

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DA PEROXIDASE DO ABACAXI

João Carlos Dias Ferreira

Orientador:

Dr. Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção
do Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas

- 1983 -

À Magda e
Fábio.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial, o autor agradece:

Ao Dr. YONG KUN PARK, Orientador do presente traba
lho.

Ao saudoso Dr. ANDRÉ TOSELLO, Criador da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao Dr. CESAR FRANCISCO CIACCO, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

À Universidade Federal da Paraíba, que permitiu ao mesmo a realização do Curso de Pós-Graduação, do qual esta tese representa o fim.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ní
vel Superior, do Ministério da Educação e Cultura, fi
nanciadora da bolsa de estudos.

À colega CÉLIA TAEKO ZENIN pela colaboração durante a fase experimental deste trabalho.

À Professora HÉLIA HARUMI SATO pelo trabalho de revi
são.

Aos demais amigos e colegas pela colaboração e estímu
lo recebidos durante a realização desta tarefa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	v
SUMÁRIO	vi
SUMMARY	viii
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - A Peroxidase como Enzima	01
1.2 - Características de Interesse Tecnológico da Peroxidase	03
1.3 - A Peroxidase e o Abacaxi.....	04
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 - Equipamentos, Reagentes e Vidraria.....	37
3.1.1 - Equipamentos.....	37
3.1.2 - Reagentes Químicos	37
3.1.3 - Vidraria	37
3.2 - Abacaxi	38
3.3 - Determinação de Proteína	38
3.4 - Determinação da Atividade de Peroxidase	38
3.5 - Extração da Peroxidase do Abacaxi	39
3.6 - Purificação da Peroxidase	40
3.6.1 - Fracionamento com Sulfato de Amônio.	40
3.6.2 - Cromatografia da peroxidase em colu na de DEAE - celulose	40

3.6.3 - Cromatografia da peroxidase em colu <u>n</u> na de CM - celulose	41
3.7 - Estudo de Algumas Características da Peroxi <u>d</u> dase Purificada do Abacaxi	43
3.7.1 - Determinação do pH Ótimo	43
3.7.2 - Determinação da energia de inativa <u>ç</u> ção	43
4 - RESULTADOS	46
4.1 - Extração da Peroxidase Bruta	46
4.2 - Purificação da Peroxidase	46
4.2.1 - Fracionamento da peroxidase com sul <u>f</u> fato de amonio	46
4.2.2 - Cromatografia da peroxidase em colu <u>n</u> na de DEAE-celulose	47
4.2.3 - Cromatografia da peroxidase em colu <u>n</u> na de CM-celulose	47
4.3 - Determinação do pH Ótimo	48
4.4 - Determinação da Energia de Inativação	48
5 - DISCUSSÃO	49
5.1 - Extração e Purificação da Peroxidase	49
5.2 - pH Ótimo	50
5.3 - Energia de Inativação	51
6 - CONCLUSÕES	52
7 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Cromatografia da peroxidase semi-purificada em coluna de DEAE - celulose	72
2	Cromatografia da fração I em coluna de CM - celulose	73
3	Cromatografia da fração II em coluna de CM - celulose	74
4	Cromatografia da fração III em coluna de CM - celulose	75
5	Cromatografia da fração IV em coluna de CM - celulose	76
6	Cromatografia da fração não adsorvida em DEAE - celulose, em coluna de CM - celulose	77
7	Determinação do pH ótimo da peroxidase obtida pelo fracionamento com sulfato de amônio	78
8	Determinação do pH ótimo das várias frações da peroxidase após purificação em coluna de DEAE-celulose e CM - celulose	79
9	Termoestabilidade da peroxidase do abacaxi a 75°C	80
10	Termoestabilidade da peroxidase do abacaxi a 80°C	81
11	Termoestabilidade da peroxidase do abacaxi a 85°C	82

12	Termoestabilidade da peroxidase do abacaxi a 90°C	83
13	Gráfico de Arrhenius para a inativação das <u>v</u> rias frações da peroxidase do abacaxi	84

ÍNDICE DE TABELAS

TABELAS		Página
I	Determinações realizadas no suco filtrado ..	85
II	Determinações realizadas no fracionado com o sulfato de amônio	85
III	Determinações realizadas nas iso-enzimas purificadas por DEAE-celulose	86
IV	Determinações realizadas nas iso-enzimas purificadas por CM-celulose	87
V	Determinação do pH ótimo da peroxidase fracionada com sulfato de amônio e das várias frações purificadas	88
VI	Determinação das energias de inativação	89

SUMÁRIO

De uma amostra de quatro abacaxis (Ananas comosus (L.) merrill) cv Pérola, foram extraídos, por homogenização da polpa, sem adição de água, 2 800 ml de suco. Ao mesmo foi adicionado $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a uma concentração de 40% de saturação. Após um período de 16 horas de repouso a 4°C a amostra foi centrifugada e o precipitado descartado. Ao sobrenadante foi adicionado $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ até 80% de saturação. Após 21 horas de repouso a 4°C o precipitado foi separado por centrifugação e em seguida dialisado contra H_2O durante 48 horas a 4°C e contra tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 durante outras 48 horas a 4°C.

Após fracionamento com sulfato de amônio a peroxidase foi purificada em colunas de Dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose) e carboximetil celulose (CM-celulose) sucessivamente. Na cromatografia em DEAE-celulose foram obtidas 5 frações distintas, eluídas com gradiente de NaCl. Em seguida cada uma das cinco frações foi submetida a cromatografia em coluna de CM-celulose. Na cromatografia da primeira fração obtida da coluna de DEAE-celulose (em coluna de CM-celulose) foram obtidas duas frações denominadas fração V e fração VI. Na cromatografia em coluna de CM-celulose de cada uma das outras quatro frações obtidas na cromatografia em coluna de DEAE-celulose, foi obtida uma só fração em cada caso, sendo denominadas frações I, II, III e IV. As 6 frações contendo atividade de peroxidase foram dialisadas e liofilizadas para os estudos posteriores.

Para a determinação do pH ótimo de atividade das várias isoenzimas da peroxidase do abacaxi foram utilizados os tampões acetato e fosfato. As frações I, II e III apresentaram um pH ótimo de 5,2; a fração IV apresentou um ótimo de atividade a pH 5,4 e as frações V e VI apresentaram pH ótimo

de 5,0.

O estudo da estabilidade térmica foi conduzido subme-
tendo-se as diversas frações a tratamentos a 75°, 80°, 85° e
90°C por tempos de 30", 1', 2' e 3'; sendo logo a seguir de-
terminadas as atividades residuais. Utilizando-se a equação
de Arrhenius determinaram-se as energias de inativação que
foram da ordem de 23 a 37 kcal/mol para as várias frações.

SUMMARY

From a sample of four pineapples (Ananas comosus (L.) merrill) Perola breed, 2 800 ml of juice were extracted, by homogenization of the pulp, without water addition. Ammonium sulfate at a concentration of 40% of saturation was added to the juice. After a period of resting, the sample was centrifugated and the precipitate was discarded. Enough $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ was added to the supernatant in order to reach a concentration of 80% of saturation. A new resting period was followed by centrifugation. The resulting supernatant was discarded, and the precipitate was dialised.

The purification of the peroxidase started afterwards, with the use of the Ionic chromatography technique. First of all the dialised was applied to a previously prepared Diethyl-aminoethylcellulose (DEAE-celulose) column and eluted from it with the use of increasing concentrations of NaCl. Five distinct fractions were obtained in this phase. Only the first fraction was shown not to link itself to DEAE-celulose and was therefore called "the unlinked fraction". The four other anionic fractions were identified by the numbers I through IV. Each one of the five fractions was dialised and added to a previously prepared carboxymethylcellulose (CM cellulose) column and eluted from it with increasing concentrations of Na Cl. When submitted to CM-cellulose chromatography the unlinked fraction generated two other fractions, (V and VI) one of them classiflicated as no-ionic because it didn't linked itself to the CM-cellulose too, and the last one classiflicated as cationic because it linked itself to CM-cellulose. Fractions I through IV, when submitted to an identical process generated each one a single final fraction. The anionic character of fractions I through IV was shown by the fact that none of their final fractions linked

itself to CM-cellulose. The six fractions were dialysed and lyophilised for storage in order to allow later experiments.

The optimum pH determination for each one of the several isoenzymes of pineapple peroxidase were made using sodium acetate buffer solutions for the acidic pH and phosphate buffer solutions for the basic pH. The following values were obtained: 5,2 for three of the anionic isoenzymes; 5,4 for the other and 5,0 for the two other ones.

The study of the thermal stability of the peroxidase was conducted submitting the several fractions to treatments at 75°, 80°, 85° and 90°C for periods of 30", 1', 2' and 3'; followed by immediate determination of the remaining peroxidase activities. With the utilization of the Arrhenius equation, the inactivation energies were determined and were shown to range from 23 to 37 kcal/mol for the several fractions.

1 - INTRODUÇÃO

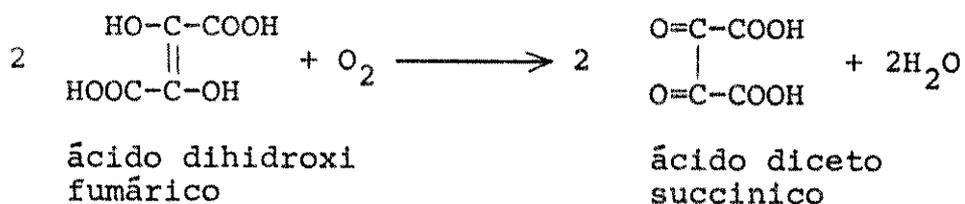
1.1 - A Peroxidase como Enzima

A Peroxidase (E.C. 1. 11. 1. 7 Doador: H₂O₂ oxidoredu_tase), uma enzima que pertence a um grupo de catalisadores de reações bioquímicas denominados oxidoredu_tases, está presente na maioria dos tecidos vegetais, tecidos animais e microorganismos. Seu mecanismo geral de reações é o seguinte:



Esta é considerada a verdadeira reação peroxidativa e é geralmente a única reação de importância. Entretanto as peroxidases podem catalisar três outros tipos de reações:

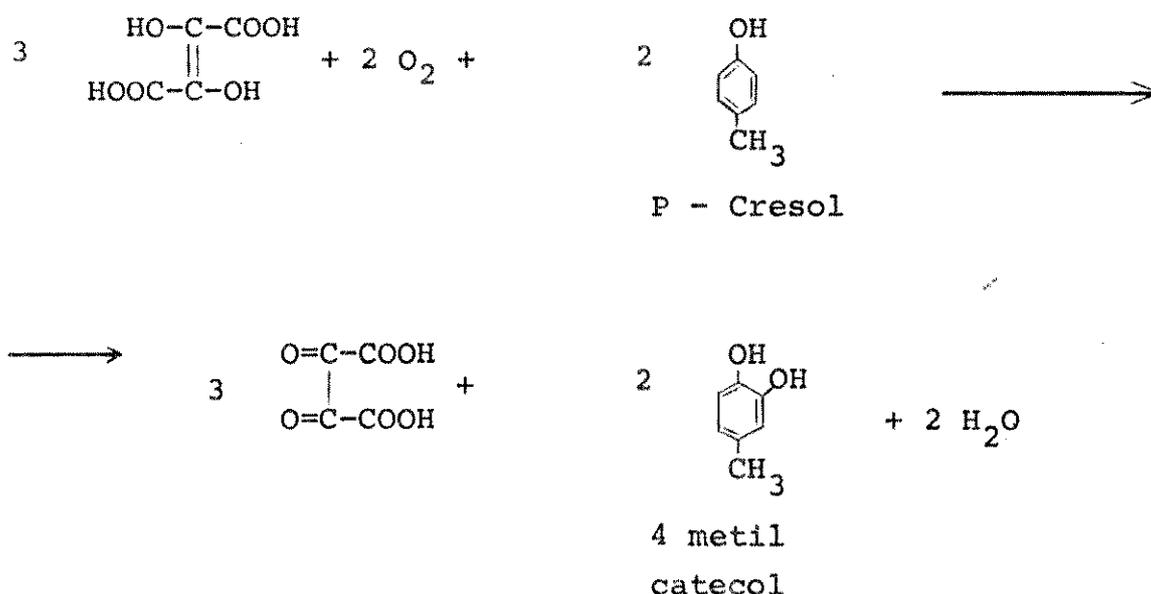
Oxidativas, por exemplo



Catalitica:



Hidroxilativas, por exemplo:



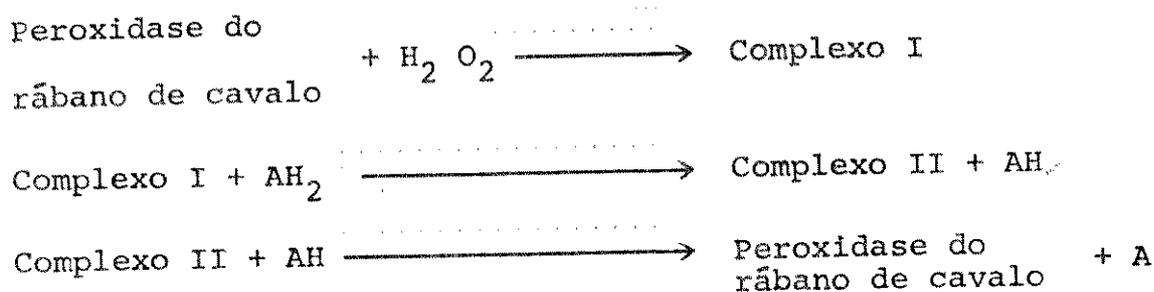
As reações peroxidativas ocorrem, tendo como substrato, substâncias do tipo do p-cresol, guaiacol, resorcinol, etc.

As reações oxidativas ocorrem com substâncias tais como ácido dihidrofumárico, ácido ascórbico, hidroquinonas, etc, como substratos, na presença de oxigênio.

A peroxidase pode também hidroxilar tirosina, fenilamina, p-cresol, ácido benzóico e ácido salicílico, entre outros, na presença de certos doadores de hidrogênio (por exemplo ácido dihidrofumárico) e oxigênio molecular.

Para a ação peroxidativa, o ROOH da equação (1) pode ser HOOH ou algum outro peróxido orgânico. Para algumas peroxidases o número de compostos que podem servir como receptores de hidrogênio é muito pequeno. Por exemplo, a peroxidase do rãbano de cavalo, a mais estudada das peroxidases, somente utiliza peróxido de hidrogênio, peróxido de metil hidrogênio e peróxido de etil hidrogênio como receptores de hidrogênio. Os doadores de hidrogênio podem ser fenóis, aminas, ou outros compostos orgânicos. O mecanismo de reação para a peroxidase do rãbano de cavalo parece estar baseado na forma

ção de complexos enzima-doador de hidrogênio e nas duas etapas de oxidação univalentes, como mostrado no esquema abaixo, onde AH₂ aparece como doador de hidrogênio e A como doador oxidado.



Existem três classes de peroxidases:

A - Peroxidases ferriprotoporfirinicas, que incluem as peroxidases das plantas superiores, dos animais e dos microrganismos. Essas peroxidases possuem ferriprotoporfirina III como grupo prostético.

B - Lactoperoxidase do leite, cujo grupo prostético tem um núcleo ferroporfirínico que não é a ferriprotoporfirina III.

C - Peroxidases flavoproteínicas, que foram purificadas de alguns estreptococos e de alguns tecidos animais. O grupo prostético dessas peroxidases é o dinucleotídeo de flavina adenina (FAD).

1.2 - Características de Interesse Tecnológico da Peroxidase

A peroxidase é uma enzima muito importante em termos de processamento de alimentos pois por ser bastante termo-resistente é largamente utilizada como um indicador da eficiência do branqueamento ou outro tratamento térmico aplicado a um produto que se encontre em processamento (JOSLYN, 61,62; ZOEIL e ESSELEN, 150; SCOTT, 117).

Por outro lado existe uma relação comprovada entre a atividade residual da peroxidase e o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis. Isto foi estabelecido para ervilhas por WAGENKNECHT e LEE (144) e por PINSENT (105); para feijões verdes e nabos por ZOUÉIL e ESSELEN (150) e para o milho por LEE e HAMMES (78).

A capacidade de regeneração da atividade é outra característica notável desta enzima o que faz com que frequentemente os tratamentos térmicos precisem ser aplicados de maneira mais severa que a normal, para prevenir a regeneração (JOSLYN; 61,62; ESSELEN e ANDERSON, 32; SCOTT, 117).

1.3 - A Peroxidase e o Abacaxi

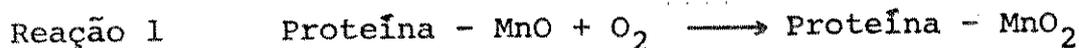
O Brasil é atualmente o 6º produtor mundial de abacaxi, mas suas exportações são extremamente limitadas, tanto quantitativamente, quanto geograficamente. Limitam-se quase que exclusivamente ao mercado argentino, estendendo-se também, em pequenas quantidades, ao Paraguai e Uruguai. Tendo-se por base a produção nacional, somente 2,2% são exportados "in natura" e apenas 0,1% destina-se ao mercado externo sob a forma de produtos industrializados (25).

Tendo-se em conta que: o aumento das exportações de produtos agrícolas é extremamente desejável para o país, e que, o aumento das exportações de produtos do abacaxi depende, em parte, de uma melhor qualidade desses produtos, julgamos oportuno realizar um estudo das características da Peroxidase do Abacaxi, por ser essa enzima uma das que podem interferir na qualidade dos produtos industriais desse fruto, seja ocasionando o desenvolvimento de sabores e odores que fazem baixar o valor do produto, seja servindo como um importante parâmetro a ser usado durante o seu processamento.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

A mais antiga citação conhecida sobre a peroxidase foi feita por SCHOENBEIN (116) em 1855, o qual observou que extratos de cogumelos e de tecidos animais, na presença de ar, desenvolviam uma cor azul em soluções de guaiacol, do mesmo modo como fazia a água clorada, o ácido nítrico, o permanganato, o hipoclorito e o superóxido de chumbo. Os extratos podiam utilizar também peróxido de hidrogênio ou os peróxidos da tintura de guaiacol para esta oxidação. SCHOENBEIN concluiu que os extratos eram capazes de ativar oxigênio atmosférico e unir-se a êle por algum tempo.

LINOSSIER (80) em 1898 preparou peroxidases livres de oxidases a partir de leucócitos e considerou as peroxidases como uma entidade separada, capaz de reagir somente com peróxidos. Ao mesmo tempo, BERTRAND (15) em 1897 introduziu a teoria que as oxidases eram complexos proteína-manganês, os quais ativariam o oxigênio através da reação 1. Um "radical proteico" reduziria um dos átomos de oxigênio do O₂.



CHODAT e BACH (24) em 1903 rejeitaram a idéia de BERTRAND (15) pois algumas das suas preparações eram incapazes de utilizar o O₂ apesar da presença de manganês e um mecanismo similar à oxidação acoplada atual foi proposto: as oxigenases ativariam o O₂ para formação de peróxido e as peroxidases utilizariam este peróxido.

LOEW (82) em 1901 agrupou as catalases ao conjunto dos "princípios" ativadores de oxigênio.

Em 1925 THURLOW (137) demonstrou a oxidação acoplada no sistema O₂-xantina oxidase-xantina/peroxidase.

CRUESS e FONG (26) em 1929 estudaram o efeito do pH e da concentração de peróxido de hidrogênio na atividade da peroxidase do damasco e demonstraram que os valores de pH ótimo, mínimo e máximo para vários indicadores da atividade da enzima variavam, mas que, em geral o pH ótimo para a maioria dos indicadores estava próximo da neutralidade. Concluíram também que a concentração de peróxido afeta grandemente a intensidade da reação e que, a faixa ótima para a concentração do H_2O_2 no suco de damasco é de 5 a 25 mg em cada 100 ml.

A natureza química das peroxidases permaneceu obscura até o início dos anos trinta, quando KUHN et alii (75) encontraram proporcionalidade entre a atividade da enzima e a absorção de luz.

JOSLYN e MARSH (60) em 1933, num estudo preliminar declararam acreditar que, como a peroxidase estava presente em tecidos vegetais que retiveram seu odor durante o armazenamento sob congelamento, essa enzima não deveria estar envolvida na deterioração. Ainda no mesmo ano, BALLS e HALE (9) descreveram um método para estimar a atividade da peroxidase, baseado na quantidade de peróxido de hidrogênio decomposto pela enzima; quantidade esta determinada por titulação iodométrica do peróxido residual. Baseando-se nesse método, em 1934, os mesmos autores estudaram a especificidade da peroxidase, suas reações de inibição, o pH ótimo para a oxidação de vários substratos e em que extensão eles sofriam oxidação.

Preparações de peroxidase com uma pureza em torno de 50% foram obtidas por SUMNER e HOWELL (128) em 1936, a partir da seiva do figo, e, por KEILIN e MANN (67) em 1937 a partir do rábano de cavalo. A riqueza dessa última fonte foi originalmente descoberta por BACH e CHODAT (8) em 1903. KEILIN e MANN (67) também descreveram o espectro de vários derivados da peroxidase do rábano de cavalo e observaram dois dos complexos peroxidase-peróxido.

BALLS e HALE (11), em 1935, estudaram o escurecimento dos tecidos de maçã recentemente cortada, causado pela peroxidase.

xidase. Foi constatado que o escurecimento ocorria mesmo na ausência de ar, enquanto houvesse peróxido de hidrogênio formado por enzimas respiratórias que usam oxigênio molecular, e continuaria com uma posterior adição de peróxido ou reexposição ao ar. Foram pesquisados também os inibidores, que pertencem a duas classes: substâncias que afetam diretamente a enzima e substâncias que aceleram sua inativação por peróxido. O primeiro tipo foi julgado o mais importante para a inibição do escurecimento e, é a esse grupo que pertencem os compostos sulfidrílicos.

Em 1939, THEORELL e SWEDIN (132) descreveram a função de oxidase do sistema Mn-peroxidase do rãbano de cavalo - ácido dihidrofumárico.

Em 1940, ALTSCHUL et alii (4), estudaram o mecanismo da oxidação do citocromo C reduzido e demonstraram que a mesma era realizada por uma enzima específica, a peroxidase do citocromo C. No mesmo trabalho, os autores descreveram as propriedades, a constituição e o método de isolamento e purificação da referida enzima.

Em 1942, ABRAMS et alii (1) demonstraram a existência de um complexo formado entre a peroxidase do citocromo C e o peróxido de hidrogênio, e, seu espectro, mostrou consistir-se de três bandas a 4.200, 5.300 e 5.600 Å. A constante de dissociação do complexo enzima-substrato foi de 1×10^{-6} moles/litro.

THEORELL (133), em 1942 cristalizou a peroxidase do rãbano de cavalo e DAVIS (27) no mesmo ano descreveu a distribuição da peroxidase nos diferentes tecidos da laranja, toronja, limão e tangerina. Foi assinalada uma grande atividade da enzima nas sementes dessas frutas, especialmente tangerinas.

SUMNER e GJESSING (129), em 1943, apresentaram um método para a determinação da atividade da peroxidase que consistia numa modificação do método de WILLSTATER e STOLL (147). Segundo o método, o purpurogalin formado pela peroxidase e o peróxido a partir do pirogalol, na presença de tampão, era

extraído com éter e a solução etérea filtrada e lida num fotômetro, sendo a leitura usada para obter mg de purpurogalin a partir de uma curva padrão. As mg de purpurogalin divididas por 1000 forneciam as unidades de peroxidase.

