

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PEROXIDASE
DO TAPEREBÁ (*Spondias lutea* L.)**

Ana Maria Pereira

Engenheira Química- Mestre em Engenharia de Alimentos

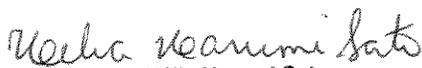
Profa Dra Hélia Harumi Sato

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ana Maria Pereira** aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de fevereiro de 2003.

Campinas, 18 de fevereiro de 2003.


Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANT

INSCRIÇÃO	21
1ª CHAMADA	
UNIVERSIDADE	UNICAMP
PROVA	P414p
EX	
OMBO BC/	53071
ROC.	16-129/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	R\$ 11,00
ATA	09/04/03
º CPD	

CM00181049-7

BIBID.286507

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

P414p Pereira, Ana Maria
Purificação e caracterização da peroxidase do taperebá
(*Spondias lutea* L.) / Ana Maria Pereira. – Campinas, SP: [s.n.],
2003.

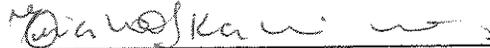
Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Peroxidase. 2.Enzimas. I.Sato, Hélia Harumi.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

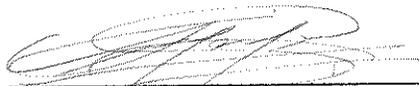
BANCA EXAMINADORA



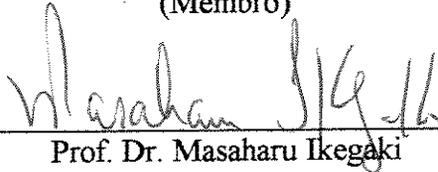
Prof. Dra. Hélia Harumi Sato
(Orientadora)



Prof. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
(Membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Membro)



Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
(Membro)

Prof. Dr Yong Kun Park
(Membro)



Prof. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Membro)

Prof. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

Campinas, de de 2003

75811857

Ao Ezequias e ao nosso querido filhinho;

Ao meu pai José Pedro, pelo grande apoio e estímulo;

A toda minha família;

Dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela orientação e compreensão.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e todos os funcionários pelo ensino e auxílio.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

Aos Departamentos de Nutrição e Engenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Química e ao Instituto de Biologia pelo uso de equipamentos e auxílio técnico de funcionários e alunos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Lúcia Helena pelo fornecimento de amostras.

A todos os meus colegas e amigos pela demonstração de apoio e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1- Taperebá (<i>Spondias lutea</i>).....	4
2.2- Peroxidases.....	6
2.3- Peroxidases de plantas.....	9
2.4- Extração, purificação e propriedades.....	12
2.5- Termoestabilidade e regeneração.....	20
2.6- Inibidores.....	24
2.7- Aplicações da peroxidase.....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1- Amostra.....	27
3.2- Extração da peroxidase bruta do taperebá.....	27
3.3- Determinação da atividade de peroxidase.....	27
3.4- Caracterização da peroxidase bruta do taperebá.....	28
3.4.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta.....	28
3.4.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta.....	28
3.4.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta.....	28
3.4.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta.....	29
3.4.5- Inativação térmica da peroxidase bruta.....	29
3.4.6- Regeneração da atividade da peroxidase bruta.....	29
3.5- Purificação da peroxidase do taperebá.....	30
3.5.1- Precipitação com acetona.....	30
3.5.2- Determinação de proteína.....	30
3.5.3- Cromatografia de permeação em gel – FPLC.....	30
3.6- Caracterização da peroxidase purificada do taperebá.....	31
3.6.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada.....	31
3.6.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada.....	31
3.6.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada.....	31
3.6.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada.....	32
3.6.5- Inativação térmica da peroxidase purificada.....	32
3.6.6- Regeneração da atividade da peroxidase purificada.....	32
3.6.7- Efeitos de sais minerais e inibidores na atividade da peroxidase purificada.....	32
3.6.8- Efeito da concentração do substrato na atividade da peroxidase purificada.....	33
3.6.9- Determinação da massa molecular da peroxidase purificada.....	33
3.6.10- Determinação do ponto isoelétrico da peroxidase purificada.....	34
3.6.11- Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
3.6.11.1- Eletroforese da peroxidase purificada.....	35
3.6.11.2- Eletroforese para detecção da atividade enzimática.....	35
3.6.11.3- Eletroforese para detecção da natureza glicoprotéica.....	35
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1- Extração da peroxidase bruta do taperebá.....	36
4.2- Caracterização da peroxidase bruta do taperebá.....	37
4.2.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta.....	37

4.2.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta.....	39
4.2.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta.....	40
4.2.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta	43
4.2.5- Inativação térmica da peroxidase bruta.....	44
4.2.6- Regeneração da peroxidase bruta.....	46
4.3- Purificação da peroxidase do taperebá.....	48
4.4- Caracterização da peroxidase purificada do taperebá.....	50
4.4.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada.....	50
4.4.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada.....	51
4.4.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada	53
4.4.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada	54
4.4.5- Inativação térmica da peroxidase purificada	56
4.4.6- Regeneração da peroxidase purificada.....	59
4.4.7- Efeito de sais minerais e inibidores na atividade da peroxidase purificada	61
4.4.8- Efeito da concentração do substrato na atividade da peroxidase purificada	64
4.4.9- Determinação da massa molecular da peroxidase purificada	65
4.4.10- Determinação do ponto isoeletrico da peroxidase purificada	67
4.4.11- Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	68
5- CONCLUSÕES	71
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Taperebá (<i>Spondias lutea</i> L.).....	1
Figura 2- Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta.....	38
Figura 3- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta.....	40
Figura 4- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta após 3h de incubação a 30°C.....	41
Figura 5- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta após 24h de incubação a 5°C.....	41
Figura 6- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta incubada por 1 h.....	43
Figura 7- Inativação térmica da peroxidase bruta.....	45
Figura 8- Regeneração da atividade da peroxidase bruta após inativação térmica.....	47
Figura 9- Perfil cromatográfico da purificação da peroxidase em coluna de permeação em gel Sephacryl S-200.....	49
Figura 10- Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada.....	50
Figura 11- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada.....	52
Figura 12- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada após 3h de incubação a 30°C.....	53
Figura 13- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada após 24h de incubação a 5°C.....	54
Figura 14- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada incubada por 1 h.....	55
Figura 15- Inativação térmica da peroxidase purificada.....	56
Figura 16- Regeneração da atividade da peroxidase purificada após tratamento térmico parcial.....	59
Figura 17- Regeneração da atividade da peroxidase purificada após inativação térmica.....	60
Figura 18- Efeito da concentração de guaiacol na atividade da peroxidase.....	64
Figura 19- Efeito da concentração de guaiacol na atividade da peroxidase- Gráfico Hanes-Woolf.....	65
Figura 20- Curva padrão de eluição de proteínas em coluna de filtração em gel Sephacryl S-200.....	66
Figura 21- Isoeletrofocalização da peroxidase de <i>Spondias lutea</i> L.....	67
Figura 22- SDS-PAGE da peroxidase purificada- coloração com prata	68
Figura 23- PAGE-Nativo da peroxidase purificada.....	69
Figura 24- SDS-PAGE da peroxidase purificada- natureza glicoprotéica.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Purificação da peroxidase de <i>Spondias lutea</i> L.....	48
Tabela 2- Efeito de inibidores na atividade da peroxidase purificada.....	62
Tabela 3- Efeito de sais minerais na atividade da peroxidase purificada.....	63

RESUMO

A peroxidase (EC 1.11.7.1, doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase) do taperebá (*Spondias lutea L.*), um fruto nativo da Amazônia com aroma bem característico e de grande uso na fabricação de sucos, geléias, néctar e sorvete, foi purificada e caracterizada. A extração da peroxidase ionicamente ligada da polpa do taperebá foi obtida pelo uso do tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0 contendo 10mM EDTA, 0,2M CaCl₂ and 2% PEG na proporção 1:1 (polpa:tampão) (v/v). A peroxidase foi purificada por meio de precipitação com acetona seguida pela filtração em gel em coluna Sephacryl S-200 em sistema FPLC. A eletroforese da peroxidase purificada em gel de poliacrilamida mostrou uma banda de atividade peroxidativa.

A peroxidase bruta do taperebá apresentou atividade ótima em pH 4,5 e 35°C e mostrou estabilidade numa ampla faixa de pH (2,6-10) e em temperaturas inferiores a 50°C. A peroxidase purificada foi caracterizada como uma glicoproteína e mostrou atividade específica igual a 514.320 U/mg, massa molecular 28,5 kDa e ponto isoelétrico 4,8. A peroxidase purificada apresentou atividade ótima a 35°C e pH 5,5. A enzima seguiu a cinética de Michaelis-Menten e o valor de Km foi igual a 20,3 mM para o substrato guaiacol. A enzima purificada mostrou-se estável numa ampla faixa de pH (pH 2,6-10). A estabilidade térmica da peroxidase purificada foi analisada na faixa 10°C-90°C. A enzima mostrou ser estável ao calor, sendo que após aquecimento a 70 °C durante 60 min, aproximadamente 65% da atividade enzimática foi mantida. A inativação térmica da peroxidase purificada apresentou um perfil não linear com o tempo de aquecimento. A isoperoxidase foi totalmente inativada depois do aquecimento a 90°C por 2 min e a atividade enzimática da peroxidase purificada não regenerou quando foi mantida a 30°C durante 24 h e a 5°C por 24h, depois da inativação térmica. A peroxidase purificada foi completamente inibida pelo ácido ascórbico na concentração final 1mM, metabissulfito de sódio e bissulfito de sódio na concentração final 10 mM, inibidores frequentemente usados no processamento de alimentos. A atividade da peroxidase foi ativada pelo CaCl₂ (10mM) e NaCl (1mM), mas foi fortemente inibida pelo CuSO₄ (10 mM), Fe₂(SO₄)₃ (1mM) e completamente inibida pelo KCN (1mM). A isoenzima purificada foi parcialmente afetada

pelos sais MnSO_4 , MgSO_4 , KCl e Na_2SO_4 e pelos compostos químicos SDS, EDTA, N-bromosuccinimida, iodoacetamida. A atividade da enzima foi totalmente inibida pelo β -mercaptoetanol na concentração final 10mM.

SUMMARY

Peroxidase (EC 1.11.7.1, donor:hydrogen peroxide oxidoreductase) from the “taperebá” fruit (*Spondias lutea* L.), a native Amazonian fruit with a typical flavour and widely used for making juice, jellies, nectars and ice cream, was purified and characterized. Extraction of the ionically bound peroxidase was achieved using 0.2M potassium phosphate buffer at pH 8.0 containing 10mM EDTA, 0.2M CaCl₂ and 2% (w/v) PEG in a 1:1 ratio of fruit to buffer. The peroxidase was purified by means of acetone precipitation followed by gel filtration on a Sephacryl S-200 column using the FPLC system. One peroxidase isoenzyme was detected in “taperebá” fruit. Electrophoresis of the purified enzyme using polyacrilamide gel, showed a single staining band for peroxidase activity.

The crude peroxidase showed maximum activity at 35°C and pH 4.5, and was stable over a wide range pH (2.6-10), showing great thermostability below at 50°C. The purified peroxidase was characterized as a glycoprotein and showed a specific activity of 514,320 U/mg, molecular weight of 28.5 kDa and isoelectric point of 4.8. The effect of temperature and pH on the enzymatic activity was analysed for the purified isoenzyme. The peroxidase showed maximum enzymatic activity at 35°C and pH 5.5. The enzyme followed the Michaelis-Menten kinetics and presented a Km value of 20.3 mM with guaiacol substrate. The enzyme was stable over a wide range pH (pH 2.6-10). The thermostability of the purified peroxidase was analysed in the 10°C-90°C temperature range and showed great thermostability. After heating at 70°C for 60 min, approximately 65% of the activity was retained. The heat inactivation of the purified peroxidase was found to be non-linear with heating time. The purified peroxidase was totally inactivated after heating at 90°C for 2 min and its enzymic activity did not regenerate when held at 30°C or 5°C for 24h after heat inactivation. The purified peroxidase was completely inhibited by 1mM ascorbic acid, 10mM sodium metabisulphite and 10mM sodium bisulphite, inhibitors often used in food processing. The peroxidase activity was activated by 10mM CaCl₂ and 1mM NaCl, but was strongly inhibited by 10mM CuSO₄, 1 mM Fe₂(SO₄)₃ and completely by 1 mM KCN. The purified enzyme was partially affected by the salts MnSO₄, MgSO₄, KCl and Na₂SO₄ and

by the compounds SDS, EDTA, N-bromosuccinimide and iodoacetamide. The enzymic activity was totally inhibited by 10 mM β -mercaptoethanol.

1- INTRODUÇÃO

O mercado de frutas da Amazônia apresenta grandes oportunidades de comércio nacional e internacionalmente em função da riqueza de vitaminas e aromas exóticos de seus frutos. Acima de 48 frutos nativos têm sido identificados na Amazônia com potencial para serem comercializados no mercado mundial. Um exemplo destes frutos é o camu-camu que contém alta concentração de vitamina C e é importado pelos Estados Unidos para produzirem tabletes de vitaminas. O cupuaçu e o açaí são outros exemplos de frutos que também estarão despontando no mercado mundial nos próximos anos devido ao seus sabores tropicais característicos. Dentre as inúmeras espécies frutíferas exóticas da região Amazônica com grande potencial para a exploração econômica destaca-se a *Spondias lutea* L. ou *Spondias mombim* L., uma árvore frutífera tropical da família *Anarcadiaceae*, distribuída por toda a Amazônia, nas matas de terra firme ou de várzea e comum no Nordeste do Brasil. O fruto é conhecido popularmente na região Amazônica como taperebá (Figura 1), na região Nordeste como cajá e na região Sul do Brasil como cajá-mirim. (Barbosa *et al.*, 1981) e (Souza *et al.*, 1996). Além da reconhecida característica aromática (Augusto *et al.*, 2000), o taperebá é rico em carotenóides, representando uma boa fonte de pró-vitamina A (Rodriguez-Amaya & Kimura, 1989).

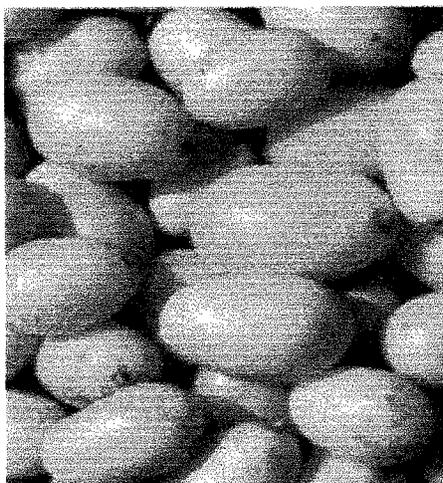


Figura 1. Taperebá (*Spondias lutea* L.)

O taperebá é bastante ácido e por apresentar esta característica é pouco consumido *in natura*. O fruto é usado na fabricação de diversos produtos alimentícios tais como, sucos, néctares, sorvetes, geléias, compotas, licores e picolés (Barbosa, 1981) e (Souza *et al.*, 1996). Além do aproveitamento do fruto para o consumo humano, o extrato das folhas e dos ramos da planta possui taninos com propriedades medicinais para o controle de bactérias gram-negativas e gram-positivas, do vírus da herpes simples e da herpes dolorosa, com grandes perspectivas de exploração pela indústria farmacêutica (Souza *et al.*, 1999 e Corthout *et al.*, 1991).

Não há conhecimentos agrônômicos de inúmeras espécies frutíferas no ecossistema amazônico, sendo que algumas como o taperebá tem o seu potencial conhecido porém pouco desenvolvido (Souza *et al.*, 1996). A viabilização sócio-econômica desta matéria-prima requer, além do conhecimento agrônômico, dados científicos sobre sua composição química, caracterização bioquímica e fisiologia pós-colheita.

Diante das perspectivas em relação à expansão da cultura e industrialização do taperebá, é necessário estudos que visem melhorar a qualidade dos frutos e seus produtos processados, tornando-os apreciáveis como alimentos e com atributos adequados para a comercialização. Na fabricação de sucos de frutas e preparação de vegetais frescos são verificadas perdas significativas, causadas pela alteração de algumas propriedades como modificação da cor e formação de aromas desagradáveis. Estas características indesejáveis podem ser causadas pela atividade de enzimas oxidativas presentes nas plantas, tais como as peroxidases.

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas pertencentes ao grupo das oxiredutases, amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, microorganismos e plantas. São reconhecidas como uma das enzimas mais termoestáveis presentes nas plantas superiores. Para a ciência e tecnologia dos alimentos as suas ações são de grande importância, pois podem causar reações de escurecimento enzimático, descoloração de pigmentos em plantas e mudanças deteriorativas no sabor, aroma, textura e valor

nutricional em alimentos tais como frutos, vegetais crus e produtos processados (Burnette, 1977). Na indústria, a peroxidase é usada convencionalmente como uma enzima indicadora da eficiência do branqueamento.

