cerca de 90% da atividade após 75°C/600seg. A fração ionicamente ligada da polpa perde cerca de 50% da atividade após 60°C/600seg e perde cerca de 95% da atividade após tratamento a 75°C/420seg.	Mello e Clemente (1996)
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i> L.	5,5	6 - 9	50°C	Mantém cerca de 80% da atividade inicial após 40°C/24h/pH 6,0	Holschuh (2000)

Messina creeper	<i>Ipomoea cairica</i>	6,0	5 - 11	50°C	Mantém 100% de atividade após tratamento a 60°C/4 horas	Lin et al. (1996)
Glória da manhã	<i>Ipomoea palmetta</i>	6,0	5 - 11	50°C	Mantém 100% da atividade inicial após tratamento a 60°C/5 horas	Srinivas et al. (1999)
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> , Planch	5,5	—	50°C	—	Soda et al. (1991)
Laranja	<i>Citrus sinenses</i> L.	6,0	—	—	Mantém 20% da atividade inicial após tratamento a 70°C/50 seg	Clemente e Robinson (1995)
Maçã	<i>Malus domestica</i> Borkh	5,0 a 6,0	—	—	Apresenta cerca de 7% de atividade residual após tratamento a 80°C/20 min	Moulding et al. (1987)
Melão	<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>reticulatus</i> Naud	5,5-7,5 a 50°C e 6,0-7,0 a 30°C	—	50 – 55°C	Mantém-se estável abaixo de 40°C e após tratamento a 50°C/10 min. Perde cerca de 90% da atividade após tratamento a 80°C/5 min.	Larnikanra e Watson (2000)
Morango	<i>Fragaria ananassa</i> Duch.	6,0	4 – 11 Entre 6 e 7,5 mantém mais de 90% da atividade inicial	30°C	Mantém 100% da atividade inicial após tratamento 45°C/20 min	Civello et al. (1995)
Pêssego	—	5,0	—	40°C	Rápida inativação acima de 70°C, com perda praticamente total da atividade após tratamento a 80°C/30seg.	Lourenço e Neves (1997)
Pimenta	<i>Capsicum annum</i> L.	—	6 - 9	—	Mantém 75% da atividade inicial após tratamento a 50°C/15 min	Pomar et al. (1997)
Repolho	<i>Brassica oleracea</i> L.	6,4	5 - 11	45°C	Mantém cerca de 50% de atividade residual após tratamento a 70°C/10 min	Fujita et al. (1995)
Uva	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	5,76	—	—	Mantém cerca de 100% da atividade inicial após tratamento a 60°C/20 min	Liao et al. (1999)

O pH ótimo de atividade da POD varia com a fonte da enzima, com a composição de isoenzimas, com o substrato e com o tampão utilizado. Frações ionicamente ligadas e frações solúveis da POD da mesma fonte podem também apresentar diferentes valores de pH ótimo (Vámos-Vigyázó, 1981).

Lu e Whitaker (1974) estudaram a POD de raiz forte e observaram que ambas as taxas de inativação e regeneração da POD pelo calor são dependentes do pH. Essa enzima foi rapidamente inativada a 76°C em pH 4,5 e inferiores e não houve ganho de atividade mensurável nessas condições. Na faixa de pH 5,0 a 10,0, o efeito do pH na taxa de inativação enzimática foi pequeno. Por outro lado, a taxa de regeneração aumentou de zero, em pH 5,0, chegando ao seu valor máximo em pH 9,0. Os autores relataram que o efeito marcante do pH menor que cinco na taxa de inativação da POD pelo calor deve estar associado com a perda do grupo "heme" da enzima, que é dependente do pH e ocorre mais rapidamente em valores de pH inferiores a 5,0.

Moulding et al. (1987) estudaram a POD de maçã e observaram que a enzima apresentou maior atividade em tampão acetato que em tampão fosfato. A enzima solúvel da polpa apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,4 a 5,8 e a 25°C, usando-se o-dianisidina como substrato.

Khan e Robinson (1993) estudaram a POD de manga e verificaram que as enzimas solúveis do extrato bruto apresentaram atividade ótima em

tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 25°C usando-se o-dianisidina como substrato.

Anese et al. (1995) relataram que o pH de extratos enzimáticos brutos de sucos de cenoura e maçã pareceu fortemente afetar a extensão da ativação e/ou inativação da POD quando ela foi submetida a tratamento de pressurização. A ativação enzimática atingiu o valor máximo para as amostras em pH 6,0.

Clemente e Robinson (1995) verificaram que a POD de laranja apresenta atividade ótima em pH 6,0 utilizando-se o-dianisidina como substrato.

Civello et al. (1995) estudaram a POD de morango e observaram que a enzima se mostrou estável na faixa de pH 4,0 a 11,0. Nessa faixa a atividade residual da enzima foi de 50% ou mais de sua atividade máxima. Os autores relataram ainda que a enzima se mostrou mais estável na faixa de pH 6,0 a 7,5, sendo que sua atividade residual nessa faixa foi de 90% de sua atividade máxima.

Pomar et al. (1997) purificaram e caracterizaram a POD de pimenta. Os autores reportaram que após incubação em diferentes valores de pH a enzima se manteve estável por 45 minutos na faixa de pH 6,0 a 9,0. Em pH 5,0 esta enzima perdeu sua atividade após 30 minutos. Em pH menor que 5,0, a enzima rapidamente perdeu sua atividade, sendo que em pH 3,0 a atividade foi perdida em 5 minutos. Os autores atribuíram esse efeito à perda do grupo heme nessas condições.

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola e relatou que a maior atividade dessa enzima foi em tampão citrato-fosfato pH 5,5. O autor também constatou que o pH exerceu forte influência na estabilidade da enzima. Em pH 3,0 a enzima reteve 24% de sua atividade inicial após 24 horas de tratamento a 40°C. Já em pH 6,0, nas mesmas condições, a enzima reteve mais de 80% de sua atividade inicial. A 25°C, após 24 horas de tratamento, a enzima mostrou atividade residual bem próxima de sua atividade inicial em tampão fosfato pH 6,0 e 7,0 e também em tampão Tris-HCl pH 8,0 e 9,0.

#### **2.3.4. POD e efeito de temperatura**

As peroxidases são as enzimas mais termorresistentes em plantas e são geralmente utilizadas como indicadores em tratamentos térmicos, por exemplo no branqueamento (Burnette, 1977). O branqueamento é utilizado como um tratamento térmico preliminar para inativar enzimas e reduzir a carga microbiana de frutas e vegetais antes de congelá-los ou enlatá-los (Rodrigo et al., 1997).

Ashie et al. (1996), no entanto, ressaltaram que existe um problema em se usar peroxidases como indicadores universais para tratamentos térmicos. Isso se deve ao fato de algumas isoenzimas de peroxidases serem extremamente termorresistentes. Assim o branqueamento, ou outros processos de inativação térmica, pode ser conduzido a um aquecimento

mais severo do que o realmente necessário o que, conseqüentemente, resultaria em diminuição da qualidade do produto e desperdício de energia.

Diversos estudos têm sido feitos para se determinar um tratamento HTST (alta temperatura por tempo curto) no qual a POD seja inativada, o que seria interessante pois esse tipo de tratamento térmico têm sido cada vez mais empregado industrialmente. As razões para que a POD seja a enzima escolhida para otimização do processo HTST são: sua grande termoestabilidade, a possibilidade da formação de novas isoenzimas quando a POD é submetida a altas temperaturas e a possível relação entre a atividade enzimática residual ou regenerada com a perda de qualidade em alimentos (Rodrigo et al., 1997).

Khan e Robinson (1993) estudaram a POD de manga. Eles testaram a inativação térmica dos extratos solúveis e ionicamente ligados da polpa e encontraram que, para ambas, a perda da atividade enzimática não foi linear com o tempo. A causa exata dessa não linearidade é desconhecida, porém os autores sugerem que possa ser devida à presença de isoenzimas com termoestabilidades diferentes. Os autores observaram uma rápida perda inicial de atividade enzimática, que parece ser devida à inativação de isoenzimas susceptíveis ao calor. Porém observaram também que mesmo quando submetida a um tratamento a 80°C por 10 minutos a POD não perdia totalmente sua atividade, e sugeriram que isso era devido a presença de isoperoxidasas mais termorresistentes. Esses autores verificaram também que a POD purificada mostrou-se mais termorresistente que a não purificada, podendo indicar que o extrato bruto da enzima deva conter outras substâncias que aumentam a perda da atividade enzimática durante o aquecimento.

Civello et al. (1995) caracterizaram a POD de morango. Essa enzima apresentou atividade ótima a 30°C. Os autores relataram também que a 50°C a atividade é cerca de 20% da máxima e a 0°C a atividade é aproximadamente 40% da máxima. A POD de morango manteve sua atividade inicial mesmo após tratamento de 45°C por 20 min. Porém sua atividade residual foi de 68% após tratamento a 55°C durante 5 min e somente 23% após tratamento a 55°C por 20 min. A 60°C um tempo de apenas 5 minutos foi suficiente para a enzima praticamente perder sua atividade.

Holschuh (2000) relatou que a POD de carambola apresentou atividade ótima a 50°C utilizando guaiacol como substrato. O autor verificou que, após tratamento de 24h em tampão fosfato de potássio pH 6,0, a 50°C a enzima reteve 78% de sua atividade inicial e a 60°C a atividade residual foi de 59%. Em temperaturas inferiores a 40°C, nas mesmas condições, mais de 80% da atividade inicial foi mantida.

### **2.3.5. Regeneração da POD**

As peroxidases são capazes de se regenerar após um tratamento térmico e, assim, provocar escurecimento em alimentos submetidos a um tratamento de branqueamento que não tenha sido eficiente. Qualquer regeneração se deve ao fato de a enzima não ter sido total ou irreversivelmente inativada pelo calor. Entre os fatores que afetam a regeneração estão a severidade do tratamento aplicado relacionado ao tempo, ou seja, quanto maior a temperatura ou o tempo de exposição ao calor maior a chance de a POD não se regenerar. Além disso, as condições

de estocagem do alimento após o tratamento térmico influenciam a regeneração da peroxidase. Os alimentos estocados congelados ou a temperaturas baixas são menos susceptíveis a regeneração da POD que aqueles estocados a temperatura ambiente (Burnette, 1977).

McLellan e Robinson (1984) estudaram a POD de laranja e observaram regeneração da enzima após diversos tratamentos térmicos e após incubação a 30°C por 150 minutos. Os autores relataram que a fração solúvel teve uma regeneração de apenas 2%, enquanto a fração ionicamente ligada a membrana teve uma regeneração de aproximadamente 25% e concluíram que aparentemente as peroxidases mais estáveis termicamente (as ionicamente ligadas) são capazes de uma regeneração consideravelmente maior que as isoenzimas solúveis. Esse nível de regeneração pode ser resultado da presença de POD ativa após o tratamento térmico.

Moulding et al. (1987) estudaram a regeneração da POD de maçã após tratamento térmico. Foi observado 10% de regeneração da atividade da POD após tratamento térmico da enzima para atingir 40% de atividade residual e incubação durante 1 hora a 30°C.

### **2.3.6. Substratos para peroxidase**

As diferentes isoenzimas presentes nas peroxidases de frutas e vegetais apresentam diferentes especificidades por substrato. Vámos-Vigyázó (1981), analisando a POD de frutas e vegetais, relatou que a

afinidade da POD pelo substrato doador de hidrogênio varia de acordo com a fonte e o grau de pureza da enzima. Foi verificado que o valor de  $K_M$  da POD de raiz forte para guaiacol é  $0,7 \times 10^{-2}$  M e para o-fenilenodiamina é  $0,13 \times 10^{-2}$  M.

Srinivas et al. (1999) estudaram a POD da planta glória da manhã (*Ipomoea palmetta*) e encontraram para essa enzima  $K_M = 18,15$  mM e  $V_{MAX} = 27,1$   $\mu$ M/min para o substrato guaiacol.

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola e verificou que para o substrato guaiacol o  $K_M$  estimado foi 20,28 mM e  $V_{MAX}$  foi 8,21 U/mL e para o substrato p-fenilenodiamina o  $K_M$  estimado foi 3,62 mM e  $V_{MAX}$  foi 15,937 U/mL.

### **2.3.7. Sais minerais e inibidores e seus efeitos na POD**

O efeito de sais minerais e substâncias inibidoras na atividade da POD de frutas e vegetais tem sido amplamente estudado e reportado em vários trabalhos.

Lu e Whitaker (1974) estudaram a POD de raiz forte e notaram uma diminuição marcante na estabilidade térmica dessa enzima na presença de cloreto de sódio. Os autores relataram um aumento de 18 vezes na taxa de inativação quando a enzima foi exposta a uma concentração de NaCl de 0,6 M a 76°C e pH 7,0. O efeito observado do NaCl na taxa de regeneração da enzima a 35°C, após tratamento a 76°C, não foi grande.

Lin et al. (1996) estudaram a POD de *Ipomoea cairica* L. e verificaram que  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ , e  $\text{AgNO}_3$  inibiram a atividade da enzima em 87, 74, 48 e 13%, respectivamente.

Liao et al. (1999) estudaram a POD catiônica de uva (*Vitis pseudoreticulata*) e observaram que os sais  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na concentração de 150 mM/L e os sais  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{MgSO}_4$  na concentração de 300 mM/L estimularam a atividade dessa POD.

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola e verificou que os inibidores mais efetivos para essa enzima foram ácido ferrúlico, ácido cafeico e ácido p-cumárico que, em uma concentração de 5,0 mM, provocaram inibição de aproximadamente 92, 76 e 48%, respectivamente.

### **2.3.8. Ensaio enzimático da POD**

Flurkey e Jen (1978) estudaram a POD de pêssego utilizando o substrato guaiacol. Eles definiram 1,0 unidade de atividade como sendo o aumento de 0,1 unidade de absorbância por minuto a 470 nm. O pêssego apresentou atividade de 1600U/g de extrato bruto.

A atividade de POD pode ser determinada utilizando-se os substratos doadores de hidrogênio, como o guaiacol e o-dianisidina e substratos receptores de hidrogênio, como o peróxido de hidrogênio. A o-dianisidina é

um composto potencialmente cancerígeno e deve ser manipulado com cuidado (Richardson e Hyslop, 1985).

Khan e Robinson, (1994) determinaram a atividade de POD de manga utilizando o-dianisidina e guaiacol. No primeiro ensaio a mistura de reação era constituída de 2,7 mL de peróxido de hidrogênio 0,03% (p/v) em tampão fosfato 10 mM pH 6,0 e 9,2 mL de extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 0,1 mL de o-dianisidina 1% (p/v). O aumento na absorbância foi acompanhado a 460 nm a 25°C. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como sendo o aumento de 1,0 unidade de absorbância por minuto por mL de extrato, sendo que os autores encontraram para a isoperoxidase mais ativa com esse substrato o valor de atividade de 36,1 U/min/mL. E no segundo ensaio a mistura de reação continha 1,4 mL de peróxido de hidrogênio 0,1% (p/v), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,6 e 0,2 mL de extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 1,4 mL de solução aquosa de guaiacol 0,5% (v/v). O aumento na absorbância foi acompanhado a 420 nm e a 30°C. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como sendo o aumento de 1,0 unidade de absorbância por minuto por mL de extrato. Os autores relataram que a isoperoxidase C1 e C3 apresentaram respectivamente maior atividade sobre o-dianisidina e guaiacol. A isoperoxidase C1 apresentou atividade de 36,1 U/mg de proteína com o substrato o-dianisidina e a isoperoxidase C3 apresentou atividade de 6,0 U/mg de proteína com guaiacol.