Em 1944, SCHWIMMER (115) estudou a regeneração da peroxidase inativada pelo calor em sucos de vegetais e concluiu que a regeneração era uma função do tempo e da temperatura empregados no tratamento térmico dos sucos.

Um método manométrico para a determinação da atividade da peroxidase foi descrito em 1947 por ALTSCHUL e KARON (5). Esse método consistia basicamente na titulação do peróxido de hidrogênio que não reagisse com uma solução muito ativa de catalase. A peroxidase, o tampão, o peróxido e o pirrogalol eram postos a reagir num frasco adequado à temperatura constante, durante 5 minutos, após os quais a catalase era adicionada e a quantidade de oxigênio liberada era medida. Nesse mesmo ano JIMENEZ (58) detectou a presença de peroxidase em goiabas. Ainda em 1947 THEORELL (134) publicou uma revisão sobre os grupos heme-ligados e sobre o modo de ação de algumas hemoproteínas, entre elas as peroxidases, destacando a composição da peroxidase do rãbano de cavalo, investigações espectrofotométricas, medições magnetométricas, a natureza dos grupos heme ligados à peroxidase e os modos de ação da enzima.

JOSLYN (61, 62), em 1949 publicou uma grande série de dados e uma revisão sobre os métodos de determinação da atividade da peroxidase em vegetais, seus substratos e seu uso como indicador da eficiência do branqueamento, bem como dados sobre a atividade e efeitos da peroxidase em vegetais armazenados por longos períodos de tempo (até 7 anos). No mesmo ano, ROSOFF e CRUESS (112), estudaram as oxidases da couve-flor e, sobre a peroxidase concluíram que sua temperatura ótima era de 30 a 34°C, a enzima era inativada após 5 minutos de tratamento a 90°C, seu pH ótimo estava entre 5,2 e 5,6 com um pico provável em 5,3 e que a peroxidase inativada pelo calor a 80°C reaparecia durante o armazenamento a ze

ro e a -18°C , sendo a quantidade de regeneração influenciada pela severidade do tratamento térmico, tendo ocorrido em alguns casos 30% de reativação.

JOSLYN (63) em 1950, utilizou ervilhas verdes, aspargos verdes e espinafre em experiências sobre a atividade da peroxidase em vegetais submetidos a tratamento térmico, congelamento e armazenamento, usando seis métodos de extração diferentes e quatro métodos de análise, mas, em vista das falhas em consistência e diferenças nos resultados obtidos por diferentes analisadores, o autor recomendou que as mesmas experiências deveriam ser feitas em maior número de laboratórios para se obter dados mais confiáveis.

NEBESKY et alii (98) em 1950 estudaram a destruição térmica e a estabilidade da peroxidase em alimentos ácidos, concluindo que a peroxidase determinada usando guaiacol como substrato foi a que mostrou a maior resistência térmica comparada com a mesma enzima medida usando a ortofenildiamina, catecol, benzidina, hidroquinona e pirogalol. Por isso, o guaiacol foi selecionado como o melhor substrato a ser usado na medição da atividade da peroxidase e sua destruição térmica. A adição de açúcar e vinagre nos produtos aumentou e diminuiu respectivamente a estabilidade térmica da enzima, enquanto a adição de pequenas quantidades de NaCl não mostrou efeitos. A estabilidade térmica da peroxidase aumentou com o aumento de sua concentração. A peroxidase de picles de pepino fresco, que não foi inativada no processamento, manteve-se ativa por um ano. Ainda em 1950, REDDI et alii (110) estudaram a atividade de peroxidase no tecido da maçã, determinando-a através de medidas com três diferentes substratos: ortofenilenodiamina, pirogalol e guaiacol. O comportamento da enzima não foi o mesmo com os três substratos estudados. Foram apresentados dados a respeito do efeito da temperatura, peróxido de hidrogênio, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, cloreto de sódio, dextrose, sacarose, tiouréia, alil tiouréia e glutatona na atividade da peroxidase da maçã.

ANDERSON et alii (6), em 1951, estudaram as razões para o desenvolvimento de "odor de passado" em picles intei

ros pasteurizados, nos quais a contagem microbiológica era baixa, indicando um tratamento térmico adequado para seu controle. Os resultados mostraram uma correlação entre a aceitabilidade organoléptica dos picles e valores mínimos da atividade de peroxidase.

KEILIN e HARTREE (68), no mesmo ano purificaram a peroxidase do rãbano de cavalo e compararam as suas propriedades com as da catalase e metamioglobina. Entre as suas conclusões está a semelhança existente em termos estruturais (as três são compostas de proteína e protohemina), cor, padrão do espectro de absorção e formação reversível de compostos espectroscopicamente reconhecíveis com cianeto, sulfeto, azida, fluoreto, óxido nítrico e peróxidos.

THEORELL (135), também em 1951, publicou uma grande revisão sobre as enzimas que contêm ferro, as catalases e peroxidases. Este trabalho envolveu a ocorrência de hidroperoxidases (nome atribuído pelo autor ao conjunto das duas enzimas), a ação e determinação da atividade, a purificação e cristalização das hidroperoxidases, suas propriedades químicas e físico-químicas e seu papel fisiológico. Ainda em 1951, NEBESKY et alii (99) estudaram a peroxidase em picles e peras. A presença de peroxidase desempenhou uma função na queda de qualidade da cor, sabor e aroma de picles de pepino. Quanto maior a concentração da enzima, maiores foram os efeitos indesejáveis. A atividade de peroxidase em peras frescas foi determinada em vários estágios de maturação e variou consideravelmente, sendo maior para a pera muito verde e madura, decrescendo acentuadamente para a fruta sobremadura e podre. Os pesquisadores concluíram que as condições de processamento térmico usadas na destruição ou inibição dos microrganismos capazes de produzir deterioração numa variedade de produtos de frutas e picles, eram também adequadas para garantir a completa inativação da peroxidase naqueles alimentos, com exceção daqueles que usavam endro como tempero.

JERMYN (56), em 1952, num pré-estudo, usando cromatografia em papel estimou que a peroxidase do rãbano de cavalo seria composta de quatro componentes.

TAUBER (131), no mesmo ano, reafirmou, com suas experiências, a teoria de THEORELL (135), segundo a qual as catalases são um grupo especial de peroxidases. O autor demonstrou que a diferença entre as catalases e as peroxidases consiste no fato de que as primeiras podem atuar como peroxidases, mas que o oposto não ocorre, isto é, as peroxidases não conseguem decompor o peróxido de hidrogênio na ausência de um segundo substrato.

Estudando a composição do sistema enzimático da oxidação do ácido indolacético em ervilhas, GALSTON, et alii (36), em 1953, concluíram através de várias evidências que o sistema da oxidase do ácido indol acético consiste numa enzima flavoproteína ativável pela luz, ligada a uma peroxidase através de peróxido de hidrogênio. GORTNER e KENT (44), também em 1953, mostraram que além da oxidase do ácido indol acético, o tecido do talo da planta do abacaxi tem também um inibidor dessa oxidação.

Em 1954, GUYER e HOLMQUIST (49), provaram que existia alguma regeneração da peroxidase, em ervilhas enlatadas tratadas pelo processo de alta temperatura e tempo curto, e sugeriram que se aumentasse o tempo de processamento térmico a fim de impedir a regeneração da enzima, o que preveniria mudanças indesejáveis no produto. No mesmo ano, JERMYN e THOMAS (57) demonstraram, usando eletroforese em papel de filtro, que o suco do rãbano de cavalo continha cinco componentes com atividade peroxidática. A quantidade desses componentes mostrou grande variedade segundo as estações do ano, todas as frações mostraram algumas diferenças em reatividade em relação aos vários substratos. Também em 1954, KENTEN e MANN (69) apresentaram um método simples para a preparação da peroxidase do rãbano de cavalo. Esse método evitava o uso da eletroforese e reduzia consideravelmente o número de etapas de fracionamento que eram as etapas críticas dos dois métodos então disponíveis. O novo método proposto consistia na remoção do material inativo do extrato bruto por precipitação com uma mistura de clorofórmio e etanol. Após esse tratamento, a peroxidase purificada era obtida por precipitação

ções fracionadas com sulfato de amônio e etanol, de onde a enzima podia ser cristalizada. Nessa mesma época LABBEF e ESSELEN (76), adicionaram novos dados acerca da relação entre a atividade da peroxidase e o desenvolvimento de odores indesejáveis em pickles recentemente embalados. Concluíram que o desenvolvimento de odores é grandemente incrementado durante o armazenamento a 4,4°C, se comparado com a armazenagem a 21,1°C ou 37,8°C. A inativação enzimática nas temperaturas mais altas foi dada como provável responsável por esta situação incomum. Os odores indesejáveis foram evitados por um tratamento térmico que reduziu a atividade da peroxidase a níveis suficientemente baixos. Preparações purificadas de peroxidase de pepino e de rãbano de cavalo causaram o desenvolvimento de odores indistinguíveis daqueles encontrados em embalagens de pickles sub-pasteurizados. Ainda nesse mesmo tempo MAEHLI e CHANCE (87), publicaram uma grande revisão dos métodos de ensaio para a peroxidase, incluindo os métodos qualitativos e quantitativos. Entre estes últimos estava incluído o método que utiliza a benzidina como doador de elétrons, substrato relacionado quimicamente com o usado no presente trabalho, a orto-dianisidina (3,3 dimetoxibenzidina). PAUL e AVI-DOR (101), em 1954, propuseram o ensaio da peroxidase com mesidina como doador de hidrogênio. Por esse método, a concentração de peroxidase de uma solução desconhecida podia ser obtida diretamente em molaridade. O método empregava uma concentração de peróxido relativamente alta, por isso, não podia ser usado como um teste geral para peroxidases em material biológico.

CHANCE e MAEHLI (22), em 1955, publicaram os princípios e métodos dos testes do guaiacol e do pírogolol para a atividade da peroxidase, bem como um método para purificação da peroxidase do rãbano de cavalo, além dos dados sobre propriedades físicas, químicas, espectroscópicas, magnéticas e dados relativos à cinética da enzima. KENTEN (70), também em 1955, investigou a possível atuação do sistema peroxidase-Mn⁺⁺ na oxidação do ácido indol acético pela seiva da raiz do feijão de vagem serosa. Entre suas conclusões estava

a afirmação de que a oxidase do ácido indol acético consistia numa fração termolábil, que parecia ser uma peroxidase e que podia ser repostada pela peroxidase do rãbano de cavalo, e numa fração termoestável, cuja atividade dependia muito da presença de substratos da peroxidase. KENTEN (71) ainda no mesmo ano demonstrou que a oxidação do ácido indol propionico e do ácido indol butirico pelo oxigênio é catalisada por peroxidase do rãbano de cavalo altamente purificada, na presença de Mn^{++} . O mecanismo da reação não foi elucidado, mas o autor sugeriu o envolvimento do peróxido de hidrogênio como um intermediário obrigatório, pois o mecanismo é inibido pela catalase. O autor sugeriu também que a oxidação do ácido indol propionico e do ácido indol butirico por extratos de plantas, anteriormente demonstradas pode ser devida à presença de peroxidase e Mn^{++} nos extratos.

MAEHLY (88), em 1955, apresentou uma revisão sobre a peroxidase em vegetais na qual discutiu a sua distribuição, seu mecanismo de reação e detalhou a preparação da peroxidase do rãbano de cavalo cristalina relatando a sua especificidade, propriedades físicas e composição química, além de dados sobre a espectroscopia, cinética e propriedades magnéticas da enzima. Ainda em 1955 MAEHLY (89) estudou a recombinação de porções equimoleculares de protohemina e apoproteína, para reconstruir a peroxidase do rãbano de cavalo em solução aquosa, usando para isso técnicas espectrofotométricas. Na região entre 360 e 450 nm dois compostos intermediários E e F foram observados. A formação de E é rápida enquanto que as reações $E \rightarrow F$ e $F \rightarrow$ peroxidase são mais lentas e ocorrem a velocidades diferentes entre si. A etapa $E \rightarrow F$ é atribuída ao estabelecimento de uma ou duas ligações do mesmo tipo entre a hemina e a proteína, durante a qual a habilidade de complexar-se com H_2O_2 é restabelecida. A energia de ativação foi estimada em 11900 ± 300 cal/mol. A apoproteína perdia a capacidade de combinar-se com a hemina quando aquecida a baixos pH.

MAIER et alii (90) no mesmo ano, estudaram a inativação reversível de enzimas a baixas temperaturas, dando ênfase

se à dependência em relação à temperatura apresentada pelas reações catalisadas pela peroxidase. A reação estudada exibiu desvios pronunciados da equação de Arrhenius à temperaturas abaixo de zero. A inativação da enzima a baixas temperaturas é atribuída a um incremento nas ligações de hidrogênio intramoleculares. SIEGEL e GALSTON (121) em 1955, estudaram a formação de peróxidos em tecidos de plantas e sua relação com a destruição do ácido indol acético. O efeito do grau de inativação da peroxidase e da temperatura de armazenamento, na qualidade de ervilhas congeladas foi pesquisado por DIE TRICH (28) também em 1955. O autor concluiu que para máxima qualidade do produto era necessário um tratamento térmico exatamente adequado para a máxima retenção do sabor, cor e ácido ascórbico. Em relação à temperatura do armazenamento, foi constatado que as mudanças nas ervilhas durante o armazenamento eram maiores quanto maiores fossem as temperaturas empregadas.

Um estudo sobre a destruição térmica da peroxidase em vegetais e altas temperaturas, apresentado por ESSELEN e ANDERSON (32) em 1956, mostrou que a quantidade de calor requerida para prevenir a regeneração da atividade enzimática durante o armazenamento era duas a quatro vezes maior do que a necessária para destruir a enzima, quando os testes eram realizados imediatamente após a aplicação do calor. A resistência térmica da peroxidase foi caracterizada por valores Z (denominando-se valor D o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática a 10% da inicial, usando para isso um tratamento térmico a temperatura constante, valor Z será o número de graus Fahrenheit na faixa de 180° a 280°F, necessário para que o valor de D decresça 90%, ou seja atravessasse um ciclo logaritmico) muito maiores do que aqueles encontrados para esporos de bactérias. Num estudo sobre o desenvolvimento de sabores indesejáveis durante o armazenamento de ervilhas frescas moídas enlatadas, FARKAS et alii (33) no mesmo ano, descobriram que, nos tratamentos térmicos em que se utilizaram temperaturas entre 100°C e 150°C, a curva de inativação da peroxidase indicava um valor Z duas vezes maior do que a normalmente obtido para alimentos enlatados.

JOSLYN e ZUEGG (64), ainda em 1956, mostraram um método para a determinação da atividade de peroxidase baseado na oxidação do ácido ascórbico na presença de leuco-2,6-dicloro-fenol-indofenol. O procedimento foi aplicado para medir a atividade de peroxidase nos feijões "lima" branqueados e em extratos de outros vegetais. Os dados indicaram haver diferenças entre o curso da oxidação em vegetais e aquele obtido a partir da enzima pura, diferenças essas não atribuíveis à presença de outras enzimas.

JOSLYN (65), em 1957, publicou a continuação de seus estudos anteriores, fornecendo melhores dados relativos às concentrações de reagentes, condições de pH e temperatura ótimas para a determinação da atividade enzimática de peroxidase. O autor recomendou ainda que o método em questão fosse submetido a estudos mais extensos e profundos.

Em 1958, GORTNER e KENT (45) identificaram a coenzima e os inibidores da ação enzimática da oxidase do ácido indol acético, enzima essa presente no talo do abacaxizeiro. Também em 1958, AKAZAWA e CONN (3) mostraram que os nucleotídeos de piridina reduzidos são oxidados aerobicamente na presença da peroxidase do rãbano de cavalo, Mn^{+2} e certos fenóis e propuseram um mecanismo para a oxidação desses nucleotídeos. MORITA e KAMEDA (94), ainda no mesmo ano, identificaram a presença de manose, xilose e arabinose na peroxidase a (fração ácida que apareceu quando o extrato bruto foi submetido a eletroforese de zona) do rãbano Japonês. Por outro lado, os mesmos pesquisadores concluíram que a enzima não contém ácido hexurônico. Foi determinada também a presença de hexoamina. VETTER et alii (141), em 1958, descreveram um procedimento para a determinação quantitativa da peroxidase no grão inteiro do milho doce. O método envolvia a determinação colorimétrica da cor formada quando a enzima oxidava a ortofenildiamina na presença de peróxido de hidrogênio. VETTER et alii (140) estudaram a inativação da peroxidase do milho doce usando uma preparação parcial purificada da enzima. Para a determinação do tempo de inativação térmica foram usados tubos capilares e latas no intervalo de temperatura de

99 a 154°C. A inativação da enzima pelo calor caracterizou-se por valores relativamente altos de F_{250} (tempo, em minutos a 250°F, para reduzir a atividade enzimática a zero), F_{300} e do valor Z. Houve também uma tendência à regeneração da peroxidase pós armazenamento. Os valores de F_{250} e F_{300} foram maiores quando a enzima foi aquecida no grão inteiro do que quando a preparação parcialmente purificada foi usada. As curvas do tempo de inativação para a enzima indicaram um ponto de inflexão a 132°C. As curvas mostraram valores de Z maiores acima dessa temperatura. Esse fato deve ser considerado no processamento que usa alta temperatura e tempo curto.

WAGENKNECHT e LEE (144), ainda em 1958, estudaram a influência da ação enzimática no desenvolvimento de sabor indesejável em ervilhas congeladas, concluindo que a peroxidase causava pequenas mudanças no sabor.

MORITA e KAMEDA (95), em 1959, estudaram a composição em aminoácidos da peroxidase a do rãbano Japonês. A análise indicou a presença dos seguintes aminoácidos: Asp₅₁, Glu₂₆, Gli₆, Ala₆₄, Val₂₀, Leu₃₆, Ileu₁₅, Ser₅₁, Tre₂₇, Cist₁₀, Met₄, Pro₁₇, Hipro₁₂, Fen₁₈, Tir₂, His₄, Lis₇ e Arg₁₁.

VETTER et alii (142) no mesmo ano, estudaram a inativação, pelo calor, da peroxidase no grão de milho inteiro processado usando alta temperatura e tempo curto. As amostras analisadas imediatamente depois do aquecimento mostraram um valor de $F_{250} = 3,43$ min e $F_{300} = 0,49$ min. Nas amostras que foram armazenadas por 72 horas a 24°C a curva de inativação térmica mostrou valores de $F_{250} = 7,0$ min e $F_{300} = 2,9$ min. Um claro ponto de inflexão foi encontrado a 132°C, sendo que os valores de Z encontrados foram 21,1°C para temperaturas abaixo de 132°C e de até 149°C para temperaturas acima de 132°C. Conclui-se ainda que a regeneração começou imediatamente depois do aquecimento e foi mais rápida e extensiva em amostras contendo um pequeno resíduo de enzima, logo depois do tratamento térmico, do que em amostras que não mostraram atividade residual naquele momento. Os autores recomendaram que, quando a atividade residual for estudada, a análise deve ser

feita nos primeiros 30 minutos após o aquecimento, pois de
pois disso já terá começado a regeneração.

Ainda em 1959, ZOUÉIL e ESSELEN (150) desenvolveram um método quantitativo para a determinação da atividade de peroxidase após o aquecimento, usando amostras de 0,04 ml no recipiente do termoresistômetro. As curvas de inativação térmica para a peroxidase de feijões verdes e nabos mostraram um valor de Z de 41^oF e 23^oF e valores de F₂₅₀ de 0,48' e 1,8' respectivamente. Considerando o problema da regeneração, para preveni-la foram necessários de Z de 47 e 46^oF e F₂₅₀ de 3,0 e 11,3 para feijões verdes e nabos respectivamente. Esses valores de Z e F₂₅₀ são 5 a 6 vezes maiores do que aqueles necessários para a inativação quando medida logo após o tratamento. As energias de ativação para a peroxidase dos feijões verdes foram de 34,4 e 19,6 Kcal com uma temperatura crítica de 104^oC. A energia de ativação para a enzima do nabo foi de 49 Kcal. A regeneração da peroxidase dos feijões verdes e nabos ocorreu quando as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas. A regeneração não ocorreu numa taxa constante quando as amostras foram armazenadas a 3,3^oC por períodos de até 120 hs. Porções experimentais de purê de feijões verdes esterilizado contendo a concentração natural e 10 vezes essa quantidade de peroxidase, mostraram odores e sabores indesejáveis quando comparados com amostras de controle, isentas de peroxidase, armazenadas a 3,3^oC; 21,1^oC e 37,8^oC por 12 semanas. A atividade de peroxidase de creceu nas amostras experimentais durante o armazenamento. O decréscimo foi mais rápido para amostras estocadas a 21,1^oC e 37,8^oC quando comparado com as armazenadas a 3,3^oC. Um decréscimo de uma unidade de pH foi observado em amostras com peroxidase adicionada. Um aumento no conteúdo de acetaldeído, devido à atividade da enzima, equivalente a 2 a 5 vezes aquele presente em feijões verdes frescos também foi notado.

RAY (109), em 1960, estudando a destruição do ácido indol acético por uma preparação enzimática a partir de um fungo (Omphalia flavida), constatou que a mesma exibia atividade de peroxidase com o substrato pirogalol e também atividade

de de oxidação do ácido indol acético, com um ótimo de atuação da faixa de pH de 3,5 a 3,7. As atividades peroxidática e de oxidação do ácido indol acético ocorrem paralelamente durante a inativação térmica e durante a purificação da enzima e, por isso, foram consideradas como sendo devidas à mesma enzima, ou seja, o autor concluiu que a oxidação do ácido indol acético é devida à peroxidase.

JOFFE e BALL (59), em 1962, estudaram a cinética, a energia necessária para a inativação térmica e as taxas de regeneração da peroxidase, usando enzima pura comercial (peroxidase do rãbano de cavalo). A cinética de inativação mostrou ser de 1ª ordem para a faixa de temperaturas entre 85°C e 100°C. A energia de inativação foi de 25,1 Kcal/mol; a mudança de energia livre foi de 27,0 a 27,5 Kcal/mol, e, a mudança de entropia igual a 7,39 a 7,89 cal/mol°C. A regeneração mostrou envolver uma lag fase de aproximadamente \approx 20 horas, um período de regeneração rápida de 1 a 2 dias e um ponto de máxima regeneração situado entre 2 a 10 dias. O valor Z de 49,8°F indicou que nos processos que usam alta temperatura e tempo curto, o critério para suficiência, precisa ser baseado no tempo necessário para estabilizar o produto.

Também em 1962, PINSENT (105) estudou a regeneração da peroxidase em ervilhas congeladas e descongeladas, e seu efeito na qualidade. O autor concluiu que peroxidase conseguia regenerar-se nos casos em que o branqueamento aplicado tinha sido exatamente suficiente para destruir a atividade original e não nas amostras que haviam recebido um tratamento térmico substancialmente maior do que o necessário para inativação. A regeneração ocorreu depois de alguns meses nas ervilhas armazenadas a -18°C ou dentro de algumas horas em ervilhas descongeladas mantidas à temperatura ambiente. Foi de 4% o máximo de regeneração ocorrido nesse estudo, e esse índice mostrou não afetar a qualidade do produto.