Foram observadas, durante o processamento e armazenamento da polpa e do néctar de taperebá em escala industrial, alterações na cor e mudanças deteriorativas no aroma original do fruto. Dentre as enzimas oxidativas presentes em frutos e vegetais, foram testadas as atividades enzimáticas da peroxidase e polifenoloxidase. Os estudos iniciais mostraram que a polpa de taperebá apresentou alta atividade de peroxidase (58.560 U/g) e baixa atividade de polifenoloxidase (92 U/g). Diante do interesse industrial em obter e comercializar néctar e suco processados de boa qualidade e aceitabilidade a partir desta matéria-prima e do interesse em conhecer as propriedades e ação catalítica da peroxidase obtida de uma nova fonte, o objetivo deste estudo foi purificar e caracterizar a peroxidase do taperebá e verificar o comportamento da enzima em relação a inativação térmica ou inibição por compostos químicos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Taperebá (*Spondias lutea* L.)

O gênero *Spondias* da família *Anacardiaceae* agrupa as fruteiras conhecidas como “ameixas dos trópicos”. Elas não são cultivadas comercialmente, mas já ocupam um lugar no mercado nacional devido à crescente demanda por seus frutos e produtos processados como polpas, sucos, néctares, geléias, doces, picolés e sorvetes. Dentre as principais espécies existentes no Brasil está o taperebazeiro ou a cajazeira (*Spondias lutea* L. ou *Spondias mombim* L.), uma espécie com grande potencial de exploração agroindustrial .

Spondias lutea L. é uma árvore frutífera que ocorre nas regiões tropicais, sendo largamente dispersa no Norte e Nordeste do Brasil. É uma espécie silvestre, cuja exploração é feita de modo extrativista. Em virtude da ausência de plantios racionais, em época de safra o taperebá é comercializado em feiras livres. Os frutos são encontrados nas feiras durante quase todo o ano, sendo que na estação chuvosa (janeiro – abril) aparecem em maior quantidade. A árvore produz cerca de 1000 frutos e a propagação da planta é feita por sementes ou estacas (Souza *et al.*, 1996).

O fruto taperebá é uma pequena drupa elipsóide, de 3 cm a 4 cm de comprimento e 2 cm a 2,5 cm de diâmetro, casca fina, lisa, cor amarelo-alaranjada quando maduro, pesando em média 11 g, sendo 17% de casca, 35% de polpa e 48% de semente. O formato do fruto varia de globoso a piriforme. Possui um caroço súbero-lenhoso com 5 lóculos, com peso de 4 g. A polpa do fruto taperebá é bastante succulenta, de cor amarela, muito aromática e extremamente ácida (Souza *et al.*, 1996).

Segundo Barbosa *et al.* (1981), o fruto apresenta 82,7% de umidade; °Brix 10,2; acidez 1,65; pH 2,1; aminoácidos 26,2 mg/100g de fruto; vitamina C 11,06 mg/100 g de fruto; fibra 1,13/100 g de fruto; açúcares redutores 6,74 %; extrato etéreo 1,03%; fósforo 0,04%; cálcio 0,001%. Bora *et al.*, 1991 em seu trabalho com o cajá do Nordeste, descreve

a fruta de cor amarela (madura), textura macia, forma elipsóide para ovóide, 3,47 cm de comprimento e 2,65 cm de diâmetro, massa de 13,4 g, pH 3,4, °Brix 11,7, acidez 1,71, umidade de 87,5%, 0,25% de proteína, 1,1% de fibra, 5,6% de açúcares totais, 5,3% de açúcares redutores, 0,25% de açúcares não redutores, 0,07% de pectina, 0,42% de tanino, 20,8mg de ácido ascórbico/100 g de fruto, 1,2 mg de ferro/100g de fruto, 28,6 mg de cálcio/100g de fruto e 26,3 mg de fósforo/100g de fruto.

O fruto apresenta uma reconhecida característica aromática, sendo que nos estudos de Augusto *et al.* (2000) foram detectados 34 compostos de aromas nas amostras extraídas da polpa de cajá e mais de 100 no trabalho desenvolvido por Allegroni & Barbeni (citado por Augusto *et al.*, 2000). Oliveira *et al.* (2001) relataram a detecção de 250 compostos voláteis no cajá, dentre estes 166 foram identificados. As principais classes foram de ésteres, álcoois, cetonas, pirazinas, álcool enol, aldeídos, furanos e terpenos.

O taperebá é também rico em carotenóides representando uma excelente fonte de pró-vitamina A. Rodriguez-Amaya & Kimura (1989) determinaram a composição de carotenóides e o valor de vitamina A do cajá. Em termos quantitativos o cajá apresentou um conteúdo total de carotenóides de 25,8µg/g, sendo o pigmento principal a β-criptoxantina, constituindo 64% do total. Além da β-criptoxantina, que mais contribuiu no valor de vitamina A equivalente a 74% do total, foram encontrados mais três carotenóides com atividade vitamínica: α-caroteno, β-caroteno e criptoflavina.

Aguiar *et al.* (2001) estudaram os componentes químicos antioxidantes do cajá e encontraram 1,26 mg de carotenóides/100g; 75,61 mg de taninos/100g e 84,62 mg de ácido ascórbico/100g. A avaliação da capacidade antioxidante mostrou que o extrato aquoso foi o de maior atividade e que este resultado foi importante, pois o maior consumo de cajá ocorre em meio aquoso, na forma de suco.

Furtunato *et al.* (2001) determinaram a atividade enzimática de enzimas termoresistentes (pectinesterase e peroxidase) presentes em algumas frutas tropicais

nordestinas, dentre as quais o cajá. A atividade de pectinesterase e peroxidase foram detectadas e seus valores quantificados, $11 \text{ U(PE)} \times 10^4/\text{ml}$ e 1263 U/ml , respectivamente.

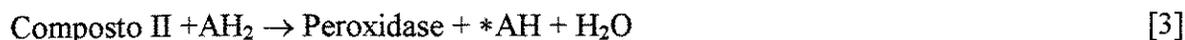
Além do reconhecido aroma, valor nutritivo e sabor característico do fruto, a planta *Spondias lutea* L. apresenta propriedades medicinais com grande perspectivas de exploração pela indústria farmacêutica. A ação antivirótica dos elagitaninos, presentes no extrato desta planta, é relatada em vários trabalhos científicos feitos na Europa, Japão e Brasil. O extrato vegetal de cajazeiras é um extrato hidroalcolico obtidos das folhas e partes aéreas da planta tropical. Devido a presença de elagitaninos, ácidos alquenilfenólicos e outros taninos neste extrato, o chá da planta vem sendo utilizado popularmente no Brasil e em outras partes do mundo para aliviar os sintomas associados com infecções viróticas dos lábios e região genital. O chá de suas folhas vem sendo utilizado há longo tempo, sem relatos de efeitos colaterais, devido a sua ação antivirótica notoriamente contra o vírus da Herpes, sendo que uma patente foi requerida no Brasil para o uso dessa planta contra infecções desse vírus (Matos, citado por Padetec, 2002). Em 1991, pesquisadores da Universidade de Antuerpia-Bélgica isolaram das partes aéreas e folhas desta espécie, Geraniina e Galoil-Geraniina, dois elagitaninos com atividade antivirótica contra o vírus Herpes simplex type 1 and Coxsackie B2 (Corthout *et al.* 1991), confirmando desta forma os estudos feitos anteriormente por Fukuchi *et al.*, citado por Padetec (2002), que demonstraram pela primeira vez a atividade anti-herpes da Geraniina e taninos similares.

2.2- Peroxidases

Os primeiros relatos sobre os produtos de ação das peroxidases foram descritos por Schoenbein em 1855 (citado por Whitaker, 1994) ao notar que extratos de cogumelos e tecidos animais causaram o aparecimento da cor azul em soluções de guaiacol na presença de ar ou soluções diluídas de água oxigenada. As investigações fundamentais sobre as peroxidases foram iniciadas por Onslow em 1920 e nos últimos vinte e cinco anos houve um grande aumento no seu conhecimento com descrições detalhadas sobre as propriedades da grande classe destas enzimas em relação à cinética, estrutura e mecanismo. As

características químicas da peroxidase vem sendo estudada por vários pesquisadores, sendo o Dr. H.B. Dunford o cientista de maior destaque nesta área. Há uma vasta literatura sobre as peroxidases e um grande número de patentes relacionadas com suas aplicações industriais e comerciais (Dunford, 1999). A presença do grupo ferro heme nestas enzimas tem sido o ponto de grande interesse das pesquisas e também estimulado o desenvolvimento de métodos biofísicos modernos para estudar os vários estados de oxidação do ferro heme. A função biológica específica, o potencial de redução do ferro e a natureza dos substratos que podem ser oxidados, são fortemente determinados pelas características estruturais da matriz protéica ao redor do grupo prostético (Banci, 1997).

As peroxidases (doador: peróxido de hidrogênio oxireductase, EC 1.11.1.7) são heme proteínas que utilizam o peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (AH₂). A reação ocorre em múltiplas etapas (equações [1] - [3]), como mostrado a seguir (Dunford, 1999):



No primeiro estágio do processo catalítico ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. A água oxigenada é reduzida produzindo água e a proteína oxidada formando o chamado composto I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto I oxida uma molécula de substrato (AH₂) gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o Composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato para o estado ferro III latente (Banci, 1997 e Hiner *et al.*, 2001).

A peroxidase é altamente específica para o substrato peróxido, sendo o peróxido de hidrogênio seu principal substrato (Vámos-Vigyázó, 1981). Para o substrato doador de

hidrogênio a enzima não é específica em sua ação, catalisando a oxidação de substratos como fenóis, aminas aromáticas, antocianinas, lignina e vitamina C (Forsyth *et al.*, 1999).

Khan & Robinson (1994) relataram que as peroxidases catalisam a oxidação de diferentes substratos doadores de hidrogênio, alguns dos quais são freqüentemente usados como substratos teste. Estes são o ácido ascórbico, guaiacol, o-dianisidina, 2-2'-azino-di-2-etil-benzotiazolina sulfonato (ABTS) e 4-metil-alfa-naftol, ácido indol-3-acético (IAA) e ácido dihidroxifumárico (DHFA). O guaiacol é freqüentemente usado na determinação de atividade residual da peroxidase após tratamento térmico e em testes qualitativos (Vámos-Vigyázó, 1981), sendo que na reação é formado o tetraguaiacol, um produto de cor marrom. No caso dos substratos IAA e DHFA a oxidação pode ocorrer na ausência de peróxido de hidrogênio, onde o oxigênio é usado como um doador de elétrons.

Vámos-Vigyázó (1981) relataram que as peroxidases são vastamente distribuídas na natureza, e podem ser divididas em duas classes principais:

- a) Classe I: peroxidases contendo ferro, que podem ser subdivididas em dois grupos: peroxidases ferriprotoporfirina e verdoperoxidases. O primeiro contém o grupo prostético ferriprotoporfirina II (hematina) e apresentam cor marrom quando purificadas. Elas são encontradas em plantas superiores (principal fonte: raiz forte), animais e microorganismos. O segundo grupo contém um grupo ferriprotoporfirina diferente. Estas enzimas são verdes quando purificadas. Ocorrem em órgãos de animais e no leite (lactoperoxidase).
- b) Classe II: peroxidase flavoproteínas, contém flavina-adenina-dinucleotídeo como grupo prostético. São encontradas em microorganismos e tecidos animais.

Em trabalhos mais recentes, usando novas técnicas de análise, várias peroxidases têm sido isoladas, sequenciadas e caracterizadas. Baseado na sequência de aminoácidos, Welinder propôs três classes de peroxidases que pertencem à superfamília de peroxidase de

plantas. Segundo a classificação de Welinder (citado por Dunford, 1999 e Banci, 1997), as peroxidases foram agrupadas nas classes:

A- Classe I: peroxidases intracelulares (ex. citocromo c de levedura e ascorbato peroxidase)

B- Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares (ex. lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase de *Arthromyces ramosus*)

C- Classe III: peroxidases de plantas (ex. peroxidase de raiz forte e de amendoim)

As peroxidases da classe I não contém pontes dissulfeto, carboidratos e íons cálcio em suas estruturas. As enzimas da classe II e III possuem pontes dissulfeto em suas estruturas que proporcionam um alto grau de rigidez a proteína. Estas duas classes são caracterizadas pela presença de dois íons cálcio, relevantes para a manutenção da estrutura do sítio ativo, e carboidratos na superfície da proteína. Foi observado que a remoção dos íons cálcio da peroxidase de raiz forte diminuiu a atividade enzimática e em particular as taxas de redução do composto II (Banci, 1997).

2.3- Peroxidases de plantas

As peroxidases estão vastamente distribuídas no reino vegetal, tendo sido identificadas em todas as plantas superiores investigadas (Halphin *et al.*, 1989). A peroxidase de raiz forte (HRP, Horseradish Peroxidase) é a principal representante desse grupo de enzimas, sendo a mais estudada e de maior importância comercial. As peroxidases de plantas são glicoproteínas (Kim & Kim, 1995) e em todas as frutas e vegetais parecem existir como isoenzimas com pontos isoelétricos variando aproximadamente de 3,5 a 10. Baseado em pesquisas recentes com as peroxidases de raiz forte os principais grupos de isoperoxidases são as ácidas ou aniônicas, neutras, e básicas ou catiônicas, com valores de pI de 4-5, 6-7 e 7-10, respectivamente (Khan & Robinson, 1994). Observou-se que elas

possuem características distintas em relação a estabilidade térmica, pH ótimo, especificidade do substrato, composição de aminoácidos e funções fisiológicas nas plantas.

O papel da peroxidase no ciclo da vida das plantas é um dos tópicos menos elucidados a respeito desta enzima. Vários fatores podem induzir a sua biosíntese e mudanças nos padrões das isoenzimas como o estresse fisiológico, injúria mecânica e infecções causadas por vírus e fungos. Ainda não foi possível elucidar as precisas reações químicas catalisadas pelas peroxidases durante estas complexas mudanças fisiológicas porque estas enzimas podem promover uma série de reações. O quadro não é esclarecedor por várias razões: primeiro a atividade enzimática é encontrada em discretas isoformas que podem ser detectadas apenas por focalização isoeletrica; segundo, os compostos fenólicos, seus substratos, ocorrem naturalmente em todos os tecidos de plantas e terceiro, a presença de diversos compostos suscetíveis a oxidação pelas peroxidases levam a formação de vários produtos (Robinson, 1991 e Vámos-Vigyázó, 1981).

As peroxidases apresentam numerosas funções fisiológicas nas plantas superiores, como biosíntese do etileno, balanço hormonal, integridade da membrana, controle da respiração no amadurecimento, senescência de frutas e vegetais e degradação da clorofila ou auxina (Vámos-Vigyázó, 1981). Pomar *et al.* (1997) relataram que a peroxidase foi relacionada, recentemente, ao metabolismo dos alcalóides e que a função precisa das isoformas individuais das peroxidases permanece sem esclarecimento pela ausência de informações sobre a localização das enzimas e a disponibilidade dos substratos *in vivo*. Morimoto *et al.* (2001) relataram a participação da peroxidase na formação de um metabólito da morfina como resposta de defesa na planta papoula. As funções específicas das distintas isoperoxidasas não têm sido totalmente estabelecidas mas, em geral, as peroxidases catiônicas são associadas à degradação do ácido indolacético e as aniônicas à biosíntese da lignina (Boeul *et al.*, 2000).

Para o processador de frutas e vegetais a peroxidase está primariamente relacionada a formação de “off-flavour” em alimentos crus e produtos processados (Vámos-Vigyázó,

1981, Burnette, 1977). Segundo Burnette (1977), estas enzimas estão relacionadas com as reações de escurecimento enzimático, descoloração de pigmentos em plantas e mudanças deteriorativas no sabor, aroma, textura e valor nutricional em alimentos tais como frutos, vegetais crus e produtos processados.

Richard-Forget & Gaillard (1997) relataram que o desenvolvimento da cor escura está relacionada primariamente a oxidação de compostos fenólicos. Esta reação, catalisada principalmente pela polifenoloxidase, resulta na formação de o-quinonas que se polimerizam formando o pigmento marrom. Os autores também descreveram em seus estudos que as peroxidases podem contribuir com o processo de escurecimento. As peroxidases cuja função primária é oxidar doadores de hidrogênio às custas de peróxidos, são altamente específicas para a água oxigenada. Entretanto, elas aceitam uma vasta faixa de doadores de hidrogênio, incluindo polifenóis. As peroxidases são capazes de oxidar derivados hidrocínâmicos e flavanas, as principais estruturas fenólicas envolvidas no escurecimento enzimático. Elas também oxidam flavonóides, que não são substratos para a polifenoloxidase, mas são encontrados degradados em frutas injuriadas. O envolvimento das peroxidases no escurecimento enzimático tem sido relatado por vários autores (Burnette, 1977, Williams *et al.*, 1985 e Nicolas *et al.*, 1994).