Cano et al. (1998) estudaram as peroxidases de mamão fêmea e hermafrodita. Para determinação da atividade alíquotas de 0,025mL do extrato enzimático de mamão, foram adicionadas a 2,7mL de tampão

fosfato de sódio pH 6,5 contendo 0,2mL de p-fenilenodiamina como doador de hidrogênio e 0,1mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro a 485nm, a 25°C. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 1 unidade de absorbância a 485nm. A atividade da POD solúvel para mamão fêmea foi 144,14 U/min/g do liofilizado e a atividade da POD solúvel para mamão hermafrodita foi de 141,75 U/min/g do liofilizado.

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola (*Averrhoa carambola*, L.) e determinou a atividade da enzima baseado no método descrito por Khan e Robinson (1994). O autor verificou que a carambola apresentou 36.000 unidades de POD/100 g de polpa madura.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Equipamentos**

- ◆ Balança analítica Mettler, modelo H-10
- ◆ Medidor de pH Digimed DMPH-2
- ◆ Centrífuga refrigerada BECKMAN, modelo J2-21
- ◆ Espectrofotômetro BECKMAN, modelo DU-70
- ◆ Coletor de frações, Isco, Modelo Foxy 200
- ◆ Banhos de água calibrados de 20 a 90°C, Fanen

#### **3.2. Reagentes e resina**

- ◆ Ácidos, bases e sais PA (Merck, Ecibra ou equivalente)
- ◆ Catecol, guaiacol, p-fenilenodiamina, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol, iodoacetamida (Sigma ou Merck)
- ◆ Resina: DEAE-celulose (Sigma D-8382)

#### **3.3. Obtenção do extrato enzimático bruto**

As amostras de polpa de açaí congelada e sem nenhum tipo de tratamento foram obtidas da região de Manaus. Amostras de 500,0 g de polpa de açaí, degeladas em geladeira até uma temperatura de 5°C, foram

centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e a 5°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto. A concentração de proteína foi determinada como descrito por Hartree (1972).

### **3.4. Determinação da atividade enzimática**

#### **3.4.1. Determinação da atividade da polifenoloxidase**

A atividade de polifenoloxidase foi determinada como descrito por Oktay et al. (1995) e Lima (1999).

A mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, foi pré-incubada a 25°C durante 10 minutos ou como indicado. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático bruto obtido de acordo com o item 3.3. Após 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 420 nm foi acompanhado até 5 minutos de reação, na temperatura indicada, utilizando-se branco para ajuste do espectrofotômetro (Beckman DU70). O tubo branco foi preparado com a mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M em solução tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 0,1 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0. Como controle determinou-se o aumento da absorbância a 420 nm da mistura de 2,9 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 0,1 mL de extrato enzimático durante 5 minutos de incubação a 25°C. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL de amostra.

### **3.4.2. Determinação da atividade da peroxidase**

A atividade de peroxidase foi determinada como descrito por Holschuh (2000), baseado em Khan e Robinson (1994).

A mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, foi previamente equilibrada por 10 minutos a 25°C ou como indicado. Em seguida foi adicionado 0,4 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão (0,33 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 100,0 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0) e 0,1 mL de extrato enzimático.

Após 15 segundos de reação o aumento de absorbância a 470 nm foi acompanhado durante 5 minutos de reação contra branco em espectrofotômetro Beckman DU 70. O tubo branco foi preparado pela mistura de 1,5 mL de solução 1% guaiacol em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 juntamente com 1,6 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 0,1 mL do extrato enzimático.

Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL amostra.

### **3.5. Caracterização da polifenoloxidase bruta de açaí**

As características bioquímicas da PFO de açaí foram determinadas no extrato enzimático bruto obtido como descrito no item 3.3.

#### **3.5.1. Efeito da temperatura na atividade da polifenoloxidase**

A solução de 2,9 mL de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 foi pré-incubada nas temperaturas de 5 a 70°C (com variações intermediárias de 5°C), em cubeta, no espectrofotômetro Beckman DU 70. Em seguida, adicionou-se 0,1mL do extrato enzimático bruto e a atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.4.1. A temperatura ótima de atividade foi utilizada nas demais análises, exceto quando especificado.

#### **3.5.2. Efeito do pH na atividade da polifenoloxidase bruta**

A mistura de 2,9 mL de solução de catecol 0,01 M nos sistemas tampão glicina-HCl (pH 2,6 a 3,5), acetato (pH 3,6 a 5,0), fosfato (pH 5,5 a 8,0), ácido bórico-borax (pH 8,0 a 9,0) e borax-NaOH (pH 9,0 a 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro da faixa de capacidade tamponante foi previamente equilibrada por 10 minutos a 40°C. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático contendo 1,6 unidades de atividade. Após 15 segundos de reação o aumento de absorbância a 420 nm foi acompanhado durante 5 minutos de reação contra branco como descrito anteriormente no

item 3.4.1. Os tubos branco foram preparados pela mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M em soluções tampão de diferentes pH e 0,1 mL do respectivo tampão. Como controle determinou-se o aumento da absorbância a 420 nm da mistura de 2,9 mL da solução tampão e 0,1 mL do extrato enzimático. O pH ótimo de atividade foi utilizado nas demais análises, exceto quando especificado.

### **3.5.3. Efeito do pH na estabilidade da polifenoloxidase bruta**

O efeito do pH na estabilidade da polifenoloxidase bruta de açaí foi testado na faixa de pH 2,6 a 10,0. Foram utilizados os seguintes sistemas tampão: glicina-HCl (pH 2,6 a 3,5), acetato (pH 3,6 a 5,0), fosfato (pH 5,5 a 8,0), ácido bórico-borax (pH 8,0 a 9,0) e borax-NaOH (pH 9,0 a 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro de sua respectiva faixa de capacidade tamponante.

As misturas de 2,0 mL de extrato enzimático contendo 32 unidades de atividade de PFO e 2,0 mL de soluções tampão de diferentes valores de pH foram submetidas a dois tratamentos: 30°C por 3 horas e a 5°C por 24 horas. Após incubação, transferiu-se alíquotas de 2,0 mL de cada uma das soluções para tubos contendo 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M no pH 6,0 e a atividade residual foi determinada, a 40°C, temperatura ótima de atividade da PFO, e conforme descrito no item 3.4.1. Para controle foi determinada a atividade da PFO na polpa sem tratamento.

Os valores de pH nas soluções enzimáticas submetidas aos tratamentos foram medidos para verificação da capacidade tamponante.

#### **3.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da polifenoloxidase bruta**

Alíquotas de 5,0 mL de extrato enzimático apresentando pH 5,0 e contendo 80 unidades de atividade de PFO foram incubadas nas temperaturas de 30, 40, 50 e 70°C por 10, 30 e 60 minutos e ainda em ebulição por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, para teste de inativação térmica. Após a incubação, as alíquotas foram imediatamente resfriadas em banho de gelo. Para controle foi determinada a atividade da PFO na polpa sem tratamento.

A atividade residual de PFO foi determinada a 40°C utilizando-se tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, como descrito no item 3.4.1.

#### **3.6. Caracterização da peroxidase bruta de açaí**

As características bioquímicas da POD de açaí foram determinadas no extrato enzimático bruto obtido como descrito no item 3.3.

##### **3.6.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta**

A mistura de 1,5 mL de solução 1,0% de guaiacol em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0, 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0, 0,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão (0,33 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 100,0 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0) e 0,1 mL extrato enzimático contendo 76,9 unidades de atividade foi

incubada na faixa de temperatura de 5 a 70°C (com variações intermediárias de 5°C). A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.4.2. A temperatura ótima de atividade foi utilizada nas demais análises, exceto quando especificado.

### **3.6.2. Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta**

A mistura de 1,5 mL de solução 1,0% de guaiacol nos sistemas tampão glicina-HCl (pH 2,6 a 3,5), acetato (pH 3,6 a 5,0), fosfato (pH 5,5 a 8,0), ácido bórico-borax (pH 8,0 a 9,0) e borax-NaOH (pH 9,0 a 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro da faixa de capacidade tamponante e 1,2 mL do respectivo tampão foi previamente equilibrada por 10 minutos a 45°C. Em seguida foram adicionados 0,4 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,33 mL de peróxido de hidrogênio 30% em água destilada) e 0,1 mL de extrato enzimático contendo 76,9 unidades de atividade. Após 15 segundos de reação o aumento de absorbância a 470 nm foi determinado durante 5 minutos de reação a 45°C contra branco para ajuste do espectrofotômetro. Os tubos branco foram preparados pela mistura de 1,5 mL de solução 1,0% de guaiacol nos tampões de diferentes pH juntamente com 1,6 mL do respectivo tampão e 0,1 mL de extrato enzimático. O pH ótimo de atividade foi utilizado nas demais análises, exceto quando especificado.

### **3.6.3. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta**

O efeito do pH na estabilidade foi testado na faixa de pH 2,6 a 10,0. Foram utilizados os seguintes sistemas tampão: glicina-HCl (pH 2,6 a 3,5),

acetato (pH 3,6 a 5,0), fosfato (pH 5,5 a 8,0), ácido bórico-borax (pH 8,0 a 9,0) e borax-NaOH (pH 9,0 a 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro de sua respectiva faixa de capacidade tamponante.

As misturas de 2,0 mL de extrato enzimático contendo 153,8 unidades de atividade de peroxidase e 2,0 mL de solução tampão de diferentes valores de pH foram incubadas a 30°C por 3 horas e a 5°C por 24 horas. Após incubação, alíquotas de 2,0 mL de cada solução foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL do tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e a atividade residual foi determinada a 45°C como descrito no item 3.4.2.

Os valores de pH nas soluções enzimáticas submetidas aos tratamentos foram medidos para verificação da capacidade tamponante.

#### **3.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta**

Alíquotas de 5,0 mL de extrato enzimático apresentando pH 5,0 e contendo 394,5 unidades de atividade, foram incubadas às temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C por 10, 30 e 60 minutos e em ebulição por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, para teste da inativação térmica. Após os tratamentos térmicos, as alíquotas foram resfriadas em banho de gelo e a atividade residual de peroxidase foi determinada a 45°C utilizando tampão acetato 0,1 M pH 5,0, como descrito no item 3.4.2.

### **3.7. Purificação parcial da peroxidase de açaí**

#### **3.7.1. Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio**

A POD foi parcialmente purificada por fracionamento do extrato enzimático bruto, obtido como descrito no item 3.3, com sulfato de amônio 40, 60 e 80 % de saturação.

O sal foi adicionado a 100 mL do extrato enzimático bruto, lentamente, com agitação branda, até 40% de saturação. Após 24 horas a 5°C a solução foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 5°C e o precipitado foi dialisado contra água destilada por 48 horas a 5°C com troca freqüente da água destilada.

Adicionou-se ao sobrenadante uma quantidade de sulfato de amônio suficiente para atingir 60% de saturação. Essa solução, novamente, foi mantida por 24 horas a 5°C e então centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi separado e dialisado contra água destilada por 48 horas a 5°C com troca freqüente da água destilada.

Em seguida o sobrenadante foi saturado até 80% com sulfato de amônio. Procedimento semelhante ao já descrito para as demais saturações foi seguido, o precipitado foi separado e dialisado contra água destilada e o sobrenadante foi descartado.

As frações dialisadas foram armazenadas congeladas para estudos posteriores.

### **3.7.2. Cromatografia da POD em coluna de DEAE-celulose**

Cerca de 20,0 g de DEAE-Celulose foram tratadas com 250,0 mL de solução de NaOH 0,25 M contendo 0,25 M NaCl filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para a remoção do NaOH e do NaCl. A seguir, a resina foi tratada com 250,0 mL de HCl 0,25 M, lavada com água destilada para a remoção do HCl e equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 7,5.

Uma amostra de 15,0 mL de solução de POD, contendo 594 unidades de atividade/mL, obtida do fracionamento com sulfato de amônio 80% e dialisada em tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 foi aplicada em coluna de DEAE-Celulose de 1,5 cm x 50 cm (diâmetro x comprimento) equilibrada com o mesmo tampão descrito acima. As frações de 5 mL foram coletadas a cada 17 minutos aproximadamente utilizando-se coletor de frações Isco modelo Foxy 200.

A amostra foi eluída inicialmente com 400 mL do mesmo tampão descrito acima e em seguida aplicou-se 500 mL de solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 contendo 0,1 M de NaCl. Aplicaram-se em seguida quantidades de 200 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 contendo 0,2 M de NaCl, 0,3 M de NaCl e assim sucessivamente até atingir a concentração de 1,0 M de NaCl.

As frações contendo atividade de POD foram reunidas e porções de 10 mL foram congeladas a  $-10^{\circ}\text{C}$  para estudos posteriores.

A concentração de proteína foi determinada como descrito por Hartree (1972).

### **3.8. Caracterização da POD parcialmente purificada**

As características da peroxidase de açaí parcialmente purificada através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose, obtida no item 3.7.2, foram determinadas como descrito a seguir.

#### **3.8.1 Efeito da temperatura na atividade da POD parcialmente purificada**

A temperatura ótima de atividade da POD parcialmente purificada de açaí foi determinada como descrito no item 3.6.1. Utilizou-se solução de peroxidase contendo 49,0 unidades/mL.

#### **3.8.2. Efeito do pH na atividade da POD parcialmente purificada**

O pH ótimo de atividade da POD parcialmente purificada de açaí foi determinado como descrito no item 3.6.2.

### **3.8.3. Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada**

A faixa de pH de estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí foi estudada como descrito no item 3.6.3.

### **3.8.4. Efeito da temperatura na POD da peroxidase parcialmente purificada**

A estabilidade térmica da POD parcialmente purificada de açaí foi testada como descrito no item 3.6.4.

E também alíquotas de 10 mL da POD parcialmente purificada foram incubadas às temperaturas de 80 e 90°C e em ebulição (97°C) por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Após os tratamentos térmicos, as alíquotas foram resfriadas em banho de gelo e a atividade residual de peroxidase foi determinada a 35°C, como descrito no item 3.4.2.

### **3.8.5. Efeito da concentração de substrato na atividade da POD parcialmente purificada**

A influência da concentração de substrato na atividade de POD foi verificada com guaiacol e p-fenilenodiamina.

A mistura de reação constituída de 0,1 mL de solução enzimática contendo 5,0 unidades de atividade, 1,2 mL da solução do substrato de concentrações variáveis entre 0,6 e 15,0 mM para guaiacol ou 1,5 a 15,0 mM para p-fenilenodiamina dissolvido em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 e 1,6 mL desse mesmo tampão foi incubada a 35°C.

A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.4.2. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima foram determinados segundo o sistema gráfico de Hanes e Woolf.

#### **3.8.6. Efeito de sais minerais e inibidores na atividade da POD parcialmente purificada**

O efeito dos sais: KCN, KCl, NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  e dos inibidores: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA),  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio e iodoacetamida nas concentrações finais de 0,1 mM, 1,0 mM e 10,0 mM em relação ao volume final de reação, na atividade da POD parcialmente purificada de açaí foi determinado a 35°C utilizando-se tampão acetato pH 5,0, como descrito no item 3.4.2.

Como controle foi determinada a atividade da POD parcialmente purificada sem a adição de sais ou inibidores.

### **3.8.7. Regeneração da atividade da POD parcialmente purificada**

Para o estudo da capacidade de regeneração da peroxidase parcialmente purificada, alíquotas de 5 mL da solução da enzima foram submetidas a tratamentos térmicos de 80 e 90°C por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, e a atividade foi medida conforme descrito no item 3.4.2. Após esses tratamentos, as soluções enzimáticas foram armazenadas a temperatura ambiente e sob refrigeração (4°C) por períodos de 3 e 24 horas, e a atividade foi novamente medida conforme descrito no item 3.4.2.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção do extrato enzimático bruto de açaí

O extrato enzimático bruto obtido pela centrifugação da polpa de açaí como descrito no item 3.3 apresentou 16 unidades de atividade de PFO por mL de extrato bruto, o que corresponde a 3.200 unidades de PFO/100g de polpa e 769 unidades de atividade de peroxidase/mL de extrato bruto, o que corresponde a 153.800 unidades de POD/100g de polpa.