YAMOMOTO et alii (148) no mesmo ano, estudaram a cinética da inativação térmica da peroxidase do milho doce usando valores de D. Os resultados indicaram que, no intervalo entre 65,5°C e 93,3°C uma fração termo-lábil e outra termo estável estavam sendo inativadas. A fração termo resistente

representou 5% da atividade total da enzima e estava concentrada no pericارpo. O aumento do tempo de tratamento a $93,3^{\circ}\text{C}$ de 2 para 5 minutos diminuiu a atividade residual de 3,3% para 1,7%. A inativação da fração termo-resistente no intervalo de 99°C a 143°C seguiu uma cinética de primeira ordem. A curva do tempo aparente de inativação mostrou que um processamento usando alta temperatura e tempo curto, baseado na destruição microbiana pode levar a uma atividade residual da enzima. WILDER (146), ainda em 1962, estudou os fatores que afetam a inativação pelo calor e a reativação parcial da peroxidase purificada por cromatografia de troca iônica. O autor, após a cromatografia, separou a maior fração obtida da enzima preparada comercialmente (peroxidase do rábano de cavalo) e a utilizou para o estudo. A inativação térmica foi levada a efeito na faixa de 121°C a 149°C , com ênfase para $136,6^{\circ}\text{C}$. A atividade enzimática foi medida segundo a taxa de utilização do peróxido de hidrogênio durante a formação do tetraguaiacol a partir do guaiacol, sendo a concentração do tetraguaiacol medida por um espectrofotometro registrador. A força iônica da solução tampão na qual a peroxidase foi aquecida teve um efeito na sua inativação. Dentro de certos limites, quanto maior a força iônica, maior a inativação pelo calor. A temperatura de armazenamento da peroxidase termo-inativada afetou a taxa e o grau de reativação, sendo que a maior percentagem de reativação ocorreu a $22,2^{\circ}\text{C}$. A $1,1^{\circ}\text{C}$ e a $37,8^{\circ}\text{C}$ a recuperação de atividade foi menor.

PAUL (102), em 1963, publicou um trabalho muito importante sobre peroxidases, descrevendo os procedimentos preparatórios para a análise, a análise da peroxidase de várias fontes, o substrato primário ou agente oxidante, o substrato secundário ou componente oxidável e as reações acopladas oxidase-peroxidase.

LANZANI e GALANTE (77), em 1964, estudaram a peroxidase encontrada no germe de trigo, a qual está presente na forma solúvel e na forma ligada aos ribossomos. Uma pequena porção da peroxidase ligada aos ribossomos solubiliza-se espontaneamente, enquanto que uma grande parte é ligada fortemente e só

pode ser solubilizada por um tratamento com EDTA. A peroxidase solubilizada espontaneamente tem propriedades cinéticas similares às da solúvel, enquanto que a enzima liberada pelo EDTA tem propriedades cinéticas diferentes.

ROSENQVIST e PAUL (111), no mesmo ano, conseguiram transferir a hematina da mioglobina do cavalo para a apoperoxidase do rábano de cavalo.

GORTNER e SINGLETON (46), em 1965, determinaram os compostos nitrogenados e enzimas constituintes do abacaxi tendo encontrado para a peroxidase uma atividade decrescente ao longo do desenvolvimento do fruto, chegando a 5 unidades/ml de suco da fruta madura. O papel da peroxidase do rábano de cavalo na oxidação do ácido indol acético foi pesquisado por FOX et alii (34), no mesmo ano, sendo que os autores sugeriram que a oxidação ocorre principalmente através de um mecanismo de radicais livres em cadeia e que a função da enzima é gerar os radicais livres. CARLSTROM (19), ainda em 1965, separou a lactoperoxidase do leite bovino em várias frações, por cromatografia em Sephadex-DEAE. A heterogeneidade foi a mesma durante todo o ano e todas as frações foram enzimaticamente ativas. O leite de uma única vaca também foi submetido ao mesmo procedimento para que uma possível influência das diferenças genéticas entre vários animais, na heterogeneidade da enzima, fosse testada, e o resultado foi o mesmo que o anteriormente obtido. KLAPPER e HACKETT (72), também em 1965, investigaram a estrutura de peroxidase do rábano de cavalo, incluindo a sua composição em aminoácidos e carboidratos. Essas investigações mostraram que as preparações comerciais da enzima contêm múltiplos componentes que podem ser separados por eletroforese em gel de amido. Os componentes predominantes foram purificados e suas propriedades estudadas, concluindo-se que: as várias frações não diferem em tamanho, espectro de absorção, atividade enzimática e composição em aminoácidos. Foram encontrados na peroxidase do rábano de cavalo os açúcares glucose, galactose, manose, arabinose, xilose, fucose e hexoamina.

KON e WHITAKER (74), ainda em 1965, caracterizaram parcialmente as peroxidases do latex do figo. Para as três frações A, B e C separadas por cromatografia em DEAE celulose foi encontrado um mesmo peso molecular, estimado em 40.000. As frações A, B e C migraram 1,50; 1,62 e 1,77cm respectivamente, para o anodo, quando a eletroforese foi realizada num tampão 0,01 M a pH 7,0. Foi B, C e A a ordem decrescente de estabilidade térmica. O pH ótimo para todas as frações foi de 6,3 - 6,4.

Em 1966, BEAUDREAU e YASUNOBU (13), a partir de talos frescos do abacaxi e de seu suco concentrado de talos, purificaram a peroxidase B (fração básica que aparece quando se submete o extrato bruto dos talos à eletroforese de zona) e a obtiveram em forma cristalina. A partir do estudo das propriedades enzimáticas e fisicoquímicas da enzima, concluiu-se que a mesma é uma peroxidase atípica. Entre as características que a diferenciam das peroxidase em geral, incluem-se um pH ótimo ácido, uma baixa atividade específica e uma absorção de Soret anômala. Foi a primeira peroxidase diferente a ser obtida em forma cristalina.

Também em 1966, GOREN e GOLDSCHMIDT (42), determinaram a atividade da peroxidase em tecidos cítricos usando quatro tipos de doadores de hidrogênio e os resultados mostraram que, independentemente do doador de H usado, a atividade da enzima crescia na sequencia dos tecidos dos frutos, folhas e raízes. Uma grande variedade de combinações entre as concentrações de H_2O_2 e dos doadores de H foi testada, para definir as condições para cada tecido.

No mesmo ano, GREGORY (47) reivindicou a descoberta de um método simples, rápido e acurado para a determinação da atividade da peroxidase. Esse método é constituído de uma reação acoplada entre o ácido ascórbico com o produto da ação da peroxidase sobre a benzidina. É um método que pode ser usado na presença de polifenol oxidases.

MACNICOL, (85), ainda em 1966, estudou as peroxidases da ervilha do Alasca (Pisum Sativum L.) usando cromatografia em coluna de troca iônica, tendo separado dois maiores e

dois menores componentes C_1 , C_3 e C_2 , N respectivamente, a partir de plantas novas. C_1 e C_2 estavam ausentes da raiz e C_3 estava ausente das folhas, enquanto N foi encontrada em toda a planta. Essa distribuição sugeriu que as frações C_1 e C_2 poderiam estar ligadas ao tecido fotossintético ativo ou potencialmente ativo e C_3 ao sistema vascular.

RACUSEN e FOOTE (107), no mesmo tempo, isolaram três isoenzimas da peroxidase, a partir de folhas de feijão, pelo método da eletroforese preparativa descontínua em gel de poliacrilamida. A quantidade dessas enzimas variou com a idade do folha, sugerindo um padrão de desenvolvimento que pode estar ligado aos eventos metabólicos de maturação e senescência.

SHANNON et alii (119), também em 1966 isolaram sete isoenzimas da peroxidase do rãbano de cavalo e as purificaram até a homogeneidade por cromatografia em coluna de troca iônica, ultracentrifugação e eletroforese em disco de poliacrilamida. A atividade recuperada após a purificação foi de 86% da atividade no homogeneizado inicial. Com base no seu comportamento cromatográfico, migração eletroforética e propriedades espectrofotométricas as sete isoenzimas puderam ser separadas em dois grupos. Cada isoenzima mostrou conter protoglobina IX como grupo prostético. Continuando em 1966, GUILBAULT (48) propôs um método para a determinação eletroquímica da peroxidase baseado na mudança de potencial elétrico de um ânodo de platina, com o tempo, durante a ação enzimática. A inclinação da curva $\Delta E/\Delta T$ era proporcional à concentração da enzima.

SIEGEL e GALSTON (122), em 1967, estudaram a atividade de oxidação do ácido indol acético mostrada pela apoperoxidase. A apoenzima mostra essa atividade quando suprida com uma concentração de 10^{-5} moles/L de íons de manganês e a mesma concentração de 2,4 diclorofenol. Concluiu-se que essa atividade é sensível ao cianeto. Portanto pareceu que a atividade da peroxidase e da oxidase do ácido indol acético não necessitava do envolvimento direto do grupo proteico heme ou que os íons de manganês ou diclorofenol podem substituir o grupo

heme na reação entre o ácido indol acético e a oxidase. No mesmo ano SIEGEL e GALSTON (123) pesquisaram a heterogeneidade da peroxidase de ervilhas, usando eletroforese em gel de amido. Foram feitas comparações entre os cultivares altos e anões e entre sistemas orgânicos desenvolvidos na luz e na escuridão. As bandas de isoperoxidase puderam ser agrupadas como catódicas, anódicas e quase neutras (a pH 9). Cada órgão teve um padrão isoenzimático característico e, os padrões em órgãos correspondentes de diferentes variedades, foram muito mais parecidos do que os padrões em órgãos diferentes dentro da mesma variedade. O efeito da luz nos padrões isoenzimáticos foi mais quantitativo que qualitativo, possivelmente influenciando as isoperoxidasas secundariamente através de seu efeito na fisiologia e no desenvolvimento dos órgãos. KAY et alii (66) no mesmo ano ainda, descreveram as propriedades catalíticas de sete isoenzimas da peroxidase do rábano de cavalo. A determinação foi feita usando orto-dianisidina como substrato para a reação peroxidática e oxaloacetato como substrato para a reação de oxidação. Cada isoenzima foi capaz de catalisar a oxidação dos dois substratos e as mesmas mostraram requerer os mesmos cofatores. As isoenzimas foram classificadas em dois grupos diferentes, que diferiram em pH ótimo, atividade específica, K_m aparente e afinidade a inibidores.

Também em 1967, CARLSTROM e VESTERBERG (20), confirmaram a pronunciada heterogeneidade da lactoperoxidase pelo método da focalização isoelétrica de anfíbolitos. Foram então demonstradas seis subfrações e suas atividades específicas e propriedades espectrofotométricas foram investigadas.

NOVACKI e HAMPTON (100) em 1968 estudaram o efeito da concentração e substrato na visualização das isoperoxidasas, na eletroforese de disco. Os pesquisadores concluíram que a visualização é grandemente influenciada pela concentração do substrato usado no procedimento de coloração. O uso de uma concentração relativamente alta de substrato pode encobrir a atividade de certas isoperoxidasas provavelmente devido a inibição pelo substrato.

EMBS e MARKAKIS (31), em 1969, publicaram um trabalho

de pesquisa sobre o efeito do bissulfeto da estrutura química e da atividade da peroxidase do rãbano de cavalo, no qual mostraram que o bissulfeto retardava a inativação da peroxidase por ácidos fracos, tendo a análise espectral indicado que o retardamento foi acompanhado por uma estabilização na ligação entre o grupo prostético e a parte proteica da enzima.

O grau de inibição da peroxidase em função do tipo de processamento do milho foi estudado por GARDNER et alii (37), ainda em 1969, concluindo-se que a moagem a seco resulta numa pequena destruição da enzima, enquanto que o cozimento em rolo ou por extrusão, geralmente resulta na total inativação da atividade da enzima. O grau de inativação depende da quantidade de calor e da umidade utilizada no processo e pode ser correlacionado, tanto com as propriedades de absorção de água do produto como com a consistência da mistura do produto com água.

A análise de extratos radiculares de lentilhas e ervilhas através da passagem por Sephadex G-100 foi efetuada, também em 1969, por GASPAR, HOFINGER e LACOPPE (38), sendo encontradas peroxidases, catalases, fenoloxidasas e oxidasas do ácido (β indol acético. Em relação a peroxidase, tanto para a lentilha para a ervilha foram encontrados dois picos distintos, sugerindo pelo menos duas frações distintas.

HAMILL e BREWBAKER (53), igualmente em 1969, identificaram 24 isoenzimas da peroxidase em 250 variedades de milho, usando eletroforese em gel de amido. Vinte dessas bandas corresponderam, em mobilidade eletroforética, às bandas observadas em peroxidase do rãbano de cavalo comercial.

STUBER e LEVINGS III (127), ainda em 1969, encontraram oito isoperoxidases na aveia, as quais foram separadas por eletroforese.

Uma comparação entre o tratamento do milho na espiga por microondas e o branqueamento por vapor ou água, e sua influência na atividade da peroxidase foi realizada por DIE TRICH et alii (29), em 1970 e mostrou que, uma exposição de 6 min às microondas inativa completamente a peroxidase, mas

causava uma desidratação considerável. Amostras que foram branqueadas com vapor por 8 a 12 min mostraram atividade residual da enzima. Um painel sensorial indicou que houve melhor retenção do sabor nas amostras tratadas por 4 min com microondas e por 12 min com vapor. Por isso, os autores concluíram que, para milho na espiga, o melhor seria usar um tratamento misto, o qual obteria uma boa inativação da peroxidase sem uma desidratação prejudicial.

IMASEKI (54), também em 1970, comprovou que a atividade de metabólica, envolvendo atividade de peroxidase, que ocorre em tecidos de batata doce fatiados, na ausência de etileno exógeno, é regulada pelo etileno endógeno, produzido em resposta à injúria causada nos tecidos pelo fatiamento.

PAUL e STIGBRAND (103), igualmente em 1970, isolaram 4 isoperoxidasas do rábano de cavalo, sendo uma altamente ácida, uma neutra e duas fortemente básicas. Uma das peroxidases básicas, supõe-se ser formada a partir da forma neutra pela perda, por esta, de 40 aminoácidos, sendo 14 deles ácidos e nenhum básico. O conteúdo em carboidratos e de mesma magnitude em três das frações, enquanto a outra fração contém cerca da metade do conteúdo de carboidratos. A peroxidase ácida contém, mais ou menos, a metade da arginina e metionina das outras três e demonstra 1/3 da atividade das outras, quando o guaiacol é usado como doador de hidrogênio.

A identificação e caracterização da peroxidase do oxococo (cranberry) foi realizada em 1971 por CHAN e YANG (21). A enzima apresentou ótimo de atividade a pH 6, a inativação térmica mostrou seguir uma cinética de primeira ordem, com uma energia de inativação de 37,2 Kcal/mol e foram determinados os seguintes valores de D: $D_{70^{\circ}\text{C}} = 9,40$ min, $D_{80^{\circ}\text{C}} = 1,60$ min e $D_{90^{\circ}\text{C}} = 0,47$ min. Guaiacol, orto-fenil-diamina e pirogalol foram testados como possíveis substratos para a ação enzimática, sendo que a orto-fenil-diamina mostrou ser o mais sensível.

Ainda em 1971, DULL (30) publicou um trabalho de caráter geral sobre o abacaxi, abrangendo sua composição, a bioquímica de seu desenvolvimento e sua fisiologia pós colheita.

mas bromelina, oxidase do ácido indol acético, peroxidase e fosfatase, tendo como fonte o talo da planta. O autor se refere, quanto à peroxidase, ao trabalho de GORTNER e SINGLETON (46) os quais encontraram 5 unidades de peroxidase por ml de suco da fruta madura.

MACRIS e MARKAKIS (86), igualmente em 1971 estudaram a inativação pós irradiação da peroxidase do rábano de cavalo tendo concluído que: quanto maior a dose de irradiação, maior a taxa de inativação pós-irradiação; a perda de atividade pós-irradiação aumentou com o aumento da temperatura de armazenamento; em pH 9 há maior inativação do que a pH 5 ou 7; glicerol adicionado à solução irradiada diminuiu a taxa de inativação; o tratamento da solução congelada diminuiu a taxa de inativação. Foi proposto um mecanismo para explicar o porque da inativação pós-irradiação, segundo o qual uma porção da enzima que não é inativada durante a irradiação, sobre uma modificação que resulta em subsequente inativação por reação com si mesma.

Continuando em 1971, SAE et alii (114), detectaram uma peroxidase em tração de grão de soja. A focalização isoelétrica mostrou duas isoenzimas básicas da peroxidase, imobilizadas a pH 9,0 e 10,0. Um pico único de peroxidase na filtração com gel, mostrou um peso molecular de 43.000.

WHITMORE (145), no mesmo ano estudou os efeitos do ácido indol acético e da hidroxiprolina em isoenzimas da peroxidase do trigo e descobriu que o ácido indol acético a 0,017 mM inibia a formação de três isoenzimas entre as presentes nas frações solúvel e ligada à parede. A hidroxiprolina na concentração de 1 mM preveniu a inibição induzida pelo ácido indol acético.

O envolvimento das isoenzimas da peroxidase e da oxidase do ácido indol acético no amadurecimento da ervilha, do tomate e da murta foi estudado por FRENKEL (35) em 1972, o qual observou, usando a técnica da eletroforese em gel, que durante o amadurecimento havia uma intensificação bastante pronunciada nas isoenzimas da oxidase do ácido indol acético,

mas não nas isoenzimas da peroxidase.

RACKIS et alii (106) também em 1972, relacionaram o sabor da soja, durante a maturação, com a atividade de peroxidase e lipoxigenase. Os autores concluíram que o mecanismo de formação desse sabor pode ser o mesmo descrito por ROTHE (112) para a aveia, composto por três etapas principais: a) formação de peróxidos por hipoxigenase; b) destruição dos peróxidos pelo composto antioxidante ajudado pela peroxidase e c) polimerização subsequente dos radicais que formam o complexo.

RANADIVE e HAARD (108), ainda em 1972, estudaram a localização da peroxidase e a formação de lignina na pera em desenvolvimento e concluíram que a enzima está concentrada nas células do parênquima que rodeiam as células granulosas.

STAFFORD e BRAVINDER-BREE (126), igualmente em 1972, detectaram a presença de pelo menos cinco bandas de isoperoxidasas em extratos do primeiro internodo do sorgo, usando análise eletroforética, com tiras de Sephadex III, o-dianisidina e H_2O_2 para detecção. Três dessas isoenzimas foram formas anódicas e duas foram formas catódicas em pH 8,3.

WANG e DIMARCO (143), continuando em 1972, isolaram e caracterizaram seis isoenzimas da peroxidase do rábano de cavalo. As seis isoenzimas foram divididas em dois grupos, cada um tendo atividade específicas e pH ótimo similares. Quanto à resistência térmica, tomando uma fração representativa de cada grupo, ou seja A_1 e C, foi determinado que: o valor Z para a isoenzima C foi de $66^\circ F$ e para a A_1 foi de $42^\circ F$. A regeneração da atividade da peroxidase do rábano de cavalo alcançou um máximo de 28,5% para a fração C e de 17% para a A_1 , depois de aproximadamente 30 horas de armazenamento a $21,1^\circ C$; enquanto que a $1,1^\circ C$ ambas mostraram 12% de regeneração sob as mesmas condições.

CHENCHIN e YAMAMOTO (23), em 1973, estudaram a distribuição, concentração e inativação térmica da peroxidase em três variedades de milho e concluíram que a atividade peroxidática, a distribuição das isoenzimas e a estabilidade térmica

ca das mesmas estão relacionadas com a variedade do milho e a origem anatômica das frações.

HAARD (50), também em 1973, isolou peroxidase da polpa de banana madura e mediu sua atividade usando orto-dianisidina como doador de hidrogênio. Os macerados celulares contêm peroxidase solúvel e ligada a partículas. Os níveis de peroxidase solúvel não diferiram nos estágios de pré-climatério e pós-climatério. A atividade da peroxidase ligada a partículas triplicou que o início da respiração do climatério e gradualmente declinou com o início da senescência.

LU e WHITAKER (84), em 1974, examinaram alguns fatores que afetam a inativação térmica e a reativação da peroxidase do rãbano de cavalo. Foram examinados os efeitos da temperatura, pH, força iônica e concentração da hemina nas taxas de inativação e reativação da enzima.

O efeito do grupo prostético na estabilidade da peroxidase do rãbano de cavalo foi pesquisado por BEREZIN et alii (14), em 1975, e, constatou-se que, embora não exista efeito na estabilidade na faixa de pH entre 5 e 10, o efeito é notável nos valores extremos de pH tais como 2,8 a 5 e 10 a 12,8 a 25°C.

MIHALYI e VAMOS-VIGYAZO (93), ainda em 1975, estudaram a determinação, localização e inativação pelo calor, da peroxidase em batatas da variedade "Gul baba", rãbano de cavalo, cogumelos cultivados pãprica verde, cabeça de aipo, couve-rãbano do inverno, nabos, rãbano preto, aspargos e cebolas. Os autores determinaram o pH ótimo, a resistência térmica, a concentração ótima de substrato e a localização da enzima.

NAGLE e HAARD (96) também em 1975, fracionaram e caracterizaram a peroxidase da banana madura. Para o fracionamento foi usada cromatografia de troca iônica, encontrando-se frações aniônicas e cationicas. O pH ótimo para a fração aniônica estava entre 4,5 e 5,0; enquanto para a fração cationica foi encontrado igual a 4,5.

TAMURA e MORITA (130), igualmente em 1975 investigaram a desnaturação térmica da peroxidase do Rãbano Japonês, for

necendo uma série de dados acerca do processo. A inativação ocorreu em temperaturas superiores a 60°C e envolveu três fases: 1ª dissociação da protohemina da holoperoxidase; 2ª uma mudança conformacional na apoperoxidase e 3ª uma modificação ou degradação da protohemina. A regeneração da peroxidase, ao ser resfriada até a temperatura ambiente, ocorreu só em pH neutro, não ocorrendo em pH 5 ou pH 9. A irreversibilidade no pH ácido foi devido a uma mudança irreversível na conformação da apoenzima. A irreversibilidade no pH alcalino foi largamente atribuída a uma modificação da protohemina.

SHINSHI e NOGUCHI (120), também em 1975, estudaram as relações entre a peroxidase, oxidase do ácido indol acético e polifenoloxidase, a partir de células de tabaco numa cultura em suspensão. Usando filtração em gel, cromatografia de troca iônica e eletroforese em disco, os pesquisadores, concluíram que a atividade da oxidase do ácido indol acético era devida inteiramente às peroxidases. Por outro lado, os zimogramas da peroxidase e polifenoloxidase obtidos usando separação aniônica em gel foram similares, mas a ocorrência de polifenoloxidases verdadeiras, distintas da peroxidase, foi demonstrada por eletroforese catiônica em disco e filtração em gel.

HAARD (51), ainda em 1975, apresentou um novo método de medição para ensaios cinéticos com a peroxidase do rãbano de cavalo, baseado na determinação contínua de um produto fluorescente da reação.

Em 1976, BRUEMMER et alii (16) pesquisaram a oxidação de um grande número de constituintes do suco de laranja, por H_2O_2 e por $O_2 + Mn^{++}$, catalisada pela peroxidase. Entretanto a atividade enzimática foi insuficiente para produzir mudanças detectáveis no conteúdo de ácido ascórbico e ácido cafeico no suco mantido por 2 horas a 30°C. Concluiu-se assim que, durante as poucas horas que o suco espera pela pasteurização, durante o processamento, seu aroma provavelmente não é adversamente afetado por reações catalisadas pela peroxidase.

GORIN e HEIDEMA (43), também em 1976, determinaram a atividade de peroxidase em maçãs var. "Golden Delicious", durante o armazenamento a 3^o - 4^oC e sob atmosfera controlada. A enzima apresentou dois picos de atividade em função do tempo de conservação, o primeiro correspondendo ao climatêrio e o segundo ao começo da senescência.