Robinson (1991) também atribuíram muitas das funções fisiológicas das peroxidases em frutas e vegetais à oxidação de fenóis. Segundo Khan & Robinson (1994), as funções fisiológicas e o mecanismo da ação da peroxidase na qualidade dos alimentos não são bem documentados devido à complexidade das isoenzimas e suas diferentes distribuições no nível subcelular. Os autores descreveram que o composto I, formado durante a catálise, apresenta ampla especificidade por compostos aromáticos, que são liberados da enzima como radicais livres oxidados. Devido a alta reatividade dos radicais um grande número de produtos podem ser formados, especialmente substâncias poliméricas. Isto justifica a ampla faixa de funções fisiológicas e os diversos efeitos na qualidade dos alimentos promovidos pela peroxidase.

López-Serrano & Rós-Barceló (1996) descreveram que a enzima peroxidase termoestável estaria envolvida nas reações de escurecimento de morangos em calda. Frutos enlatados mostraram uma perda significativa do pigmento vermelho e aparecimento de produtos escuros e visíveis após o processamento térmico. López-Serrano & Rós-Barceló (1996), relataram que as reações de escurecimento podem ocorrer em parte pela oxidação de catequinas mediada pela peroxidase. Em seus estudos, os autores observaram a forte cooperação da isoperoxidase básica, extraída e purificada a partir de morangos, em oxidar a catequina em baixas concentrações de água oxigenada. O processo de purificação removeu totalmente outras enzimas que atuariam neste substrato, tais como polifenoloxidasas.

Alvim & Clemente (1998) relataram que a peroxidase tem um aumento em sua solubilidade durante o período de maturação da fruta e, conseqüentemente, um aumento na atividade no pós-climatério. Por essa razão, tem sido considerada uma das principais enzimas responsáveis pela qualidade e deterioração em muitas frutas.

2.4- Extração, purificação e propriedades

As peroxidases estão localizadas na célula das frutas e vegetais na forma parcialmente solúvel, no citoplasma, e parcialmente insolúvel, ligadas covalente e ionicamente à parede celular (Vámos-Vigyázó, 1981). Khan & Robinson (1994) relataram que as peroxidases ocorrem na forma solúvel e ligada, associadas à parede celular das plantas e provavelmente associadas a certas organelas. As proporções destas formas podem variar durante o amadurecimento. A fração solúvel pode ser extraída com água ou com tampão de baixa força iônica (0,05M - 0,18M), a fração ionicamente ligada com um tampão de força iônica maior contendo NaCl ou CaCl₂, e a forma covalentemente ligada usando-se enzimas celulolíticas ou pectinolíticas (Vámos-Vigyázó, 1981). É recomendável o uso de aditivos na extração de enzimas de plantas. Os compostos químicos usados são: tampões cuja função é a proteção das enzimas contra a ação de ácidos liberados dos vacúolos na ruptura da célula; força iônica (0,1 a 0,5M) para a dessorção da enzima ligada à parede celular; PEG (Polietilenoglicol) e PVP (Polivinilpirrolidona), proteção contra a inativação

por fenóis e seus produtos de oxidação; EDTA como quelante; CaCl_2 para a extração da peroxidase ionicamente ligada e precipitação de proteínas (em concentrações mais elevadas) e também de substâncias pécticas. Substâncias pécticas causam problemas porque o extrato forma gel especialmente se a pectinametilesterase estiver presente. Enzimas proteolíticas presentes causam proteólise e para minimizar este efeito, deve-se trabalhar a baixas temperaturas (Doonan, 1996).

A purificação das peroxidases a partir dos extratos brutos é baseada em métodos que variam de acordo com a fonte da enzima e o grau de pureza a ser obtido. De modo geral, após a extração da enzima bruta, as preparações enzimáticas são purificadas e as isoenzimas separadas, usando-se as técnicas de precipitação com solventes orgânicos, “salting out”, cromatografia de permeação em gel, troca iônica, hidrofóbica e afinidade em sistemas convencionais ou FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), como pode ser mostrado em alguns exemplos descritos, a seguir.

Segundo Haard (citado por Lee *et al.*, 1983), é difícil obter peroxidases purificadas de forma homogênea devido à presença de um grande número de isoformas e substratos. Muitos trabalhos têm sido publicados sobre peroxidases obtidas de várias frutas e vegetais. Um grande número de isoenzimas foram encontradas em raiz forte. Dunford (1999) relata que a detecção de componentes múltiplos em preparações de peroxidase de raiz forte foi assunto de várias investigações. Em uma série de trabalhos publicados por Shanon e colaboradores a partir de 1967 até 1971, foram relatadas as características das isoenzimas de A a E, numeração universalmente aceita para raiz forte. Segundo Dunford (1999), sete isoenzimas foram detectadas e nomeadas A1, A2, A3, B, C, D e E. As isoenzimas ácidas A1, A2 e A3 apresentaram propriedades similares. As isoformas B e C foram caracterizadas como neutras e as enzimas D e E como básicas. Em trabalhos posteriores foi identificada a presença de outras isoenzimas nas preparações das formas neutras e básicas. No total foram contabilizadas 14 isoperoxidasas em raiz forte.

Lee *et al.* (1983) estudaram o isolamento de uma isoperoxidase a partir de uvas De Chaunac. O extrato bruto foi obtido usando-se acetona e a peroxidase foi purificada até a homogeneidade através de cromatografia em colunas de DEAE-celulose e Phenyl-sepharose CL-4B. A temperatura e o pH ótimo da enzima purificada foram 47°C e 6, respectivamente. O K_m aparente foi igual a 1,2 mM para o substrato guaiacol na concentração ótima de H_2O_2 . O K_m para a H_2O_2 foi 1,5 mM na concentração ótima de guaiacol. A enzima mostrou-se estável a altas temperaturas, retendo mais que 60% de sua atividade a 65°C.

Lee & Klein (1988) relataram que o isolamento de isoperoxidasas pode ser obtido através da cromatografia repetitiva em colunas de troca iônica, mas que este procedimento consome muito tempo. Em seu trabalho, os autores desenvolveram um método simples de identificação de isoperoxidasas em ervilhas diretamente do extrato bruto, sem qualquer purificação. As sementes de ervilha foram moídas com gelo seco e misturadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, a 4°C durante 1 h. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e desalinizado, obtendo-se o extrato enzimático bruto. A técnica analítica de focalização isoeletrica (IEF) em gel poliacrilamida foi usada para detectar as isoformas presentes no extrato bruto. Foram identificadas 18 isoenzimas com valores de pI na faixa de 3,5 a 9,1.

Moulding *et al.* (1987), extraíram e detectaram atividade de peroxidase na polpa e na casca de maçãs inglesas maduras. A peroxidase presente na polpa e na casca foram extraídas, separadamente, usando-se tampão fosfato 0,01 M a pH 6. Após a filtração e centrifugação do homogenato obteve-se a fração solúvel, presente no sobrenadante. A fração ionicamente ligada, presente no precipitado, foi obtida usando-se NaCl 1 M resfriado. A focalização isoeletrica em camada delgada também foi usada e foram detectados dois grupos distintos de isoenzimas, aniônicas e catiônicas, na fração solúvel, e somente isoenzimas catiônicas na fração ionicamente ligada. As isoenzimas apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 5 a 6, e no extrato solúvel da polpa de maçã foram encontradas as peroxidases mais estáveis ao calor.

Marangoni *et al.* (1989) extraíram peroxidases de tomate usando tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,5 contendo vários aditivos dentre os quais EDTA, NaCl, Triton X-100, ascorbato, metabissulfito de sódio e PVP insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio e ressuspendido em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4. Depois da diálise a amostra foi sonicada e purificada em colunas Mono-Q (HR 5/5) aniônica no sistema FPLC. O pI da peroxidase obtida foi 3,5 e pela eletroforese, SDS-PAGE, foram reveladas três bandas majoritárias com massas moleculares iguais a 16,6; 40 e 42 kDa. A peroxidase de tomate mostrou ser dependente do Ca^{2+} .

Soda *et al.* (1991), purificaram e determinaram algumas propriedades da peroxidase do fruto kiwi. Na extração foram usados o tampão Tris-HCl, pH 9, contendo alguns aditivos tais como 5% de NaCl, 1mM de EDTA, dentre outros. A peroxidase foi purificada até a homogeneidade através da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em colunas SP-Toyopearl, AF Blue-Toyopearl e Toyopearl HW-55. A massa molecular da peroxidase foi estimada em 29 kDa por filtração em gel em resina Sephadex G-100, e o pI igual a 9,5. O pH e a temperatura de atividade máxima foram 5,5 e 50°C. As constantes cinéticas determinadas foram K_m iguais a 7,4 mM para o substrato guaiacol e 1,3 mM para o peróxido de hidrogênio. Quanto à especificidade ao substrato, a peroxidase apresentou alta atividade em relação aos compostos fenólicos, guaiacol, pirogalol e o-dianisidina. A atividade enzimática da peroxidase foi totalmente inibida por KCN 1 mM, e os autores sugeriram a partir desta observação que a peroxidase do fruto kiwi contém o grupo protoheme no sítio ativo, como verificado em outras peroxidases de plantas.

Khan & Robinson (1994) purificaram isoperoxidases de manga através da cromatografia por filtração em gel e troca iônica. Os autores determinaram por meio de filtração em gel os pesos moleculares de isoperoxidases purificadas de manga. As peroxidases aniônicas (A1 e A2) apresentaram massas moleculares maiores que as catiônicas (C1 e C2), cujos valores foram iguais a 40, 44, 22 e 27 kDa, respectivamente.

Civello *et al.* (1995) descreveram em seu trabalho a purificação parcial e determinação de algumas propriedades da peroxidase de morango. O extrato total da enzima (fração solúvel e associada às membranas) foi parcialmente purificado através da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-300 e cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose Fast Flow. O grau de purificação alcançado foi em torno de 35 vezes em relação ao extrato bruto. A peroxidase purificada apresentou atividade ótima a 30°C e pH 6. A enzima mostrou baixa estabilidade térmica, pois quando submetida ao tratamento térmico acima de 60°C por 5 minutos perdeu quase totalmente a sua atividade. Na faixa de pH 4-11 a peroxidase mostrou-se estável, mantendo cerca de 50% ou mais da sua atividade enzimática máxima. Neste estudo, foram detectadas duas isoperoxidasas básicas com pontos isoelétricos iguais a 9,5 e 10 e massas moleculares 58,1 kDa e 65,5 kDa. Os autores concluíram também que a atividade específica da peroxidase de morango decresceu marcadamente durante o amadurecimento do fruto, e que a atividade enzimática foi encontrada principalmente associada às membranas.

Forsyth & Robinson (1998) relataram o estudo da purificação e isolamento de duas isoperoxidasas catiônicas e duas aniônicas a partir de extratos de couve de bruxelas. A extração máxima da enzima foi alcançada usando-se tampão fosfato 10 mM em pH 7,5, contendo CaCl₂ 0,8 M na proporção 1:2 (couve de bruxelas:tampão). O extrato bruto foi purificado através da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel e troca iônica. Foram identificadas quatro isoperoxidasas distintas (A1, A2, C1 e C2) com massas moleculares iguais a 48,3; 33,4; 32 e 26,8 kDa e pontos isoelétricos (pI) 3,46; 4,88; 9,5 e 8,75, respectivamente. Os autores relatam que esta faixa ampla de massas moleculares foi inesperada, pois as peroxidases geralmente apresentam valores próximos a 40 kDa.

Lourenço & Neves (1997) estudaram a purificação parcial e propriedades da peroxidase solúvel de pêssego. A extração foi feita usando-se tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5 contendo 1 mM de l-cisteína e policíar At como sequestrador de compostos fenólicos. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi

concentrado e purificado pela combinação sequencial de cromatografia em colunas de DEAE-celulose, Sephadex G-100 e hidroxiapatita. A peroxidase, obtida como única fração, foi purificada 29 vezes com recuperação final de 55%. A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença de duas bandas de atividade em todas as fases da purificação. Os géis foram corados com os substratos o-dianisidina e água oxigenada. A peroxidase mostrou atividade ótima a 40°C e pH 5,0, demonstrando estabilidade na faixa de pH 3 a 8. A enzima mostrou-se praticamente estável quando exposta a 60°C. Porém a inativação térmica foi rápida acima de 70°C com quase perda completa da atividade a 80°C por 30 segundos. A energia de ativação (E_a) foi igual a 7,97 kcal/mol e o K_m 5,62 mM para o substrato o-dianisidina e 10,71 mM para a água oxigenada.

López-Serrano & Rós-Barceló (1996) descreveram a extração e purificação da isoperoxidase básica de morangos em seus estudos. O procedimento para extrair a enzima foi realizado em etapas sequenciadas, usando-se precipitação com acetona e sulfato de amônio, cromatografia hidrofóbica em coluna Phenyl-sepharose CL-4B, de afinidade em coluna de Conavalina A-Sepharose 4B e de troca iônica. O fator de purificação da isoperoxidase foi igual a 166,9 com rendimento final igual a 10%.

Clemente (1998) extraiu peroxidase solúvel e ionicamente ligada de laranjas e purificou através de focalização isoeletrica, filtração em gel e cromatografia de troca iônica em FPLC. Foram encontradas isoperoxidasas aniônicas e catiônicas cujos pI variaram de 4,5-9,0 e o peso molecular de 22 a 44 kDa.

Holschuh (2000) testou vários métodos de extração para a peroxidase livre e ionicamente ligada de carambola. A adição de 0,2M de $CaCl_2$, 0,01M de EDTA e 2% de PEG ao tampão de extração, fosfato de potássio 0,2M, pH 8, resultou no maior rendimento de extração por grama de carambola. A purificação da enzima bruta foi realizada por precipitação com acetona resfriada na proporção 1:2 (enzima:acetona), cromatografia de troca iônica em colunas DEAE-Toyopearl 650-C e permeação em gel em Toyopearl HW-55F. Foram obtidas quatro isoenzimas, mas apenas a isoenzima A2, de maior reatividade,

foi estudada. A isoperoxidase A2 foi purificada cerca de 124 vezes com rendimento de 22,5%. A atividade máxima da enzima foi a 50°C e pH 5,7-5,9. A isoenzima mostrou-se estável a 0°C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25°C na faixa de pH 6,0-9,0 durante 24 h, inativando-se após 1h de tratamento térmico a 75°C em pH 6,0 e após 5 minutos à temperatura de ebulição na faixa de pH 6,0-9,0. O valores de Km e Vmáx foram iguais a 20,3 mM e 8210 U/ml para o substrato guaiacol e 3,62 mM e 15937 U/ml para o p-fenilenodiamina, respectivamente. Para a água oxigenada o Km e Vmáx foram 12,75 mM e 11635 U/ml na reação com o guaiacol, e 1,85 mM e 19702 U/ml na reação com o p-fenilenodiamina, respectivamente.

Duarte-Vázquez *et al.* (2001) purificaram e determinaram as propriedades da isoperoxidase de nabo. A extração foi realizada homogeneizando-se as amostras do vegetal com tampão acetato de potássio, pH 6. O extrato bruto foi purificado até a homogeneidade pelas etapas de ultrafiltração, precipitação com acetona resfriada (-20°C; 1:2 (extrato:acetona)), cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e de interação hidrofóbica (metil-HIC). Foram obtidas duas frações ativas (F1 e F2), sendo que a F2 apresentou maior atividade específica. O fator de purificação foi igual a 210 e rendimento de 13,5 % para a F2 e 118 e 7,8% para a F1. Após a análise por eletroforese SDS-PAGE e coloração com prata, foi observado pequenas impurezas na F1 e apenas uma banda de proteína na F2. Somente a fração 2 foi usada nos estudos subsequentes devido ao maior grau de pureza. A massa molecular obtida por SDS-PAGE foi igual a 36 kDa. A análise determinada através da IEF revelou a natureza neutra da peroxidase cujo pI foi igual a 7,2. A natureza glicoprotéica da enzima foi avaliada por coloração, após o SDS-PAGE, usando-se um kit de detecção (Sigma). A isoperoxidase do nabo foi descrita como uma glicoproteína monomérica com 9,1% de carboidrato em sua constituição. Os valores de pH ótimo para a atividade enzimática e Km foram iguais a 4,5 e 0,7 mM para o substrato doador de hidrogênio, ABTS, e 5,5 e 3,7 mM para o guaiacol, respectivamente. A enzima reteve aproximadamente 70% de sua atividade após 11 min de tratamento térmico a 65°C, enquanto que a energia de ativação para inativação foi igual a 132 kJ/mol. A enzima purificada reteve aproximadamente 90% de atividade depois da estocagem a 2-6°C durante 1 mês e 100% após 6 meses a -20°C.