Flurkey e Jen (1978) estudaram a PFO e a POD de pêssego. Esses autores utilizaram catecol e guaiacol como substratos para PFO e POD, respectivamente, e definiram uma unidade de atividade de PFO e de POD como sendo o aumento de 0,1 unidade de absorbância por minuto a 420 e 470 nm, respectivamente. Eles encontraram os valores de atividade de 1600 unidades de POD/ g de extrato bruto e 900 unidades de PFO/g de extrato bruto, aproximadamente.

Khan e Robinson (1994) estudaram a POD de manga. Os autores relataram que as isoperoxidasas C1 e C3 apresentaram, respectivamente, maior atividade sobre o-dianisidina e guaiacol. A isoperoxidase C1 apresentou atividade de 36,1  $DO_{460nm}/mg$  de proteína com o substrato o-dianisidina e a isoperoxidase C3 apresentou atividade de 6,0  $DO_{420nm}/mg$  de proteína com guaiacol.

Lima (1999) verificou que a pinha (*Annona squamosa* L.) apresentou 8.993.333 unidades de PFO/100 g de polpa. Comparando-se a pinha e o

açaí, este último apresentou atividade de PFO cerca de 2.800 vezes menor que a pinha.

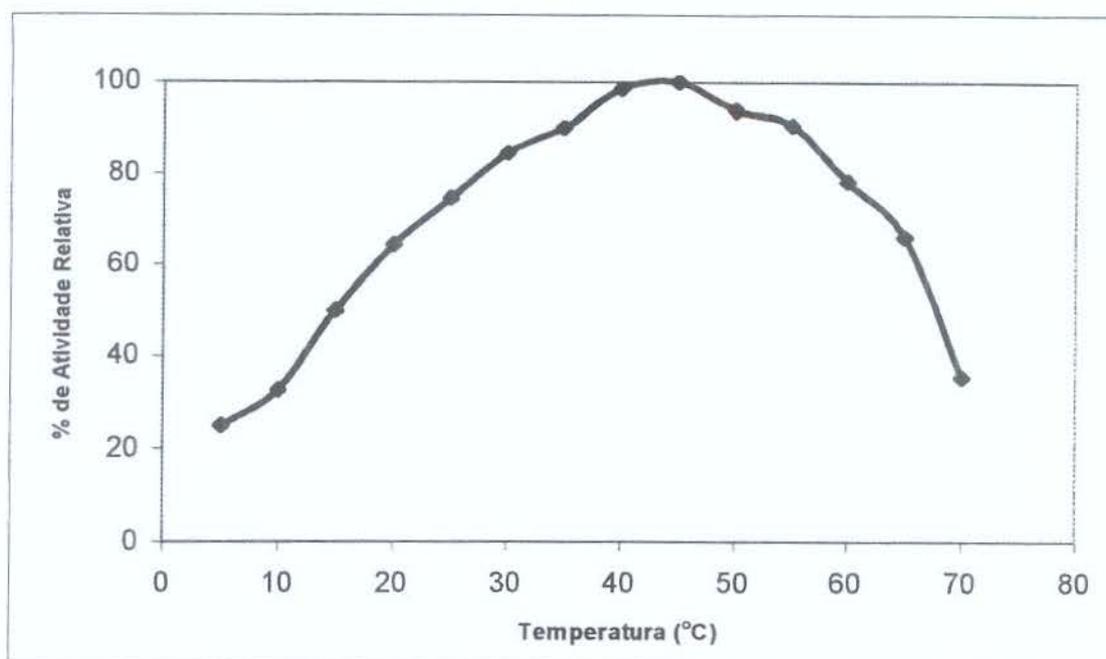
Holschuh (2000) relatou que a carambola (*Averrhoa carambola*, L.) apresentou 36.000 unidades de POD/100 g de polpa madura. Comparando-se a carambola e o açaí, este último apresentou atividade de POD cerca de 4,3 vezes maior do que a carambola.

## **4.2. Caracterização da polifenoloxidase bruta de açaí**

As características de temperatura e pH ótimo de atividade e de estabilidade da PFO do extrato bruto de açaí, obtido como descrito no item 3.3, foram determinadas e são apresentados a seguir.

### **4.2.1. Efeito da temperatura na atividade da PFO bruta**

O estudo do efeito da temperatura na atividade de PFO do extrato bruto da polpa do açaí foi determinado de acordo com a metodologia constante no item 3.5.1. A enzima apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 40 - 45°C, utilizando-se catecol como substrato em tampão fosfato pH 6,0, conforme ilustrado na Figura 07.



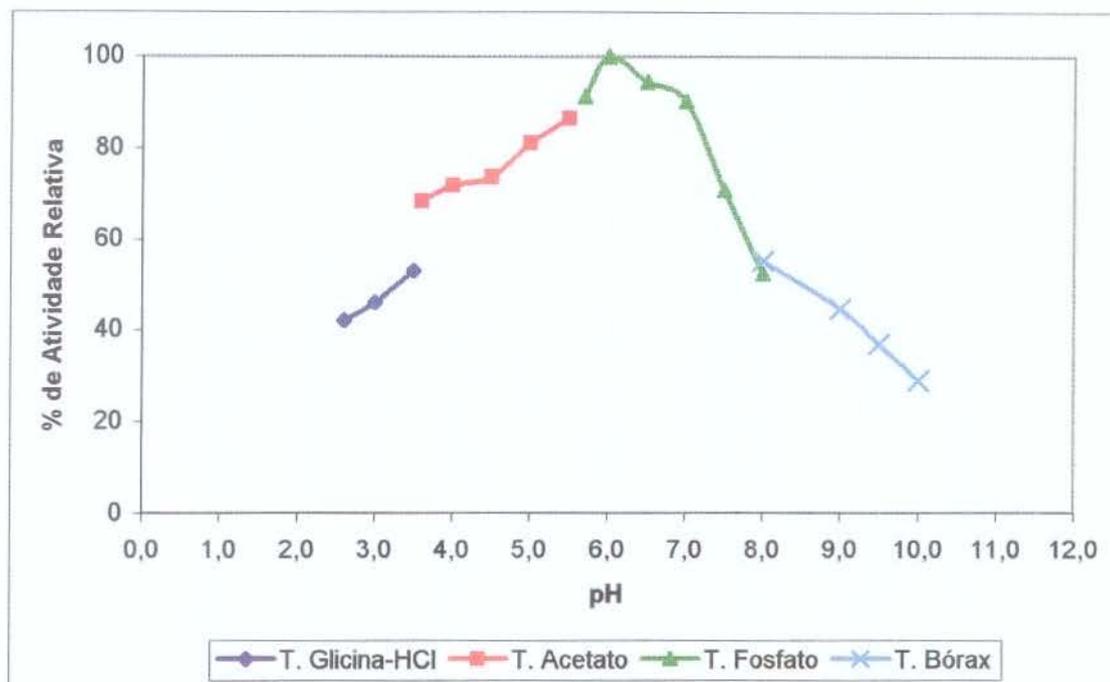
**Figura 07 – Efeito da temperatura na atividade da PFO bruta de açaí.**

A PFO de açaí apresentou atividade ótima em temperatura mais elevada do que as polifenoloxidasas de ameixa (20°C) (Siddiq et al., 1994), pinha (20°C) (Lima, 1999) e dos palmitos *Acanthophoenix rubra* e *Euterpe edulis* (30°C para ambos) (Lourenço et al., 1990 e Robert et al., 1995) (Tabela 01).

Fujita et al. (1995), num estudo com repolho, verificaram que a PFO apresentou temperatura ótima de atividade entre 40 e 45°C, muito semelhante à enzima de açaí.

#### **4.2.2. Efeito do pH na atividade da PFO bruta**

O efeito do pH na atividade da PFO do extrato bruto de açaí foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.2. A Figura 08 ilustra que a enzima bruta apresenta maior atividade em pH 6,0, em tampão fosfato de sódio 0,1M e utilizando-se catecol como substrato.



**Figura 08 – Efeito do pH na atividade da PFO bruta de açaí.**

O valor de pH ótimo de atividade para a PFO de açaí está dentro da faixa de valores encontrados para pH ótimo de atividade de diversas frutas citadas na literatura, 5,0-7,0 (Tabela 01) e está também de acordo com a constatação feita pelos autores Oktay et al. (1995) e Arslan et al. (1998): que, em geral, as polifenoloxidasas da maioria das plantas apresentam máximo de atividade em pH neutro ou próximo da neutralidade

Park et al. (1980), estudando a PFO de manga Haden, e utilizando tampão acetato de sódio 0,2M e catecol como substrato, encontraram atividade máxima para essa enzima em pH entre 5,6 e 6,0.

Lourenço et al. (1990), estudando a PFO de palmito (*Euterpe edulis*), testaram a atividade da enzima nos substratos ácido clorogênico, catequina, ácido caféico, 4-metilcatecol e no catecol, utilizando tampão McIlvaine contendo KCl 0,3M. Esta enzima apresentou maior atividade sobre catecol em pH 6,6.

A PFO de pêra Yali apresentou atividade ótima em catecol em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (Zhou e Feng, 1991).

Murata et al. (1992), estudaram a PFO de maçã Fuji (*Malus pumila*). Essa enzima apresentou atividade ótima sobre o ácido clorogênico em tampão McIlvaine pH 4,0.

Robert et al. (1995), verificaram que a PFO de palmito (*Acanthophoenix rubra*) apresentou atividade ótima em pH 5,2 usando os substratos 4-metilcatecol e pirogalol.

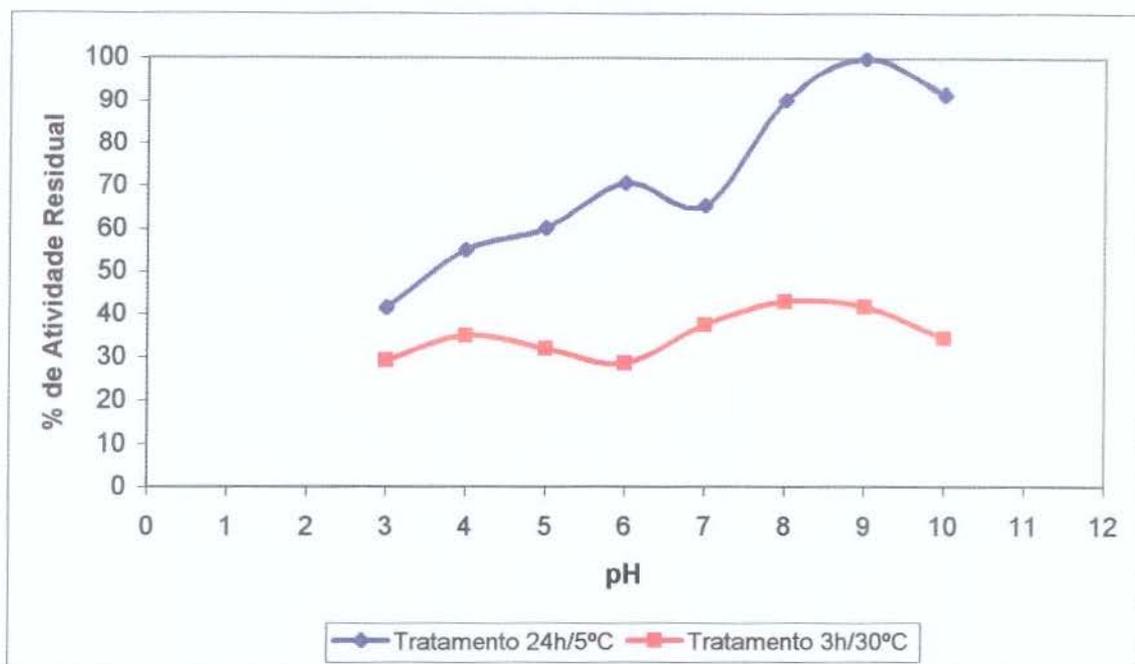
Arslan et al. (1998), estudando a PFO de damasco, e utilizando catecol como substrato, encontraram um máximo de atividade em pH 8,5, que é acima da média de valores de pH ótimo de atividade para a PFO da maior parte das frutas e vegetais.

#### **4.2.3. Efeito do pH na estabilidade da PFO bruta**

O efeito do pH na estabilidade da PFO de açaí foi testado pela incubação do extrato enzimático bruto, em diferentes valores de pH, em duas condições: 24 horas a 5°C e a 3 horas a 30°C como descrito no item 3.5.3.

A Figura 09 ilustra que após tratamento do extrato enzimático bruto de açaí em diferentes valores de pH na faixa de 2,6 a 10,0 por 24 horas a 5°C foram observadas duas faixas de maior atividade residual de PFO, uma em torno de pH 6,0 e outra em torno de pH 9,0, onde as enzimas retiveram 70 e 100% da atividade inicial, respectivamente. Incubando-se o extrato enzimático bruto de açaí na faixa de pH 2,6 a 10,0 por 3 horas a 30°C, verificou-se duas faixas de pH em que a PFO reteve maior atividade residual, uma em torno de pH 4,0 e outra em torno de pH 8,0 - 9,0 onde a enzima reteve 40 e 50% da atividade inicial, respectivamente. Esses resultados parecem indicar a presença de isoenzimas.

A PFO da preparação bruta de açaí mostrou menor estabilidade em pH ácido ou levemente ácido.



**Figura 09 –Efeito do pH na estabilidade da PFO bruta de açai.**

Lourenço et al. (1990) relataram que a PFO de palmito (*Euterpe edulis*) apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 8,0 após 3 horas a 30°C utilizando-se ácido clorogênico em pH 5,6.

Robert et al. (1995) verificaram que a PFO de palmito (*Acanthophoenix rubra*) mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,0 após 10 minutos a 30°C, usando 4-metilcatecol como substrato.

Fujita et al. (1995) verificaram que a PFO de repolho (*Brassica oleracea* L.) mostrou maior estabilidade na faixa de pH 5,0 a 11,0 após 20 horas de incubação a 5°C. A enzima manteve mais de 90% da atividade inicial após esse tratamento.

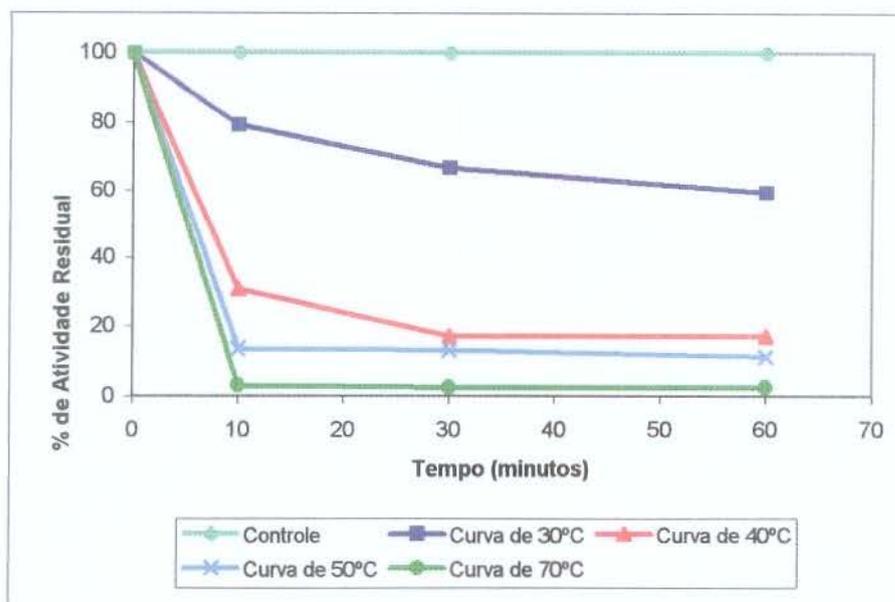
A PFO de pinha (*Annona squamosa* L.), parcialmente purificada, reteve cerca de 90% da sua atividade inicial na faixa de pH 6,0 a 8,0 após 20 horas de incubação a 20°C (Lima, 1999).