Uma revisão sobre a relação entre a peroxidase e o aroma e qualidade dos alimentos foi efetuada por BURNETTE (17), em 1977. Nesse trabalho, o uso da peroxidase como um índice de branqueamento de frutas e vegetais foi revisto. A peroxidase é considerada a enzima mais termo estável das existentes em plantas. Quando for inativada, todos os outros sistemas enzimáticos usualmente estarão também inativados no produto. Há uma relação empírica entre a atividade residual da peroxidase e o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis em alimentos. A atividade de peroxidase foi detectada em produtos armazenados a -18^oC e sob condições de umidade tão baixa como 12,5%. Qualquer atividade detectada após severos tratamentos térmico é usualmente porque a enzima não foi totalmente inativada. Um tratamento térmico inadequado pode ainda resultar em regeneração da enzima.

LIU e GIBSON (81), igualmente em 1977, propuseram um novo substrato, não cancerígeno, para substituir a benzidina e seus derivados, na identificação da peroxidase. Essa substância, que ocorre "in vivo" é o Eugenol (2 metoxi-4 alil fenol), principal componente do óleo de cravo da Índia e mostrou bons resultados por permitir a visualização da peroxidase em eletroforese em gel de amido e sua determinação quantitativa num método fluorométrico.

SRIVASTAVA e VAN HUUSTEE (125), também em 1977, estudaram a atividade de oxidase do ácido indol acético e polifenoloxidativa das quatro formas anionicas encontradas entre as sete isoenzimas da peroxidase, isoladas a partir de células de amendoim cultivadas em suspensão num meio de cultura. As atividades específicas, de cada uma das enzimas diferiram nas quatro isoenzimas. O pH ótimo estabelecido para a peroxidase foi ácido, para a oxidase do ácido indol acético foi

neutro e para a polifenoloxidase foi alcalino. Todas as quatro isoenzimas apresentaram diferentes valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para as atividades de peroxidase e de polifenoloxidase.

HAARD (52), ainda em 1977, publicou uma revisão sobre as funções fisiológicas de peroxidase nas frutas e vegetais após a colheita, na qual foram discutidas sua classificação, suas propriedades catalíticas, suas isoenzimas, sua localização celular, seu efeito na biossíntese de lignina, seu papel na formação de metabólitos de "stress" e sua função no amadurecimento de frutas.

ADAMS (2), em 1978, estudou a inativação e regeneração da atividade peroxidática em processamento de vegetais, usando alta temperatura e tempo curto. Foi demonstrado que a regeneração ocorreu após tratamentos térmicos usando 70° , 90° e 110°C , os quais causaram inativação parcial.

Também em 1978, BURNETTE e FLICK (18), estudaram a atividade da peroxidase e sua resistência à inativação térmica na carne de diversas partes do caranguejo azul, usando amostras de carne fresca e pasteurizada. Através desse trabalho, foram determinados vários valores de D para a peroxidase, que são os seguintes: $D_{80^{\circ}\text{F}} = 47$ min, $D_{110^{\circ}\text{C}} = 18,2$ min e $D_{150^{\circ}\text{F}} = 11,2$ min. O valor de $Z = 92^{\circ}\text{F}$ também foi determinado para a enzima.

GIBRIEL et alii (39), ainda em 1978, examinaram a cinética de inativação da peroxidase pelo calor em extratos de cenouras, espinafres e damascos. A peroxidase presente nas cenouras foi a mais termo-estável e mostrou o maior índice de reativação durante o armazenamento, enquanto que a enzima presente nos damascos, foi a mais termo-sensível e não mostrou reativação durante o armazenamento. As maiores taxas de reativação foram geralmente observadas para as amostras armazenadas a -5°C , comparadas com aquelas armazenadas a 4° e a 18°C . O pH ótimo para a reativação da peroxidase do espinafre e dos damascos foi 8,0. A presença de cloreto de sódio, resultou em maiores índices de reativação durante o armazena

mento, enquanto a sacarose não mostrou efeito significativo.

GKINIS e FENNEMA (40), igualmente em 1978, estudaram o comportamento da peroxidase solúvel e da peroxidase ligada, durante o armazenamento de feijões verdes a baixas temperaturas, e, concluíram que a atividade da peroxidase solúvel decresceu, enquanto que a atividade da enzima ionicamente ligada cresceu com o tempo, durante o armazenamento a -4°C . A fração ligada covalentemente permaneceu com sua atividade constante durante o armazenamento em toda a faixa de temperaturas do estudo, que foi de 5°C a -4°C .

LING e LUND (79), ainda em 1978, apresentaram um método para determinar os parâmetros da inativação térmica de isoenzimas resistentes ao calor e termo lábeis a partir de curvas de destruição térmica. O método foi aplicado à peroxidase do rábano de cavalo comercial para testar a sua aplicabilidade, e, a análise dos dados gerados a partir do tratamento térmico mostrou resultados satisfatórios, obtendo-se os valores de E_a de 21 Kcal/mol e 34 Kcal/mol para a peroxidase termo-lábil e termo-resistente respectivamente. Os valores de $D_{82^{\circ}\text{C}}$ foram de 1,2 e 42 min respectivamente.

ZMRHAL e MACHACKOVA (149), também em 1978, isolaram e caracterizaram uma isoenzima da peroxidase do trigo. Seu peso molecular foi de 85.000. A enzima continha 40% de açúcares neutros, assim distribuídos: 17,2% de arabinose, 15,3% de galactose e 5% de glicose. A oxidação dos ácidos ferúlico e p-cumárico pela enzima ocorriam com pH ótimo de 4,4 e 5,4 - 5,6 respectivamente. Essa isoenzima também oxidava o ácido indol acético na faixa de pH de 4,4 a 5,6.

UGAROVA e LEBEDEVA (138), em 1979, examinaram e estrutura, as propriedades físico-químicas, o mecanismo de ação e a cinética das reações catalizadas pela peroxidase do rábano de cavalo e concluíram que apesar de todo o grande volume de dados disponíveis na literatura, não se pode dizer que o mecanismo da catálise por peroxidase, está determinado. A estrutura dinâmica do sítio ativo da enzima, a polifuncionalidade dos grupos do sítio ativo, as altas potencialidades pa

ra a realização de vários caminhos de transporte de elétrons pela enzima, são os principais fatores que evidentemente permitem a alta performance das funções fisiológicas da peroxidase.

MARSHALL e CHISM (91), igualmente em 1979, compararam a conveniência de utilização de três doadores de hidrogênio na determinação da atividade de peroxidase: orto-dianisidina, guaiacol e pirogalo. A conclusão foi que, o guaiacol e o pirogalo são muito mais convenientes para determinações quantitativas da peroxidase, porque a atividade da enzima, no caso de se usar o-dianisidina é dependente da concentração do substrato, dentro da faixa usual, e, nessa concentração pode variar, pois a o-dianisidina pode cristalizar na solução de metanol.

LEE e HAMMES (78), também em 1979, estudaram a inativação pelo calor, da peroxidase do milho na espiga, visando conhecer a relação entre a atividade residual da enzima e, o sabor do milho armazenado congelado. A energia de inativação foi estimada em $7,4 \pm 0,4$ Kcal/mol e, o milho branqueado a 99°C por menos de 15 minutos desenvolveu variados graus de sabor indesejável, determinados por um painel sensorial. Foi encontrada uma relação entre o desenvolvimento de sabores indesejáveis e a atividade da peroxidase na parte externa e interna da espiga.

KOKKINAKIS e BROOKS (73), ainda em 1979, purificaram a peroxidase a partir do pericarpo do tomate e, a compararam com a peroxidase do rãbano de cavalo, encontrando muitas propriedades semelhantes entre as duas, bem como diferenças contrastantes. A peroxidase do tomate se assemelhou à peroxidase do rãbano de cavalo na sua habilidade em ser reduzida a ferropoxidase, em ser convertida a oxiferropoxidase e em formar complexos com peróxido de hidrogênio. Em contraste com a peroxidase do rãbano de cavalo, a peroxidase do tomate falhou em catalisar a oxidação aeróbica do ácido indol acético na presença de 2,4 diclorofenol e manganês. A peroxidase do tomate pode ser decomposta em duas subunidades não iden

rábano de cavalo permanece como uma cadeia polipeptídica única, depois de tal tratamento.

JEN et alii (55), em 1980, purificaram a peroxidase do tomate, usando cromatografia hidrofóbica como parte do esquema de purificação, e, assim, obtiveram uma isoenzima homogênea. A isoenzima teve um espectro claro na região visível e um valor R_z (403 nm/280 nm) igual a 2,36. Ela mostrou uma única banda na eletroforese em gel em tampões básicos e ácidos, em eletroforese em fita de acetato e em eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio. Uma estimativa do peso molecular deu como resultado 43000 ± 2000 daltons. O pH ótimo foi de 5,5 com guaiacol e 7,5 com pirogalol como substratos respectivamente. Estudos cinéticos mostraram que o pirogalol e o peróxido de hidrogênio inibem a enzima na concentração de 5 mM.

Em 1980, BAARDSETH e SLINDE (7), estudaram o calor de inativação e o pH ótimo das enzimas peroxidase e catalase, oriundas da cenoura, couve sueca e couve de Bruxelas. Foram encontradas diferenças entre as estabilidades térmicas das peroxidases de diferentes vegetais, mas todas as peroxidases foram mais estáveis que as catalases. A partir das curvas de pH e de termo-estabilidade, os pesquisadores concluíram que, tanto a peroxidase como a catalase são diferentes nas três espécies vegetais.

Ainda em 1980, VAMOS-VIGYÁZÓ et alii (139) estudaram algumas propriedades da peroxidase em couve-rábano e couve-flor. O pH ótimo para a enzima da couve-rábano e da couve-flor foram 5,7 e 5,5 respectivamente. Em relação à temperatura, a atividade da peroxidase nos dois produtos subiu até atingir um máximo a 40°C. A energia de inativação para a couve-flor foi de 63,3 KJ/mol. Tratamentos de dez minutos a 120°C tiveram diferentes efeitos na peroxidase dos dois produtos: na couve-flor a enzima foi inativada a 95°C enquanto que na couve-rábano houve retenção de 0,1% da atividade mesmo a 120°C. A enzima na couve-rábano mostrou também uma maior capacidade de regeneração: após um tratamento de 10 min a 90°C a atividade cresceu durante 24 horas a 25°C de 2,2% a 28,2%

enquanto que no caso da couve flor os valores correspondentes foram 0,05% e 0,14%. O congelamento e armazenagem nesse estado fez decrescer a atividade específica da peroxidase nos dois produtos, sendo que a enzima na couve-rábano foi afetada numa menor extensão.

Em 1981, THOMAS et alii (136) estudaram as mudanças ocorridas na peroxidase solúvel e ligada durante o desenvolvimento do tomate. A peroxidase solúvel aumentou enormemente sua atividade durante os primeiros estágios do desenvolvimento, alcançado um máximo no estágio verde-maduro. As peroxidases ligadas ionicamente e covalentemente aumentaram ininterruptamente sua atividade durante o desenvolvimento da fruta.

NAVEH et alii (97), em 1981 descreveram um método baseado na quimioluminescência para a determinação quantitativa da atividade de peroxidase no milho. O método baseou-se na oxidação do purpurogalin pela peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio. Os fótons de luz emitida são contados por um contador de cintilação durante o período entre o décimo nono e o vigésimo quinto segundo de reação. Uma relação linear foi estabelecida entre a contagem de fótons conseguida e a atividade enzimática. O erro padrão foi estimado ser de 1,0 a 2,5% da leitura. O método é isento de interferência da turbidimetria, não requer transparência da solução e é capaz de medir diretamente as frações ligada e solúvel da peroxidase.

McLELLAN e ROBINSON (92), em 1981, estudaram o efeito do calor na peroxidase da couve comum e da couve de Bruxelas. Foram preparadas soluções de peroxidase solúvel, peroxidase ligada ionicamente e peroxidase ligada covalentemente, sendo estudado o efeito do aquecimento, em cada fração, a 60, 65, 70 e 75°C, na atividade da enzima. Os autores observaram uma cinética de inativação bifásica em todos os casos, exceto para a peroxidase ionicamente ligada da couve comum da primavera, a qual mostrou também ser a menos termo-estável. O cálculo das energias de inativação resultou em valores de 5,92 KJ mol⁻¹ para a peroxidase solúvel da couve comum da primavera, 10 KJ mol⁻¹ para a enzima ligada ionicamen

te da mesma fonte; $7,77 \text{ KJ mol}^{-1}$ para a peroxidase solúvel da couve de Bruxelas e $8,52 \text{ KJ mol}^{-1}$ para a enzima ligada ionicamente da mesma fonte. Os pesquisadores estudaram também a regeneração da peroxidase, usando incubação a 30°C , conuindo que somente a enzima ligada ionicamente, da couve de Bruxelas mostrou regeneração detectável.

Ainda em 1981, SESSA e ANDERSON (118) purificaram a peroxidase da soja e determinaram algumas de suas propriedades. A purificação iniciou-se a partir de um extrato de feijão soja parcialmente desengordurado e constituiu de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna por filtração em gel, eluições por gradiente a partir de DEAE-Sephadex A-50, cromatografia de afinidade em con-A-sepharose 4B e cromatografia hidrofóbica em fenil-sepharose CL.4B. Foram detectadas três isoenzimas anionicas por eletroforese em gel de poliacrilamida as quais diferiram mais em carga do que em peso molecular. As peroxidases da soja mostraram um pH ótimo de 5,5 com guaiacol como doador de hidrogênio, um Km de 0,58 mM de H_2O_2 a uma concentração ótima de guaiacol, um Km de 5,9 mM para o guaiacol a uma concentração ótima de H_2O_2 . O peso molecular foi estimado em 37.000 para a cadeia polipeptídica, por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio poliacrilamida. A 70°C 72 minutos foram necessários para se conseguir 97% de inativação e a 80°C a peroxidase foi completamente inativada após 15 minutos.

SIGNORET e CROUZET (124), em 1982, purificaram a peroxidase solúvel do tomate, utilizando uma coluna de concavilin-A-sepharose onde a enzima ficou retida, sendo eluída usando um gradiente de x-metil-D-mamose. Pela inclusão dessa etapa no esquema de purificação, a peroxidase do tomate foi purificada 236 vezes, com uma recuperação de 63% da atividade inicial. A enzima assim obtida se mostrou homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Equipamentos, Reagentes e Vidraria

3.1.1 - Equipamentos

Centrífuga refrigerada Beckman modelo J 21 B

Espectrofotometro Coleman modelo 295

Espectrofotometro Coleman modelo 124 D

Balança analítica Sauter tipo 414/10

Balança semi analítica Sauter tipo sp 2000 T/011

Banho maria Soc. Fabbe Ltda modelo 110 E

Potenciometro Horiba Analyser modelo H-5

Liofilizador Virtis modelo nº 10 - 146 MR-BA

3.1.2 - Reagentes Químicos

Orto-dianisidina (3,3' dimetoxibenzidina) marca Riedel.

Demais reagentes analiticos das marcas Carlo Erba, Ba
ker e Merck.

3.1.3 - Vidraria

Vidraria em geral marca Pyrex

3.2 - Abacaxi

A amostra do abacaxi (Ananas comosus (L.) merrill) cv Perôla constituiu-se de 4 frutos, colhidos no dia 02.07.80 na cidade de Coração de Maria, no Estado da Bahia, e adquiridos no dia 07.07.80 no CEASA da cidade de Campinas, estado de São Paulo.

Uma vez retirados os restos dos pedúnculos e as coroas, os frutos foram pesados, obtendo-se um total de 4597,0 gramas de peso.

A seguir, os abacaxis foram descascados, obtendo-se assim um peso líquido de 3955,0 gramas, das quais 3942,0 gramas foram utilizadas para o estudo em questão.

3.3 - Determinação de Proteína

A concentração de proteínas nas várias preparações enzimáticas, desde o suco bruto, passando pela solução obtida após a diálise do precipitado com sulfato de amônio, até a concentração nas várias frações obtidas após as etapas de troca iônica, foi determinada sempre segundo o método de LOWRY et alii (83).

O curso da eluição das proteínas das colunas de troca iônica, foi acompanhado por medidas de absorvância a 280 nm.

3.4 - Determinação da Atividade da Peroxidase

O método utilizado para a determinação da atividade enzimática baseou-se no descrito para peroxidase (104), dado pela medida de absorvância, a 460 nm, da orto-dianisidinaoxi dada.

O cálculo da atividade enzimática é efetuado plotando-se a variação de absorbância contra o tempo para os primeiros 90 segundos, quando a reação é de primeira ordem, obtendo-se uma reta. Ao valor de absorbância, conseguido através dessa reta, para o tempo de 1 minuto designa-se atividade enzimática em unidades/min, e, como o volume da solução enzimática usada é conhecido (0,1 ml), calcula-se a atividade em unidades/minuto/ml.

3.5 - Extração da Peroxidase do Abacaxi

Os frutos foram picados, com uma faca de aço inoxidável, em pedaços de 2 a 3 cm de lado e homogenizados num liquidificador comum, durante 2 minutos, sem adição de água, pois a quantidade de suco do próprio fruto, foi julgada suficiente para a homogeneização do material, e, para produzir um volume de líquido suficiente para os trabalhos que viriam a seguir.

O material homogenizado foi então submetido a uma filtração grosseira inicial, utilizando-se como filtro um pano (tecido de algodão) limpo, visando a retenção das partículas grosseiras. Em seguida, o produto passou por uma segunda filtração, na qual foi usado papel de filtro, numa operação auxiliar a vácuo, obtido de uma trompa ligada a uma torneira de água comum. Após essa segunda filtração, o volume de suco que constituiu o filtrado foi de 2.800 ml. Esse material recebeu a denominação de suco bruto.

A seguir, procedeu-se a uma centrifugação do suco bruto, tendo por objetivo clarificá-lo, livrando-o das partículas que haviam atravessado o papel de filtro. Esta centrifugação foi realizada a 10.000 rpm durante 10 minutos.

3.6 - Purificação da Peroxidase

3.6.1 - Fracionamento com sulfato de Amônio

Ao sobrenadante obtido no item 3.3 foram adicionados 672 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ou seja 40% de saturação) e deixado em repouso para decantar por uma noite a 4°C . Após a centrifugação a 10.000 rpm por 10', o precipitado foi descartado e ao sobrenadante obtido foram juntados mais 896 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, suficientes para que se atingisse 80% de saturação. O material foi deixado para decantação por uma noite a 4°C e depois centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo coletado o precipitado obtido que passou a constituir a massa proteica bruta.

A massa proteica bruta foi colocada num saco de diálise e dialisada contra água destilada, para a eliminação do sulfato de amônio, e consequentemente ressolubilização, a 4°C por 48 horas, sendo a água trocada periodicamente. Em seguida foi feita a dialise contra tampão fosfato 0,05M pH 6,0 durante 48 horas. A amostra dialisada foi purificada em coluna de DEAE-celulose de acordo com o item 3.6.2.

3.6.2 - Purificação por Troca Iônica em Coluna de Dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose)

Hidratou-se previamente 40g (peso seco) de DEAE-celulose e tratou-se com 500 ml de HCl 1N, filtrou-se em lâ de vidro e lavou-se com água destilada, até completa remoção do HCl. A seguir a resina foi tratada com 500 ml de NaOH 1N e lavada com água destilada para a remoção do NaOH, e finalmente, foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 6,0.

A solução enzimática obtida no item 3.6.1 foi aplicada em coluna de DEAE-celulose (2,7 cm de diâmetro por 32,2cm de comprimento) e eluído inicialmente com 100 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6,0. As frações de 10 ml foram coletadas a cada 30 minutos. A cromatografia foi realizada em câmara fria a 4°C .

Em seguida as proteínas foram eluídas da coluna através da aplicação de porções de 100 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6,0 contendo NaCl com concentrações crescentes, de 0,1M para primeira até 1M para a décima e última.

O curso da eluição das proteínas da coluna acompanhado por medidas de absorvância a 280 nm. A atividade de peroxidase das frações foi determinada de acordo com o item 3.4.

Após a cromatografia, os tubos de números 14 a 26 foram reunidos constituindo a fração denominada não ligada, os tubos de números 30 a 38 foram reunidos constituindo a fração I, os tubos de números 40 a 47 foram reunidos formando a fração II, os tubos de números 49 a 54 foram reunidos formando a fração III e os tubos de números 56 a 60 foram reunidos constituindo a fração IV (Figura 1).

As cinco frações contendo atividade de peroxidase foram submetidas à diálise contra água destilada durante 48 horas a 4°C e em seguida à diálise contra o tampão fosfato 0,05M pH 6,0 também a 4°C.

As várias frações foram então aplicadas às várias colunas de CM-celulose de acordo com o item 3.6.3.

3.6.3 - Purificação por Troca Iônica em coluna de Carboximetil celulose (CM-celulose)

Hidrataram-se previamente 40 g de CM-celulose e, tratou-se com 500 ml de HCl 1,0 N, lavou-se em seguida com água destilada, para a remoção do HCl. Em seguida tratou-se com 500 ml de NaOH 1,0 N, lavou-se com água destilada para a remoção do NaOH e finalmente equilibrou-se com tampão fosfato 0,05 M pH 6,0. Foram montadas, com essa enzima, 5 colunas, contidas em tubos de vidro específicos para esse fim, e, com as seguintes dimensões:

Coluna P - 2,7 x 24,6 cm (destinada a receber a fração não ligada)

Coluna Q - 2,7 x 23,3 cm (destinada a receber a fração I)

Coluna R - 2,7 x 25,2 cm (destinada a receber a fração II)

Coluna S - 2,7 x 24,2 cm (destinada a receber a fração III)

Coluna T - 2,7 x 22,6 cm (destinada a receber a fração IV)

As várias frações obtidas no item 3.6.2 foram então aplicadas às várias colunas de CM-celulose e cada coluna foi a seguir lavada com 100 ml do mesmo tampão fosfato, iniciando-se com a lavagem, a coleta de porções de 10 ml, em cada coluna, sendo a vazão ajustada nas mesmas condições do item 3.6.2. Continuando, cada coluna recebeu porções de 100 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6,0 contendo NaCl numa concentração crescente que variou de 0,1M para a primeira porção a 1M para a décima e última.

A eluição da peroxidase em cada coluna foi acompanhada por testes de atividade (item 3.4) e por determinações espectrofotométricas de proteína (item 3.3), as quais forneceram as informações necessárias para que se pudesse isolar, a partir de cada conjunto de porções, eluídas de cada coluna, as porções (tubos) contendo peroxidase.

As soluções enzimáticas contidas nos tubos números 9 a 23 coletados da coluna P foram reunidas e denominadas fração V e o conteúdo dos tubos números 31 a 40 foram reunidos e denominados fração VI.

As soluções enzimáticas contidas nos tubos números 8 a 18 eluídas da coluna Q foram reunidos e denominadas fração I.

O conteúdo dos tubos números 8 a 20 eluídos da coluna R foram reunidos e denominado fração II.

O conteúdo dos tubos números 7 a 22, eluídos da colu
na S foram reunidos e denominado fração III.

O conteúdo dos tubos números 8 a 21 eluídos da colu
na T foram reunidos fração IV.

As soluções enzimáticas constituintes de cada uma das
frações foram dializadas contra água destilada, nas mesmas
condições do item 3.6.1 e a seguir liofilizadas, sendo con
servadas em congelador, para os estudos posteriores.