Bouel *et al.* (2000) estudaram a purificação e caracterização de uma peroxidase básica a partir do meio de cultura de suspensão de células de chicória. A enzima foi purificada através da precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica e permeação em gel. A peroxidase catiônica apresentou uma massa molecular igual a 34 kDa determinada por cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE corada com prata. O pI obtido foi igual a 8,9. A sequência parcial de aminoácidos da peroxidase não mostrou ser homóloga quando comparada a outras peroxidases de plantas. A enzima mostrou uma alta reatividade em relação ao substrato guaiacol e nenhuma reatividade ao substrato siringaldazina. Segundo os autores, o resultado obtido com a siringaldazina pode indicar que a enzima não esteja envolvida no processo de lignificação da parede celular.

Santos (2002) estudou as características da peroxidase parcialmente purificada do fruto açaí. A polpa do açaí foi centrifugada e o sobrenadante obtido foi denominado extrato enzimático bruto. A peroxidase foi parcialmente purificada por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A enzima mostrou atividade enzimática máxima a 35°C em pH 4,0 a 5,0 e boa estabilidade térmica, retendo aproximadamente 56% de sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento térmico a 70°C. A peroxidase purificada mostrou ser estável em ampla faixa de pH e a sua inativação térmica foi obtida após 3 minutos de tratamento térmico a temperatura de ebulição. A enzima apresentou maior afinidade em relação ao substrato guaiacol do que à p-fenilenodiamina. Os valores de Km e Vmáx para o guaiacol foram iguais a 2,4 mM e 25,5 U/min/ml e para o p-fenilenodiamina foram 3,9 mM e 52,9 U/ml/min, respectivamente.

Brito (2002) extraiu e caracterizou parcialmente a peroxidase bruta dos abacaxis cultivar IAC gomo de mel e clone IAC-1. O extrato bruto foi obtido após homogeneização e centrifugação da polpa. A enzima bruta de IAC1 e IAC gomo de mel apresentaram atividade ótima nas faixas de 50-55°C e 45-50°C, respectivamente, em pH 4,5. A peroxidase de IAC1 manteve cerca de 14 % de sua atividade enzimática após 30 minutos de tratamento térmico a 70°C e de 16% para o IAC gomo de mel, sendo que a inativação

térmica foi atingida após 2 minutos a 90°C. As peroxidases mostraram-se estáveis na faixa de pH 3,0-9,0 após 24 h de incubação a 5°C e após 3 h a temperatura ambiente.

2.5- Termoestabilidade e regeneração

O comportamento da peroxidase durante o aquecimento e resfriamento ou congelamento é o tópico mais investigado em relação a esta enzima. Tradicionalmente, a peroxidase tem sido relacionada à qualidade dos alimentos no processamento devido a sua alta estabilidade térmica (Burnette, 1977). A inativação térmica da POD obtida a partir de muitas fontes é, em certas condições, um processo bifásico e parcialmente reversível. A enzima é composta de unidades ou frações de diferentes resistências térmicas, e parte de sua atividade é restaurada durante períodos curtos ou longos de estocagem em temperatura ambiente ou mais baixa após o tratamento térmico (Vámos-Vigyázó, 1981).

Vámos-Vigyázó (1981) relataram que as reações de oxiredução catalisadas pelas peroxidases podem ocorrer mesmo a baixas temperaturas. O congelamento e a subsequente estocagem dos produtos congelados é feita geralmente depois do branqueamento porque a atividade enzimática da peroxidase não é destruída a -18°C ou -20°C, somente reduzida ou inativada reversivelmente (e regenerada após descongelamento), levando a deterioração do alimento.

Segundo Vámos-Vigyázó (1981), a resistência à estabilidade térmica e a tendência à regeneração da peroxidase, especialmente em vegetais não ácidos, induz o processador de alimentos a usar um processo de branqueamento ou pasteurização de forma mais severa. Estas condições podem prejudicar a qualidade do produto enlatado ou congelado, causando deterioração da cor, consistência, aroma, assim como perdas de componentes valiosos, tais como vitaminas, proteínas, aminoácidos, etc, ou seja, o tratamento térmico de frutas e vegetais pode afetar o valor nutritivo e a aceitabilidade das mercadorias processadas. Portanto, o excesso de branqueamento deveria ser evitado. Os autores relataram que este é um problema sério para as indústrias de enlatados e congelados. Nenhuma regra geral tem

sido ainda estabelecida em que extensão a presença da atividade da enzima regenerada é permitida a partir do aspecto da preservação da qualidade de frutos ou vegetais processados durante a estocagem.

Lu & Whitaker (1974) observaram em seus estudos com a peroxidase de raiz forte (HRP) que as taxas de inativação e reativação da enzima eram dependentes do pH. A peroxidase foi inativada rapidamente a 76°C e pH 4,5 ou inferiores, e não houve ganho mensurável na atividade nestas condições. A partir do pH 5 até 10, o efeito na taxa de inativação foi pequeno. Por outro lado, a taxa de regeneração aumentou de zero em pH 5 para o valor máximo em pH 9. Segundo os autores, a liberação do grupo heme da peroxidase é dependente do pH e esta seria a explicação para o efeito marcante do pH na inativação térmica da peroxidase.

McLellan & Robinson (1984) estudaram a regeneração das peroxidases solúveis e ionicamente ligadas extraídas a partir do albedo e do suco de laranjas após diversos tratamentos térmicos. A regeneração das enzimas foi feita após incubação a 30°C até 150 minutos. As peroxidases solúvel e ligada obtidas a partir do suco regeneraram 2% e 25%, respectivamente. Similarmente, a fração solúvel e ligada do albedo mostraram 5% e 25% de regeneração, respectivamente. Os autores concluíram que as peroxidases ionicamente ligadas foram mais estáveis ao calor e capazes de uma regeneração consideravelmente maior que as solúveis.

Boyes *et al.* (1997), relataram que a análise da peroxidase para testar o adequamento do branqueamento apresenta vários problemas tais como o número de isoenzimas, controle do pH, temperatura, concentração de sal, substrato da enzima, a presença de uma fase lag com algumas reações da peroxidase, a presença de cosubstratos endógenos e a sensibilidade na preparação das amostras. É freqüentemente difícil fazer comparações da peroxidase residual requerida para estabilidade do sabor em diferentes produtos durante a estocagem. As indústrias de alimentos podem testar somente a atividade da peroxidase residual solúvel em vegetais branqueados pela análise do sobrenadante de um homogenato centrifugado. Os

autores desenvolveram um método eficiente de preparação de três isoformas de grão e espiga de milho para examinar as propriedades relevantes para seus usos como enzimas indicadoras do branqueamento. Três isoformas, solúvel, ligada a membrana e a celulose foram isoladas e caracterizadas em relação aos seus usos individuais como indicadores para o branqueamento. As isoformas ligadas a membrana e a celulose apresentaram estabilidade térmica similares. Ambas foram significativamente mais estáveis ao calor que a isoforma solúvel quando medida in vivo depois do branqueamento. A regeneração foi relacionada principalmente a isoforma solúvel.

Rodrigo *et al.* (1997) relataram que a elevada termoestabilidade das peroxidases, a possibilidade de formação de novas isoenzimas quando estas são aquecidas a altas temperaturas, e a possível relação entre a atividade enzimática residual ou regenerada e as perdas de qualidade em HTST (High Temperature Short Time) são as razões pelas quais a peroxidase seja a enzima escolhida para otimizar o processo de branqueamento.

Segundo Cano *et al.* (1998), a ação prejudicial da peroxidase é observada na maioria das frutas e vegetais congelados, junto com a lipoxigenase, catalase e polifenoloxidase. As atividades destas enzimas diminuem a baixas temperaturas, exceto das peroxidases. As reações químicas que elas catalisam podem ocorrer mesmo a temperaturas de subcongelamento. A quebra das células da membrana pelo congelamento descompartmentaliza as enzimas que podem levar a formação de outros compostos fisiológicos. A atividade da peroxidase é usualmente reduzida ou reversivelmente inativada a baixas temperaturas, e a regeneração é freqüentemente observada depois de longos períodos de estocagem.

A inativação térmica é mostrada como sendo um processo bifásico, presumidamente, devido a existência de isoenzimas com estabilidades térmicas diferentes. Estudos de inativação térmica da peroxidase em extratos de plantas têm mostrado, de maneira geral, ser este processo não linear com relação ao tempo e a temperatura, devido à presença de isoperoxidasas com diferentes graus de termoestabilidade. Alvim & Clemente

(1998) estudaram a termoestabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada extraídas da polpa e casca de mexerica. As frações solúveis e iônicas da casca mostraram ser mais resistentes ao tratamento térmico quando comparadas aos extratos da polpa. Foi observado após separação cromatográfica que o extrato solúvel da casca continha duas isoenzimas aniônicas e duas catiônicas. As isoenzimas catiônicas foram mais resistentes ao tratamento térmico que as aniônicas. Os autores descreveram que o estudo da atividade enzimática mostrou ser não linear em relação ao aumento da temperatura.

Forsyth *et al.* (1999) relataram que vários mecanismos tem sido propostos para explicar o desvio da linearidade no processo de inativação térmica da peroxidase. Além da presença de isoperoxidasas com propriedades térmicas diferentes, os autores relataram explicações alternativas como a formação de agregados termoestáveis e mudanças conformacionais e químicas na enzima. Tamura & Morita (citado por Forsyth *et al.*, 1999), sugeriram a perda do grupo heme para formar a apoenzima. Adams (1997) mostraram que os fragmentos heme foram formados durante a inativação térmica de uma preparação comercial de peroxidase de raiz forte e que a cinética não linear de inativação térmica ocorreu devido a recuperação e regeneração da atividade da peroxidase em valores de pH ácido.

As termoestabilidades de quatro isoperoxidasas, duas catiônicas (C1 e C2) e duas aniônicas (A1 e A2), altamente purificadas de couve de bruxelas foram determinadas no estudo feito por Forsyth *et al.* (1999). Os pesquisadores fizeram o estudo durante os primeiros segundos do tratamento, ponto em que os autores consideraram ser de maior perda de atividade. Os autores verificaram que as isoenzimas aniônicas mostraram ter uma maior regeneração da atividade depois do tratamento térmico e isto seria devido as suas maiores capacidades de recuperação do grupo heme liberado previamente. Eles relataram que mais estudos serão necessários para entender completamente as diferenças de estabilidade entre as isoperoxidasas purificadas.

Forsyth *et al.* (1999) relataram que grandes diferenças na glicosilação das peroxidases justificaria algumas das diferenças de estabilidade observadas. Esta colocação foi feita a partir das sugestões apresentadas por Forsyth & Robinson (1998) sobre as massas moleculares das isoperoxidasas de couve de bruxelas. As isoenzimas apresentariam graus variados de glicosilação, a forma A1 (PM= 48 Kda) seria a mais glicosilada enquanto a forma C2 (PM= 26 Kda) provavelmente menos. Nos trabalhos de Sanchez & Romero e Tams & Welinder (citado por Forsyth *et al.*, 1999), a desglicosilação da peroxidase, a partir de rábano ou abacate, levou ao decréscimo na resistência térmica.

Santos (2002) estudou a capacidade de regeneração da atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí após tratamento térmico a 80 e 90°C até 5 minutos. A regeneração foi avaliada após incubação da enzima à temperatura ambiente e refrigeração por 3 e 24 horas. Foram observadas regenerações da atividade enzimática de até 30% após tratamento térmico a 80°C e de aproximadamente 18% a 90°C, após incubação por 24 horas a temperatura ambiente.

2.6- Inibidores

O uso de compostos químicos, adicionados em baixas quantidades nos alimentos sem alterar as suas propriedades organolépticas e físico-químicas drasticamente, é também uma opção tecnológica para inibir a atividade de enzimas oxidativas. Vámos-Vigyázó (1981) relataram que o mecanismo de inativação envolveria a interação direta com a enzima, com alguns dos substratos ou produtos.

O inibidores mais usados frequentemente na indústria são o SO₂ e os sulfitos. O uso de 0,1 a 0,15 % de metabissulfito de sódio evitou a formação de “off-flavour” em ervilhas processadas, mas apenas reduziu parcialmente a regeneração da enzima (Haisman, citado por Vámos-Vigyázó, 1981). A ação de SO₂ nas peroxidases parece estar relacionada meramente à destruição da água oxigenada. O SO₂ elimina a água oxigenada, bloqueando a

atividade enzimática e mantendo o substrato doador na sua forma reduzida (Vámos-Vigyázó, 1981).

Ashie *et al.* (1996) relataram que a maioria dos compostos químicos usados industrialmente são eficientes no controle da atividade enzimática, mas o seu uso é freqüentemente restrito devido a toxidez, custo e influência na qualidade total do alimento. Em relação aos sulfitos, apesar de serem efetivos no controle do escurecimento enzimático, há vários atributos negativos associados ao seu uso. Eles podem causar efeitos adversos à saúde, como reações alérgicas principalmente em pessoas asmáticas.

Lourenço & Neves (1997) analisaram o efeito de alguns íons na atividade enzimática da peroxidase purificada de pêsego e o estudo mostrou que a inibição mais expressiva foi a do íon Fe^{2+} na concentração de 10 mM. O ácido cafeico, ferrúlico, p-fumárico, ditiotreitól, l-cisteína e KCN também mostraram-se inibidores da enzima. A incubação da enzima a 70°C na presença de diferentes sais acarretou num aumento da velocidade de inativação, a qual foi crescente em função da concentração de Na_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, KCl, LiCl e $CaCl_2$. Os autores relatam que os dados sobre o efeito dos sais na atividade de diferentes enzimas variam desde a ativação até a inibição, dependendo da enzima, substrato, tipo e concentração do sal, pH, etc.

Lu & Whitaker (1974) observaram que o NaCl teve um efeito marcante na atividade da peroxidase de raiz forte (HRP) quando submetida ao aquecimento a 76°C e pH 7, mas um efeito muito menor na recuperação da atividade.

Da Silva *et al.* (1997) estudaram a qualidade do suco polposo de cajá obtido por extração mecânico-enzimática. Como parte complementar do processamento foi empregado o método conjugado “hot fill” mais aditivos químicos para a preservação do suco integral. Após a adição dos compostos químicos, benzoato de sódio 50 ppm e metabissulfito 200 ppm, o suco foi submetido a um tratamento térmico em batelada a 95°C por 3 minutos. Os autores não relataram qualquer controle da atividade da peroxidase ou outra enzima

oxidativa. Apenas foi observado que durante o período de estocagem de 120 dias a 25°C, as características físico-químicas e sensoriais do suco permaneceram inalteradas.

Holschuh (2000) estudou o efeito de diversos compostos químicos na atividade da isoperoxidase purificada de carambola. A enzima foi inibida fortemente por CuSO₄ 0,05mM, KCN 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, ácido ferrúlico 5 mM, metabissulfito de sódio 5 mM e Fe₂(SO₄)₃ 10mM, enquanto que o CaCl₂ na concentração de 5 mM ativou-a.

Santos (2002) estudou o uso de alguns compostos químicos no controle da atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí. A enzima foi inibida 99,9% em sua atividade pelo uso de metabissulfito de sódio 1 mM e ácido ascórbico 1 mM e foi completamente inibida pela ação de β-mercaptoetanol 10 mM e KCN 1 mM. Os sais KCl, MnSO₄, MgSO₄, NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄ na concentração final 10mM inibiram parcialmente a peroxidase, sendo obtidas atividades residuais iguais a 75,7%, 71,9%, 68,2%, 49,5%, 37,1% e 23,2%, respectivamente.

2.7- Aplicações da peroxidase

Além de suas atividades ligadas a funções fisiológicas nas frutas e vegetais e ações na qualidade dos alimentos, as peroxidases isoladas de plantas, animais e microrganismos tem atraído a atenção das indústrias devido às suas propriedades catalíticas como a versatilidade em reconhecer vários substratos e a sua termoestabilidade. Elas apresentam aplicações de grande interesse na área de análises clínicas como determinação de glicose por método enzimático, na área de síntese orgânica (Loughlin, 2000), tratamento de resíduos industriais (Tong *et al.*, 1997), confecção de biosensores (Fatibello Filho & Vieira, 2000) e imunoenaios enzimáticos (Milande *et al.*, 1996). As peroxidases, dependendo da fonte obtida, podem apresentar aplicações únicas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostra

As amostras de fruto e polpa de taperebá foram obtidas de indústria de processamento de frutas do município de Manaus, Estado do Amazonas.

3.2- Extração da peroxidase bruta do taperebá

A extração da peroxidase foi feita homogeneizando-se, em liquidificador, a polpa de taperebá com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0 na proporção 1:1. Em seguida, foi adicionado EDTA, CaCl₂ e PEG na concentração final de 0,01M, 0,2M e 2%, respectivamente (Holschuh, 2000). A amostra foi homogeneizada, em banho de gelo por 15 minutos usando-se um liquidificador, e centrifugada a 11.000 g por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi filtrado, em papel de filtro, obtendo-se assim o extrato bruto.