#### **4.2.4. Efeito da temperatura na estabilidade da PFO bruta**

O efeito da temperatura na estabilidade da PFO bruta de açaí foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.5.4.

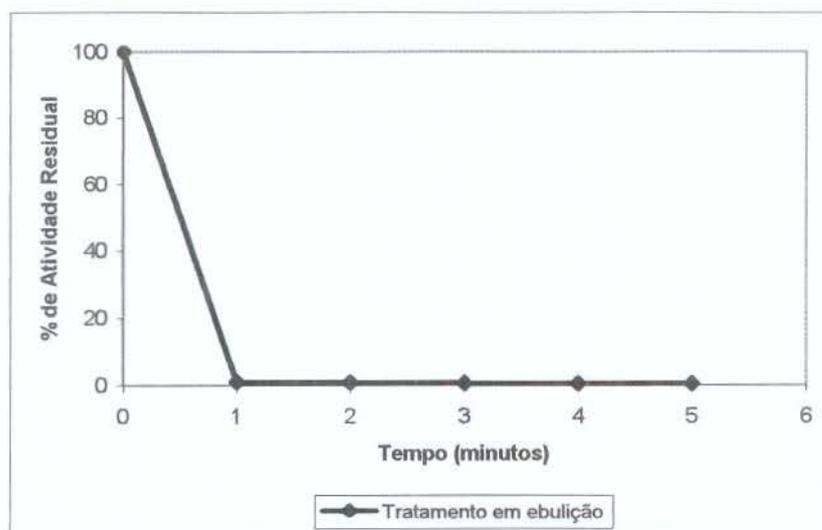
A Figura 10a ilustra que após 10 minutos de tratamento do extrato enzimático bruto a 30°C, 40°C, 50°C e 70°C a atividade residual da PFO de açaí foi de 80, 30, 15 e 5% respectivamente. Após 60 minutos de tratamento a 30°C, 40°C, 50°C e 70°C a atividade residual da enzima foi de 60,0, 16,9, 11,3 e 2,5% respectivamente.

A PFO de açaí (*Euterpe oleracea* M.) mostrou-se mais termossensível do que a PFO do palmito *Euterpe edulis* estudada por Lourenço et al. (1990). A enzima desse palmito mostrou-se estável entre 50 e 60°C e foi inativada a 75°C. A PFO de açaí também se mostrou mais termossensível do que a enzima do palmito *Acanthophoenix rubra* descrita por Robert et al. (1995). A PFO desse palmito apresentou 50% de inibição após 18 minutos de tratamento a 70°C.



**Figura 10a – Efeito da temperatura na estabilidade da PFO bruta.**

A Figura 10b mostra que a PFO do extrato bruto de açaí perdeu 99% de sua atividade após 1 minuto de tratamento em ebulição (97°C) e foi completamente inativada após 2 minutos nessa condição.



**Figura 10b – Inativação térmica da PFO bruta de açaí.**

McCord e Kilara (1983), estudando a PFO de cogumelo (*Agaricus bisporus*), investigaram a estabilidade dessa enzima quando exposta a temperaturas de 25 a 70°C, com incrementos de 5°C, pelo período de 10 minutos. A atividade residual foi avaliada em pH 6,5 e 25°C e verificou-se que 100% da atividade inicial foi mantida nos tratamentos entre 25 e 45°C. Entre as temperaturas de 45 e 70°C foi observado um declínio gradual na atividade residual com o aumento da temperatura de exposição. Para temperaturas de exposição superior a 70°C, a enzima não apresentou atividade residual.

Siddiq et al. (1994), trabalhando com PFO de ameixas, encontrou resultados bastante similares ao relatado acima para PFO de açai. Observaram que a PFO de ameixas apresentou estabilidade na faixa de 10 a 50°C, porém, acima de 50°C a enzima perdia atividade rapidamente, não sendo completamente inativada, entretanto, na temperatura de 70°C.

Arslan et al. (1997) verificaram que a PFO de alho mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 40°C. O aquecimento durante 30 minutos a 40°C não causou perda significativa da atividade enzimática.

Arslan et al. (1998), estudando a PFO de damasco, encontrou que o tratamento a 40°C, após 40 minutos não causou perda de atividade significativa. Os tempos requeridos para obter 50% de inativação a 60 e 80°C foram, respectivamente, 47 e 16 minutos. Os autores afirmam ainda que a estabilidade térmica está relacionada ao grau de amadurecimento da fruta e, em alguns casos, ao pH. Além do que formas moleculares

diferentes da enzima, de uma mesma fonte, podem apresentar termoestabilidades diferentes.

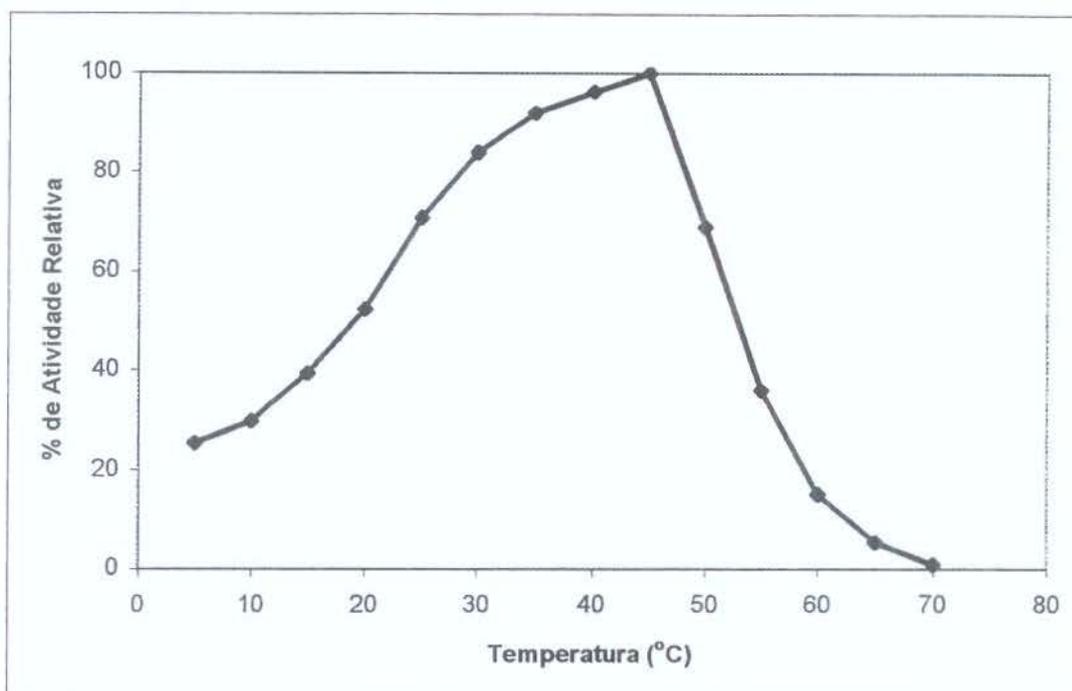
### **4.3. Caracterização da peroxidase bruta de açaí**

As características de temperatura e pH ótimo de atividade e estabilidade da POD no extrato bruto de açaí foram determinadas como descrito no item 3.6.

#### **4.3.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta**

O estudo do efeito da temperatura na atividade de POD do extrato bruto da polpa do açaí foi determinado de acordo com a metodologia constante no item 3.6.1. A enzima apresentou maior atividade à temperatura de 45°C, em tampão fosfato pH 6,0 e usando guaiacol como substrato, conforme ilustrado na Figura 11.

Foi observado que a POD de açaí mostrou-se ativa à baixa temperatura, sendo que a 5°C apresentou 25% da atividade máxima. No entanto, em temperaturas superiores à 45°C a atividade da enzima diminuiu rapidamente, sendo inativada à 70°C.



**Figura 11 – Efeito da temperatura na atividade da POD bruta de açaí.**

A POD de açaí apresentou atividade ótima dentro da faixa de temperatura ótima de atividade de peroxidases de diversas frutas e vegetais descritos na literatura, entre 30 e 55°C. As peroxidases de morango, pêssigo e repolho apresentaram atividade ótima a 30, 40 e 45°C, respectivamente, enquanto que as enzimas de carambola, kiwi e melão apresentaram atividade ótima a 50°C (Tabela 02).

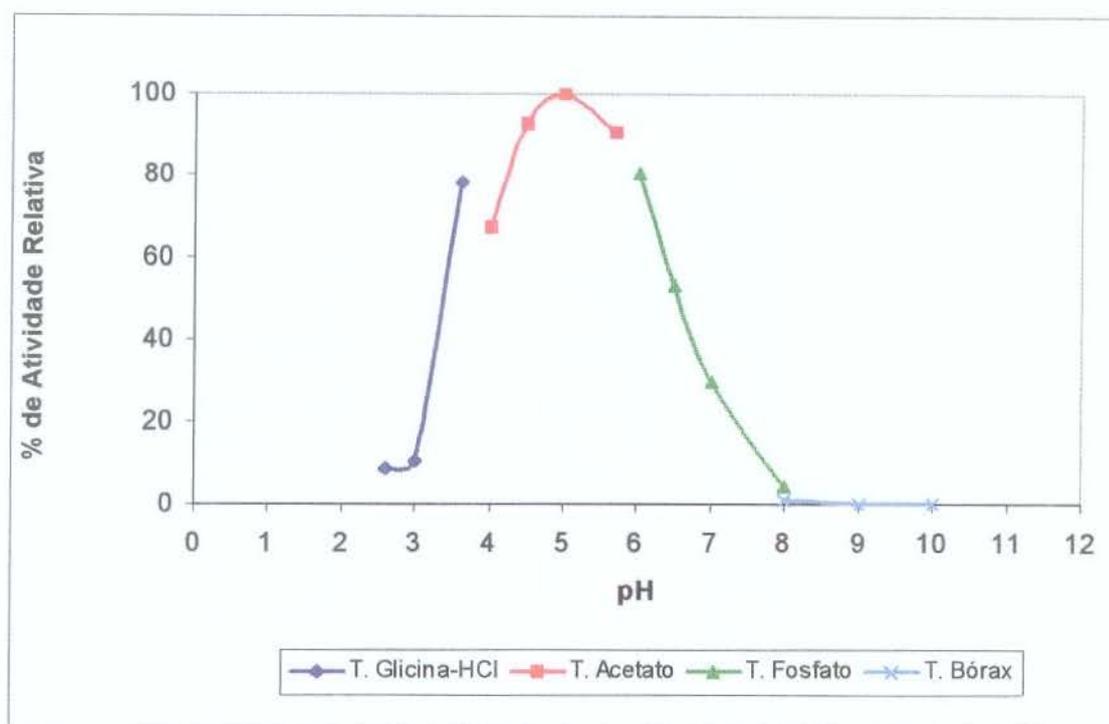
Civello et al. (1995), estudando a POD de morango, verificaram que a atividade ótima da enzima, nas condições estudadas, foi à 30°C. Notaram ainda que a atividade decrescia rapidamente em altas temperaturas, sendo

muito baixa (menos de 20% da máxima) a 50°C. No entanto, a atividade da enzima ainda era consideravelmente alta a baixas temperaturas, mantendo cerca de 40% da atividade máxima a 0°C.

#### **4.3.2. Efeito do pH na atividade da POD bruta**

O efeito do pH na atividade da POD do extrato bruto de açaí foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.2. A Figura 12 ilustra que a enzima bruta apresenta maior atividade em pH 5,0, em tampão acetato 0,1M e utilizando-se guaiacol como substrato.

O valor de pH ótimo de atividade para POD de açaí está dentro da faixa de valores encontrados para pH ótimo de atividade de diversas frutas citadas na literatura, 5,0-7,0 (Tabela 02).



**Figura 12 – Efeito do pH na atividade da POD bruta do açaí.**

Moulding et al. (1987), estudando peroxidases extraídas de maçã, testaram a atividade em diferentes valores de pH, usando tampões 0,1M de acetato e fosfato de sódio, numa faixa de 4,0 a 7,0. Os autores observaram dois picos de atividade ótima de POD na faixa de pH 5,4 a 5,8, na fração enzimática solúvel extraída da polpa de maçã. Os autores observaram ainda que em tampão acetato, essa enzima se mostrou mais ativa.

Civello et al. (1995) verificaram que a POD de morango apresenta atividade ótima em pH 6,0. Os autores observaram ainda que esse valor dependia do doador de hidrogênio utilizado, bem como do substrato utilizado.

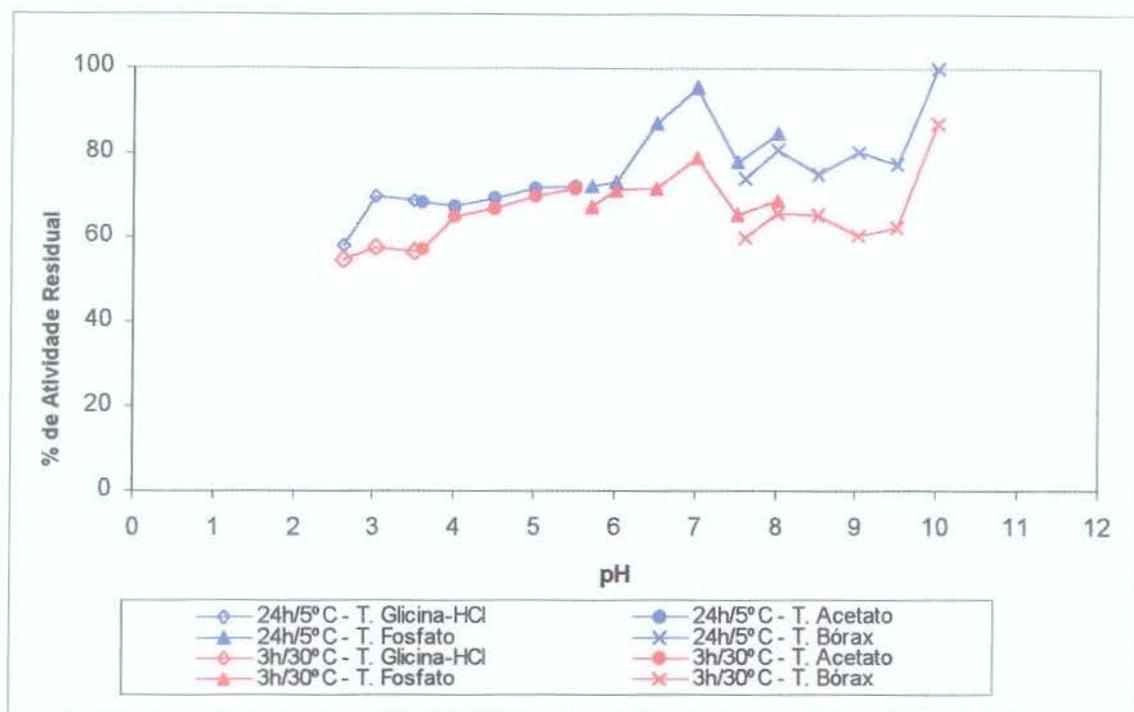
### **4.3.3. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta**

O efeito do pH na estabilidade da POD bruta de açaí foi testado pela incubação do extrato enzimático bruto, em diferentes valores de pH, em duas condições: 24 horas a 5°C e a 3 horas a 30°C, como descrito no item 3.6.3.

No primeiro tratamento, expondo-se o extrato enzimático bruto a diferentes valores de pH na faixa de 2,6 a 10,0 por 24 horas a 5°C foram observadas diferentes zonas de maior estabilidade da enzima em pH 3,0 , pH 7,0 , pH 8,0 e pH10,0 , como pode ser observado na Figura 13.