3.7 - Estudo de Algumas Características da Peroxidase Purifica cada do Abacaxi

3.7.1 - Determinação do pH ótimo

Para essa determinação, amostras das várias frações
liofilizadas foram diluídas em água destilada de maneira a
padronizar as atividades. Foram preparados os tampões aceta
to de sódio/ácido acético de pH 3,6 a 5,9 e fosfato de sô
dio para os pH 6,5 a 8,0; na concentração 0,1M segundo o mê
todo de GOMORI (41).

Adicionou-se 0,5 ml de tampão de cada pH a 0,5 ml de
solução enzimática de cada fração, agitou-se e, logo a se
guir foi medida a atividade de acordo com o item 3.4.

3.7.2 - Determinação da Energia de Inativação

Amostras das várias frações liofolizadas foram solubi
lizadas em água destilada de modo a padronizar a atividade.
A seguir, a 0,5 ml de solução de cada fração enzimática, fo
ram adicionados 0,5 ml de tampão acetato pH 5,6 0,1 M. Os tu
bos contendo 1,0 ml de mistura tampão enzima, foram incuba

dos então em banho maria a temperaturas de 75°, 80°, 85° e 90°C por tempos de 30", 1', 2' e 3' sendo logo a seguir mergulhado no gelo fundente. Determinaram-se então, logo em seguida, para cada fração, a cada tempo de tratamento e a cada temperatura, as atividades residuais de acordo com o item 3.4.

Plotando-se o logarítmo decimal da percentagem de atividade residual contra o tempo de tratamento, para cada fração, em cada temperatura, foi possível obter-se retas das quais o coeficiente angular representa a constante K de inativação térmica, segundo a equação abaixo:

$$tK = \ln \frac{n_0}{n} \quad (\text{válida para reações com cinética de 1ª ordem})$$

onde:

t = tempo, em minutos

K = constante de velocidade de inativação térmica

n₀ = percentagem de atividade antes do tratamento (= 100%)

n = percentagem de atividade residual após o tratamento

Fazendo-se o tempo de tratamento igual a 1 minuto, temos:

$$K = \ln \frac{n_0}{n} \quad \text{ou} \quad K = 2,303 (\log n_0 - \log n)$$

Segundo a equação de Arrhenius,

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

onde:

K = Constante de velocidade da reação de inativação térmica

A = Constante de Arrhenius

E_a = Energia de inativação (Kcal/mol)

R = Constante universal dos gases (1,987 cal/°K - mol)

T = Temperatura (°K)

existe uma dependência linear entre o logaritmo neperiano da constante de inativação térmica e a energia de inativação, para cada temperatura T em graus absolutos. Por isso, plotando-se o ln das várias constantes K, conseguidas para cada temperatura de tratamento, contra o inverso da temperatura em graus Kelvin, para cada fração obtiveram-se retas das quais o coeficiente angular é igual a $\frac{E_a}{R}$, sendo então calculada E_a em Kcal/mol.

4 - RESULTADOS

4.1 - Extração da Peroxidase Bruta

A extração da enzima foi realizada de acordo com o item 3.5, sendo a proteína total determinada segundo o item 3.3 e a atividade da peroxidase determinada de acordo com o item 3.4. Os resultados determinados nesta etapa estão ilustrados na Tabela I, encontrando-se 4760,0 miligramas de proteína total e 8,59 unidades/minuto/miligrama de proteína, de atividade específica.

4.2 - Purificação da Peroxidase

A purificação da peroxidase foi realizada de acordo com o item 3.6, sendo a proteína total determinada segundo o item 3.3 e a atividade da peroxidase determinada de acordo com o item 3.4. Os resultados são mostrados nas Figuras 1 a 6 e Tabelas II a IV.

4.2.1 - Resultados da etapa de fracionamento com sulfato de amônio

Os resultados determinados nesta etapa estão mostrados na Tabela II. Foram obtidas 3160,0 miligramas de proteína total com a atividade específica de 6,76 unidades/minuto/miligrama de proteína, tendo-se obtido uma recuperação de 52,3%

em relação à peroxidase bruta (item 4.1). A atividade específica foi menor do que a encontrada na peroxidase bruta.

4.2.2 - Resultados da etapa de purificação por DEAE-celulose

Encontramos dois tipos de isoenzimas separadas pelo DEAE-celulose: Um tipo foi eluída da resina sem ficar ligado, ao qual designamos fração não ligada. O outro tipo ligou-se a DEAE-celulose e foi eluída com o gradiente de concentração do NaCl, separando-se em quatro frações, na seguinte ordem de eluição, correspondente ao aumento de concentração do NaCl e designadas: fração I (F-I), fração II (F-II), fração III (F-III) e fração IV (F-IV), sendo então classificadas como anionicas. O curso da eluição é ilustrado na Figura 1. Os resultados determinados nesta etapa estão na Tabela III, sendo obtidas 177,5 miligramas de proteína total e 629,0 unidades/minuto/miligramma de proteína de atividade específica, para todas as frações juntas.

4.2.3 - Resultados da etapa de purificação por CM-celulose

Esta etapa de purificação resultou numa única isoenzima para cada uma das frações I, II, III e IV, as quais não foram adsorvidas ao CM-celulose. A fração que não havia se ligado ao DEAE-celulose, ao passar pelo CM-celulose mostrou ser composta de duas outras, denominadas frações V e VI. Por não ter se ligado nem ao DEAE-celulose e nem ao CM-celulose a fração V foi classificada como não ionica e, a fração VI, ligando-se ao CM-celulose foi classificada como cationica. O curso dessa eluição está ilustrado nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6. Os dados completos determinados nesta etapa estão na Tabela IV. Foram obtidas 63,87 miligramas de proteína total e uma atividade específica de 848,0 unidades/minuto/miligramma

de proteína para todas as frações juntas.

4.3 - Determinação do pH ótimo

O pH ótimo da peroxidase fracionada com sulfato de amônio e das frações purificadas foram determinadas de acordo com o item 3.7.1, e, os resultados estão mostrados na Tabela V. A peroxidase fracionada com sulfato de amônio apresentou um pH ótimo igual a 5,0. As frações I a III apresentaram pH igual a 5,2, a fração IV mostrou pH ótimo de 5,4 e as frações V e VI revelaram um pH ótimo de 5,0. O comportamento da enzima fracionada com o sulfato de amônio e das várias frações purificadas em relação ao pH do meio de reação pode ser visualizado nas Figuras 7 e 8.

4.4 - Determinação da Energia de Inativação

A determinação da energia de inativação da peroxidase purificada do abacaxi foi realizada segundo o item 3.7.2. Os resultados da termoestabilidade são mostrados nas Figuras 9, 10, 11 e 12 que mostram os efeitos das várias temperaturas e tempos de tratamento utilizados, sobre as várias frações.

A Figura 13 é o gráfico de Arrhenius para as várias isoenzimas e as energias de inativação determinados nesta etapa, são mostrados na Tabela VI.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Extração e Purificação da Peroxidase

Como foi mostrado no item 4.1, foram extraídas 4760,0 miligramas de proteína, com uma atividade específica de 8,59 unidades de atividade/minuto/miligrama de proteína, tendo sido extraídas somente as proteínas solúveis, não havendo preocupações em extrair as proteínas ligadas ionicamente e covalentemente.

Como foi mostrado no item 4.2.1 o fracionamento das proteínas com sulfato de amônio, reduziu a quantidade de proteína total para 3160,0 miligramas e a atividade específica para 6,76 unidades/minuto/miligrama de proteína, havendo uma taxa de recuperação de 52,3% em relação a proteína bruta (item 4.1). As perdas deveram-se à necessidade de se descartar as proteínas precipitadas com 40% de saturação de sulfato de amônio para melhor purificar a peroxidase.

De acordo com o que foi mostrado no item 4.2.2 a purificação com DEAE-celulose ocasionou a separação da peroxidase em dois tipos de isoenzimas. O primeiro tipo foi eluído na lavagem da coluna, não se ligando a ela e conteve a maior porção de proteína; 95,80 miligramas, correspondendo a 54% do total de proteínas purificadas nesta fase. O outro tipo de peroxidase ficou ligado ao DEAE-celulose sendo eluído com o gradiente de concentração do NaCl, obtendo-se assim as frações I, II, III e IV; que juntas corresponderam a 81,7 miligramas de proteína ou 46% do total de proteína separadas nesta etapa. As frações I, II, III e IV foram julgadas aniônicas, portanto com predominância de cargas negativas em sua molécula, o que levou-as a se ligarem ao DEAE-celulose, que possui cargas positivas.

BC/505J

De acordo com o que foi mostrado no item 4.2.3 a purificação com CM-celulose confirmou a suposição de que as frações I, II, III e IV são anionicas, pois nenhuma delas ligou-se ao CM-celulose, sendo todas eluídas na lavagem, somando juntas 43,50 mg de proteína ou seja 68,09% das proteínas purificadas nesta fase. Por outro lado, a peroxidase, ao passar pelo CM-celulose revelou compor-se de duas frações. A primeira, fração V, não se ligou ao CM-celulose, sendo eluída na lavagem da coluna, considerada portanto como não ionica por não se ligar a nenhum dos dois tipos de coluna. Esta fração apresentou 19,17 mg de proteína, correspondendo a 30,01% das proteínas purificadas nesta fase. A última, fração VI, ligou-se ao CM-celulose, sendo eluída com o gradiente de concentração do NaCl, classificada como catiônica, devendo nessa isoenzima haver predominância de cargas positivas. A fração VI apresentou 1,20 mg de proteína, ou seja, 1,9% das proteínas desta etapa.

5.2 - pH ótimo

Como foi mostrado no item 4.3 o pH ótimo da peroxidase fracionada com sulfato de amônio foi 5,0; mostrando que a enzima atua melhor num pH levemente ácido. O pH ótimo das frações purificadas mostrou valores de 5,2 para as frações I, II e III, anionicas; 5,4 para a outra fração anionica e 5,0 tanto para a fração V não ionica, como para a fração VI cationica.

Esses valores de pH ótimo estão de acordo com os existentes na literatura para a peroxidase do tomate (JEN et alii (55)), para a peroxidase da banana (NAGLE (96)), do oxococo (cranberry) (CHAN e YANG (21)) e da couve-flor (ROSOFF (112)).

5.3 - Energias de Inativação

Como foi mostrado no item 4.4, as energias de inativação da peroxidase do abacaxi situaram-se na faixa de 23,18 Kcal/mol para a fração V, que foi a mais termolábil, até 38,80 Kcal/mol para a fração III, que foi a mais termoresistente. Estes valores são da mesma ordem daqueles existentes na literatura para a peroxidase do rãbano de cavalo (25,10 Kcal/mol) encontrado por JOFFE (59) e para o oxicoco (cranberry) (37,2 Kcal/mol) encontrado por CHAN e YANG (21).

6 - CONCLUSÕES

- 6.1 - A peroxidase bruta extraída do abacaxi apresentou uma atividade total de 40.880,00 unidades/minuto e uma atividade específica de 8,59 unidades/minuto/ miligrama de proteína.
- 6.2 - A peroxidase fracionada com sulfato de amônio, apresentou atividade total de 21.360,00 unidades/minuto e atividade específica de 6,76 unidades/minuto/ miligrama de proteína.
- 6.3 - A purificação com DEAE-celulose separou quatro isoenzimas anionicas e outra fração não ligada. A purificação por CM-celulose separou uma isoenzima não ionica e outra cationica, sendo assim no total seis isoenzimas.
- 6.4 - O pH ótimo das isoenzimas F-I, F-II e F-III anionicas foi 5,2 e para a F-IV também aniônica foi 5,4. Para as frações não iônica e cationica o pH ótimo foi 5,0.
- 6.5 - A energia de inativação das quatro frações aniônicas variou de 30,1 a 36,8 Kcal/mol, sendo maior que o valor para a fração não iônica que apresentou o valor de 23,18 e maior que o valor para a fração cationica que, que apresentou 23,2 Kcal/mol.

7 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 - ABRAMS, R; ALTSCHUL, A.M. e HOGNESS, T.R. Cytochrome C Peroxidase II. The Peroxide-Hydrogen Peroxide Complex. J. Biol. Chem., Baltimore, 142: 303, 1942.
- 2 - ADAMS, J.B. The Inactivation and Regeneration of Peroxidase in relation to the High-Temperature-Short Time processing of Vegetables. J. Food Technol., Oxford, 13 (4): 281-297, 1978.
- 3 - AKAZAWA, T. e CONN, E.E. The oxidation of reduced Pyridine Nucleotides by Peroxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, 232: 403, 1958.
- 4 - ALTSCHUL, A.M; ABRAMS, R. e HOGNESS, T.R. Cytochrome C Peroxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, 136:777, 1940.
- 5 - ALTSCHUL, A.M. e KARON, M.L. A manometric method for the determination of Peroxidase activity. Application to an Investigation of the Peroxidase of Germinating cottonseed. Arch. Biochem., New York, 13: 161, 1947.
- 6 - ANDERSON, E.E.; RUDER, L.F; ESSELEN, W.B.JR.; NEBESKY, E.A. e LABBEE, M. Pasteurized Fresh Whole Pickles. II. Thermal Resistance of microorganisms and Peroxidase. Food Technol., Chicago, 5: 364, 1951.
- 7 - BAARDSETH, P. e SLINDE, E. Heat inactivation and pH optima of peroxidase and catalase in carrot, swede

- and Brussels sprouts. Food Chem., Essex, 5 (2): 169-174, 1980.
- 8 - BACH, A. e CHODAT, R. Ber. 36: 600, 1903. Apud PAUL, K.G. Peroxidase. In: BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBACK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 9 - BALLS, A.K. e HALE, W.S. Determination of Peroxidase in Agricultural Products. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 16: 445, 1933.
- 10 - _____ On Peroxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, 107: 767, 1934.
- 11 - _____ Peroxidase in the Darkening of Apples. Ind. Eng. Chem., Washington, 27: 335, 1935.
- 12 - BEAUDREAU, C.A. Diss. Abstr., Ann Arbor, 24: 4385, 1964.
- 13 - BEAUDREAU, C.A e YASUNOBU, K.T. Heme Proteins. VI Crystalline Pineapple Peroxidase B Biochemistry, Washington, 5 (4): 1405-1412, 1966.
- 14 - BEREZIN, I.V.; UGAROVA, N.N; KERSHEN GOL'TS, B.M. e BROVKO, L.YU. The effect of the prostetic group of horseradish peroxidase on the stability of the enzyme. Biochem. (N.Y.) New York. 40 (2.Pt.1.):248-251, 1975.
- 15 - BERTRAND, G. Compt. rend. Acad. Sci. 124:1356, 1897. Apud PAUL, K.G. Peroxidase In: BOYER, P.; LARDY, H.; MYRBACK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.

- 16 - BRUEMMER, J.H.; ROE, B.; BOWEN, E.R. e BUSLIG, B. Peroxidase reactions and orange juice quality. J. Food Sci., Chicago, 41 (1): 186-189, 1976.
- 17 - BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relations to food flavor and quality: a review. J. Food Sci., Chicago, 42 (1): 1-6, 1977.
- 18 - BURNETTE, F.S e FLICK, G.J.JR. Activity and resistance to thermal inactivation of peroxidase in the blue crab (Callinectes sapidus). J. Food Sci., Chicago, 43 (1): 31-34, 1978.
- 19 - CARLSTROM, A. The heterogeneity of lactoperoxidase. Acta Chem. Scand., Kobenhavn, 19 (10): 2387-2394, 1965.
- 20 - CARLSTROM, A. e VESTERBERG, O. Isoelectric focusing and separation of the subcomponents of lactoperoxidase. Acta Chem. Scand., Kobenhavn, 21 (1): 271-278, 1967.
- 21 - CHAN, H.T. JR. e YANG, H.Y. Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the McFarlin cranberry. J. Food Sci., Chicago, 36 (1): 169-173, 1971.
- 22 - CHANCE, B. e MAEHLY, A.C. Assay of Catalases and Peroxidases. In: COLOWICK, S.P. e KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1955, vol 2, p. 764.
- 23 - CHENCHIN, E. E. e YAMAMOTO, H.Y. Distribution and heat inactivation of peroxidase isoenzymes in sweet corn. J. Food Sci., Chicago, 38 (1): 40-42, 1973.

- 24 - CHODAT, R. e BACH, A. Ber. 36: 606, 1903 Apud PAUL, K.G. Peroxidase. In: BOYER, P.D., LARDY, H.; MYR BÄCK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 25 - COMISSÃO ESTADUAL DE PLANEJAMENTO AGRÍCOLA DA PARAI BA. Programa de Produção e Abastecimento da Cultu ra do Abacaxi, 1979/1985, João Pessoa, 1979.
- 26 - CRUESS, W.V. e FONG, W.Y. The effect of pH value and hydrogen Peroxide Concentration on Fruit Oxidase activity. Plant Physiol., Rockville, 4: 363, 1929.
- 27 - DAVIS, W. B. The Distribution and Preparation of Ci trus peroxidase. Amer. J. Botany, Lexington, 29: 252, 1942.
- 28 - DIETRICH, W. C.; LINDQUIST, F. E.; BOHART, G.S. e MORRIS, H. J. Effect of Degree of Enzyne Inactiva tion and Storage Temperature on quality Retention in Frozen Peas. J. Food Res. 20: 480, 1955.
- 29 - DIETRICH, W. C.; HUXSOLL, C.C.; WAGNER, J. R. e GUA DAGNI, D. C. Comparison of microwave with steam or Water blanching of corn-on-the cob. II. Peroxi dase inactivation and flavor retention. Food Te chnol., Chicago, 24 (3): 293-296, 1970.
- 30 - DULL, G. G. The Pineapple: General In: HULME, A. C. The Biochemistry of Fruits and Their Products. New York, Academic Press, 1971, vol 2, p. 303-324.
- 31 - EMBS, R. J. e MARKAKIS, P. Bisulfite effect on the chemistry and activity of horseradish peroxidase. J. Food Sci., Chicago, 34 (6): 500-501, 1969.

- 32 - ESSELEN, W. B. e ANDERSON, E. E. Thermal destruction of Peroxidase in vegetables at high temperatures. J. Food Res. 21: 322-325, 1956.
- 33 - FARKAS, D. F.; GOLDBLITH, S. A. e PROCTOR, B.E. Stopping storage off-flavors by curbing Peroxidase. Food Eng., Radnor, 28 (1): 52-53, 1956.
- 34 - FOX, L.R.; PURVES, W. K. e NAKADA, H.I. The role of Horseradish Peroxidase in Indole-3-acetic Acid Oxidation. Biochemistry, Washington, 4 (12): 2754, 1965.
- 35 - FRENKEL, C. Involvement of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase isozymes from pear, tomato, and blueberry fruit in ripening. Plant Physiol., Rockville, 49 (5): 757-763, 1972.
- 36 - GALSTON, A.W. e BAKER, R.S. e BONNER, J. Flavoprotein and Peroxidase as Components of the indole acetic acid oxidase system of Peas. Arch. Biochem. Biophys., New York, 42: 456-470, 1953.
- 37 - GARDNER, H. W.; INGLETT, G. E. e ANDERSON, R.A. Inactivation of peroxidase as a function of corn processing. Cereal Chem., St. Paul, 46 (6); 626-634, 1969.
- 38 - GASPAR, T.; HOFINGER, M. e LACOPPE, J. Sephadex G-100 chromatography of peroxidases, catalases, phenoloxidases and indole-3-acetic acid oxidases, extracted from Lens and Pisum roots. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 191 (2): 463-465, 1969.
- 39 - GIBRIEL, A. Y.; EL-SAHRIGI SOHEIR, A. F-; KANDIL, H. e ELMANSY, H.A. Effect of pH, sodium choride and sucrose on heat-inactivation and reactivation of

peroxidase in certain foods. J. Sci. Food Agric., London, 29 (3): 261-266, 1978.

- 40 - GKINIS, A. M. e FENNEMA, O. R. Changes insoluble and bound peroxidases during low-temperature storage of green beans. J. Food Sci., Chicago, 43 (2):527-531, 1978.
- 41 - GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.P. e KAPLAN, N.O. methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1955, vol 1, p. 138.
- 42 - GOREN, R. e GOLDSCHMIDT, E. E. Peroxidase activity in citrus tissues. Phytochem., New York, 5: 153, 1966.
- 43 - GORIN, N. e HEIDEMA, F. T. Peroxidase activity in Golden Delicious apples as a possible parameter of ripening and senescence (in storage) J.Agric. Food Chem., Washington. 24 (1): 200-201, 1976.
- 44 - GORTNER, W. A. e KENT, M.J. Indoleacetic Acid Oxidase and an Inhibitor in Pineapple Tissue, J. Biol. Chem., Baltimore, 204: 593, 1953.
- 45 - GORTNER, W.A. e KENT, M.J. The Coenzyme Requirement and Enzyme Inhibitors of Pineapple Indoleacetic Acid Oxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, 233: 731-753, 1958.
- 46 - GORTNER, W. A. e SINGLETON, V. L. Chemical and Physical Development of the Pineapple Fruit. III. Nitrogenous and Enzyme Constituents. J. Food Science, Chicago, 30: 24-29, 1965.

- 47 - GREGORY, R. P: F. 1966. A rapid assay for Peroxidase activity. Biochem. J., London, 101: 582-583, 1966.
- 48 - GUILBAULT, G. G. Eletrochemistry of enzymes. Determination of peroxidase and catalase. Anal. Biochem., Baltimore, 14 (1): 61-70, 1966.
- 49 - GUYER, R. B. e HOLMQUIST, J. W. Enzyme Regeneration in high-temperature-short time sterilized canned foods. Food Technol., Chicago, 8: 547-550, 1954.
- 50 - HAARD, N. F. Upsurge of particulate peroxidase in ripening banana fruit. Phytochem., New York, 12 (3): 555-560, 1973.
- 51 - HAARD, N. F.; CHISM, G. e NAGLE, N. A fluorimetric method for the kinetic assay of indole-3-acetic acid oxidase (horseradish peroxidase). Anal. Biochem., Baltimore, 69 (2): 627-631, 1975.
- 52 - HAARD, N. F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. ACS Symp. Ser., 47 (Enzymes in Food Beverage Process., Symp.) 143-171, 1977.
- 53 - HAMILL, D. E. e BREWBAKER, J. L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. Peroxidase isoenzymes of maize (Zea mays) Physiol. Plant., Copenhagen, 22 (5): 945-958, 1969.
- 54 - IMASEKI, H. Induction of Peroxidase activity by ethylene in sweet potato. Plant Physiol., Rockville, 46: 172, 1970.

- 55 - JEN, J.J. SEO, A. e FLURKEY, W. H. Tomato Peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. J. Food Sci., Chicago, 45 (1): 60-63, 1980.
- 56 - JERMYN, M. A. Horse-Radish peroxidase. Nature London, 169: 488-489, 1952.
- 57 - JERMYN, M.A. e THOMAS, R. Multiple Components in horse-radish peroxidase. Biochem. J., London, 56: 631, 1954.
- 58 - JIMÉNEZ, M. A. A study of oxidizing enzymes of guava. J. Food Res. 12: 300, 1947.
- 59 - JOFFE, F. M. e OLIN BALL, C. Kinetics of thermal inactivation and the regeneration rates of peroxidase systems. J. Food Sci., Chicago, 27: 587-592, 1962.
- 60 - JOSLYN, M. A.; MARSH, G. L. The role of peroxidase in the deterioration of frozen fruits and vegetables. Science, Washington, 78: 174, 1933.
- 61 - JOSLYN, M. A. Enzyme activity in frozen vegetables. Science, Washington, 94: 174, 1949.
- 62 - _____ Enzyme activity in frozen vegetable tissue. Advances in Enzymol. 9: 613-652, 1949.
- 63 - _____ Report on peroxidase in frozen vegetables. J. Assoc. Offic. Agric. Chem. 33 (3): 504, 1950.
- 64 - JOSLYN, M. A. e ZUEGG, E. Report on peroxidase in frozen vegetables. Ascorbic acid oxidation methods of determining peroxidase activity. J. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 39: 267, 1959.
- 65 - JOSLYN, M. A. Report on peroxidase in frozen vegetables. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 40: 338, 1957.