3.3- Determinação da atividade de peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada usando-se os substratos guaiacol e peróxido de hidrogênio, como descrito por Khan & Robinson (1994) com modificações. A mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5 e 1,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,5 foi previamente incubada em cubeta a 35°C durante 10 minutos em espectrofotômetro Beckman UV/VI, modelo DU-70 acoplado a um controlador de temperatura. Em seguida, foi adicionado 0,4 ml de solução 0,33% de H₂O₂ em tampão citrato fosfato 0,05M, pH 5,5, e 0,1 ml da enzima. A reação foi acompanhada registrando-se o aumento da absorbância a 470 nm durante 5 minutos a 35°C contra o branco. Para o tubo branco, misturou-se 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5, 1,6 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,5 e 0,1 mL da enzima. Uma **unidade de atividade** da peroxidase foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto.

3.4- Caracterização da peroxidase bruta do taperebá

3.4.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta

O efeito do pH na atividade da peroxidase foi testado na faixa de pH 2,6 a 10 usando-se os sistemas tampão acetato (pH 3,6 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0), tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 7,0) e tampão borato (pH 8,0 a 10,0). A mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol e 1,2 mL de tampão 0,1M de diferentes valores de pH foi pré-incubada em cubeta a 35°C durante 10 minutos no espectrofotômetro Beckman UV/VI, modelo DU-70 acoplado a um controlador de temperatura. Em seguida, foram adicionados 0,4 ml de solução 0,33% de H₂O₂ e 0,1 ml de enzima. A reação foi acompanhada registrando-se o aumento da absorbância a 470 nm durante 5 minutos a 35°C contra o branco. Para o tubo branco, misturou-se 1,5 mL de solução de 1% de guaiacol, 1,6 mL de tampão 0,1M e 0,1 mL da enzima.

3.4.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta

O efeito da temperatura na atividade de peroxidase foi testado como descrito no item 3.3 na faixa de 10°C a 70°C.

3.4.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta

Tubos contendo 0,5 mL de solução enzimática foram incubados com 0,5 mL de diferentes soluções tampão 0,2 M na faixa de pH 2,6-10 a 5°C por 24 h e 30°C durante 3h em banhos de água termostatizados. Os tampões usados foram tampão acetato (pH 3,6 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0), tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 7,0) e tampão borato (pH 8,0 a 10,0). A atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3. Como controle determinou-se a atividade da solução de peroxidase sem tratamento térmico (100% de atividade).

3.4.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta

Tubos contendo 0,5 mL de solução enzimática foram incubados na faixa de 10°C a 90°C durante 1h em banhos de água termostatizados. Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3. Como controle determinou-se a atividade da solução de peroxidase sem tratamento térmico (100% de atividade).

3.4.5- Inativação térmica da peroxidase bruta

Tubos contendo 2 ml de solução enzimática foram tratados a 70°C, 80 °C, 90 °C e ebulição durante 30 segundos e 1, 2, 3, 4 e 5 minutos de incubação em banhos de água termostatizados. Após os tratamentos térmicos as amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e a atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3. Como controle determinou-se a atividade da solução de peroxidase sem tratamento térmico (100% de atividade).

3.4.6- Regeneração da atividade da peroxidase bruta

Tubos contendo 2 ml da solução enzimática foram tratados termicamente a 90°C por 2 min em banho de água termostatizado. Após o aquecimento as amostras foram incubadas a 5°C e a 30° C por 24 h para verificar a capacidade de regeneração da atividade enzimática. A atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3.

3.5- Purificação da peroxidase do taperebá

A peroxidase foi purificada por meio de precipitação com acetona e cromatografia de permeação em gel em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) da Amersham Pharmacia Biosciences.

3.5.1- Precipitação com acetona

A peroxidase do extrato bruto obtida como descrito no item 3.2 foi precipitada com acetona resfriada a -20°C na proporção de 1:2 (enzima: acetona) em banho de gelo por aproximadamente 3 minutos, e em seguida centrifugada a 11.000 g por 15 minutos a 5°C . O precipitado contendo a peroxidase, foi submetido à secagem em placas de vidro ao ar livre em ambiente refrigerado. O material foi pulverizado e estocado a -15°C . A concentração de proteína foi determinada como descrito a seguir.

3.5.2- Determinação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972) usando-se ovoalbumina como padrão de proteína.

3.5.3- Cromatografia de permeação em gel – FPLC

Uma amostra de 7,5 g do pó cetônico obtido como descrito no item 3.5.1 foi ressuspendida em 100 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. A solução enzimática foi centrifugada a 11.000 g por 15 minutos a 5°C e filtrada em filtro com $0,22\ \mu\text{m}$ de porosidade para soluções aquosas. Uma alíquota de 2 ml da amostra de peroxidase contendo 79.363 U/ml foi aplicada em coluna de permeação em gel Sephacryl S-200 (1,6cm x 60cm) acoplada ao FPLC. A coluna foi equilibrada previamente com o tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,5 contendo NaCl na concentração final de 0,1 M, no fluxo de

0,3 ml/min. A eluição das proteínas foi realizada usando-se o mesmo tampão no fluxo de 0,3 ml/min. Foram coletadas frações de 2,4 ml, e as amostras contendo atividade de peroxidase foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e estocadas a -15°C . A concentração de proteína foi determinada como descrito no item 3.5.2.

3.6- Caracterização da peroxidase purificada do taperebá

As características da peroxidase purificada foram determinadas como mostrado a seguir.

3.6.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada

O efeito do pH na atividade da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.4.1.

3.6.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada

O efeito da temperatura na atividade de peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.4.2.

3.6.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada

O pH de estabilidade da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.4.3.

3.6.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada

A termoestabilidade da peroxidase purificada foi determinada como descrito no item 3.4.4.

3.6.5- Inativação térmica da peroxidase purificada

A inativação térmica da peroxidase purificada foi determinada como descrito no item 3.4.5.

3.6.6- Regeneração da atividade da peroxidase purificada

Tubos contendo 2 ml da solução enzimática foram tratados termicamente a 90°C por 2 min. em banho de água termostaticado. Após o aquecimento as amostras foram incubadas a 5°C e a 30°C por 24 h para verificar a capacidade de regeneração da atividade enzimática. O estudo da regeneração da atividade de peroxidase purificada foi testada também na amostra inativada parcialmente a 70°C durante 10 min., após incubação a 30°C durante 30 min. e 3 h. A atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3.

3.6.7- Efeitos de sais minerais e outros inibidores na atividade da peroxidase purificada

Foram testados os efeitos dos sais minerais, KCN, CuSO₄, KCl, NaCl, MgSO₄, MnSO₄, Fe(SO₄)₃, Fe₂O₃, CaCl₂ e Na₂SO₄, e dos inibidores SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), N-bromosuccinimida, EDTA, β-mercaptoetanol, iodoacetamida, bissulfito de sódio e metabissulfito de sódio nas concentrações finais de 1 e 10 mM, na atividade da peroxidase purificada. A atividade residual da peroxidase foi determinada como descrito no item 3.3.

3.6.8- Efeito da concentração do substrato na atividade da peroxidase purificada

A influência da concentração do substrato na atividade da peroxidase purificada foi determinada para o substrato guaiacol. Para a determinação do efeito do substrato, a mistura de 1,5 ml do guaiacol nas concentrações variáveis entre 5 e 90 mM em tampão citrato-fosfato 0,5M, pH 5,5, e 1,2 ml de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5, foram pré-incubadas em cubeta a 35°C durante 10 minutos no espectrofotômetro Beckman UV/VI, modelo DU-70 acoplado a um controlador de temperatura. Em seguida, adicionou-se 0,4 ml de solução 100mM de H₂O₂ e 0,1 ml da enzima. A reação foi acompanhada registrando-se o aumento da absorbância a 470 nm durante 5 minutos a 35°C contra o branco. Para o tubo branco, misturou-se 1,5 mL de solução de guaiacol nas concentrações indicadas, 1,6 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5 e 0,1 mL da enzima.

Os valores da constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinados para o substrato guaiacol usando-se o sistema gráfico de Hanes-Woolf (Dixon & Webb, 1971).

3.6.9- Determinação da massa molecular da peroxidase purificada

A massa molecular (MM) da peroxidase foi estimada por filtração em gel em uma coluna Sephacryl S-200 (1,6 cm x 60 cm) acoplada ao FPLC, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5 contendo NaCl na concentração final de 0,1M. O volume vazio (V₀) foi determinado pela eluição da "Blue Dextran" através da coluna. O volume de eluição (V_e) para cada padrão de proteína foi determinado pela medida da absorbância a 280 nm. Foram usados os seguintes padrões de proteínas para calibrar a coluna: β-amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), soro ovoalbumina (46kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,4 kDa). A curva de log (MM) versus V_e/V₀ foi usada para determinar a massa molecular da peroxidase.

3.6.10- Determinação do ponto isoelétrico da peroxidase purificada

O ponto isoelétrico da peroxidase foi determinado em unidade de eletrofocalização IPGphor da Amersham Biosciences com sistema SE-600 conectado a um sistema refrigerado Multitemp II.

A eletroforese foi realizada em gel bidimensional em condições desnaturantes seguindo as instruções dos fabricantes (número do catálogo 17-1235-01). Uma amostra de 20 µg da enzima purificada foi solubilizada em 350µl de tampão amostra contendo 8M de uréia, 4% (p/v) de CHAPS, 2% (v/v) de anfólitos carreadores pH 3-10, 70mM de DTT e 0.001% (p/v) de azul de bromofenol (BPB). A amostra foi aplicada em tiras de IPG (Immobilized pH Gradient) com uma faixa de pH 3-10 de separação não-linear. Depois da reidratação por 10 horas, a focalização isoelétrica foi realizada a 20°C por 1 hora em 500V, por 1 hora adicional em 1000V e então por 10 horas em 8000V, mantendo uma corrente de 50µA por tira. Depois da corrida, a tira foi embebida por 10 minutos em uma solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6M de uréia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de SDS e 2% (p/v) de DTT, e em seguida embebida por 10 minutos no mesmo solvente contendo 2,5% (p/v) de iodoacetamida ao invés do DTT. Para a eletroforese de segunda dimensão (SDS-PAGE), a tira foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida 12,5% e vedada com agarose. A eletroforese foi conduzida por 1 hora a 90V no qual uma amperagem constante de 30mA foi aplicada por gel até o corante alcançar o final do gel. As proteínas foram detectadas usando-se o corante coomassie blue e o ponto isoelétrico foi determinado usando-se a curva de calibração fornecida pelo fabricante.

3.6.11- Eletroforese em gel de poliacrilamida

A amostra purificada foi submetida aos estudos de eletroforese em condições desnaturantes e não desnaturantes para determinação da massa molecular das subunidades, pureza da enzima e atividade enzimática como descrito a seguir.

3.6.11.1- Eletroforese da peroxidase SDS-PAGE

A eletroforese da peroxidase foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% a temperatura ambiente de acordo com Weber & Osborn (1969) e Laemmli (1970). As seguintes proteínas foram usadas como padrões: fosforilase b (94 kDa), soro albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4kDa). As proteínas foram coradas com nitrato de prata.

3.6.11.2- Eletroforese para detecção da atividade da peroxidase

A eletroforese da peroxidase foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% a temperatura ambiente de acordo com Weber & Osborn (1969) e Laemmli (1970) em condições não desnaturantes. A atividade enzimática foi realizada de acordo com Gove & Hoyle (1975), utilizando-se os substratos guaiacol a 1% e H₂O₂ a 0,33% em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,5.

3.6.11.3- Eletroforese para detecção da natureza glicoprotéica

A eletroforese da peroxidase foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% a temperatura ambiente de acordo com Weber & Osborn (1969) e Laemmli (1970). A natureza glicoprotéica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Korn & Wright (1973). As proteínas foram coradas com o reagente de Schiff.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Extração da peroxidase bruta do taperebá

A peroxidase ionicamente ligada do taperebá foi extraída com tampão e aditivos, de acordo com o método descrito no item 3.2. O tampão de alta força iônica e o CaCl_2 foram usados para extrair a peroxidase ionicamente ligada e os aditivos PEG e EDTA na proteção contra a inativação enzimática, como citado por Vámos-Vigyázó (1981) e Holschuh (2000). O extrato bruto da peroxidase de taperebá apresentou atividade igual a 44.350 U/ml correspondente a 88.700 U/g de polpa e atividade específica igual a 16.475 U/mg de proteína.

Vários autores relataram o uso de aditivos químicos na extração de peroxidases de plantas. Soda *et al.* (1991) extraíram a peroxidase do fruto kiwi pelo uso do tampão Tris-HCl 200mM, pH 9, contendo alguns aditivos dentre os quais 5% de NaCl e 1mM de EDTA. A peroxidase bruta de kiwi apresentou atividade específica igual a 2 U/mg de proteína, usando-se o substrato guaiacol. A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causa uma mudança de 1 DO a 470 nm por minuto.

Lourenço & Neves (1997) extraíram a peroxidase solúvel de pêssego usando tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, contendo 1 mM de l-cisteína e policlar At como sequestradores de compostos fenólicos. O extrato bruto apresentou atividade específica igual a 39.286 U/mg de proteína, usando-se o-dianisidina como substrato.

Forsyth & Robinson (1998) extraíram a enzima solúvel de couve de bruxelas usando tampão fosfato 10 mM em pH 7,5 e 1% de PVP. Os autores também verificaram o efeito da concentração do CaCl_2 na extração da peroxidase ligada. A extração máxima (68,8% da atividade total) foi alcançada usando-se tampão fosfato 10 mM em pH 7,5 contendo CaCl_2 0,8mM na proporção 1:2 (couve de bruxelas:tampão). A atividade da peroxidase foi estimada utilizando-se o-dianisidina como substrato doador de hidrogênio.

Holschuh (2000) testou vários métodos de extração, com ou sem aditivos, da peroxidase livre e ionicamente ligada de carambola. A adição de 0,2M de CaCl₂, 0,01M de EDTA e 2% de PEG ao tampão de extração, fosfato de potássio 0,2M, pH 8, resultou no maior rendimento de extração por grama de carambola.

Santos (2002) verificou que a peroxidase do açaí apresentou 1.538 U de peroxidase por grama de polpa e Brito (2002) encontrou a maior atividade de peroxidase no abacaxi IAC-1 equivalente a 4.065 U/g de polpa. As peroxidases brutas de ambos os frutos foram obtidas na forma solúvel.

4.2- Caracterização da peroxidase bruta do taperebá

As características bioquímicas da peroxidase bruta do taperebá foram determinadas como descrito no item 3.4.

4.2.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta

O efeito do pH na atividade da peroxidase bruta do taperebá foi determinado como descrito no item 3.4.1. A peroxidase apresentou alta atividade enzimática na faixa de pH (4,0- 5,5) alcançando um valor máximo a pH 4,5 em tampão acetato, como mostrado na Figura 2. A atividade da peroxidase bruta foi menor que 20% para valores de pH igual e acima de 8. A enzima exibiu considerável atividade relativa em pH mais ácido, aproximadamente 40% em pH 2,6.

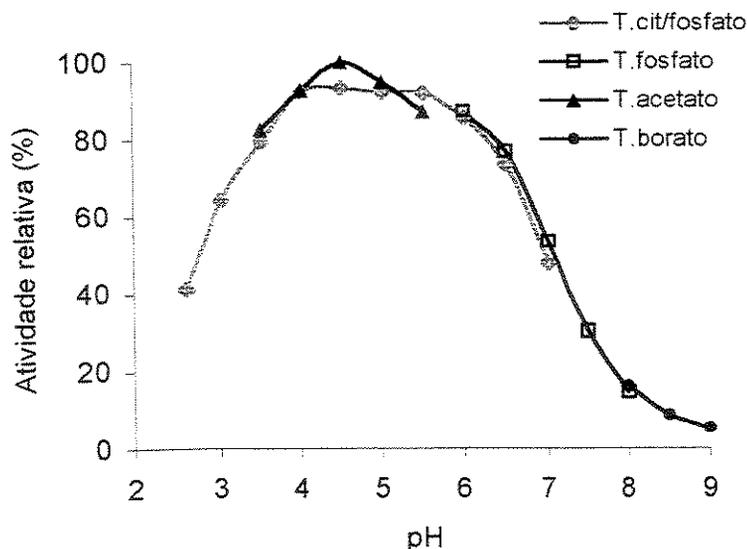


Figura 2. Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta do taperebá

O pH ótimo de atividade da peroxidase bruta de taperebá foi semelhante ou próximo ao encontrado para algumas peroxidases de frutas.

Moulding *et al.* (1987) verificaram que as isoperoxidasas de maçã apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 5 a 6, usando-se o substrato o-dianisidina. Os autores observaram que as isoenzimas mostraram-se mais ativas em tampão acetato.