No segundo tratamento, incubando-se o extrato enzimático bruto a diferentes valores de pH na faixa de 2,6 a 10,0 durante 3 horas a 30°C foram observadas zonas de pH de maior estabilidade em pH 3,0 , pH 7,0, pH 8,0 e pH 10,0 indicando a presença de isoenzimas de POD no extrato bruto da polpa de açaí. Esses dados podem ser observados na Figura 13.

A POD de açaí mostrou-se estável na faixa de pH 2,6 a 10,0, mantendo mais que 50% da atividade inicial após 24 horas de incubação a 5°C e 3 horas de incubação a 30°C.



**Figura 13 – Efeito do pH na estabilidade da POD bruta de açaí.**

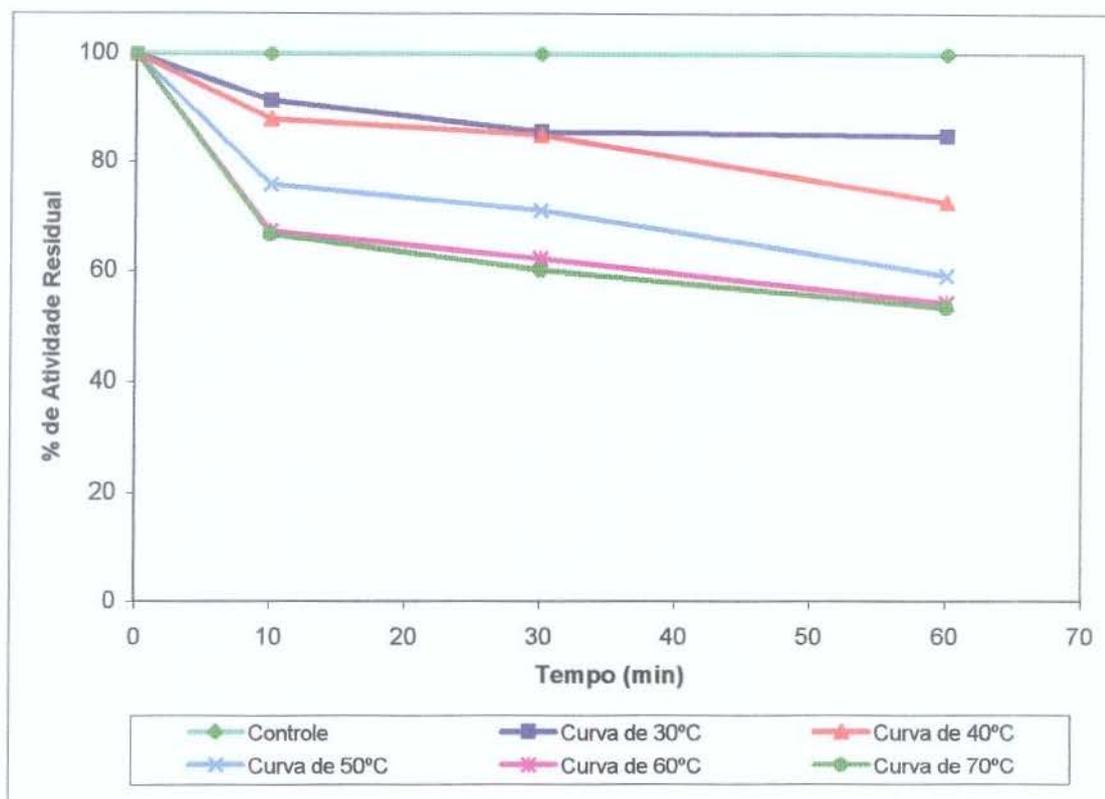
Burnette (1977) afirmou que a atividade oxidativa da POD é afetada pelo pH, e que uma acidificação da POD causa uma pronunciada mudança na conformação da proteína, do seu estado nativo a um estado de desnaturação reversível.

#### **4.3.4. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta**

O efeito da temperatura na estabilidade da POD bruta de açaí foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.6.4.

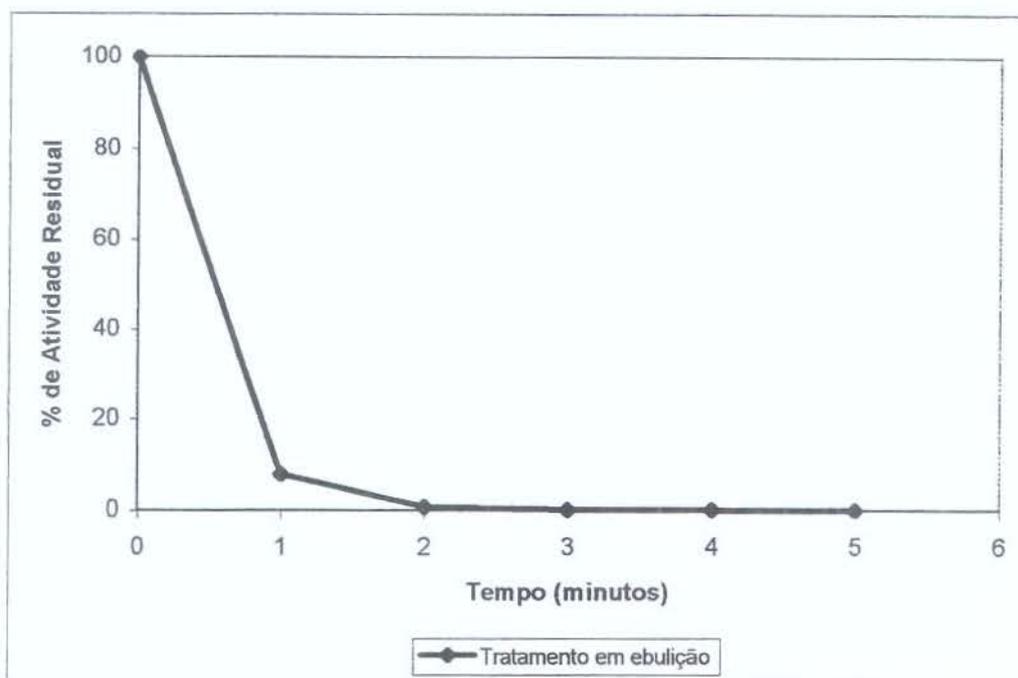
A Figura 14a ilustra que após 60 minutos de tratamento a 30°C a enzima ainda reteve cerca de 90% de sua atividade inicial. A Figura mostra

ainda que, após 60 minutos a 70°C, a POD ainda reteve mais de 50% de sua atividade inicial.



**Figura 14a – Efeito da temperatura na estabilidade da POD bruta.**

A Figura 14b ilustra que a POD do extrato bruto de açaí perdeu 98,8% de sua atividade após 2 minutos de tratamento em ebulição (97°C) e foi completamente inativada após 3 minutos nessa condição.



**Figura 14b – Inativação térmica da POD bruta de açaí.**

Moulding et al. (1987) estudaram peroxidases extraídas de maçã e relataram que as frações solúveis dessa enzima mantiveram cerca de 40% de sua atividade após um tratamento a 70°C por 10 minutos. Já em um tratamento a 80°C, a POD solúvel perdeu cerca de 80% de sua atividade em 2 minutos.

Khan e Robinson (1993), estudando a POD de manga, relataram que a enzima perdeu cerca de 70% de sua atividade inicial após 10 minutos de tratamento térmico a 60°C. Acima dessa temperatura as perdas foram maiores, sendo que a 80°C, por 2 minutos, a enzima perdeu mais de 90% de sua atividade original.

Civello et al. (1995), estudando a POD de morango, verificaram que a enzima conserva sua atividade original mesmo após 20 minutos de

tratamento a 45°C. Já a 55°C, a enzima reteve 68% da atividade inicial após 5 minutos de tratamento e apenas 23% após 20 minutos de tratamento. Temperaturas superiores a 60°C resultaram em perda de atividade praticamente completa, mesmo por períodos muito curtos.

Pomar et al. (1997), estudando a POD de pimenta, verificaram que a enzima reteve apenas 25% de sua atividade inicial após 15 minutos de tratamento, a 60°C. O tratamento durante 5 minutos a 80°C resultou em 90% de inativação da enzima, sendo que a inativação completa ocorreu a 100°C.

#### **4.4. Purificação parcial da peroxidase de açaí**

A POD de açaí foi parcialmente purificada através do fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose como descrito no item 3.7.

##### **4.4.1. Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio**

Todas as frações resultantes das precipitações com 40, 60 e 80% de saturação com sulfato de amônio, denominadas I, II e III respectivamente, foram testadas quanto a atividade de PFO e POD.

Na fração I, resultante da precipitação com 40% de saturação com sulfato de amônio, foram encontradas 2 unidades de PFO / mL e 100

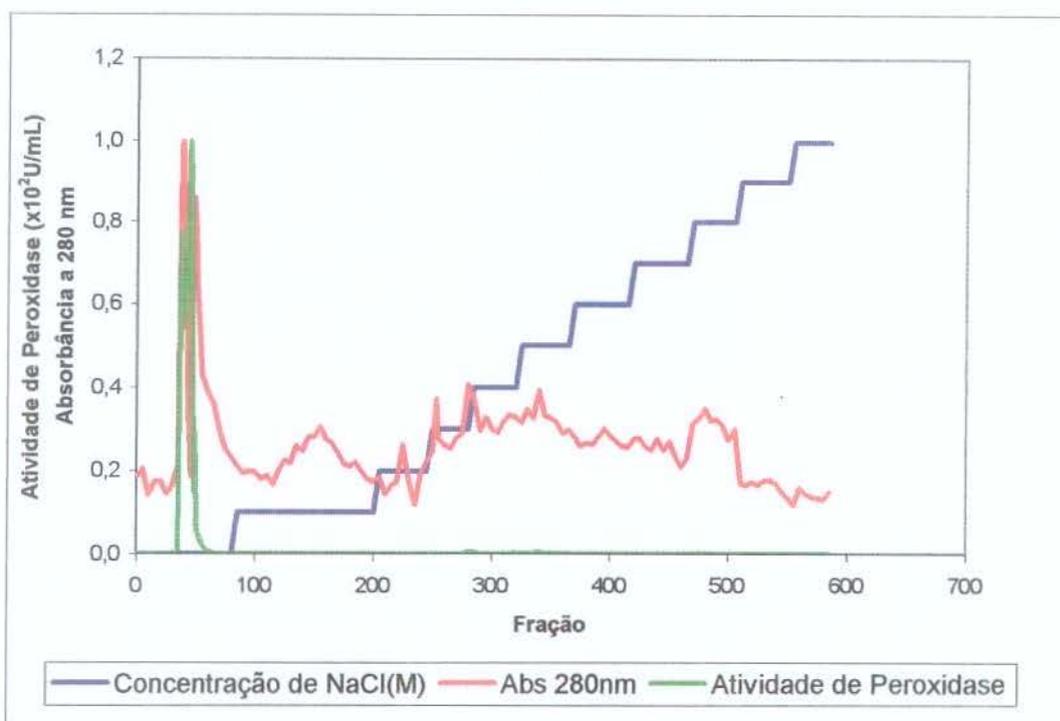
unidades de POD / mL. A PFO da fração I apresentou baixa estabilidade sendo inativada após 30 dias de estocagem a - 10°C.

A fração II, resultante da precipitação com 60% de saturação com sulfato de amônio, apresentou atividade de PFO próxima de zero (0,3 unidades de PFO / mL) e 80 unidades de POD / mL .

A fração III, que foi obtida pela precipitação com 80% de saturação com sulfato de amônio, apresentou atividade apenas da POD. A fração III, contendo 120 unidades de atividade de POD / mL foi escolhida para o estudo de purificação parcial e caracterização porque apresentou maior atividade e estabilidade durante a estocagem, à - 10°C.

#### **4.4.2. Cromatografia da peroxidase em coluna de DEAE-celulose**

A POD da fração III obtida pela precipitação com 80% de saturação com sulfato de amônio e dialisada foi eluída em coluna de DEAE - celulose como descrito no item 3.7.2. A Figura 15 ilustra que a peroxidase de açaí não foi adsorvida na coluna de DEAE - celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,05M pH 7,5, sendo eluída com tampão de equilíbrio, sem a adição de NaCl, nas frações 37 a 46. Não foi detectada atividade de POD nas frações eluídas com tampão fosfato 0,05M pH 7,5 contendo até 1,0M de NaCl.



**Figura 15 – Eluição da peroxidase em coluna de DEAE-celulose**

A Tabela 03 ilustra que a POD de açaí foi purificada cerca de 7,9 vezes através do fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

**Tabela 03 – Purificação Parcial da Peroxidase de Açaí**

Etapa do Procedimento	Volume (mL)	Unidades de peroxidase / mL	Atividade Total (Unidades de peroxidase)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U / mg de proteína)	Purificação	Rendimento %
Extrato bruto	100	769	76.900	1,216	632,4	1,0	100,0
Fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-celulose	30	120	3.600	0,024	5.000,0	7,9	4,7

## **4.5. Caracterização da peroxidase parcialmente purificada de açaí**

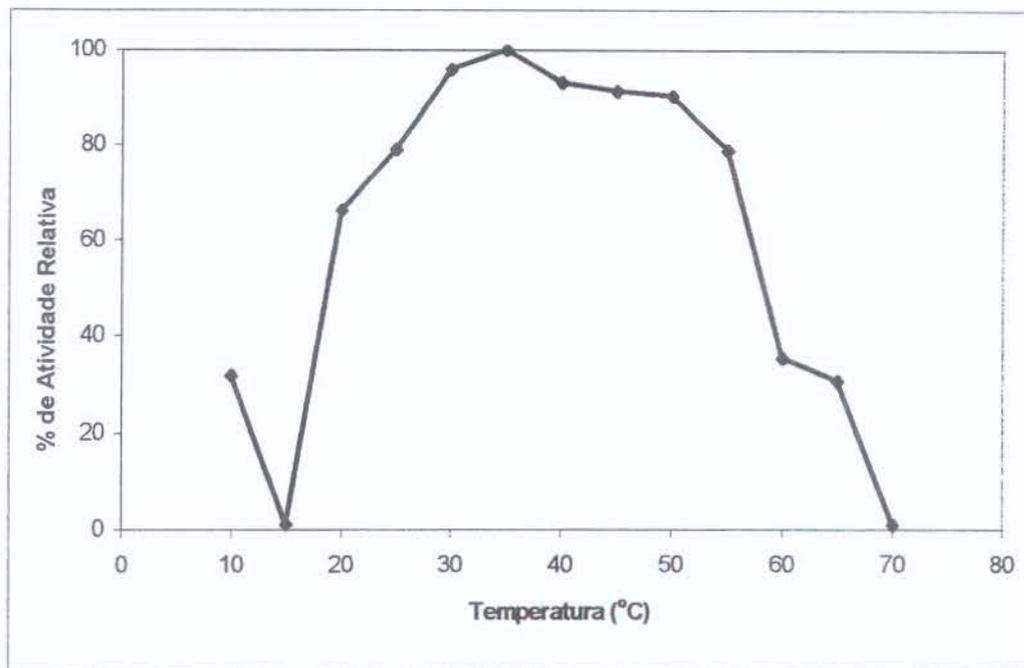
As características bioquímicas da fração III da POD parcialmente purificada em coluna de DEAE - celulose de acordo com o item 3.7.2 foram determinadas como descrito no item 3.8.

### **4.5.1. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí**

O estudo do efeito da temperatura na atividade da POD da fração III, parcialmente purificada de açaí, foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.8.1. A peroxidase da fração III apresentou maior atividade à temperatura de 35°C, conforme ilustrado na Figura 16.

Foi observada maior atividade da POD à 10°C do que à 15°C. Este resultado parece indicar a presença de uma isoenzima na preparação enzimática parcialmente purificada de POD, mais ativa à 10°C do que à 15°C.