- 66 - KAY, E.; SHANNON, L. M. e LEW, J. Y. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. II. Catalytic properties. J. Biol. Chem., Baltimore, 242 (10): 2470-2473, 1967.
- 67 - KEILIN, D.; MANN, T. Proc. Roy. Soc. 122B, 199, 1937. Apud PAUL, K. G. Peroxidases In: BOYER, P.D.; LARDY, H. e MYRBACK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 68 - KEILIN, D. e HARTREE, E. F. Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. Biochem. J., London, 49: 88-104, 1951.
- 69 - KENTEN, R. H. e MANN, P.J.G. A simple method for the preparation of horseradish peroxidase. Biochem. J., London, 57: 347-348, 1954.
- 70 - KENTEN, R. H. The oxidation of indolyl-3-acetic acid by Waxpod bean root sap and peroxidase systems. Biochem. J., London, 59: 110-121, 1955.
- 71 - _____ The oxidation of β -(3-Indolyl) propionic acid and β -(3-Indolyl)-n-butyric acid by peroxidase and Mn^{2+} . Biochem. J., London, 61: 353, 1955.
- 72 - KLAPPER, H. M. e HACKETT, D. P. The multiple components of commercial horseradish peroxidase Biochem Biophys Acta, Amsterdam, 96 (2): 272-282, 1965.
- 73 - KOKKINAKIS, D. M. e BROOKS, J. L. Tomato peroxidase. Purification, characterization and catalytic properties. Plant Physiol., Rockville, 63 (1): 93-99, 1979.
- 74 - KON, S. e WHITAKER, J. R. Separation and partial

characterization of the peroxidases of Ficus glabrata latex. J. Food Sci., Chicago, 30: 977-985, 1965.

- 75 - KUHN, R.; HAND, D. e FLORKIN, M. Z. physiol. Chem. 201: 255, 1931 Apud PAUL, K.G. Peroxidases. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. The Enzymes, 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol. 8, p. 227-274.
- 76 - LABBEE, M. D. e ESSELEN, W. B. Effect of peroxidase concentration, acidity and storage temperature on the development of off-flavors in fresh pack pickles. Food Tech., 8: 50-54, 1954.
- 77 - LANZANI, G. A. e GALANTE, E. Peroxidase activities from Wheat embryo ribossomes. Arch. Biochem. Biophys., New York, 106: 20-24, 1964.
- 78 - LEE, Y. C. e HAMMES, J. K. Heat inactivation of peroxidase in corn-on-the cob. J. Food Sci., Chicago, 44 (3): 785-787, 1979.
- 79 - LING, A. C. e LUND, D. B. Determining Kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isoenzymes from thermal destruction curves. J. Food Sci., Chicago, 43 (4): 1307-1310, 1978.
- 80 - LINOSSIER, M. G. Compt. rend. soc. biol. 50: 373, 1978 Apud PAUL, K. G. Peroxidases. In: BOYER P. D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. The Enzymes, 2a.ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 81 - LIU, E. H. e GIBSON, D. M. Visualization of peroxidase isoenzymes with eugenol, a noncarcinogenic substrate (Horseradish, maize, peas) Anal. Biochem., Baltimore, 79 (1/2): 597-601, 1977.

- 82 - LOEW, O. U. S. Dept. Agr. Rept. N° 68: 47, 1901
 Apud PAUL, K. G. Peroxidases. In: BOYER, P. D.;
 LARDY, H.; MYRBACK, K. The Enzymes 2a. ed. New
 York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 83 - LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. e FARR, A. L. Pro
 tein measurement with the Folin Phenol Reagent. J.
Biol. Chem., Baltimore, 193: 265-275, 1951.
- 84 - LU, A. e WHITAKER, J. R. Factors affecting rates of
 heat inactivation and reactivation of horseradish
 peroxidase. J. Food Sci., Chicago, 39 (6): 1173-
 1178, 1974.
- 85 - MACNICOL, P. K. Peroxidases of the Alaska pea (Pisum
sativum) Enzimic properties and distribuiton wi
 thin the plant. Arch. Biochem. Biophys., New York,
117 (2): 347-356, 1966.
- 86 - MACRIS, B. J. e MARKAKIS, P. Post-irradiation inacti
 vation of HRP. J. Food Sci., Chicago, 36 (5): 812-
 815, 1971.
- 87 - MAEHLI, A. C. e CHANCE, B. The assay of catalases and
 peroxidases In: GLICK, D. Methods of Biochemical
Analysis. New York, Interscience Publishers, 1954,
 vol 1, p. 357.
- 88 - MAEHLI, A. C. Plant Peroxidase In: COLOWICK, S. P. e
 KAPLAN, N. O. Methods in Enzymology. New York,
 Academic Press, 1955, vol 2, p. 801.
- 89 - _____ Experiments With peroxidase. III. Recombina
 tion of hemin and protein to the active enzyme.
Arch. Biochem. Biophys., New York, 56: 507, 1955.

- 90 - MAIER, V. P.; TAPPEL, A. L. e VOLMAN, D. H. Reversible inactivation of enzymes at low temperatures. Studies of temperature dependence of phosphatase and peroxidase catalyzed reactions. J. Am. Chem. 77: 1278-1280, 1955.
- 91 - MARSHALL, M. e CHISM, G. W. A comparison of the suitability of three hydrogen donors in the determination of peroxidase activity. J. Food Sci., Chicago, 44 (3): 942,943, 1979.
- 92 - McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. The effect of heat on cabbage and Brussels sprout peroxidase enzymes. Food Chem. Essex 7: 257, 1981.
- 93 - MIHALYI, K. e VAMOS-VIGYAZO, L. Determination, localization and heat inactivation of peroxidase in some vegetables. Acta Aliment. Acad. Sci. Hung., Budapest, 4 (3): 291-308, 1975.
- 94 - MORITA, Y. e KAMEDA, K. Studies on Phytoperoxidase. X. Carbohydrate composition of crystalline japanese radish peroxidase a. Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., Kyoto, 14: 49-60, 1958.
- 95 - _____ Studies on Phyto-Peroxidase part XII. Amino Acid composition of japanese radish peroxidase a. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan. 23 (1): 28-33, 1959.
- 96 - NAGLE, N. E. e HAARD, N. F. Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit. J. Food Sci., Chicago, 40 (3): 576-579, 1975.
- 97 - NAVEH, D.; MIZRAHI, S.; KOPELMAN, I. J. Quantitative Determination of Peroxidase in Sweet Corn by hemiluminescence. J. Agric. Food Chem., Washington, 29: 36, 1981.

- 98 - NEBESKY, E. A.; ESSELEN, W. B. JR.; KAPLAN, A. M. e FELLERS, C. R. Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods. J. Food Res. 15: 114, 1950.
- 99 - NEBESKY, E. A.; ESSELEN, W. B. JR. e FELLERS, C. R. Studies on the Peroxidase in Pickles and Peas. Food Tech., Chicago, 5 (3): 110-113, 1951.
- 100 - NOVACKY, A. e HAMPTON, R. E. The effect of substrate concentration on the visualization of isoperoxidas es in disc electrophoreses. Phyto Chem., New York, 7: 1143, 1968.
- 101 - PAUL, K. G. e AVI-DOR, Y. The assay of peroxidase with mesidine as the hidrogen donor. Acta Chem. Scand., Kobenhavn, 8: 649-657, 1954.
- 102 - PAUL, K. G. Peroxidases. In: BOYER, P. D.; LARDY, H. e MYRBÄCK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963. vol 8, p. 227-274.
- 103 - PAUL, K. G. e STIGBRAND, T. Four isoperoxidas es from horseradish root. Acta Chem. Scand., Kobenhavn, 24 (10): 3607, 1970.
- 104 - Peroxidase (Horseradish) In: WORTHINGTON BIO CHEMICAL CORPORATION, Descriptive Manual, Freehold, 1961, N^o 11, p. 4-67.
- 105 - PINSENT, B. R. W. Peroxidase regeneration and its effect on quality in frozen peas and thawed peas. J. Food Sci., Chicago, 27: 120-125, 1962.

- 106 - RACKIS, J. J.; HONIG, D. H.; SESSA, D. J. e MOSER, H. A. Lipoxygenase and peroxidase activities of soybeans as related to the flavor profile during maturation. Cereal Chem., St. Paul, 49 (5): 586-597, 1972.
- 107 - RACUSEN, D. e FOOTE, M. Peroxidase isoenzymes in bean leaves by preparative disc eletrophoresis. Can. J. Bot., Ottawa, 44: 1633, 1966.
- 108 - RANADIVE, A. S. e HAARD, N. F. Peroxidase Localiza tion and Lignin Formation in Developing pear Fruit. J. Food Sci., Chicago, 37: 381, 1972.
- 109 - RAY, P. M. The destruction of indoleacetic acid III; Relationships between peroxidase action and indo leacetic acid oxidation. Arch. Biochem. Biophys., New York, 87: 19, 1960.
- 110 - REDDI, R. R.; ESSELEN, W. B. JR. e FELLERS, C. R. 1950 Peroxidase activity of apple tissue. Food Tech., Chicago, 4 (2): 63, 1950.
- 111 - ROSENQVIST, U e PAUL, K. G. The transfer of hematin from horse myoglobin to horse-radish apoperoxida se. Acta. Chem. Scand., Kobenhavn, 18 (7): 1802, 1964.
- 112 - ROSOFF, H. D. e CRUESS, W. V. The oxidase of cauli flower. J. Food Res. 14: 283, 1949.
- 113 - ROTHE, M. Versuche zur Aufklärung der Bitter-stoff-bildung in Getreideproduktion. Ernaehrungsforchung 1: 315, 1956 Apud Cereal Chem., St. Paul, 49: 586, 1972.

- 114 - SAE, S. W.; KADOUM, A. M. e CUNNINGHAM, B. A. Purification and some properties of grain esterase and peroxidase. Phytochem., New York, 10 (1): 1, 1971.
- 115 - SCHWIMMER, S. Regeneration of Heat-Inactivated peroxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, 154: 487, 1944.
- 116 - SCHOENBEIN, C. F. Verhandl. naturforsch. Ges. Basel. 1: 339, 1855 Apud PAUL, K. G. Peroxidases. In: BOYER, P. D.; LARDY, H. e MYRBÄCK, K. The Enzymes 2a. ed. New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 117 - SCOTT, D. Oxidoreductases. In: REED, G. Enzymes in Food Processing, New York, Academic Press, 1975, p. 243-247.
- 118 - SESSA, D. J.; ANDERSON, R. L. Soybean Peroxidases: Purification and Some Properties. J. Agric. Food Chem. Washington, 29: 960, 1981.
- 119 - SHANNON, L. M.; KAY, E. e LEW, J. Y. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. J. Biol. Chem., Baltimore, 241 (9): 2166, 1966.
- 120 - SHINSHI, H. e NOGUCHI, M. Relationships between peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase. Phytochem., New York, 14: 1255, 1975.
- 121 - SIEGEL, S. M. e GALSTON, A. W. 1955. Peroxide genesis in plant tissues and its relation to indoleacetic acid destruction. Arch. Biochem. Biophys., New York, 54: 102, 1955.

- 122 - SIEGEL, B. Z. e GALSTON, A. W. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. Science, Washington, 157: 1557, 1967.
- 123 - _____ The isoperoxidases of Pisum sativum. Plant Physiol., Rockville, 42 (2): 221, 1967.
- 124 - SIGNORET, A.; CROUZET, J. Tomato Peroxidase: Purification by Affinity chromatography. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 46 (2): 459, 1982.
- 125 - SRIVASTAVA, O. P. e VAN HUUSTEE, R. B. IAA Oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes. Phytochem., New York, 16 10: 1527, 1977.
- 126 - STAFFORD, H. A. e BRAVINDER-BREE, S. Peroxidase isozymes of first internodes of Sorghum Tissue and intracellular localization and multiple peaks of activity isolated by gel filtration chromatography. Plant Physiol., Rockville, 49: 950, 1972.
- 127 - STUBER, C. W. e LEVINGS III, C. S. Auxin Induction and Repression Isozymes in Oats (*Avena sativa* L.) Crop. Sci., Madison, 9: 415, 1969.
- 128 - SUMNER, J. B. e HOWELL, S. F. Enzymologia 1:133, 1936 Apud THEORELL, H. The Iron Containing Enzymes B. Catalases and Peroxidases. "Hydroperoxidases". In: SUMNER, J. B. e MYRBÄCK, K. The Enzymes. New York, Academic Press, 1951, vol 2, part 1, p. 397-427.
- 129 - SUMNER, J. B. e GJESSEING, E. C. A method for the determination of peroxidase activity. Arch. Biochem., New York, 2: 291, 1943.

- 130 - TAMURA, Y. e MORITA, Y. Thermal denaturation and re generation of Japanese-radish peroxidase. J. Biochem., (Tokyo), Tokyo, 78 (3): 561, 1975.
- 131 - TAUBER, H. Crystalline Catalase, a peroxidase. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 81: 237, 1952.
- 132 - THEORELL, H.; SWEDIN, B. Naturwiss 27: 95, 1939 Nature 145: 71, 1940, Apud: PAUL, K. G. Peroxidases In: BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. (ed) The Enzymes 2a. ed, New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 133 - THEORELL, H. Crystalline Peroxidase Enzymologia, The Hague, 10: 250, 1942.
- 134 - _____ Heme-Linked groups and mode of action of some hemeproteins. Advances in Enzymol., 7: 265, 1947.
- 135 - _____ The Iron - Containing Enzymes. B. Catalases and Peroxidases. "Hydroperoxidases" In: SUMNER, J. B. e MYRBÄCK, K. The Enzymes. New York, Academic Press, 1951, vol 2, part 1, p. 397-427.
- 136 - THOMAS, R. L.; JEN, J. J.; MORR, C. V. Changes in Soluble and Bound Peroxidase - IAA Oxidase During Tomato Fruit Development. J. Food Sci., Chicago, 47 (1): 158, 1981.
- 137 - THURLOW, S. B J 19: 175, 1925 Apud PAUL, K. G. Peroxidases In: BOYER, P. D.; LARDY, H. e MYRBÄCK, K. The Enzymes, 2a. ed, New York, Academic Press, 1963, vol 8, p. 227-274.
- 138 - UGAROVA, N. N. e LEBEDEVA, O. V. Structure and functions of horseradish peroxidase. Biochemistry (N.Y.) 43 (10, Pt. 1): 1363, 1979.

- 139 - VAMOS-VIGYÁZÓ, L.; FARKAS, J.; BABOSSZEBENYI, É. A study into some properties of peroxidase in vegetables. Acta Alimentaria, Budapest 9 (1): 11, 1980.
- 140 - VETTER, J. L.; NELSON, A. I. e STEINBERG, M. P. Heat inactivation of sweet corn peroxidase in the temperature range of 210^o to 310^oF. Food Tech., Chicago, 12: 244, 1958.
- 141 - VETTER, J. L.; STEINBERG, M. P. e NELSON, A. I. Quantitative Determination of Peroxidase in Sweet corn. J. Agr. Food Chem., Washington, 6 (1): 39-41, 1958.
- 142 - VETTER, J. L.; NELSON, A. I. e STEINBERG, M. P. Heat inactivation of peroxidase in HTST processed Whole kernel corn. Food Tech., Chicago, 13²: 410, 1959.
- 143 - WANG, S. S.; DIMARCO, G. R. Isolation and characterization of the native, thermal inactivated, and regenerated horse radish peroxidase isoenzymes. J. Food Sci., Chicago, 37 (4): 574, 1972.
- 144 - WAGENKNECHT, A. C. e LEE, F. A. Enzyme action and off-flavour in frozen peas. J. Food Res., 23: 25, 1958.
- 145 - WHITMORE, F. W. Effect of indoleacetic acid and hydroxyproline on isoenzymes of peroxidase in Wheat coleoptiles. Plant Physiol., Rockville, 47: 169, 1971.
- 146 - WILDER, C. J. Factors affecting heat inactivation and partial reactivation of peroxidase purified by ion-exchange chromatography. J. Food Sci., Chicago, 27: 567, 1962.

- 147 - WILLSTATER, R. e STOLL, A. Ann. Chem. 416: 21, 1918
Apud Arch Biochem., New York, 2: 291, 1943.
- 148 - YAMAMOTO, H. Y. et alii Kinetic studies on the heat
inactivation of peroxidase in sweet corn. J. Food
Sci., Chicago, 27: 113, 1962.
- 149 - ZMRHAL, Z. e MACHACKOVA, I. Isolation and characteri
zation of Wheat peroxidase isoenzyme B.1. Phytoche
mistry, New York, 17 (9): 1517, 1978.
- 150 - ZOUEIL, M. E. e ESSELEN, W. B. Thermal destruction
rates and regeneration of peroxidase in green
beans and turnips. J. Food Res., 24: 119, 1959.

IGURA 1

ROMATOGRAFIA DA PEROXIDASE SEMI-PURIFICADA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

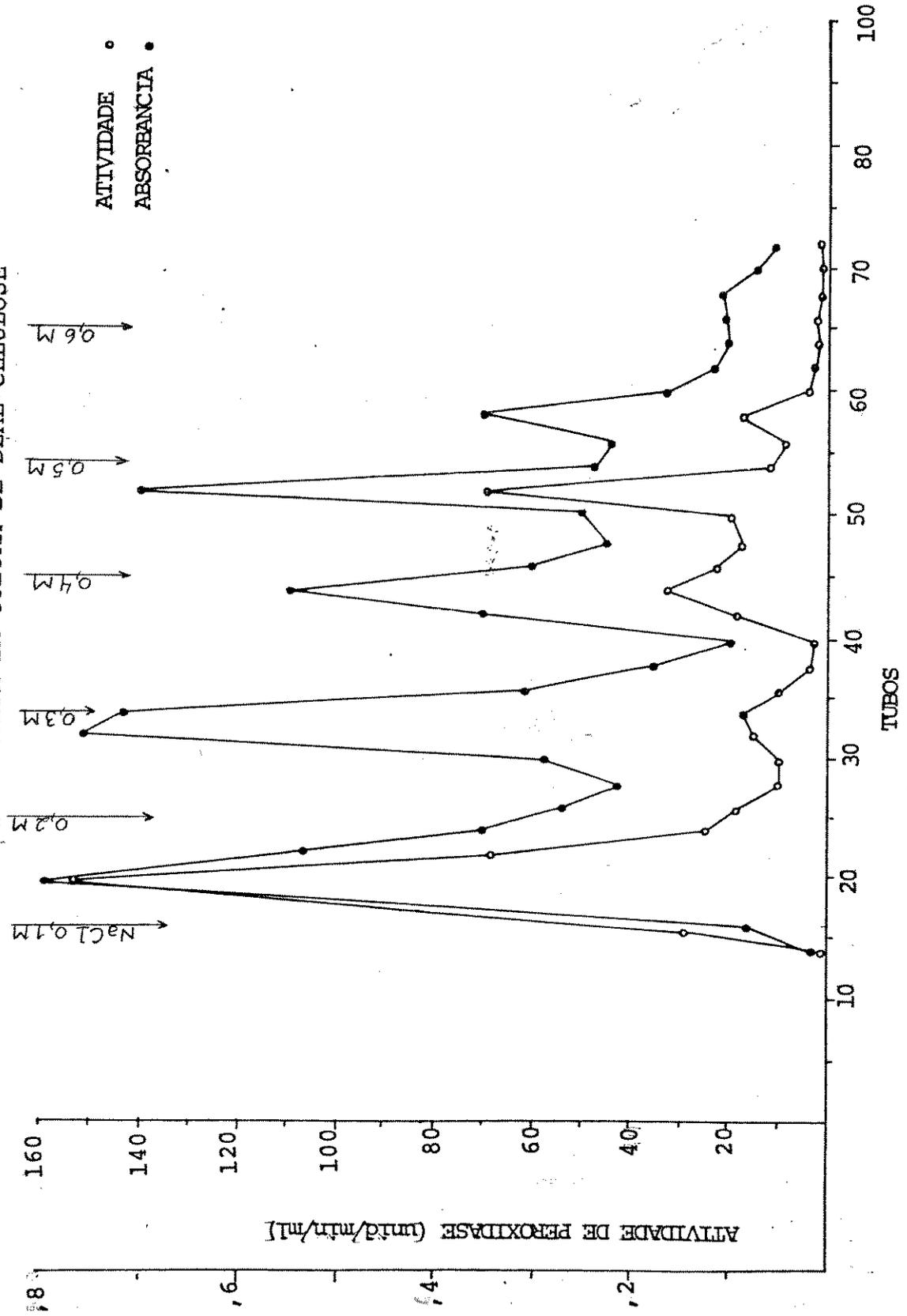


FIGURA 2

CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO I EM COLUNA DE CM-CELULOSE

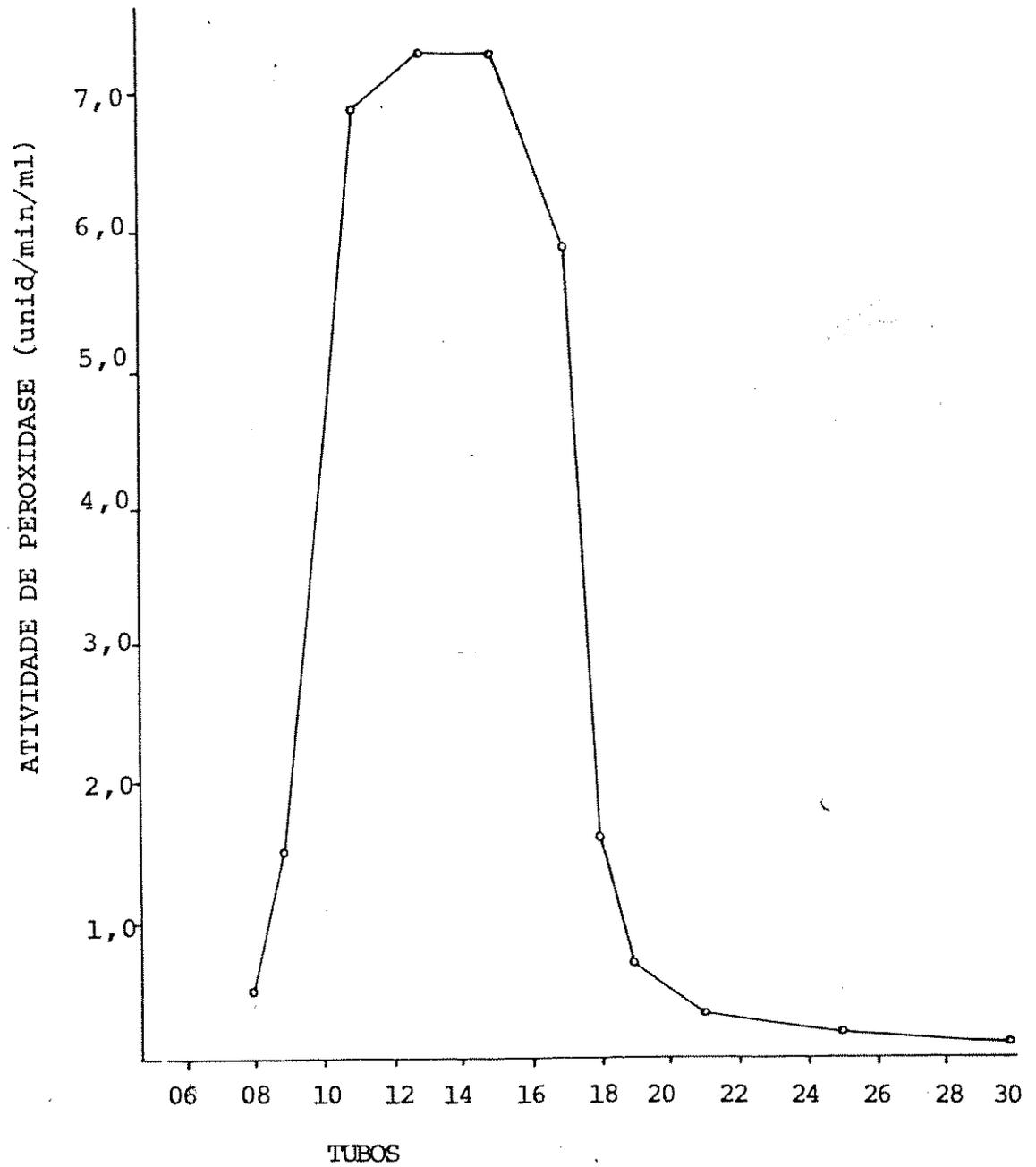


FIGURA 3

CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO II EM COLUNA DE CM-CELULOSE