Lourenço & Neves (1997) estudaram a peroxidase solúvel de pêssgo e encontraram atividade máxima em pH 5,0 utilizando o substrato o-dianisidina.

Soda *et al.* (1991) estudou o efeito do pH na atividade da peroxidase do kiwi e verificou uma atividade máxima em pH 5,5, usando-se guaiacol como substrato doador de hidrogênio.

Santos (2002) verificou que a peroxidase bruta do açaí apresentou maior atividade em pH 5 em tampão acetato, usando-se o substrato guaiacol.

Brito (2002) relatou que a peroxidase bruta do abacaxi IAC1 e IAC gomo de mel apresentou atividade ótima em pH 4,5 em tampão citrato-fosfato e acetato, usando-se como substrato o guaiacol.

Valores mais elevados foram encontrados para as peroxidases de uva (pH 6) (Lee *et al.*, 1983) e carambola (pH 5,7-5,9) (Holschuh, 2000), utilizando-se o guaiacol como substrato.

Segundo Vámos-Vigyázó (1981), o pH para atividade máxima de peroxidase varia com a fonte da enzima, a composição de isoenzimas, o substrato doador e o tampão utilizado na análise.

4.2.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta

O efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta foi determinado como descrito no item 3.4.2. De acordo com a Figura 3, a atividade da peroxidase alcançou um máximo a 35°C, atingindo menos que 20% de atividade relativa a 70°C. A enzima exibiu uma elevada atividade enzimática a 10°C, em torno de 60%.

Os valores de atividade ótima para peroxidases de frutas e vegetais são encontrados na faixa de 30°C a 55°C. A temperatura ótima da peroxidase bruta do taperebá foi semelhante ao valor de 35°C obtido para a peroxidase de açaí (Santos, 2002), couve-rábano (Vámos- Vigyázó, 1981) e próxima ao valor encontrado por Civello *et al.* (1995) para a enzima de morango (30°C). A atividade da peroxidase de morango estudada por Civello *et al.* (1995) decresceu acentuadamente em temperaturas elevadas, atingindo valores menores que 20% a 50°C.

Valores mais elevados de temperatura ótima foram encontrados para peroxidases obtidas de outros frutos. Soda *et al.* (1991) e Holschuh (2000) determinaram a temperatura

ótima das peroxidases de kiwi e carambola, respectivamente, e obtiveram um valor igual a 50°C. Lourenço & Neves (1997) estudaram as propriedades da peroxidase solúvel de pêsego e a enzima mostrou atividade máxima a 40°C. Brito (2002) extraiu e caracterizou parcialmente a peroxidase bruta dos abacaxis cultivar IAC gomo de mel e clone IAC-1. As enzimas brutas de IAC1 e IAC gomo de mel apresentaram atividade ótima nas faixas de 50-55°C e 45-50°C, respectivamente.

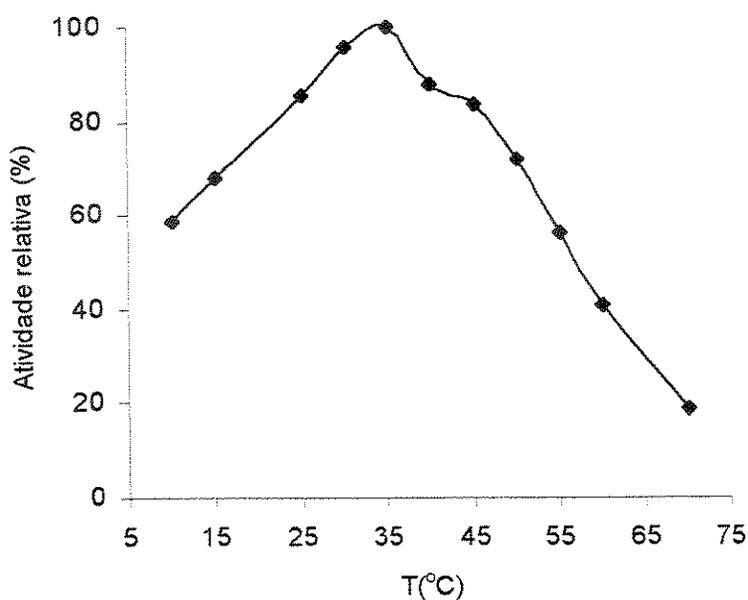


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta do taperebá

4.2.3- Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta

O efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta do taperebá foi determinado como descrito no item 3.4.3. As Figuras 4 e 5 ilustram o efeito do pH na estabilidade da peroxidase após 3h a 30°C e 24h a 5°C, respectivamente. As Figuras 4 e 5 mostram que a peroxidase bruta do taperebá apresentou estabilidade na faixa de pH 2,6-10, mantendo atividade residual maior que 40% após 3h de incubação a 30°C e 24h a 5°C. Foram observados diferentes picos de maior estabilidade da enzima bruta sugerindo a presença de isoformas. A peroxidase bruta mostrou maior estabilidade em tampão citrato-fosfato em pH

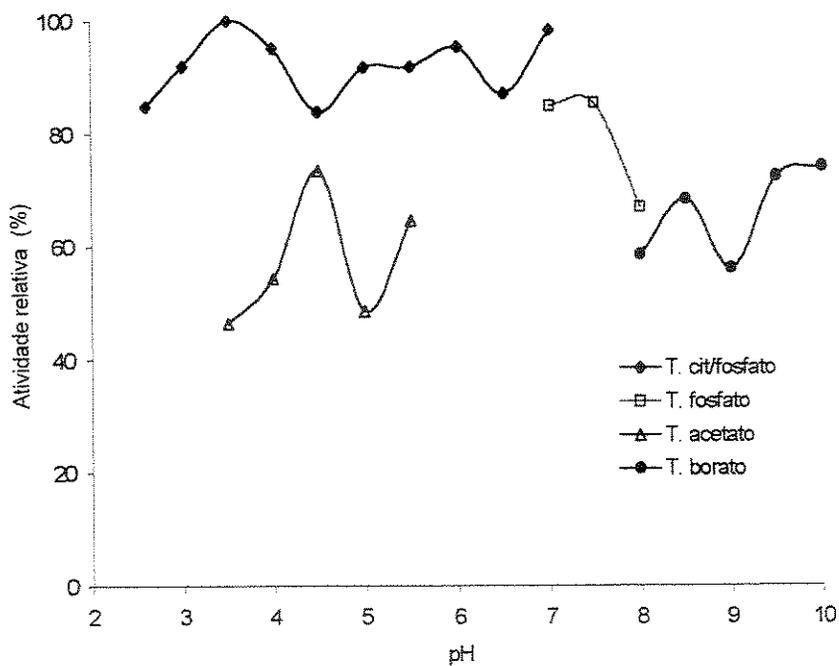


Figura 4. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta após 3 h de incubação a 30°C

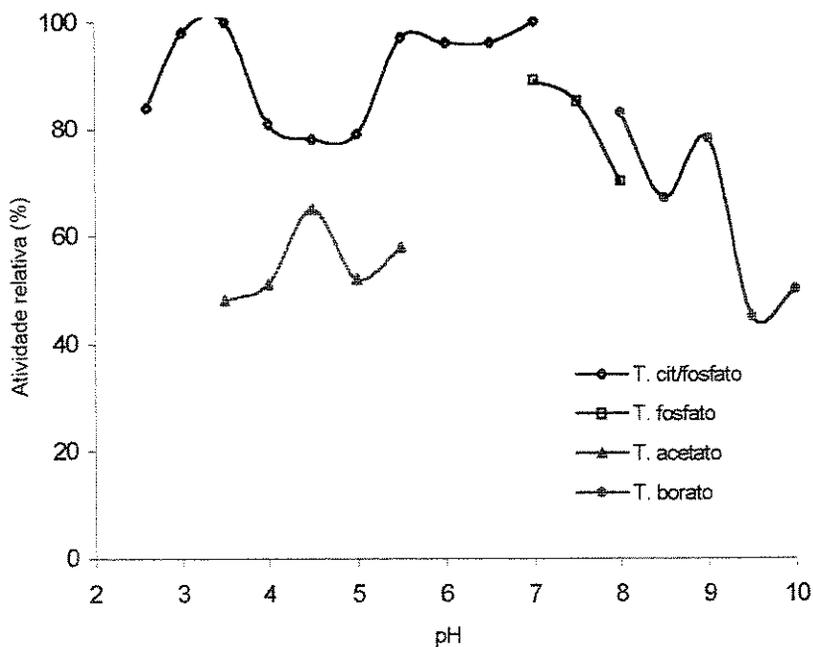


Figura 5. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta após 24h de incubação a 5°C

3,5 e na faixa de 5,0-6,0, retendo mais que 90% de atividade residual a 30°C por 3h (Figura 4). A 5°C durante 24h de incubação a peroxidase bruta mostrou maior estabilidade em tampão citrato-fosfato em pH 3,5 e na faixa de 5,5-7,0, retendo até 100% de atividade (Figura 5).

As peroxidases de frutas usualmente apresentam estabilidade em ampla faixa de pH. Civello *et al.* (1995) verificaram que a peroxidase de morango apresentou estabilidade na faixa de pH 4-11 quando incubada a 20°C durante 30 min. A enzima mostrou-se mais estável na faixa de pH 6,0-7,5 com atividade residual igual a 90% de sua atividade máxima. A estabilidade da enzima foi totalmente perdida em pH menores que 3.

Lourenço & Neves (1997) estudaram as características da peroxidase de pêssego e observaram que a enzima mostrou-se estável na faixa de pH 3,0-8,0 durante 2h a 30°C sem perda de atividade.

Holschuh (2000) verificou que a isoperoxidase de carambola manteve-se estável a 0°C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25°C na faixa de pH 6,0-9,0 durante 24 h.

Santos (2002) relatou que a peroxidase de açaí apresentou alta atividade na faixa de pH 2,6-10 durante 24h a 5°C. No tratamento a 30°C durante 3h a enzima manteve-se estável em ampla faixa de pH, sendo observado um pico de maior atividade em pH 3 e na faixa de pH 5,0 a 6,0.

Brito (2002) observou que a peroxidase bruta do abacaxi mostrou-se estável na faixa de pH 3,0-9,0 após 24 h de incubação a 5°C e após 3 h a temperatura ambiente.

4.2.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta

O efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta foi determinado como descrito no item 3.4.4. Os resultados obtidos após os tratamentos térmicos da peroxidase são mostrados na Figura 6.

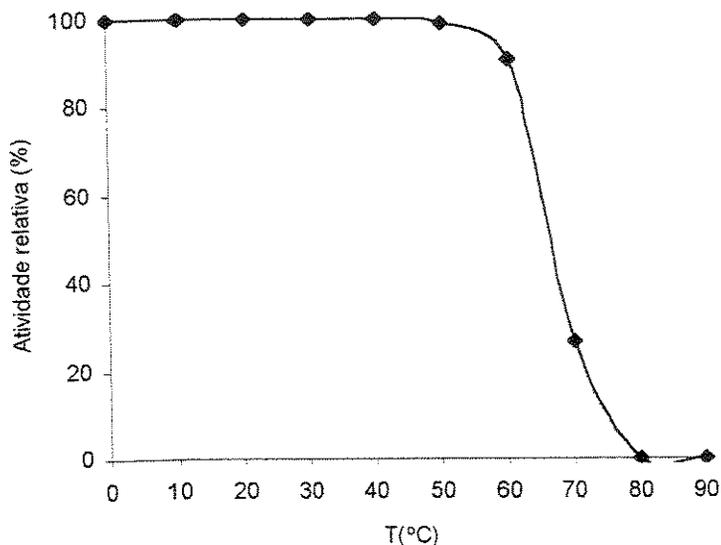


Figura 6. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta após 1 h de incubação

O estudo do efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase de taperebá mostrou que esta enzima é termoestável após 1 h de tratamento térmico até 50°C. Após 1h de tratamento térmico a 60°C a enzima reteve 80% da atividade inicial. Em temperaturas superiores a 60°C a queda da atividade enzimática foi bem acentuada. Após 1h de tratamento térmico a 70°C, a peroxidase bruta do taperebá reteve menos que 30% de atividade residual e em temperaturas mais elevadas (80°C e 90°C) a perda da atividade da peroxidase foi completa.

A peroxidase bruta do taperebá mostrou ser mais termoestável que a peroxidase bruta do abacaxi IAC1 e IAC gomo de mel, que manteve cerca de 14 % e 16% de sua atividade enzimática após 30 minutos de tratamento térmico a 70°C, respectivamente,

(Brito, 2002) e menos termoestável que a peroxidase do açaí, a qual reteve mais que 50% de sua atividade inicial após 1h de incubação a 70°C (Santos, 2002).

Tratamentos térmicos em tempos mais longos também foram feitos na peroxidase de morango. Civello *et al.* (1995) verificaram que a enzima manteve a atividade original após 20 min. de tratamento a 45°C, sendo que a 55°C após 20 minutos apenas 23% de atividade residual foi obtida. Em temperaturas superiores a 60°C a perda de atividade enzimática foi quase total.

Pomar *et al.* (1997) relataram que a peroxidase de pimenta apresentou 25% de atividade residual após 15 min. de tratamento térmico a 60°C.

As peroxidases são consideradas uma das enzimas mais termoestáveis presentes nas plantas superiores e suas atividades podem causar modificação da cor, formação de aromas desagradáveis e perdas de valor nutricional em alimentos crus e processados (Burnette, 1977). O branqueamento é um método utilizado para controlar a atividade oxidativa desta enzima. Os resultados obtidos para a inativação térmica da peroxidase bruta do taperebá serão discutidos no item a seguir.

4.2.5- Inativação térmica da peroxidase bruta

A inativação térmica da peroxidase bruta foi determinada como descrito no item 3.4.5. A Figura 7 mostra que a inativação térmica da peroxidase bruta do taperebá apresentou um comportamento não linear com o tempo de aquecimento como descrito para as peroxidases no extrato bruto de manga (Khan & Robinson, 1993), abacaxi (Mello & Clemente, 1996) e laranja (McLellan & Robinson, 1984).

A peroxidase manteve 100% de sua atividade inicial após 30 segundos de tratamento a 70°C e 80°C, sendo que a 90°C no mesmo tempo de incubação a atividade residual foi de aproximadamente 90%. Em temperaturas maiores que 70°C o tempo de tra-

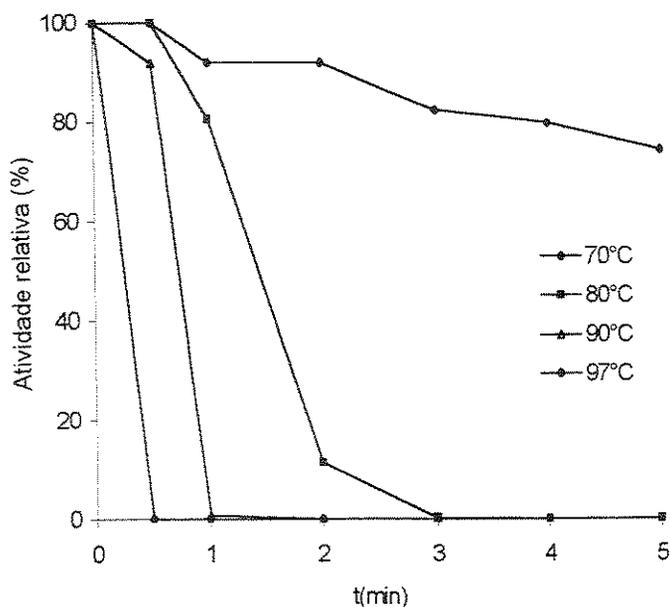


Figura 7. Inativação térmica da peroxidase bruta do taperebá

tamento foi importante, como pode ser observado nos perfis obtidos. A enzima reteve cerca de 75% de atividade residual após 5 min. de tratamento a 70°C. Por outro lado, foi observado que após 1 minuto de tratamento a 80°C a atividade residual da peroxidase foi em torno de 80%, enquanto que após 2 minutos a 80°C a atividade residual foi cerca de 10%. A inativação térmica da peroxidase a 80°C ocorreu após 4 minutos de incubação. No tratamento térmico realizado a 90°C por 30 segundos, a peroxidase reteve em torno de 90% da sua atividade inicial, mas com 1 minuto de tratamento a perda foi quase completa, sendo totalmente inativada no tempo de 2 minutos. A peroxidase foi inativada após 30 segundos de tratamento na temperatura de ebulição (97°C).

A inativação térmica total obtida para peroxidase bruta do taperebá foi semelhante a de outras frutas, como abacaxi IAC gomo de mel (Brito, 2002) e maçã (Silva, 1981).

Ambas foram inativadas termicamente após 2 minutos a 90°C, condição similar ao da peroxidase bruta do taperebá.

A peroxidase bruta do taperebá foi mais estável ao calor que a peroxidase do pêssego, cuja inativação térmica foi rápida acima de 70°C com quase perda completa da atividade a 80°C por 30 segundos (Lourenço & Neves, 1997) e mostrou menor estabilidade térmica quando comparada a peroxidase purificada do açaí (Santos, 2002), cuja inativação térmica total foi obtida após 3 minutos de tratamento térmico a temperatura de ebulição (97°C).