A preparação bruta da POD de açaí apresentou atividade ótima a 45°C (Figura 11). Esses resultados indicam que a preparação bruta de peroxidase de açaí contém isoenzimas que apresentam atividade ótima em diferentes temperaturas. Estudos posteriores de purificação da POD de açaí são recomendados.



**Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade da POD parcialmente purificada de açaí.**

A POD das preparações bruta e purificada de morango, estudada por Civello et al. (1995) apresentou atividade ótima a 30°C enquanto a peroxidase de pêssigo apresentou atividade ótima a 40°C (Lourenço e Neves, 1997).

As peroxidases de carambola (Holschuh, 2000), kiwi (Soda et al., 1991) e melão (Lamikanra e Watson, 2000) apresentaram atividade ótima a 50°C.

#### 4.5.2. Efeito do pH na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí

O efeito do pH na atividade da fração III, parcialmente purificada, foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.8.2. A Figura 17 ilustra que a POD apresenta maior atividade em pH 4,0 a 5,0, em tampão acetato 0,1M, à uma temperatura de 35°C e utilizando-se guaiacol como substrato.

O valor de pH ótimo de atividade para POD de açaí está dentro da faixa de valores encontrados para pH ótimo de atividade de diversas frutas citadas na literatura, 5,0-7,0 (Tabela 02).

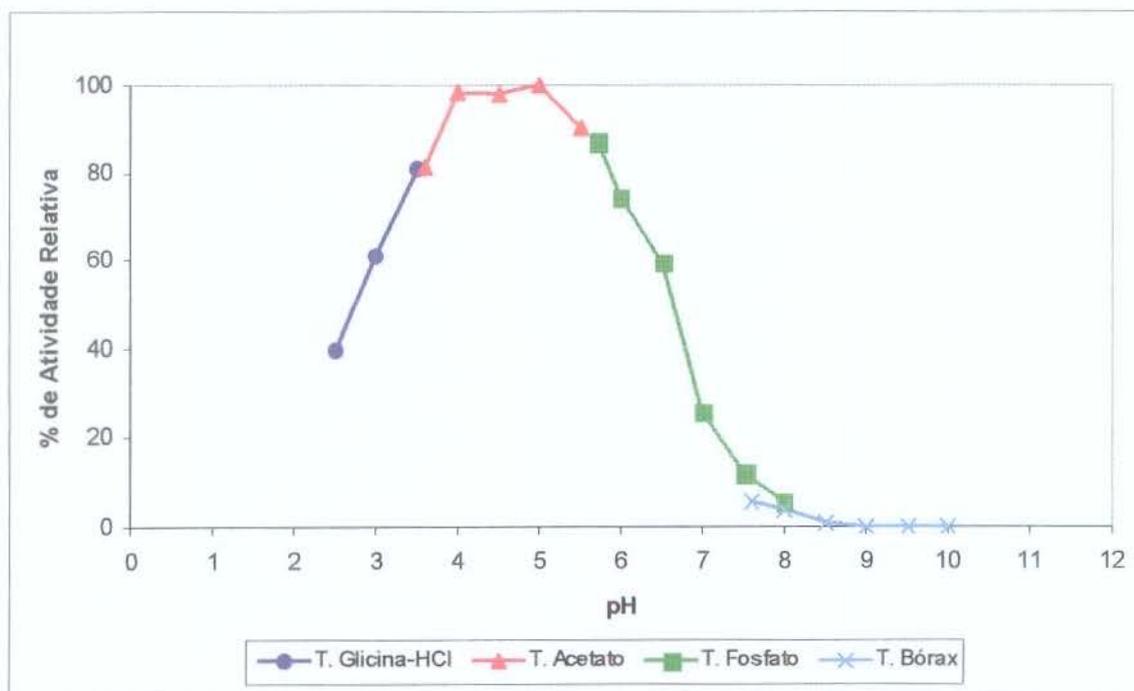


Figura 17 – Efeito do pH na atividade da POD parcialmente purificada

Khan e Robinson (1993) verificaram que as peroxidases solúveis do extrato bruto de manga apresentaram atividade ótima em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e a 25°C, utilizando-se o-dianisidina como substrato.

Clemente e Robinson (1995) estudaram a POD de laranja e constataram que essa enzima apresentou atividade ótima em pH 6,0 , usando o-dianisidina como substrato.

Holschuh (2000) analisou a POD purificada de carambola e relatou que a maior atividade dessa enzima foi em tampão citrato-fosfato pH 5,5, utilizando-se guaiacol como substrato.

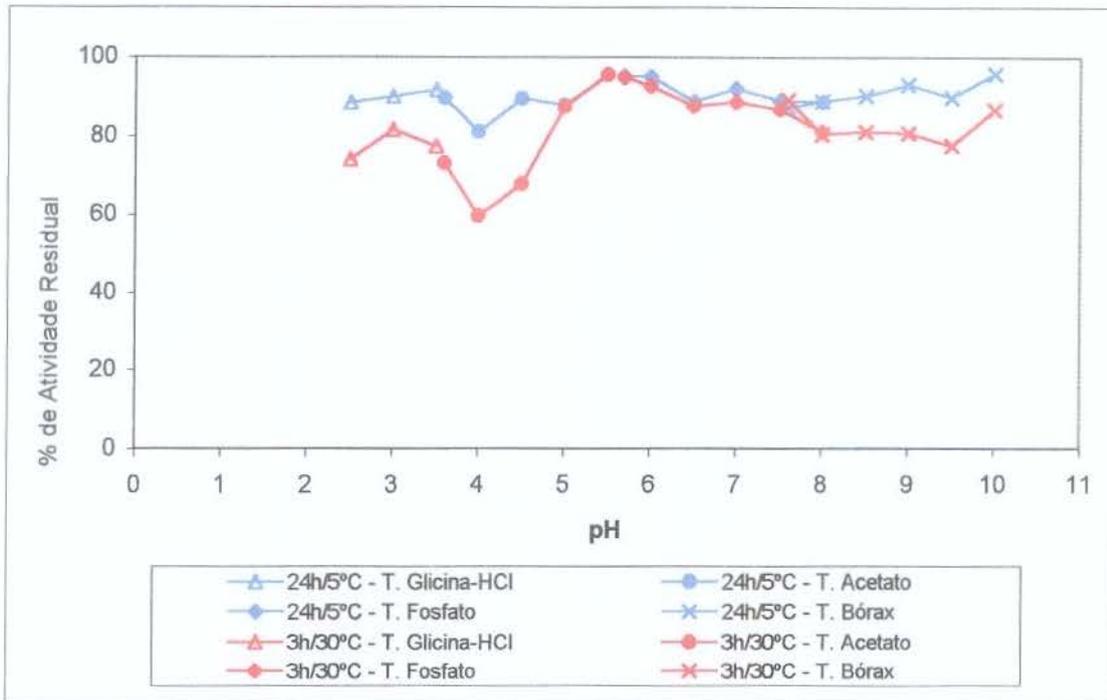
#### **4.5.3. Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada**

O efeito do pH na estabilidade da POD da fração III, parcialmente purificada, foi estudado como descrito no item 3.8.3.

A Figura 18 ilustra que no primeiro tratamento, expondo-se a enzima a diferentes valores de pH na faixa de pH 2,6 a 10,0 durante 24 horas a 5°C, foi observado alta atividade de peroxidase praticamente em toda a faixa de pH testada (2,6 a 10,0).

No segundo tratamento, incubando-se a enzima a diferentes valores de pH na faixa de pH 2,6 a 10,0 durante 3 horas a 30°C, foi observado que a enzima manteve-se estável em ampla faixa de pH, sendo que foi observado pico de maior atividade em pH 3,0 e na faixa de pH 5,0 a 6,0.

Estes resultados sugerem a presença de isoenzimas de POD na fração III parcialmente purificada de açaí.



**Figura 18 – Efeito do pH na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí.**

Pomar et al. (1997) estudaram a POD de pimenta. Os autores reportaram que após incubação em diferentes valores de pH a enzima se manteve estável por 45 minutos na faixa de pH 6,0 a 9,0. Em pH 5,0 a POD de pimenta perdeu sua atividade após 30 minutos. Em pH menor que 5,0, a enzima rapidamente perdeu sua atividade, sendo que em pH 3,0 a atividade foi perdida em 5 minutos.

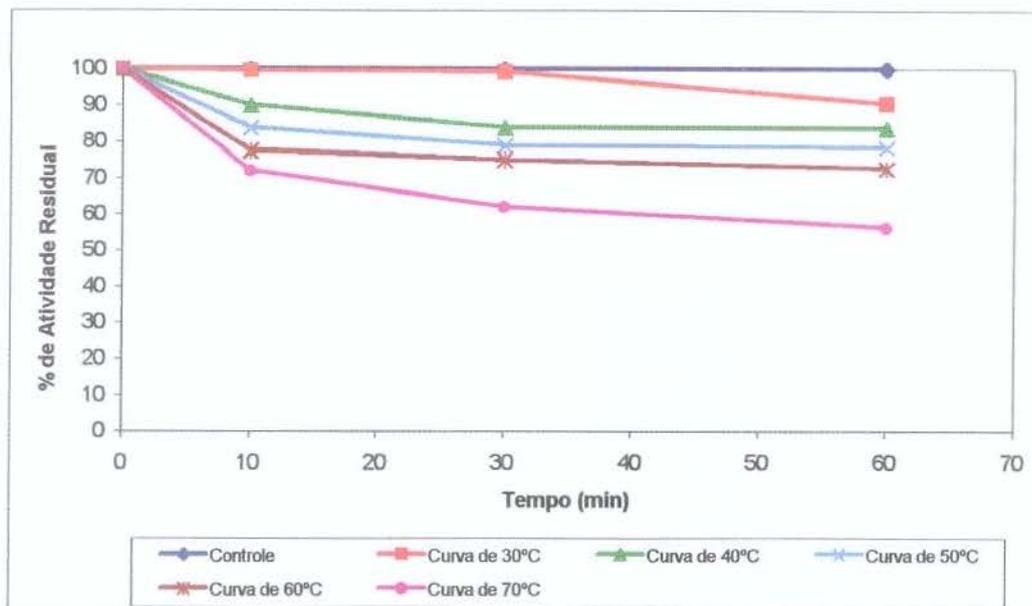
Civello et al. (1995) estudaram a POD de morango e observaram que a enzima se mostrou estável na faixa de pH 4,0 a 11,0. Nessa faixa a atividade residual da enzima foi de 50% ou mais de sua atividade máxima. Os autores relataram ainda que a enzima se mostrou mais estável na faixa de pH 6 a 7,5, sendo que sua atividade residual nessa faixa foi de 90% de sua atividade máxima.

#### **4.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí**

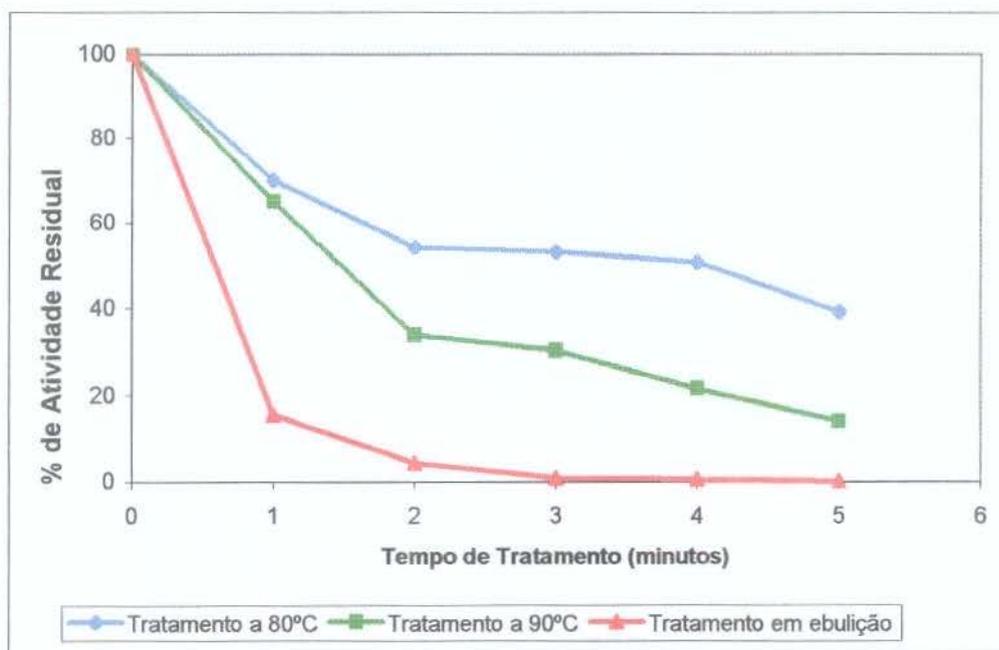
O efeito da temperatura na estabilidade da POD da fração III parcialmente purificada de açaí foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.8.4.

A POD da fração III mostrou-se uma enzima termoestável, retendo cerca de 70% da atividade inicial após 10 minutos de tratamento a 70°C (Figura 19a). A enzima reteve ainda cerca de 20% de atividade após 5 minutos de tratamento a 90°C (Figura 19b).

A peroxidase da fração III somente foi inativada após 3 minutos de tratamento em ebulição (97°C) (Figura 19b).



**Figura 19a –Efeito da temperatura na estabilidade da POD parcialmente purificada de açaí.**



**Figura 19b – Efeito da temperatura na estabilidade da POD Parcialmente Purificada de Açaí**

A POD é considerada uma enzima bastante termoestável, sendo empregada como indicadora da eficácia em tratamentos térmicos como branqueamento e pasteurização. A POD de açaí mostrou-se mais termoestável que a POD de maçã (Moulding et al., 1987), morango (Civello et al., 1995) e manga (Khan e Robinson, 1993).

As peroxidases solúveis de maçã estudadas por Moulding et al. (1987) mantiveram cerca de 40% de sua atividade após tratamento a 70°C por 10 minutos.

Khan e Robinson (1993), estudando POD extraída de manga, relataram que esta enzima perde cerca de 70% de sua atividade inicial após um tratamento térmico de 10 minutos a 60°C. Os autores verificaram que a POD purificada de manga mostrou-se mais termorresistente que a não purificada, e sugeriram que o extrato bruto da enzima deva conter outras substâncias que aumentam a perda da atividade enzimática durante o aquecimento.

Civello et al. (1995) encontraram que a POD de morango conserva sua atividade original mesmo após 20 minutos de tratamento a 45°C. No entanto, tratamentos térmicos em temperaturas superiores a 60°C, mesmo por períodos curtos, provocaram inativação quase completa da enzima.

Lourenço e Neves (1997) isolaram POD solúvel de pêssego, purificaram-na por cromatografia de troca iônica e verificaram que sua inativação térmica seguiu padrão não-linear e foi rápida em temperaturas superiores a 70°C, com perda praticamente total da atividade em tratamento a 80°C durante 30 segundos.

#### 4.5.5. Efeito da concentração de substrato na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí

O efeito da concentração dos substratos guaiacol e p-fenilenodiamina na atividade da POD parcialmente purificada foi investigado usando-se as concentrações de 0,6 a 15mM. Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram determinados utilizando-se o método gráfico de Hanes e Woolf.

Obteve-se os valores de  $K_M$  2,4 mM e  $V_{max}$  25,5 U/min/mL da POD para o substrato guaiacol ( Figura 20a ) e os valores de  $K_M$  3,9 mM e  $V_{max}$  52,9 U/min/mL da POD para o substrato p-fenilenodiamina (Figura 20b ).