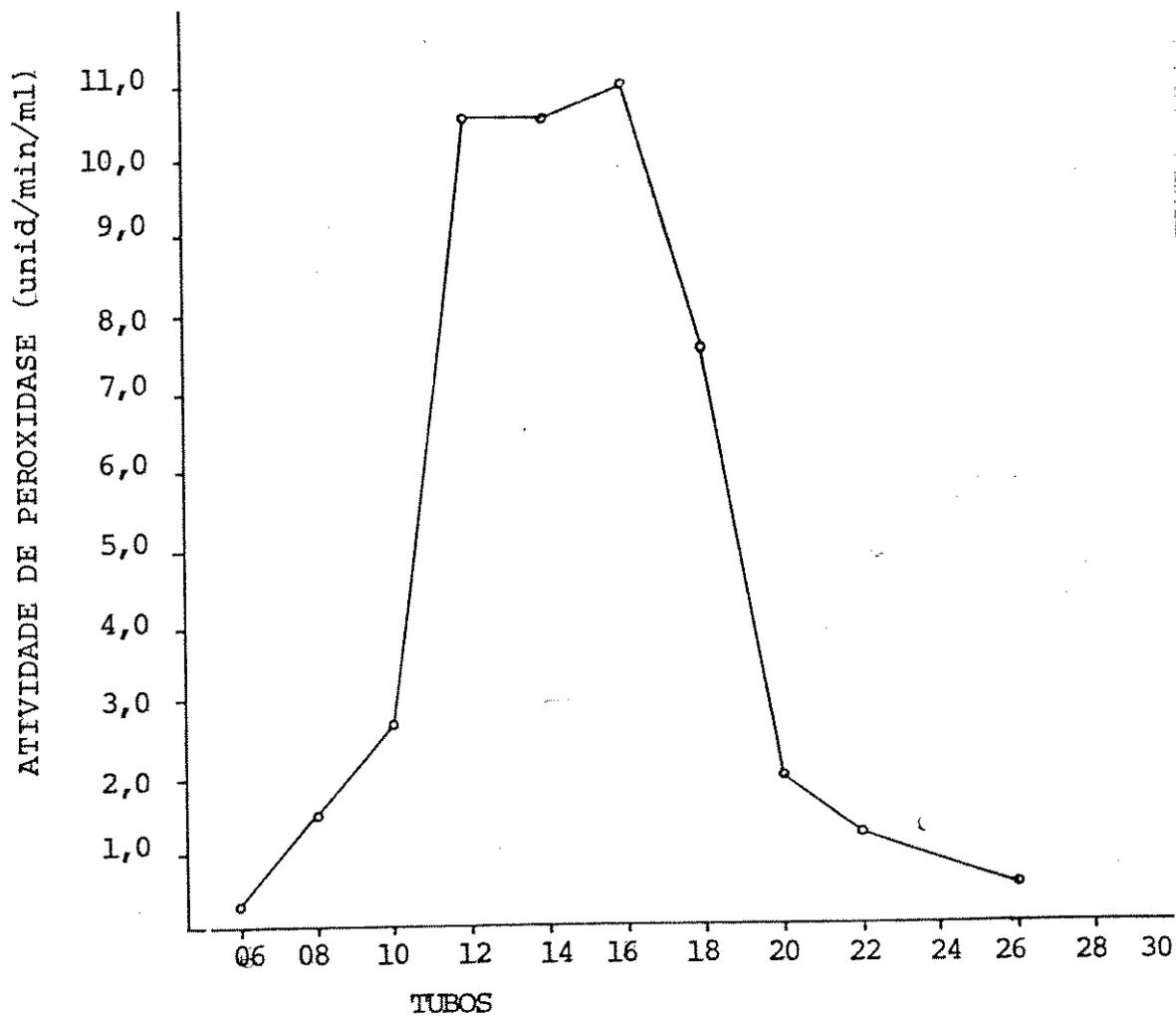


FIGURA 4

CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO III EM COLUNA DE CM-CELULOSE.

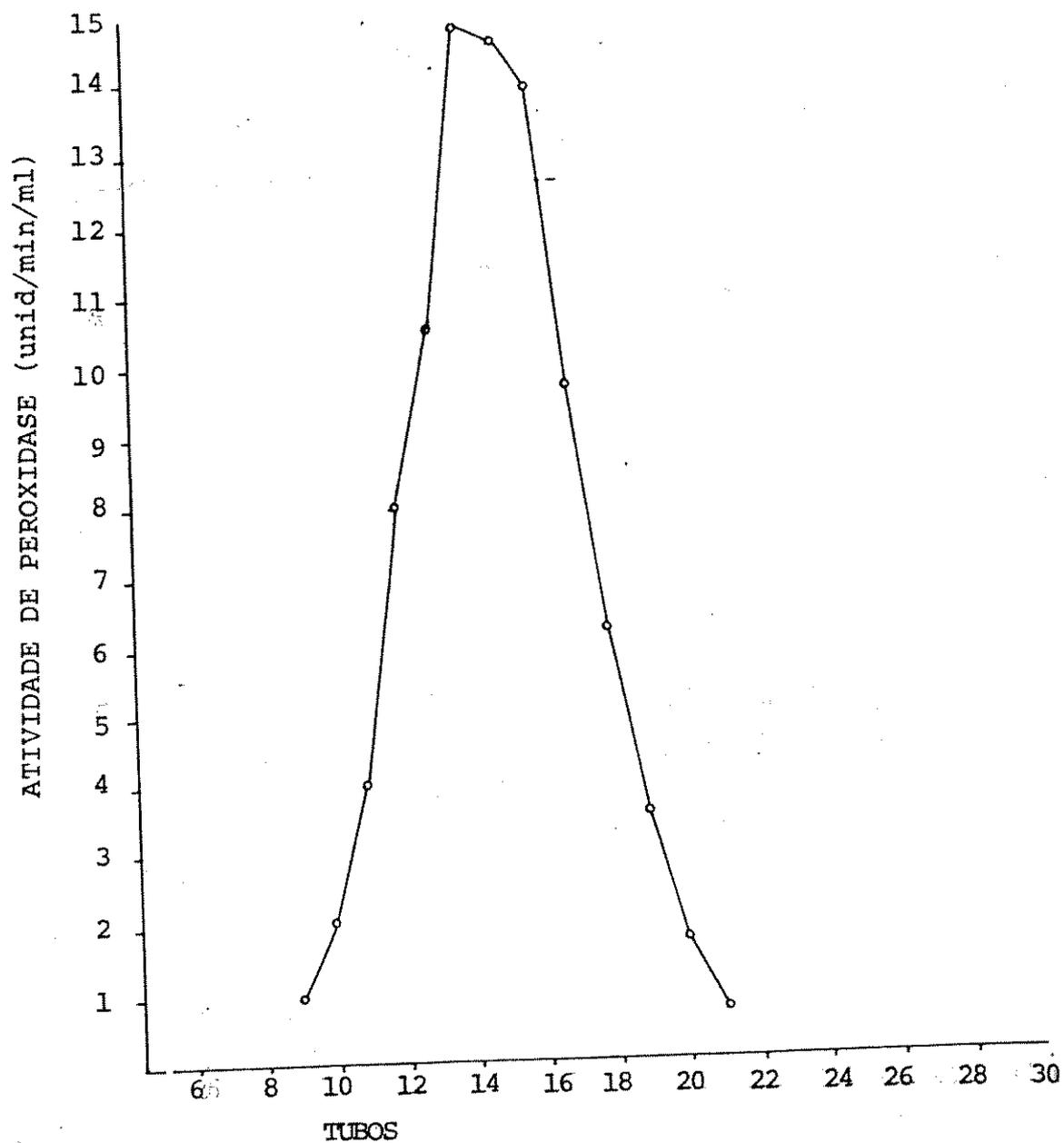


FIGURA 5

CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO IV EM COLUNA DE CM-CELULOSE.

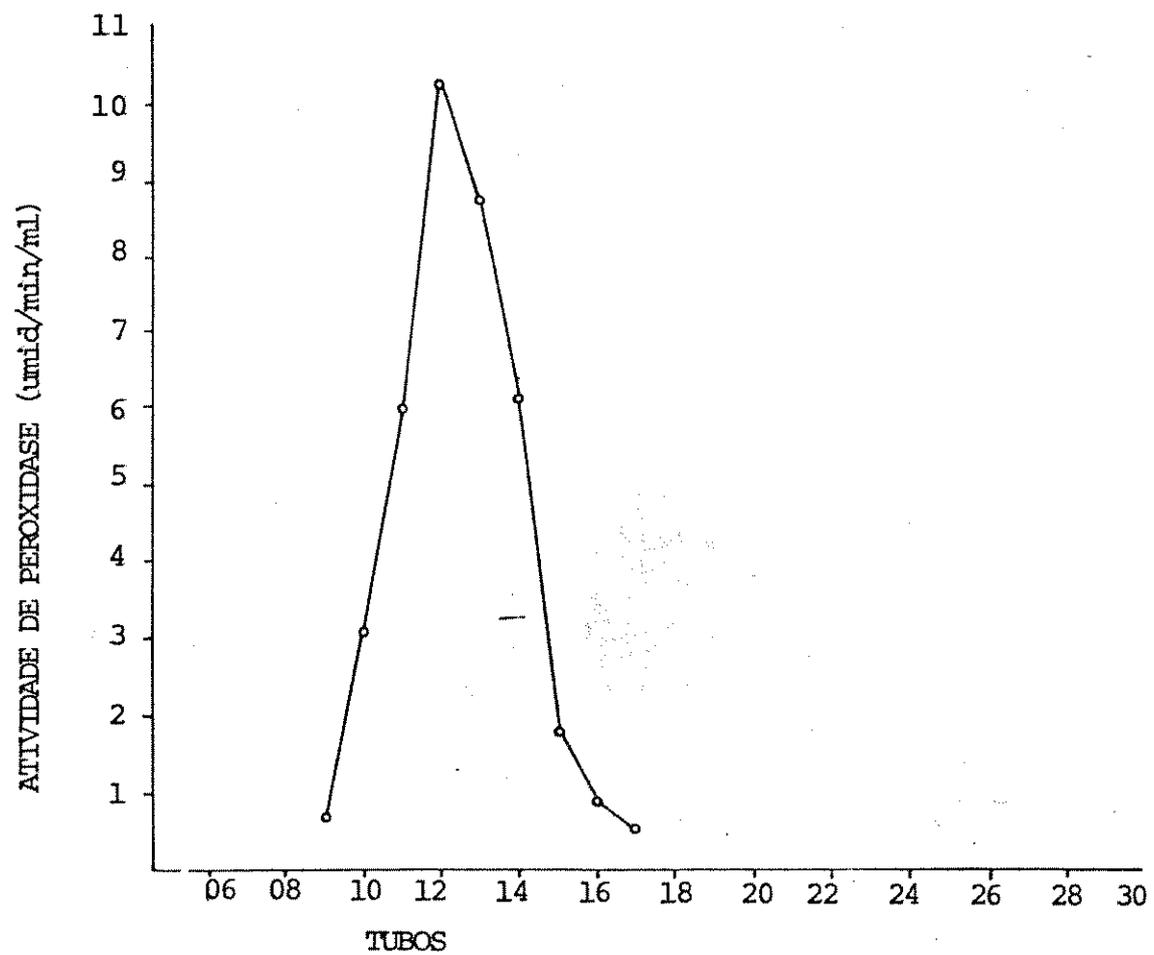


FIGURA 6

- CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO NÃO ABSORVIDA EM DEAE-CELULOSE, EM COLUNA CM-CELULOSE.

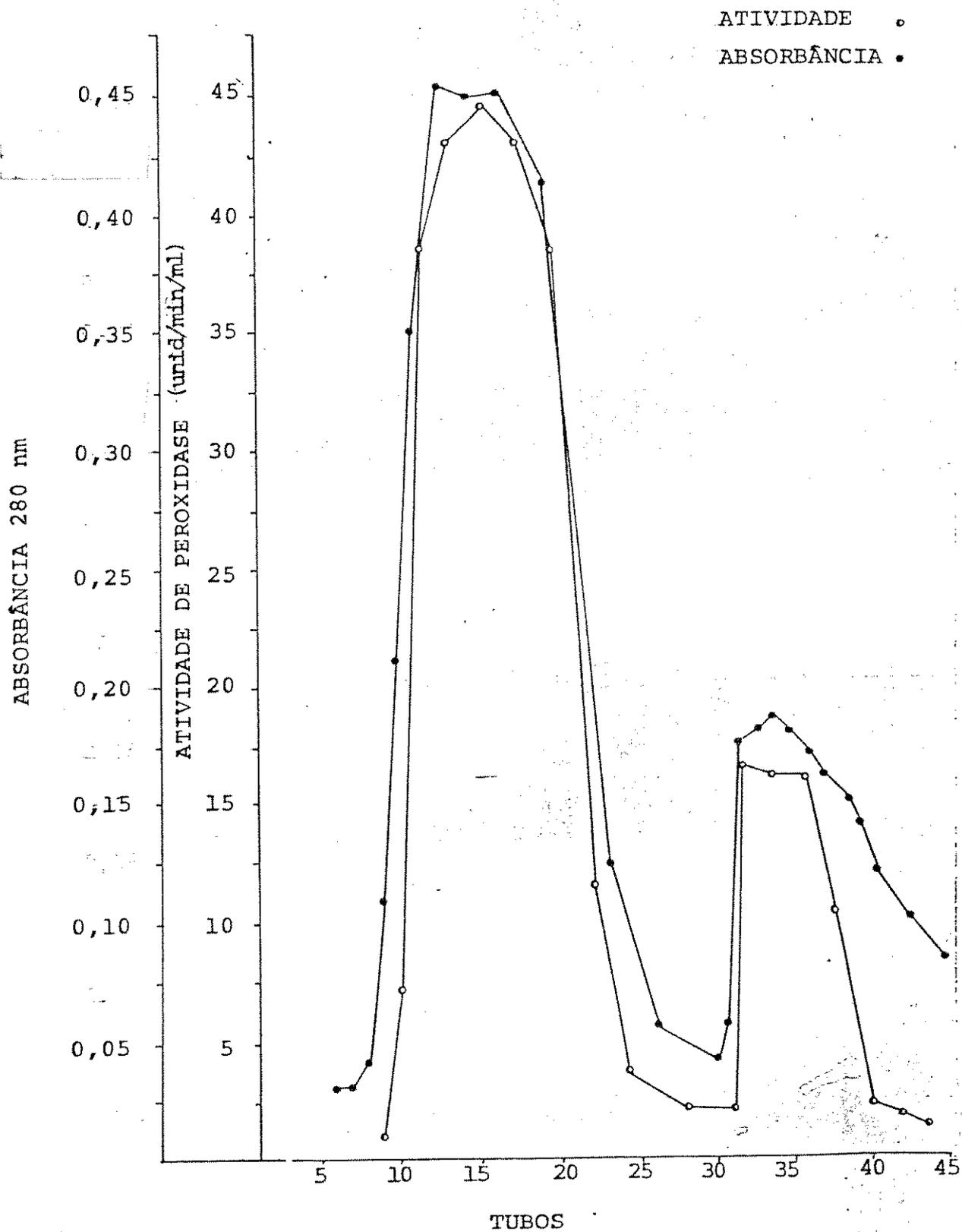


FIGURA 7

DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA PEROXIDASE OBTIDA PELO FRA
CIONAMENTO COM SULFATO DE AMONIO.

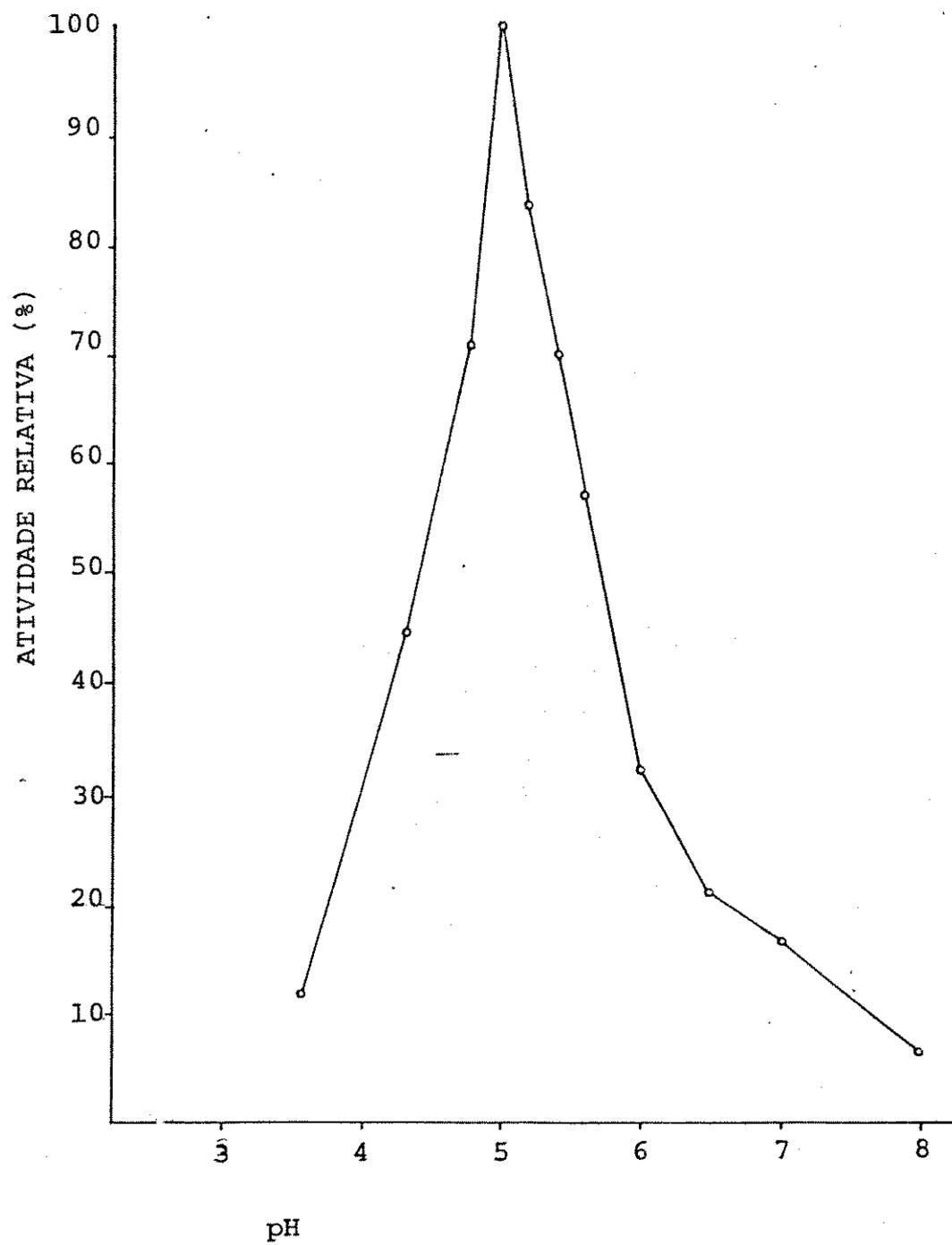


FIGURA 8

DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DAS VÁRIAS FRAÇÕES DA PEROXI
DASE APÓS PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE
CM-CELULOSE.