Moulding *et al.* (1987) relataram que a peroxidase solúvel extraída de maçãs apresentou atividade residual em torno de 40% após tratamento térmico a 70°C durante 10 min. e que após 2 min. a 80°C a peroxidase perdeu cerca de 80% de sua atividade original.

Khan & Robinson (1993) verificaram que a peroxidase de manga perdeu 70% de sua atividade inicial após 10 min. de tratamento térmico a 60°C e que a 80°C por 2 min. a atividade enzimática residual foi menor que 10%.

Pomar *et al.* (1997) relataram que a peroxidase de pimenta apresentou um decréscimo na atividade enzimática acima de 90% a 80°C e foi totalmente inativada a 100°C após 5 min. de incubação.

4.2.6- Regeneração da peroxidase bruta

O estudo de regeneração da peroxidase bruta foi determinado como descrito no item 3.4.6. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 8.

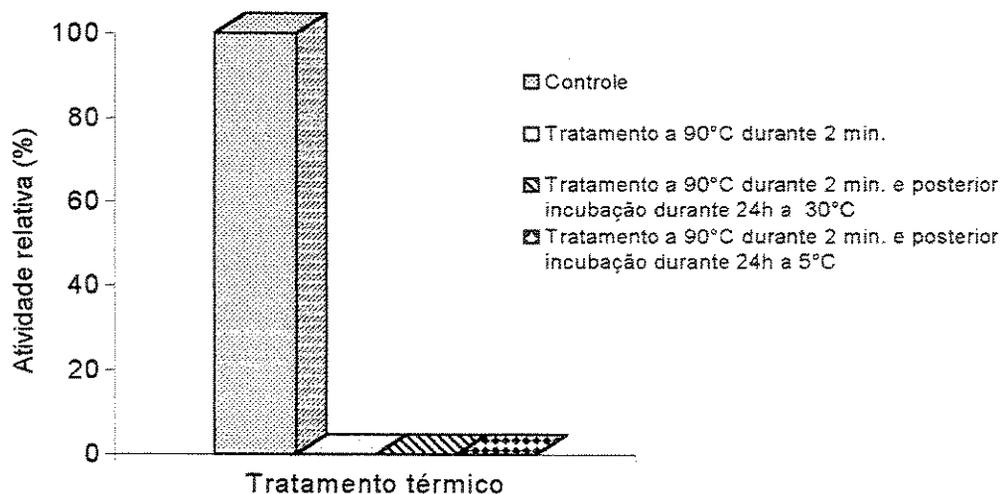


Figura 8. Regeneração da atividade da peroxidase bruta após tratamento térmico

A Figura 8 ilustra que a peroxidase bruta do taperebá submetida a tratamento térmico a 90°C durante 2 min. e posterior incubação durante 24h a 30°C ou 24h a 5°C não apresentou regeneração da atividade.

Moulding *et al.* (1987) verificaram que a fração solúvel da peroxidase de maçã inativada parcialmente foi regenerada em 10% após 1h de incubação a 30°C. As outras frações, submetidas ao mesmo tratamento, mostraram porcentagens de regeneração da atividade enzimática iguais a 5 e 6%.

Brito (2002) estudou a regeneração da atividade da peroxidase bruta do abacaxi após inativação térmica a 90°C durante 2 min. e a 75°C por 10 minutos e posterior incubação durante 24h a 5°C ou 3h a 25°C. As enzimas dos abacaxis IAC e gomo de mel regeneraram 5% e 10%, respectivamente, após tratamento durante 10 min. a 75°C e posterior incubação durante 24h a 5°C ou 3h a 25°C, sendo que no estudo da peroxidase tratada a 90°C por 2 min. e posterior incubação nas condições citadas não foi verificada regeneração enzimática.

Santos (2002) observou em seu estudo com a peroxidase do açaí regenerações de atividade de até 30% após tratamento térmico a 80°C e de até 18% a 90°C após 24h a temperatura ambiente.

4.3.- Purificação da peroxidase do taperebá

A purificação da peroxidase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.5. A peroxidase foi purificada através da precipitação com acetona e cromatografia de permeação em gel Sephacryl S-200 em sistema FPLC como descrito nos itens 3.5.1 e 3.5.2, respectivamente. Os resultados do procedimento de purificação da peroxidase bruta do taperebá são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Purificação da peroxidase de *Spondias lutea* L.

Etapas	Quantidade	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	340ml	915,280	15.079.000	16.474,74	1	100
Extrato cetônico	7.200mg	55,584	7.618.846	137.069,08	8,3	50,5
Extrato cetônico aplicado na coluna de Sephacryl S-200	150mg/2ml	1,158	158.726	137.069,08	8,3	50,5
Sephacryl S-200	2,4ml	0,040	20.572,8	514.320,00	31,2	6,5

A precipitação com acetona foi importante para concentrar a amostra e retirar parte do pigmento amarelo característico do fruto. O volume de 340 ml do extrato bruto do taperebá rendeu 7.200mg de pó cetônico. A atividade total da peroxidase no extrato cetônico foi igual a 7.618.846 U e a perda de atividade enzimática em relação ao extrato bruto foi igual a 50,5%. Nesta etapa, a peroxidase foi purificada 8,3 vezes e sua atividade específica passou de 16.475 U/mg no extrato bruto para 137.069 U/mg de proteína no extrato cetônico. Na etapa subsequente, 2 ml de amostra contendo 150mg de pó cetônico com 158.726 U de peroxidase e 1,158 mg de proteína foi aplicada em coluna Sephacryl S-200. A Figura 9 ilustra a purificação da peroxidase do taperebá em coluna Sephacryl S-200 no sistema FPLC. Nesta etapa, a peroxidase foi purificada 31,2 vezes com um rendimento final de 6,5%. A peroxidase purificada de *Spondias lutea* L. apresentou 514.320 U/mg de proteína.

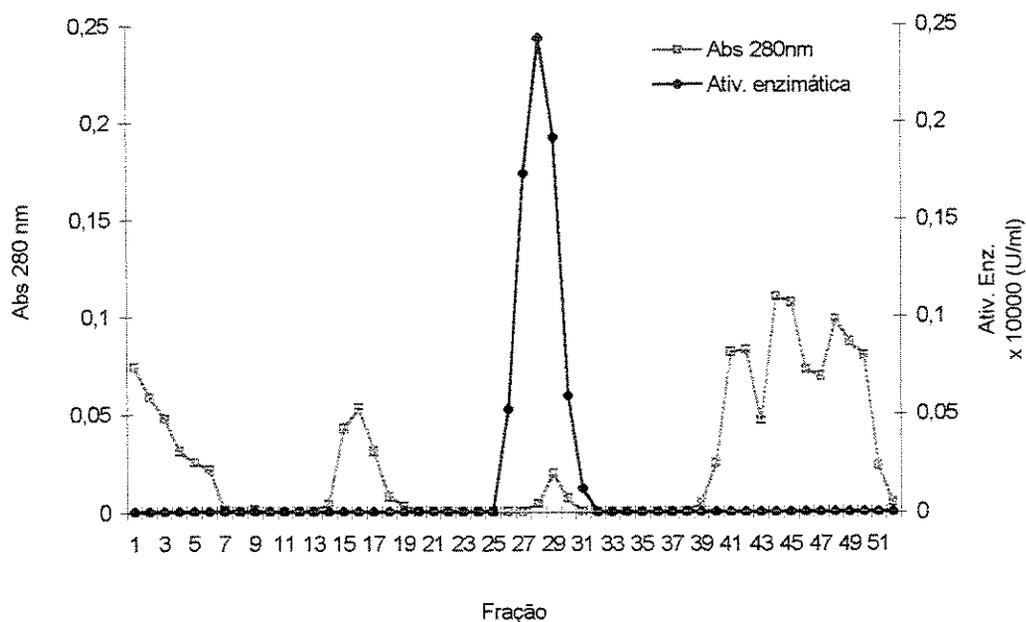


Figura 9. Perfil cromatográfico da purificação da peroxidase em coluna de permeação em gel Sephacryl S-200

A purificação feita no sistema FPLC foi repetida várias vezes com reprodutibilidade e com isso foram obtidas maiores quantidades de enzima purificada para os estudos de caracterização.

4.4- Caracterização da peroxidase purificada do taperebá

As características bioquímicas da peroxidase purificada do taperebá foram determinadas como descrito no item 3.6.

4.4.1- Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada

O efeito do pH na atividade da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.6.1. A peroxidase purificada do taperebá apresentou maior atividade enzimática na faixa de pH 5,0-5,5 em tampão citrato-fosfato, como mostrado na Figura 10. A atividade enzimática da peroxidase purificada decresceu em valores de pH superiores a 7, sendo que

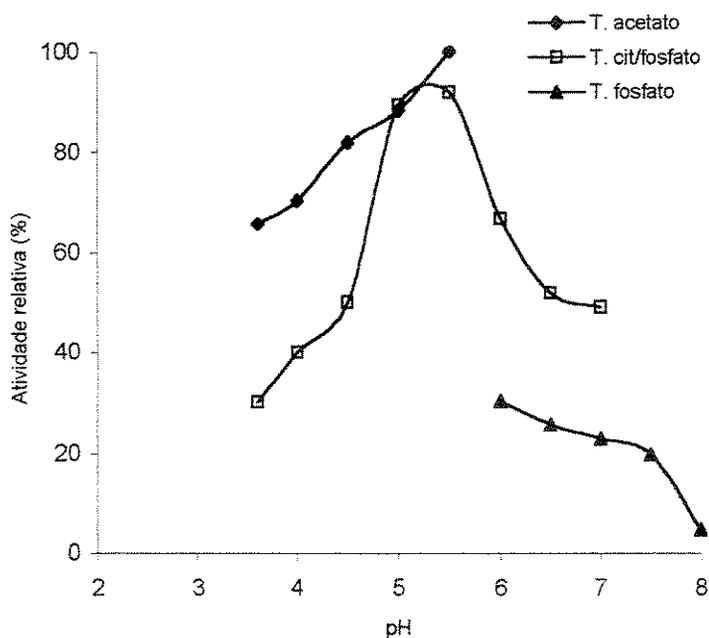


Figura 10. Efeito do pH na atividade da peroxidase purificada

em pH 7,5 e 8 a atividade relativa foi cerca de 19% e 5%, respectivamente. A atividade relativa da peroxidase purificada em tampão citrato-fosfato pH 3,5 foi cerca de 30%.

O pH ótimo de atividade da peroxidase purificada de taperebá foi similar ao do fruto kiwi (pH 5,5) (Soda *et al.*, 1991), nabo (pH 5,5) (Duarte-Vázquez, 2001) e tomate (pH 5,3-5,5) (Heidrich *et al.*, 1983) e próximo ao das enzimas de uva (pH 6,0) (Lee *et al.*, 1983), de carambola (pH 5,7-5,9) (Holschuh, 2000) e açaí (4,0-5,0) (Santos, 2002). Estes valores são comparáveis devido ao uso do guaiacol como substrato doador de hidrogênio. As peroxidases são específicas para a água oxigenada como substrato, mas podem usar um número variado de doadores de hidrogênio. O pH ótimo para a atividade da peroxidase pode variar com a fonte da enzima e com o substrato usado na reação enzimática em uma faixa ampla de valores.

4.4.2- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada

O efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada do taperebá foi determinado como descrito no item 3.6.2. A Figura 11 mostra que a peroxidase purificada apresentou temperatura ótima de atividade a 35°C.

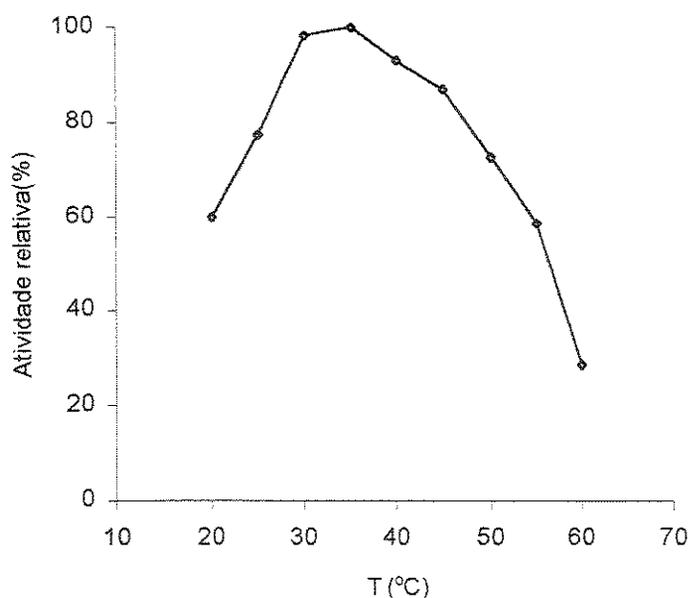


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da peroxidase purificada

Os valores de atividade ótima para peroxidases de frutas e vegetais são encontrados na faixa de 30°C a 55°C. A temperatura ótima da peroxidase purificada do taperebá foi semelhante ao valor de 35°C obtido para a peroxidase de couve-rábano (Vámos- Vagyázó, 1981), açaí (Santos, 2002) e próxima ao valor encontrado por Civello *et al.* (1995) para a enzima de morango (30°C). A atividade da peroxidase purificada de morango estudada por Civello *et al.* (1995) decresceu acentuadamente em temperaturas elevadas, atingindo valores menores que 20% a 50°C. Nesta temperatura, a peroxidase purificada do taperebá apresentou aproximadamente 70% de atividade enzimática. Algumas peroxidases que apresentaram atividade máxima em temperaturas acima de 35°C foram obtidas de frutos como uva (Lee *et al.*, 1983), kiwi (Soda *et al.*, 1991), carambola (Holschuh, 2000) e abacaxi (Brito, 2002).

4.4.3- -Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada

O efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.6.3. As Figuras 12 e 13 mostram que a peroxidase purificada apresentou estabilidade na faixa de pH 2,6-10,0 após 3h a 30°C e 24h a 5°C, mantendo mais que 60% de atividade residual. A peroxidase purificada mostrou maior estabilidade em tampão citrato-fosfato na faixa de pH 3,0-7,0, retendo mais que 80% de atividade residual a 30°C por 3h (Figura 12). A 5°C durante 24h de incubação a peroxidase bruta mostrou maior estabilidade na faixa de pH 2,6-10, retendo até 100% de atividade (Figura 13).

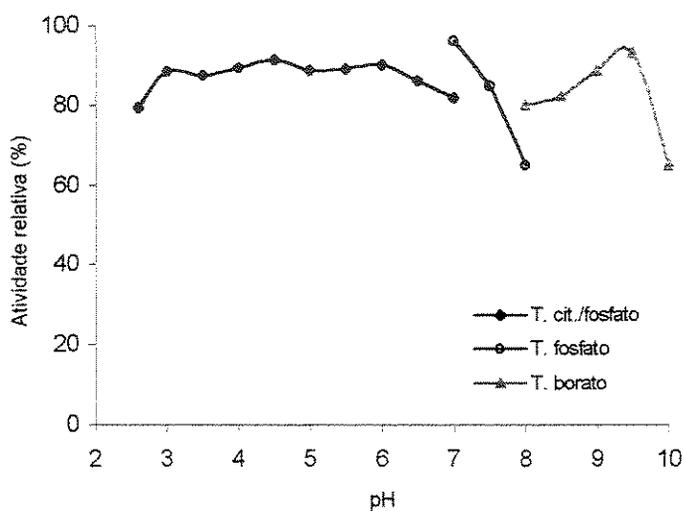


Figura 12. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada após 3h de incubação a 30°C

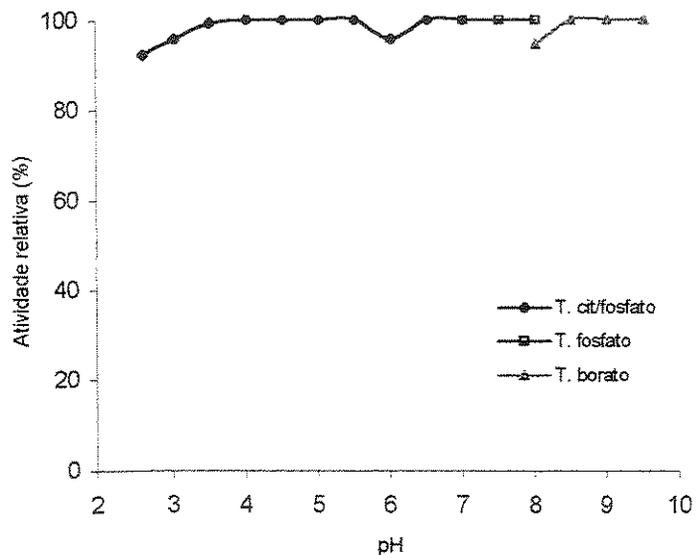


Figura 13. Efeito do pH na estabilidade da peroxidase purificada após 24h de incubação a 5°C

Este resultado foi similar ao encontrado para peroxidase de pêssego que demonstrou estabilidade na faixa de pH 3,0-8,0, com praticamente nenhuma perda de atividade mesmo nos extremos de pH (Lourenço & Neves, 1997). Da mesma forma que as peroxidases purificadas dos frutos açaí (Santos, 2002), pêssego (Lourenço & Neves, 1997) e morango (Civello *et al.*, 1995), a peroxidase purificada do taperebá mostrou ser estável em ampla faixa de pH.