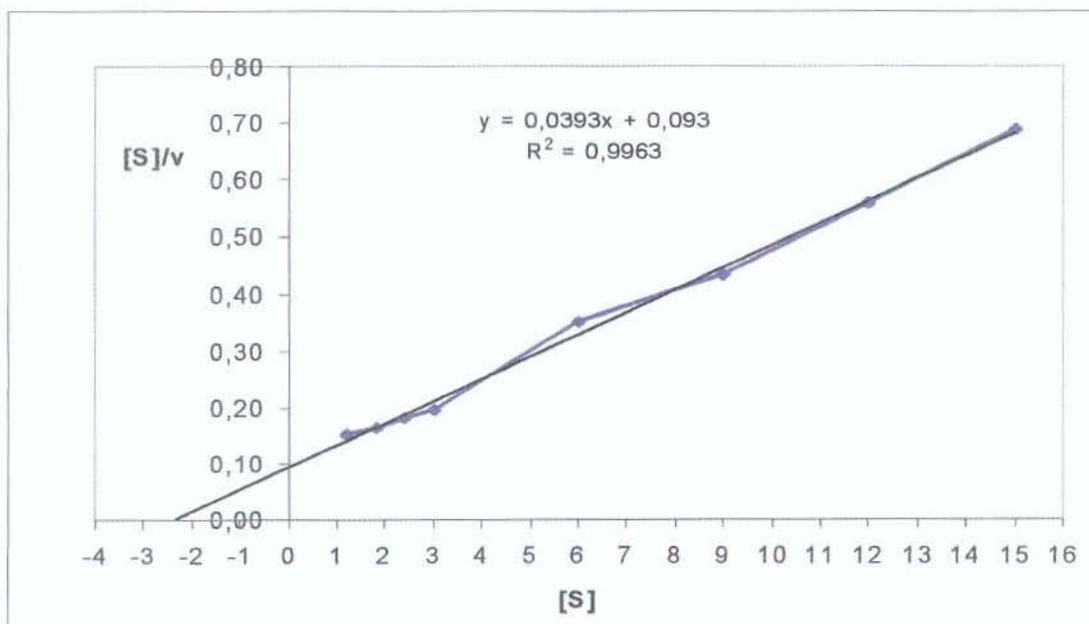
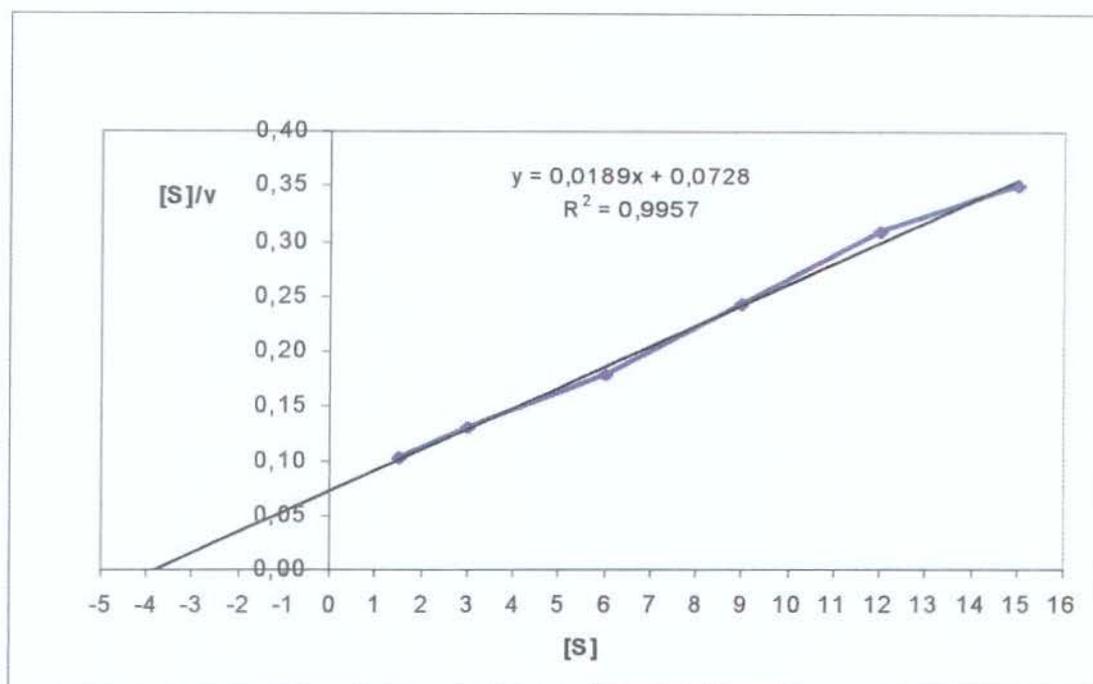


Figura 20a – Determinação dos parâmetros cinéticos da atividade de POD para o substrato guaiacol



**Figura 20b – Determinação dos parâmetros cinéticos de atividade da POD para o substrato p-fenilenodiamina**

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola e verificou que para o substrato guaiacol o  $K_M$  estimado foi 20,28 mM e  $V_{MAX}$  foi 8,21 U/mL e para o substrato p-fenilenodiamina o  $K_M$  estimado foi 3,62 mM e  $V_{MAX}$  foi 15,937 U/mL.

#### **4.5.6. Efeito de sais minerais e de inibidores na atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí**

O efeito dos sais minerais  $Fe_2(SO_4)_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $Na_2SO_4$  e  $KCN$  foi estudado na POD parcialmente

purificada de açaí, nas concentrações de 0,1 , 1,0 e 10,0 mM, como descrito no item 3.8.6. Os resultados estão apresentados na Tabela 04.

Os sais  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  e  $\text{CuSO}_4$ , na concentração final 1,0 mM, inibiram parcialmente a POD, sendo obtido respectivamente 61,3 e 84,8% de atividade residual.

Os sais  $\text{KCl}$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$ , na concentração final 10,0 mM, inibiram cerca de 25 a 30% a atividade da POD, sendo obtido respectivamente atividade residual de 75,7 , 71,9 e 68,2%.

Os sais  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , na concentração final 10,0 mM, inibiram mais que 50% a atividade da POD, sendo obtido atividade residual de 49,5 , 37,1 e 23,2%.

O sal  $\text{KCN}$  inibiu completamente a POD parcialmente purificada de açaí, mesmo a uma concentração de 0,1 mM.

Liao et al. (1999) estudaram a POD catiônica de uva (*Vitis pseudoreticulata*) e observaram que os sais  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na concentração de 150 mM/L e os sais  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{MgSO}_4$  na concentração de 300 mM/L estimularam a atividade dessa POD.

**Tabela 04 – Efeito de sais minerais na atividade da POD parcialmente purificada**

Sal Mineral	Concentração do Sal		
	0,1 mM	1,0 mM	10,0 mM
	Atividade Residual de POD (%)		
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	108,4	61,3	—*
CuSO <sub>4</sub>	94,6	84,8	—*
NaCl	95,8	78,5	49,5
KCl	90,0	81,3	75,7
MgSO <sub>4</sub>	90,9	82,5	68,2
MnSO <sub>4</sub>	95,9	86,3	71,9
CaCl <sub>2</sub>	88,2	79,6	37,1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	77,6	65,0	23,2
KCN	0,3	0,0	0,0

\* Concentração não testada.

O efeito dos inibidores  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido ascórbico, iodoacetamida, EDTA e metabissulfito de sódio, foi estudado na POD parcialmente purificada de açaí, nas concentrações de 0,1 , 1,0 e 10,0 mM. Os resultados são apresentados na tabela 05.

Os inibidores mais efetivos da POD de açaí foram o  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio. Na presença destes inibidores, na concentração final 10,0 mM, a peroxidase foi praticamente inativada.

O EDTA e iodoacetamida, na concentração final 10,0 mM, inibiram fracamente a atividade da POD parcialmente purificada de açaí, sendo obtida atividade residual de 79,7 e 84,0%, respectivamente.

**Tabela 05 – Efeito da adição de inibidores na atividade da POD parcialmente purificada**

Inibidor	Concentração do Inibidor		
	0,1 mM	1,0 mM	10,0 mM
	Atividade Residual da POD (%)		
EDTA	93,5	84,0	79,7
$\beta$ -mercaptoetanol	66,0	22,3	0,0
Ácido ascórbico	9,2	0,1	0,07
Metabissulfito de sódio	74,3	0,08	0,0
Iodoacetamida	95,1	88,8	84,0

Holschuh (2000) estudou a POD de carambola e verificou que os inibidores mais efetivos para essa enzima foram ácido ferrúlico, ácido cafeico e ácido p-cumárico que, em uma concentração de 5,0 mM, provocaram inibição de aproximadamente 92, 76 e 48%, respectivamente.

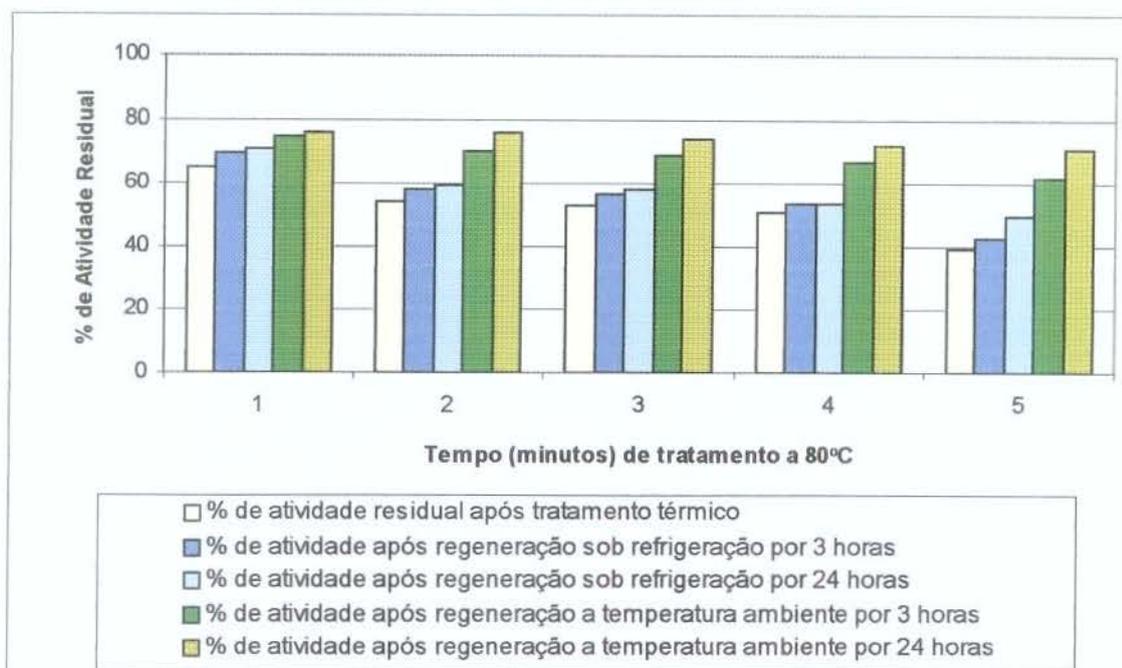
#### 4.5.7. Regeneração da peroxidase parcialmente purificada

A capacidade de regeneração da POD parcialmente purificada de açaí após tratamento térmico a 80 e 90°C, por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos foi avaliada, mantendo-se as soluções enzimáticas às temperaturas ambiente e refrigerada por períodos de 3 e 24 horas.

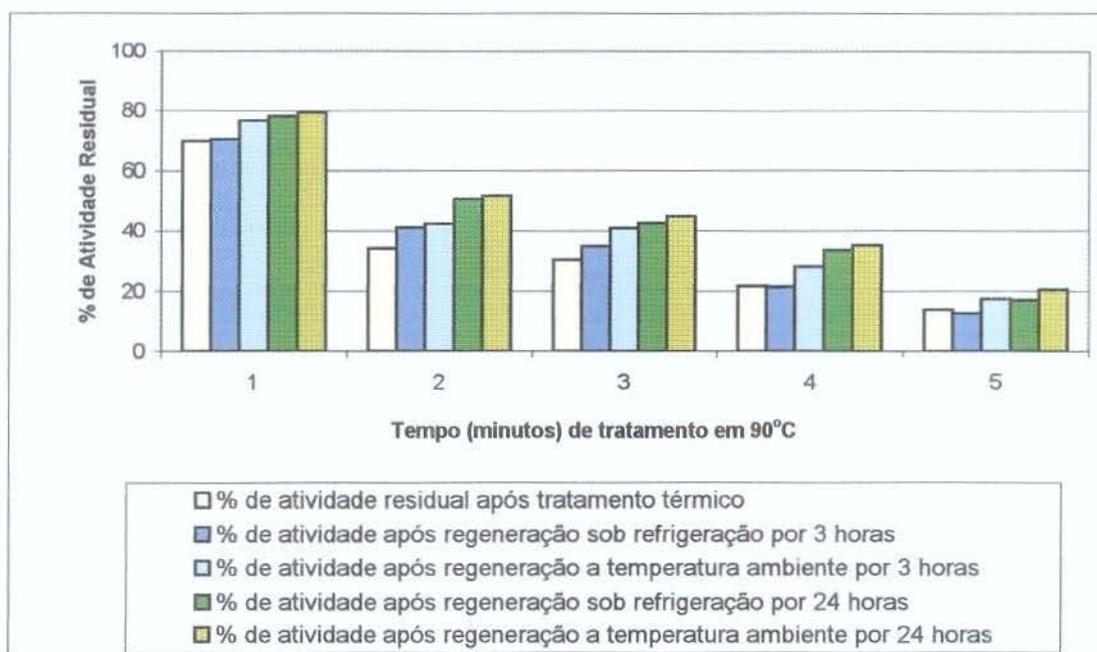
Foram observadas regenerações da atividade de até 30% após tratamento térmico a 80°C e de até 18% a 90°C após 24 horas a temperatura ambiente. De um modo geral, a regeneração após tratamento térmico a 80°C, foi maior que a regeneração a 90°C, para o mesmo tempo de tratamento e condições similares de regeneração (Figuras 21a e 21b).

Lu e Whitaker (1974) estudaram a POD de raiz forte e observaram que a porcentagem da regeneração da atividade dependia da extensão da inativação, entretanto, a quantidade absoluta de ganho de atividade foi independente da extensão da inativação nas condições estudadas pelos autores. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo da regeneração da POD parcialmente purificada de açaí. Por exemplo, as atividades residuais resultantes dos tratamentos da preparação da POD de açaí parcialmente purificada a 80°C por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos foram 64,9 , 54,2 , 53,2 , 50,8 e 39,1%, respectivamente. Após 3 horas a temperatura ambiente, as atividades residuais foram 78,1 , 70,2 , 69,0 , 66,8 e 57,8%, respectivamente, enquanto os ganhos de atividade foram de 13,2 , 16,0 , 15,8 , 16,0 e 18,7% (Figura 21a).

Moulding et al. (1987) estudaram a POD de maçã e observaram 10% de regeneração da enzima da fração solúvel da casca após 1 hora de incubação a 30°C. Essa regeneração se seguiu a um tratamento térmico no qual a enzima sofreu aproximadamente 60% de inativação. Outras frações da enzima, submetidas ao mesmo tratamento, tanto de inativação quanto para regeneração, apresentaram 5 a 6% de regeneração da atividade.



**Figura 21a – Estudo da capacidade de regeneração da POD parcialmente purificada de açai após tratamento térmico a 80°C.**



**Figura 21b – Estudo da capacidade de regeneração da POD parcialmente purificada de açai após tratamento térmico a 90°C.**

## **5. CONCLUSÕES**

O extrato enzimático bruto de açaí, obtido pela centrifugação da polpa de açaí, apresentou baixa atividade de PFO, 3.200 U/100g de polpa e alta atividade de POD, 153.800 U/100g de polpa.

A PFO do extrato bruto de açaí apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40 – 45°C.

A PFO bruta de açaí mostrou-se mais estável em pH alcalino ( 8,0 a 10,0 ) do que em pH ácido ( 3,0 a 5,0 ) após 24 horas de incubação a 5°C.