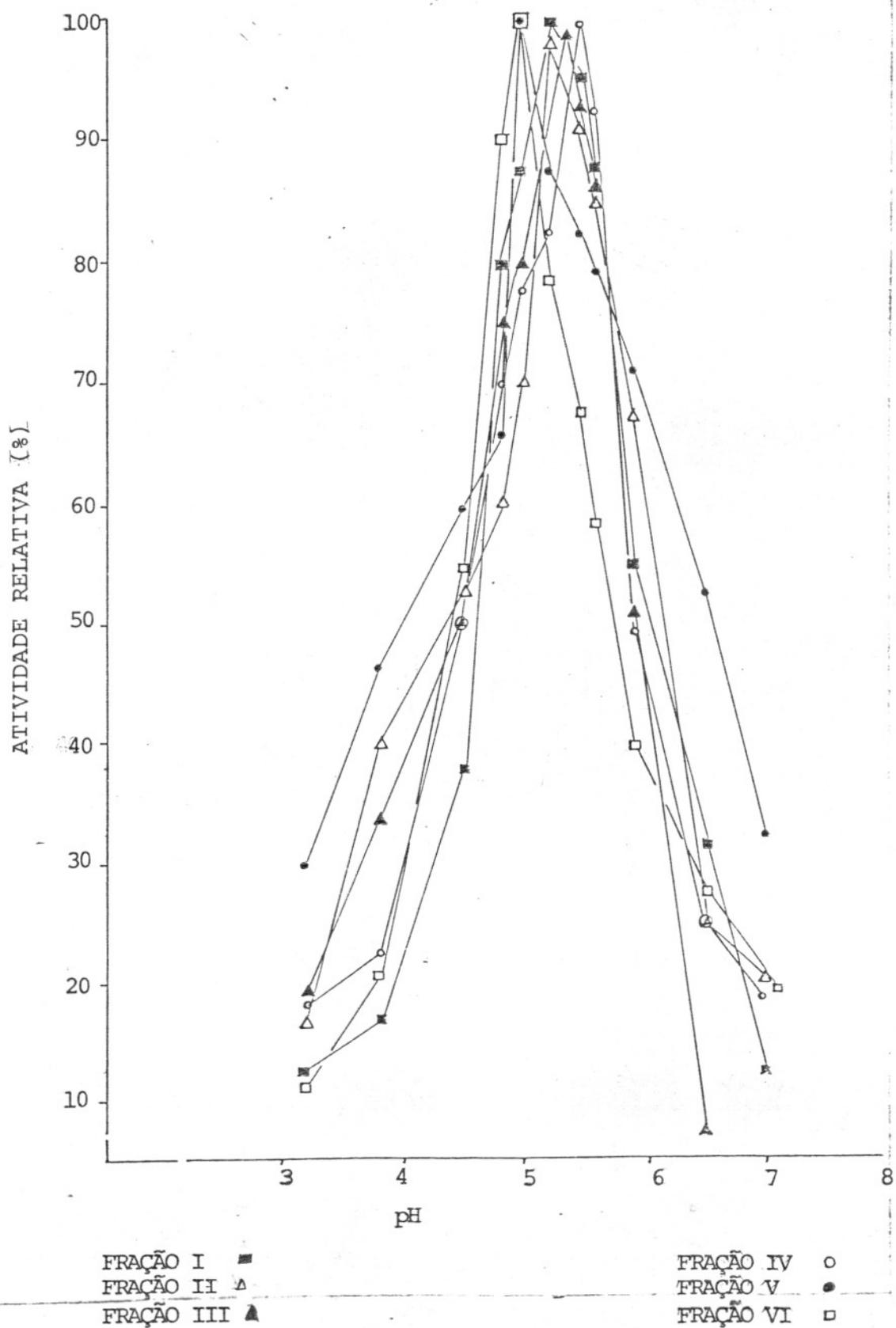


FIGURA 9

TERMO-ESTABILIDADE DA PEROXIDASE DO ABACAXI A 75°C

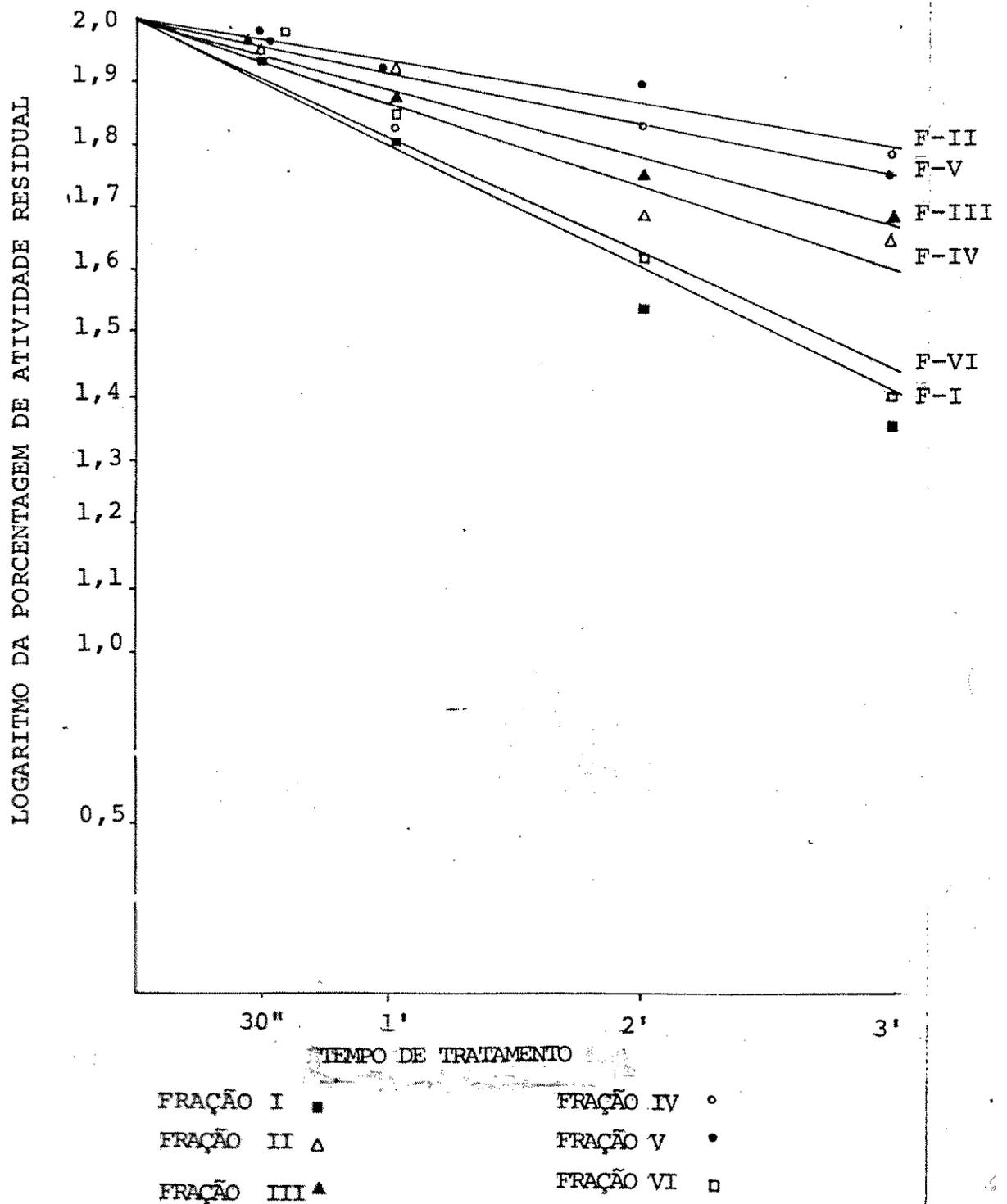
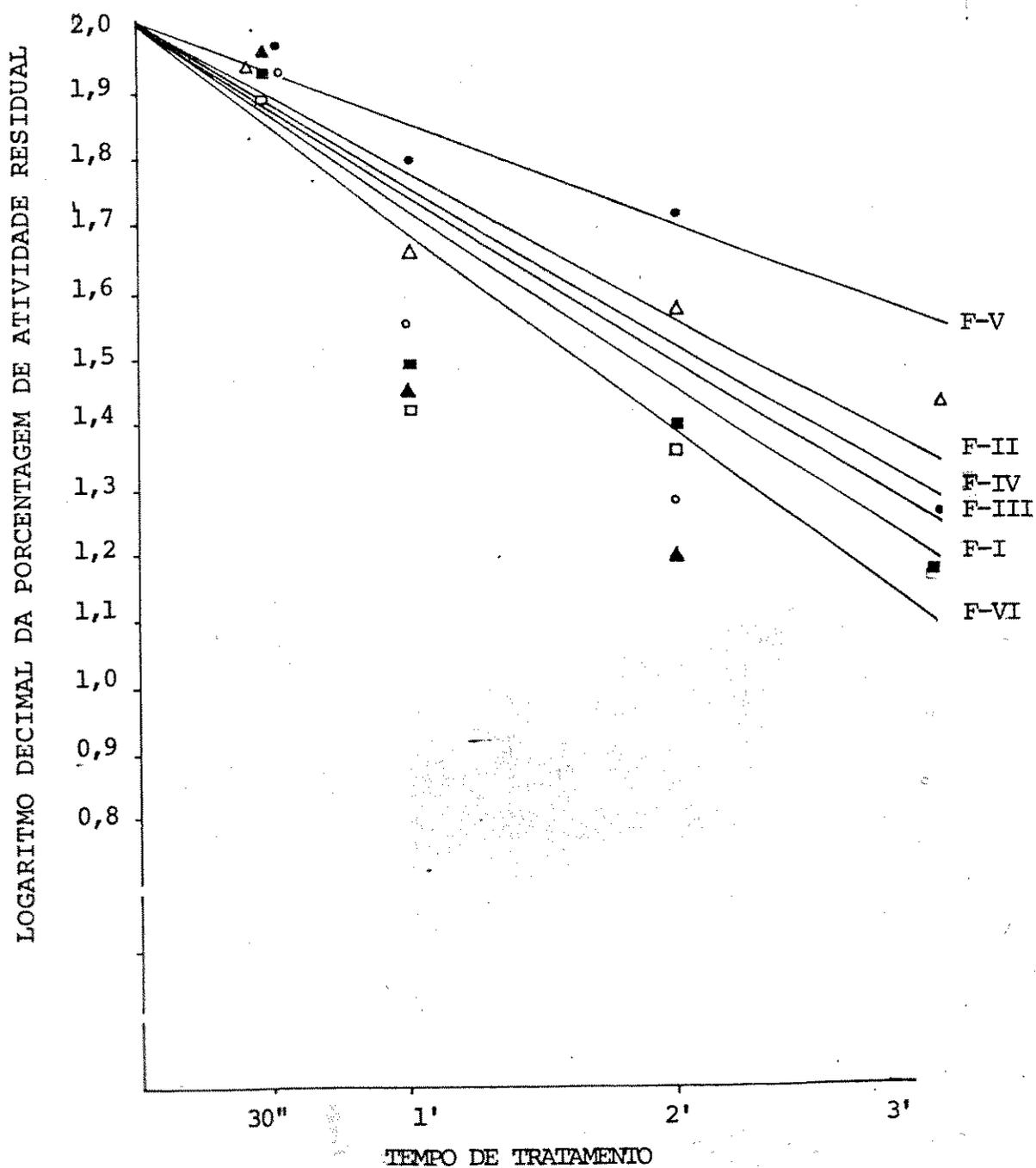


FIGURA 10

TERMO-ESTABILIDADE DA PEROXIDASE DO ABACAXI A 80°C



FRAÇÃO I ■
 FRAÇÃO II △
 FRAÇÃO III ▲

FRAÇÃO IV ○
 FRAÇÃO V ●
 FRAÇÃO VI □

FIGURA 11

TERMO-ESTABILIDADE DA PEROXIDASE DO ABACAXI A 85°C

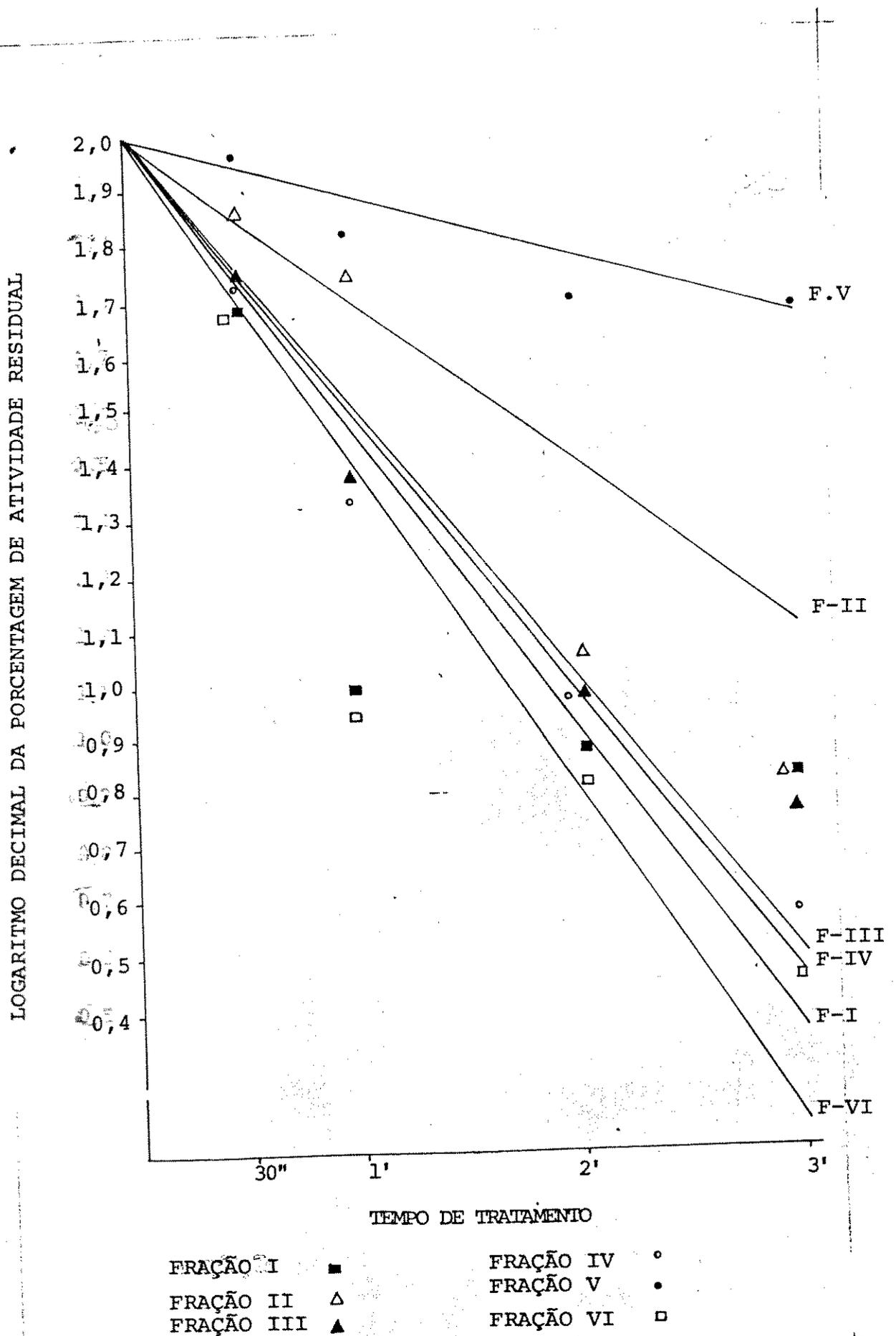
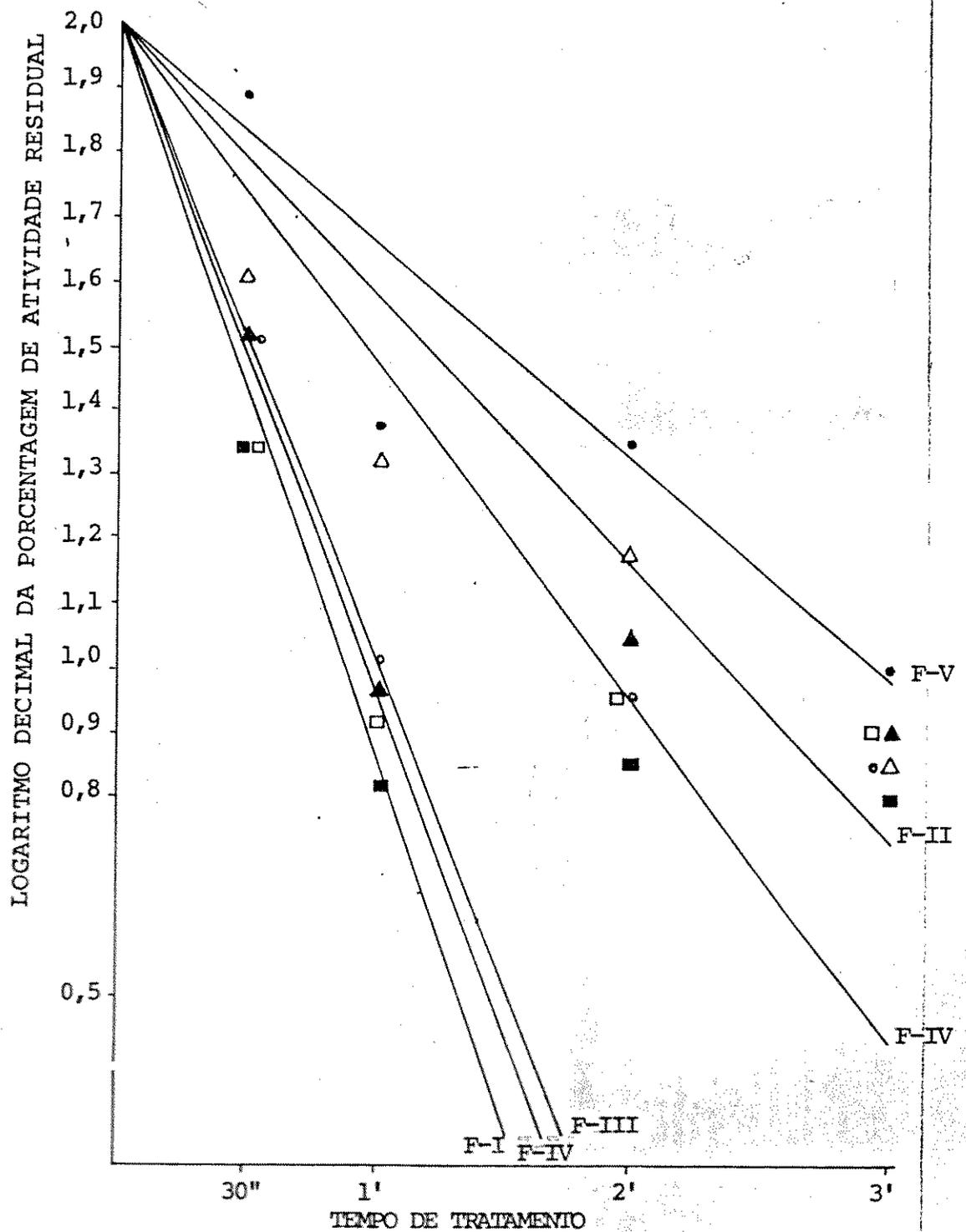


FIGURA 12

TERMOESTABILIDADE DA PEROXIDASE DO ABACAXI A 90°C



FRAÇÃO I ■
 FRAÇÃO II △
 FRAÇÃO III ▲

FRAÇÃO IV ○
 FRAÇÃO V ●
 FRAÇÃO VI □

FIGURA 13

GRÁFICO DE ARRHENIUS PARA A INATIVAÇÃO DAS VÁRIAS FRAÇÕES DA PEROXIDASE DO ABACAXI

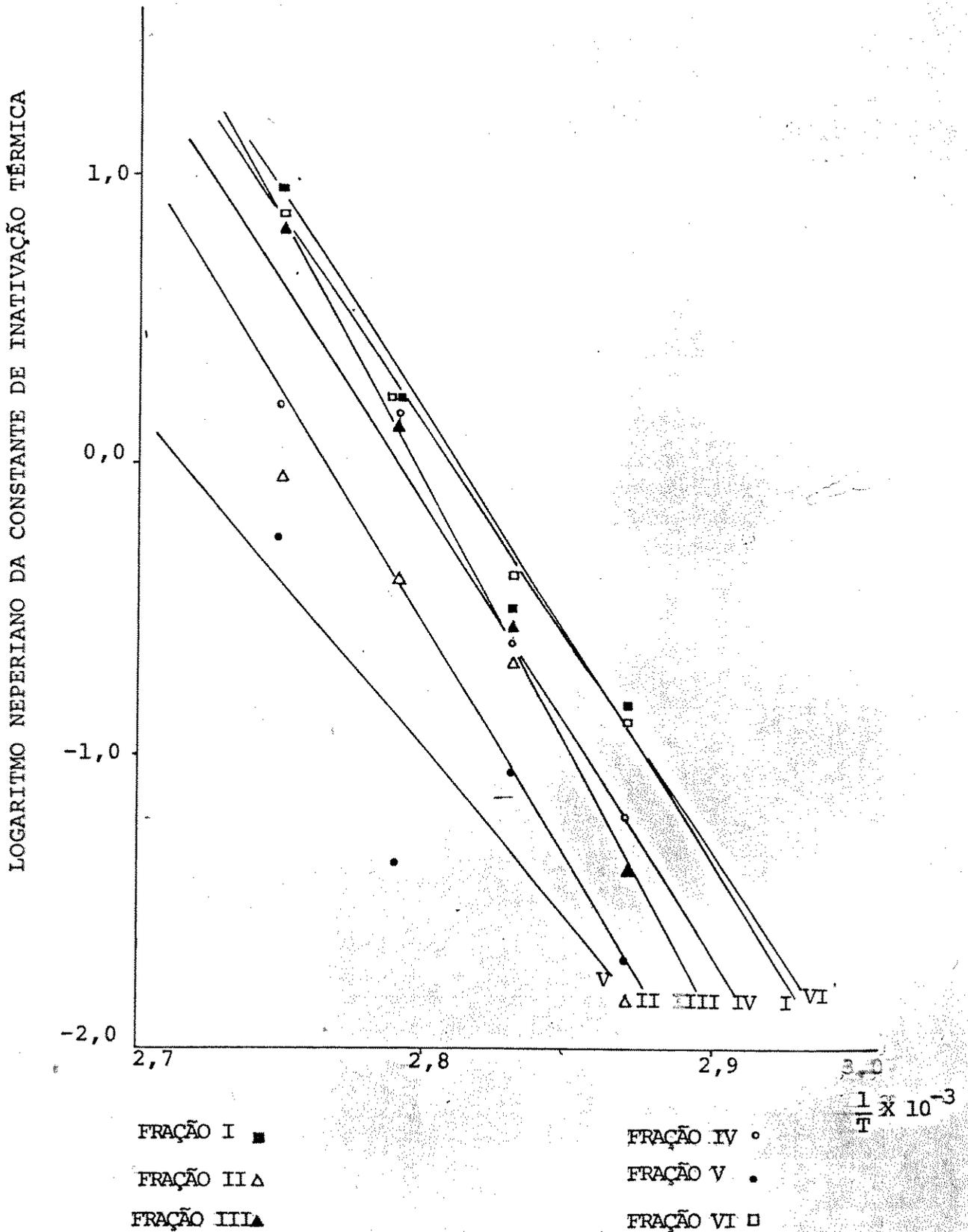


TABELA I - Determinações realizadas no suco do abacaxi fil
trado.

Volume Total (ml)	Proteína Total (mg)	Atividade total (Unidades de pe roxidase/minuto)	Atividade Específica (Unidades/minuto/mg. de proteína)	% Recuperação
2800	4760,0	40880,0	8,59	100

TABELA II - Determinações realizadas no fracionamento com sulfato de amônio

Volume Total (ml)	Proteína Total (mg)	Atividade total (Unidades de pe roxidase/minuto)	Atividade Específica (Unidades/minuto/mg. de proteína)	% Recuperação
44,5	3160,0	21360,0	6,76	52,3

TABELA III - Determinações realizadas nas isoenzimas da peroxidase do abacaxi purificadas por DEAE-celulose

Frações	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade total (Unidades de peroxidase/minuto)	Atividade Específica (Unidades/minuto/mg. de proteína)	% de Distribuição
Não ligada	124,4	95,80	5.909,0	61,7	54,0
F-I	80,7	33,90	847,0	25,0	19,1
F-II	76,6	13,80	4.366,0	316,4	7,8
F-III	57,2	24,30	2.974,0	122,4	13,6
F-IV	49,0	9,70	1.004,0	103,5	5,5
Total	387,9	177,50	15.100,0	629,0	100,0

TABELA IV - Determinações realizadas nas isoenzimas da peroxidase do abacaxi purificadas por CM-celulose

Frações	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade total (Unidades de peroxidase/minuto)	Atividade Específica (Unidades/minuto/mg. de Proteína)	% de Distribuição
I	128,0	21,80	397,0	18,2	34,09
II	143,0	12,00	701,0	58,4	18,80
III	114,0	7,10	798,0	112,4	11,10
IV	86,0	2,60	163,0	62,7	4,10
V	147,4	19,17	3.906,0	203,8	30,01
VI	100,2	1,20	471,0	392,5	1,90
Total	718,6	63,87	6.436,0	848,0	100,00

TABELA V - pH ótimo da peroxidase do abacaxi fracionada com sulfato de amonio e das várias frações purificadas

Peroxidase	pH ótimo
Fracionada com sulfato de amonio	5,0
Fração I	5,2
Fração II	5,2
Fração III	5,2
Fração IV	5,4
Fração V	5,0
Fração VI	5,0

TABELA VI - Energias de inativação das isoenzimas da peroxidase do abacaxi

Frações	Energia de Inativação (Kcal/mol)
I	30,10
II	31,54
III	36,80
IV	31,05
V	23,18
VI	29,22