A PFO bruta mostrou-se termossensível perdendo 70% de sua atividade inicial após 10 minutos de tratamento a 40°C, sendo que após 10 minutos de tratamento a 70°C foi obtido 5% de atividade residual.

A PFO bruta de açaí foi completamente inativada após 2 minutos de tratamento térmico em ebulição (97°C).

A POD do extrato bruto de açaí apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a 45°C.

A POD do extrato bruto de açaí mostrou alta estabilidade térmica retendo 50% da sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento a 70°C.

A POD do extrato bruto de açaí mostrou estabilidade em ampla faixa de pH, retendo mais de 60% da sua atividade na faixa de pH 3,0 a 10,0 após 24 horas de incubação a 5 °C.

A POD de açaí foi purificada cerca de 7,9 vezes após fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

A POD parcialmente purificada de açaí (fração III) apresentou atividade ótima em pH 4,0 a 5,0 e a 35°C.

A POD parcialmente purificada de açaí mostrou-se termoestável retendo 56% de sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento a 70°C.

A preparação de POD parcialmente purificada apresentou estabilidade em ampla faixa de pH.

Verificou-se a presença de diferentes picos de maior estabilidade da enzima ao pH indicando que a preparação de POD parcialmente purificada contém mais de uma isoenzima.

A POD parcialmente purificada de açaí foi inativada após 3 minutos de tratamento térmico em ebulição (97°C).

A POD parcialmente purificada de açaí mostrou maior afinidade em relação ao substrato guaiacol do que em relação à p-fenilenodiamina. Os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  da peroxidase para o substrato p-fenilenodiamina

foram respectivamente 3,9 mM e 52,9 U/min/mL enquanto que para o substrato guaiacol foram 2,4 mM e 25,5 U/min/mL, respectivamente. A eficiência da enzima ( $V_{MAX}/K_M$ ) foi 10,6U/mL.mM e 13,5 U/mL.mM para o guaiacol e p-fenilenodiamina, respectivamente.

Os compostos metabissulfito de sódio e ácido ascórbico, na concentração final 1,0 mM, inibiram 99,9% a POD parcialmente purificada de açaí.

Os compostos  $\beta$ -mercaptoetanol e KCN respectivamente na concentração final 10,0mM e 1,0mM inibiram completamente a atividade da POD parcialmente purificada de açaí.

Os sais KCl, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl , CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , na concentração final 10,0mM, inibiram a POD parcialmente purificada de açaí, sendo obtido atividade residual de 75,7%, 71,9% , 68,2%, 49,5%, 37,1% e 23,2% , respectivamente.

## **6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO**

Purificação e caracterização bioquímica das polifenoloxidasas e das peroxidases da polpa do açaí. Estudo da termoestabilidade e inativação térmica das isoenzimas.

Efeito de aditivos e do tratamento térmico na inativação da polifenoloxidase e peroxidase e manutenção da coloração característica da polpa de açaí.

Estudar as aplicações da enzima peroxidase de frutos de açaí.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AESCHBACH, S. A., AMADÒ, R. e NEUKOM, H., Formation of Dityrosine Cross-Links in Proteins by Oxidation of Tyrosine Residues. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.439, n.2, p.292-301, 1976
2. ANESE, M., NICOLI, M. C., DALL'AGLIO, G. e LERICI, C. R., Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities. **Journal of Food Biochemistry**, v.18, p. 285–293, 1995
3. ANGUITA, G., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., HAZA, A. I., GONZÁLES, I., SANZ, B. e HERNÁNDEZ, P. E., A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine  $\beta$ -Casein. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.1, p. 64-66, 1997
4. ARSLAN, O., TEMUR, A. e TOZLU, I., Polyphenol Oxidase from *Allium* sp.. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.45, p.2861-2863, 1997
5. ARSLAN, O., TEMUR, A. e TOZLU, I., Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus ameniaca* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 46, p.1239-1241, 1998
6. ASHIE, I. N. A., SIMPSON, B. K. e SMITH, J. P., Mechanisms for Controlling Enzymatic Reactions in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.1e2, p.1–30, 1996

7. BEAUDREAU, C. e YASUNOBU, K. T., Heme Proteins. VI Crystalline Pineapple Peroxidase B. **Biochemistry**, v.5, n.4, p.1405-1412, 1966
8. BERNHARDT, L. W., LIMA, D. C., YANG, J. F. e SOARES, G. J. D., Melhoria das Técnicas de Processamento do Palmito Enlatado, **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v.9, p.43-62, 1978
9. BURNETTE, F. S., Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: a Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, p.1-6, 1977
10. CANO, M. P., LOBO, M. G. e DE ANCOS, B., Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Long-Term Frozen Stored Papaya Slices. Differences among Hermaphrodite and Female Papaya Fruits. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, p.135-141, 1998
11. CHAZARRA, S., CABANES, J., ESCRIBANO, J. e GARCÍA-CARMONA, F., Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v. 44, p. 984-988, 1996
12. CHEN, C. H. e CHANG, T. C., An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.8, p.873-878, 1995

13. CHU, F. S. e FAN, T. S. L., Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Saxitoxin in Shellfish. **Journal of the AOAC**, Washington DC, v.68, n.1, p.13-16, 1985
14. CIVELLO, P. M., MARTÍNEZ, G. A., CHAVES, A. R. e AÑÓN, M. C., Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.43, p.2596–2601, 1995
15. CLEMENTE, E. e ROBINSON, D. S., The Thermoestability of Purified Oranges Isoperoxidasas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, n.4, p.1109–1118, dez., 1995
16. CLEMENTE, E., Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v.16, n.1, p.1-5, jan-maio, 1996
17. CLEMENTE, E., e PASTORE, G. M., Peroxidase and Polyphenoloxidase. The Importance for Food Technology. **Boletim SBCTA**, v.32, n.2, p.167 – 171, set/dez, 1998
18. DAS, J. R., BHAT, S. G. e GOWDA, L. R., Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Kew Cultivar of Indian Pineapple Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.45, p.2031-2035, 1997

- 19.ESCRIBANO, J., CABANES, J., CHAZARRA, S. e GARCÍA-CARMONA, F., Characterization of Monophenolase Activity of Table Beet Polyphenol Oxidase. Determination of Kinetic Parameters on the Tyramine/Dopamine Pair. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.45, p.4209-4214, 1997
- 20.FLURKEY, W. H. e JEN, J. J., Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Developing Peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p.1826-1828, 1978
- 21.FUJITA, S., SAARI, N., MAEGAWA, M., TETSUDA, T., HAYASHI, N. e TONO, T., Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p.1138-1142, 1995
- 22.HARTREE, E. F., Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972
- 23.HO, S. Y., MITTAL, G. S. e CROSS, J. D., Effects of High Field Electric Pulses on the Activity of Selected Enzymes. **Journal of Food Engineering**, v.31, p.69-84, 1997
- 24.HOLSCHUH, H. J., **Isolamento, Purificação e Caracterização Bioquímica da Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola*, L.)**. Campinas, 2000. 159p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- 25.KADER, F., ROVEL, B., GIARDIN, M. e METCHE, M., Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Role of Blueberry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.74, p.31-34, 1997
- 26.KHAN, A. A. e ROBINSON, D. S., Purification of an Anionic Peroxidase Isoenzyme from Mango (*Mangifera indica* L. var. *chanusa*). **Food Chemistry**, Oxford, v.46, p.61-64, 1993
- 27.KHAN, A. A. e ROBINSON, D. S., The Thermostability of Purified Mango Isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.47, p.53-59, 1993
- 28.KHAN, A. A. e ROBINSON, D. S., Hydrogen Donor Specificity of Mango Isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.49, p.407-410, 1994
- 29.LAMIKANRA, O. e WATSON, M. A., Cantaloupe Melon Peroxidase: Characterization and Effects of Additives on Activity. **Nahrung-Food**, v.44, n.3, p.168-172, 2000
- 30.LIAO, X., ZHU, X. e HE, P., A Cationic Peroxidase from Leaves of *Vitis Pseudoreticulata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.51, p.143-145, 1999
- 31.LIMA, E. D. P. A. , **Purificação e Caracterização Bioquímica da Polifenoloxidase (PPO) em Fruto da Família Anonácea-Pinha (*Annona squamosa* L.)**. Campinas, 1999. 131p. Tese (Doutor em

Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas

- 32.LIN, Z., CHEN, L. e ZHANG, W., Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L.) SW. Isolation, Purification and Some Properties. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 443–448, 1996
- 33.LÓPEZ-SERRANO, M. e ROS BARCELÓ, A., Purification and Characterization of a Basic Peroxidase Isoenzyme from Strawberry. **Food Chemistry**, Oxford, v.55, n.2, p.133-137, 1996
- 34.LÓPEZ-SERRANO, M. e ROS BARCELÓ, A., Kinetic Properties of (+)-Catechin Oxidation by a Basic Peroxidase Isoenzyme from Strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.676-679, 1997
- 35.LOURENÇO, E. J., LEÃO, J. S. e NEVES, V. A., Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenoloxidase from Palmito (*Euterpe edulis*). **Journal of Science and Food Agriculture**, v.52, n.2, p.249-259, 1990
- 36.LOURENÇO, E. J. e NEVES, V. A., Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v.17, n.1, p.42-48, 1997
- 37.LU, A. T., e WHITAKER, J. R., Some Factors Affecting Rates of Heat Inactivation and Reactivation of Horseradish Peroxidase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, p.1173-1178, 1974

- 38.MARTINEZ, M. V., e WHITAKER, J. R., The Biochemistry and Control of Enzymatic Browning. **Trends in Food Science e Technology**, June, v.6, p.195-200, 1995
- 39.MAYER, A. M. e HAREL, E., Polyphenol Oxidase in Plants. Review. **Phytochemistry**, Oxford, v.18, p.193-218, 1979
- 40.MAYER, A. M. e HAREL, E., **Food Enzymology**, (Fox, P.F., ed.), p.373-399, Elsevier, 1991
- 41.McCORD, J. D. e KILARA, A., Control of Enzymatic Browning in Processed Mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, n.5, p.1479-1483, 1983
- 42.McLELLAN, K. M. e ROBINSON, D. S., Heat Stability of Peroxidases from Orange. **Food Chemistry**, Oxford, v.13, p.139–147, 1984
- 43.MELLO, E. T. e CLEMENTE, E., Thermostability of Crude Extract of Peroxidase from Pineapple. **Revista UNIMAR**, Maringá/PR, v.18, n.4, p.757-763, 1996
- 44.MOULDING, P. H., GRANT, H. F., McLELLAN, K. M. e ROBINSON, D. S., Heat Stability of Soluble and Ionically Bound Peroxidases Extracted from Apples. **International Journal of Food Science and Technology**, v.22, p.291-397, 1987
- 45.MOULDING, P. H., GOODFELLOW, J., McLELLAN, K. M. e ROBINSON, D. S., The Occurrence of Isoperoxidases in Conference Pears.

**International Journal of Food Science and Technology**, v.24, p.269-275, 1989

46.MURATA, M., KUROKAMI, C. e HOMMA, S., Purification and some Properties of Chlorogenic Acid Oxidase from Apple (*Malus pumila*). **Bioscience, Biotechnology e Biochemistry**, Tokyo, v.56, n.11, p.1705-1710, 1992

47.MURATA, M., HIRAIDE, A., MURATA, C., HOMMA, S., SAKUTA, M., SHIMIZU, S. e KAKIUCHI, N., Expression and Induction of Polyphenol Oxidase in Apple (*Malus pumila*) Cell Culture. **Bioscience, Biotechnology e Biochemistry**, Tokyo, v.59, n.8, p.1472-1476, 1995

48.OKTAY, M., KÜFREVIDGLU, I., KOCACALISKAN, L. e SAKIROGLU, H., Polyphenoloxidase from Amasya Apple. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.3, p.494-496, 1995

49.OSZMIANSKI, J. e LEE, C. Y., Inhibition of Polyphenol Oxidase Activity and Browning by Honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.38, p.1892-1895, 1990

50.PARK, Y. K., SATO, H. H., ALMEIDA, T. D. e MORETTI, R. H., Polyphenol Oxidase of Mango (*Mangifera indica* var. Haden). **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, p.1619-1621, 1980

51.POMAR, F., BERNAL, M. A., DÍAZ, J. e MERINO, F., Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v.46, n.8, p.1313-1317, 1997

52. POULET, D., **Açaí, Estudo da Cadeia Produtiva: Fruto e Palmito**,  
Publicação do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do  
Estado do Amapá, Macapá: IEPA, 1998, 28 p.
53. RICHARDSON, T. e HYSLOP, D. B., Enzymes. In: FENNEMA, O. R.,  
**Food Chemistry**, 2ed., 1985, New York, Marcel Dekker, INC.
54. ROBERT, C. M., CADET, F. R., ROUCH, C. C., PABION, M. e  
RICHARD-FORGET, F., Kinetic Study of the Irreversible Thermal  
Deactivation of Palmito (*Acanthophoenix rubra*) Polyphenol Oxidase and  
Effect of pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43,  
p.1143-1150, 1995
55. RODRIGO, C, ALVARRUIZ, A., MARTÍNEZ, A., FRÍGOLA, A. e  
RODRIGO, M., High-Temperature Short-Time Inactivation of Peroxidase  
by Direct Heating with a Five-Channel Computer-Controlled  
Thermoresistometer. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.8,  
p.967-972, 1997
56. RODRIGO, C, RODRIGO, M., ALVARRUIZ, A. e FRÍGOLA, A.,  
Inactivation and Regeneration of Horseradish Peroxidase Heated at High  
Temperatures. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.8, p.961-966,  
1997
57. SÁNCHEZ-FERRER, A., RODRÍGUEZ-LOPEZ, J. N., GARCÍA-  
CÁNOVAS, F. e GARCÍA-CARMONA, F., Tyrosinase: a Comprehensive

- Review of Its Mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1247, p.1-11, 1995
- 58.SENESI, J. e PASTINE, R., Pre-Trattamenti di Frutta Fresca in Pezzi Pronta per il Consumo (IV gamma). **Industrie Alimentari**, Itália, v.XXXV, novembre, p.1161-1166, 1996
- 59.SIDDIQ, M., ARNOLD, J. F., SINHA, N. K. e CASH, J. N., Effect of Polyphenol Oxidase and Its Inhibitors on Anthocyanin Changes in Plum Juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.18, p.75-84, 1994
- 60.SILVA, S. **Frutas no Brasil**, 1996, São Paulo, Empresa das Artes. 230 p.
- 61.SODA, I., HASEGAWA, T., SUZUKI, T. e OGURA, N., Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.6, p.1677-1678, 1991
- 62.SRINIVAS, N. D., RASHMI, K. R. e RAGHAVARAO, K. S. M. S., Extraction and Purification of a Plant Peroxidase by Aqueous Two-Phase Extraction Coupled with Gel Filtration. **Process Biochemistry**, v.35, p.43-48, 1999
- 63.SWAIN, T., MAPSON, L. W. e ROBB, D. A., Activation of *Vicia faba* (L) Tyrosinase as Effected by Denaturing Agents. **Phytochemistry**, Oxford, v.5, p.469-482, 1966

64. VALERO, E., VARÓN, R. e GARCÍA-CARMONA, F., Characterization of Polyphenol Oxidase from Airen Grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.5, p.1482-1485, 1988
65. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L., Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.15, p.49-127, 1981;
66. ZHOU, H. e FENG, X., Polyphenol Oxidase from Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*). **Journal of Science and Food Agriculture**, v.57, p.307-313, 1991
67. ZIOTI, A., EL MODAFAR, C. e BOUSTANI, E., Rôle des Composés Phénoliques du Palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans la Défense contre le Bayoud (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*). **Polyphenol Communications 98, XIX<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols**, Lille (France), v.1-4, September, p.457-458, 1998