4.4.4- Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada

O efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.6.4. Os resultados obtidos após os tratamentos térmicos da peroxidase purificada são mostrados na Figura 14. O estudo do efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase de taperebá mostrou que esta enzima é termoestável, mantendo mais que 80% de sua atividade enzimática original após 1 hora de tratamento térmico a

60°C e em torno de 65% a 70°C. A peroxidase purificada do taperebá foi completamente inativada após 1h de tratamento a 80°C.

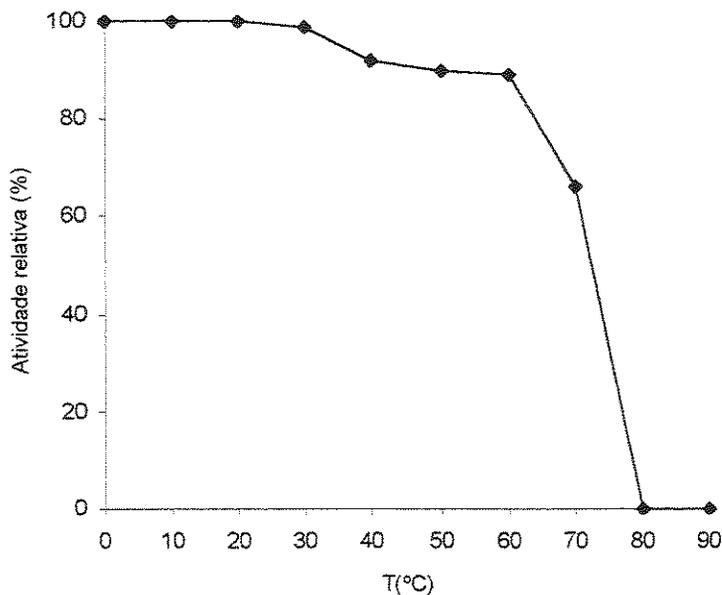


Figura 14. Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase purificada incubada após 1 h de incubação

A peroxidase purificada do taperebá mostrou estabilidade térmica similar a peroxidase do açaí que reteve aproximadamente 56% de sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento térmico a 70°C. A alta termoestabilidade das peroxidases é descrita para várias frutas e vegetais, sendo que a peroxidase purificada do taperebá mostrou-se mais estável ao calor que as peroxidases de manga, cuja atividade residual foi em torno de 30% após 10 min. de tratamento térmico a 60°C (Khan & Robinson, 1993), de pêsego que mostrou-se estável após 10 min. de tratamento térmico a 60°C (Lourenço & Neves, 1997) e do nabo que reteve aproximadamente 70% da sua atividade após 11 min. de tratamento térmico a 65°C (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001).

4.4.5- Inativação térmica da peroxidase purificada

A inativação térmica da peroxidase purificada foi determinada como descrito no item 3.6.5. Foram realizados estudos de inativação térmica em função do tempo e da temperatura como mostrado na Figura 15.

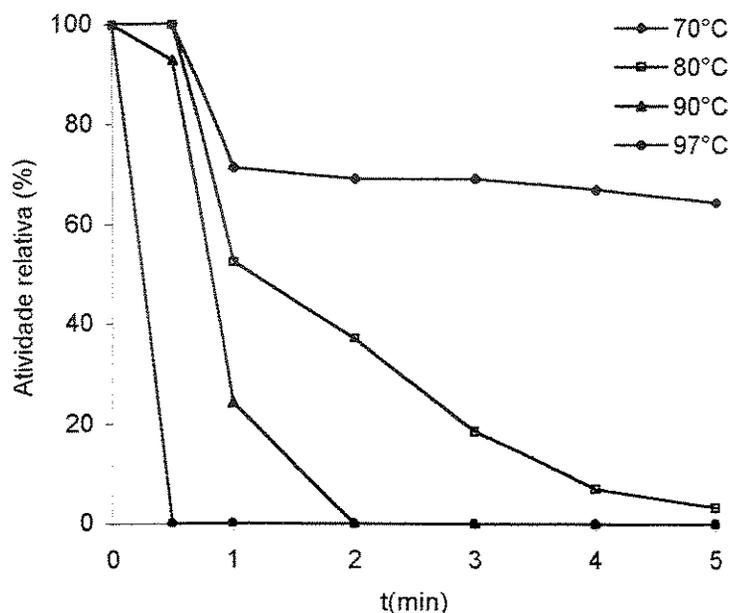


Figura 15. Inativação térmica da peroxidase purificada

Pode ser observado que quanto maior a temperatura e o tempo de tratamento menor a atividade residual. O comportamento foi similar ao da enzima bruta, mas a peroxidase purificada mostrou maior estabilidade térmica em relação a bruta. A peroxidase purificada manteve aproximadamente 70% de sua atividade inicial após 1 minuto de tratamento a 70°C e em torno de 50% a 80°C, sendo que a 90°C no mesmo tempo de incubação a atividade residual foi de aproximadamente 20%. Após 2 minutos de tratamento a 70°C e 80°C foi obtido cerca de 68% e 35% de atividade residual, respectivamente, sendo que a peroxidase purificada foi totalmente inativada a 90°C durante 2 minutos e na temperatura de ebulição (97°C) por 30 segundos, condição similar a da enzima bruta. A maior

estabilidade das peroxidases purificadas em relação a bruta frente ao tratamento térmico também foi verificada para isoenzimas de laranja (Clemente, 1996) e de manga (Khan & Robinson, 1993).

A peroxidase purificada do taperebá foi muito mais estável ao calor que as peroxidases de frutos tais como pêsego, cuja inativação térmica foi rápida acima de 70°C com quase perda completa da atividade a 80°C por 30 segundos (Lourenço & Neves, 1997). No entanto, mostrou menor estabilidade térmica quando comparada a peroxidase purificada do açaí (Santos, 2002), cuja inativação térmica total foi obtida após 3 minutos de tratamento térmico a temperatura de ebulição (97°C).

Pomar *et al.* (1997) relataram que a peroxidase de pimenta apresentou um decréscimo na atividade enzimática acima de 90% a 80°C e foi totalmente inativada a 100°C após 5 min. de incubação.

Holschuh (2000) verificou que a isoperoxidase de carambola foi inativada após 1h de tratamento térmico a 75°C em pH 6,0 e após 5 min. à temperatura de ebulição (97°C) na faixa de pH 6,0-9,0.

A peroxidase do taperebá foi encontrada na forma ionicamente ligada e segundo McLellan & Robinson (1983) e Boyes *et al.* (1997) em seus ensaios com as isoperoxidasas de laranja e milho, respectivamente, as isoenzimas ionicamente ligadas foram mais estáveis ao calor que as solúveis. No entanto, Moulding *et al.* (1987) estudaram a inativação térmica de maçãs e verificaram que as isoperoxidasas solúveis foram mais estáveis ao calor com 7% de atividade residual após o tratamento térmico a 80°C durante 20 min, em comparação as isoenzimas ionicamente ligadas que foram completamente inativadas a 70°C após 8 min. de incubação.

A peroxidase é considerada uma enzima estável quando submetida a um tratamento térmico e a redução da sua atividade é usada como uma medida do branqueamento

adequado. Porém, a resistência ao tratamento depende da fonte da enzima e em uma determinada fonte pode haver variação de uma isoenzima para outra.

Como pode ser observado os perfis de inativação térmica da peroxidase não foram lineares com o tempo, como o comportamento já relatado na literatura. McLellan & Robinson (1981) sugeriram que diferentes estados da enzima podem explicar a ocorrência deste perfil. Outros autores atribuíram às curvas de inativação não lineares a formação, durante o tratamento térmico, de um novo composto de termoestabilidade mais alta formado a partir de uma proteína desnaturada pelo calor e grupos de peroxidases que permanecem ativas (Vamos-Vigyázo, 1981). Forsyth *et al* (1999) relataram que vários mecanismos tem sido propostos para explicar o desvio da linearidade no processo de inativação térmica da peroxidase. Além da presença de isoperoxidasas com propriedades térmicas diferentes, os autores descreveram algumas explicações alternativas como a formação de agregados termoestáveis e mudanças conformacionais e químicas na enzima. Tamura & Morita, citado por Forsyth *et al* (1999), sugeriram a perda do grupo heme para formar a apoenzima. Adams (1997) mostrou que os fragmentos heme foram formados durante a inativação térmica de uma preparação comercial de peroxidase de raiz forte e que a cinética não linear de inativação térmica ocorreu devido a recuperação e regeneração da atividade da peroxidase em valores de pH ácido.

Khan & Robinson (1993) apresentaram uma explicação para o perfil não linear de inativação para uma única forma de peroxidase purificada, relatando que as isoperoxidasas purificadas de manga poderiam apresentar microheterogeneidade devido a presença de quantidades variáveis de carboidratos neutros ligados covalentemente. Estas substâncias não afetariam o ponto isoelétrico mas poderiam afetar a termoestabilidade. Segundo Silva *et al.* (1990) citado por Khan & Robinson (1993), as moléculas de carboidrato da peroxidase de raiz forte exercem um efeito estabilizador na enzima.

4.4.6- Regeneração da peroxidase purificada

O estudo de regeneração da peroxidase purificada foi determinado como descrito no item 3.6.6. Os resultados do estudo de regeneração da atividade da peroxidase purificada após o tratamento térmico são apresentados nas Figuras 16 e 17.

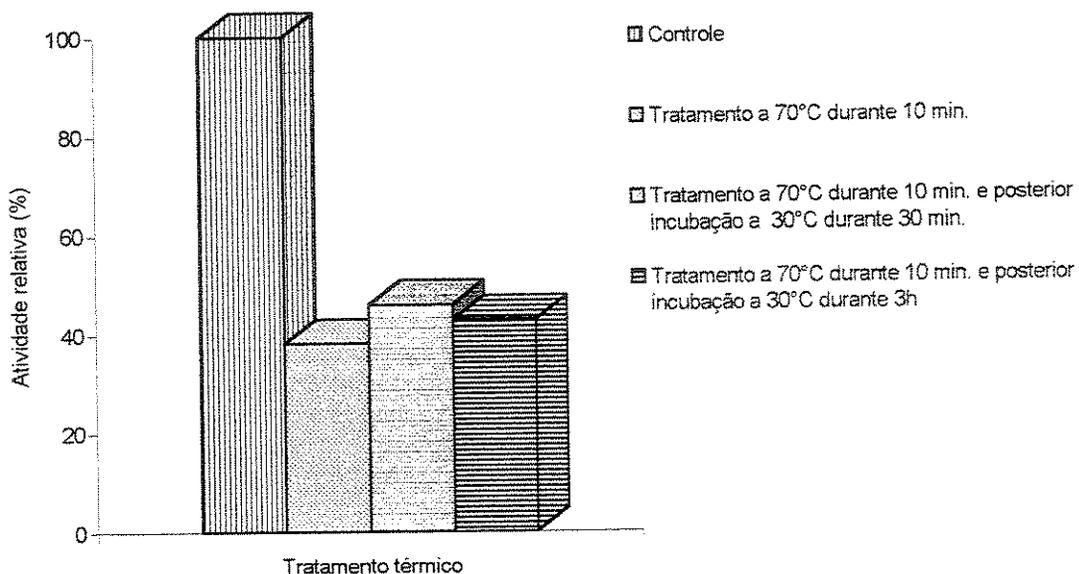


Figura 16. Regeneração da atividade da peroxidase purificada após inativação térmica parcial

A enzima purificada submetida ao tratamento a 70°C durante 10 min. foi inativada parcialmente, apresentando 38,1% de atividade relativa residual. Após 10 min. de tratamento térmico a 70°C e posterior incubação a 30°C durante 30 min. e 30°C por 3h foi observado 7,8% e 4,8% de regeneração da atividade de peroxidase, respectivamente (Figura 16). A peroxidase purificada submetida ao tratamento térmico durante 2 min. a 90°C foi completamente inativada e não foi regenerada após incubação a 30°C e 5°C durante 24h (Figura 17).

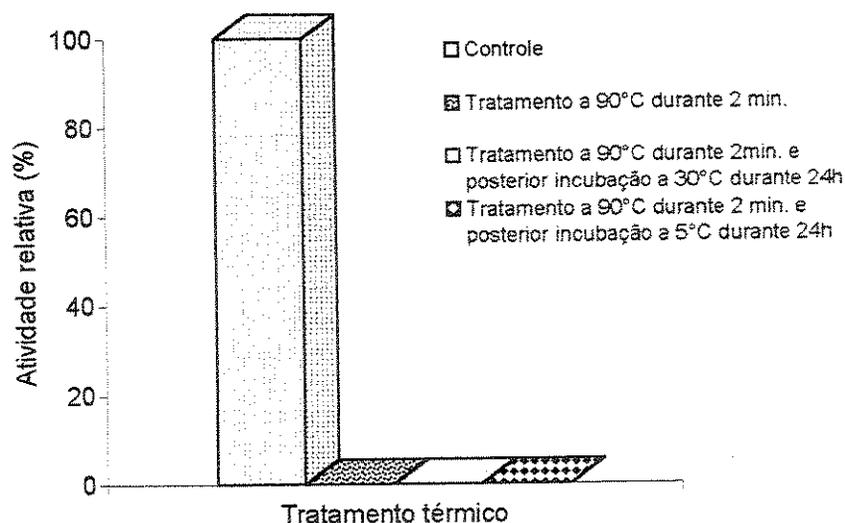


Figura 17. Regeneração da atividade da peroxidase purificada após inativação térmica

Boyes *et al.* (1997) relataram que quando o branqueamento é feito de modo a obter a inativação incompleta da peroxidase, a separação da proteína estrutural e do grupo heme resultam em condições ideais para recombinação e regeneração da enzima.

Santos (2002) estudou a capacidade de regeneração da atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí após tratamento térmico a 80 e 90°C até 5 minutos. A regeneração foi avaliada após incubação da enzima à temperatura ambiente e refrigeração por 3 e 24 horas. Foram observadas regenerações da atividade enzimática de até 30% após tratamento térmico a 80°C e de aproximadamente 18% a 90°C, após incubação por 24 horas a temperatura ambiente.

A reativação ou regeneração da atividade da peroxidase tem sido relatada por vários pesquisadores. McLellan & Robinson (1984) estudaram a regeneração das peroxidases solúveis e ionicamente ligadas extraídas a partir do albedo e do suco de laranjas após inativação térmica parcial das amostras a 60°C, 65°C, 70°C e 75°C. A regeneração das

enzimas foi avaliada após incubação a 30°C até 150 minutos. As peroxidases solúvel e ligada obtidas a partir do suco regeneraram 2% e 25%, respectivamente. Similarmente, a fração solúvel e ligada do albedo mostraram 5% e 25% de regeneração, respectivamente. Os autores concluíram que as peroxidases ionicamente ligadas foram mais estáveis ao calor e capazes de uma regeneração consideravelmente maior que as solúveis.

4.4.7- Efeito de sais minerais e inibidores na atividade da peroxidase purificada

O efeito de sais minerais e inibidores na atividade da POD purificada foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.6.7.

A Tabela 2 mostra o efeito de inibidores sobre a atividade enzimática da peroxidase, dentre os quais apenas o bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio e o ácido ascórbico são os compostos frequentemente usados em alimentos. Estes três compostos inibiram totalmente a atividade da peroxidase do taperebá na concentração de 10 mM. Para o ácido ascórbico a inibição total ocorreu em concentração mais baixa a 1mM. O β -mercaptoetanol inibiu a peroxidase do taperebá na concentração final 10 mM. As peroxidases de plantas possuem pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura da enzima (Banci, 1997). O β -mercaptoetanol reduz pontes dissulfeto e pode alterar a estrutura de proteínas. Os compostos EDTA, iodoacetamida e N-bromosuccinimida inibiram parcialmente a atividade da peroxidase e o SDS mostrou-se um potencial inibidor da peroxidase.

A Tabela 3 mostra que todos os sais minerais testados inibiram a peroxidase purificada do taperebá, exceto os sais NaCl e CaCl₂ que atuaram como ativadores na concentração de 1 e 10mM, respectivamente. Banci (1997) relatou que íons cálcio são importantes para a manutenção da estrutura do sítio ativo da peroxidase de plantas e que a remoção destes íons da peroxidase de raiz forte diminuiu a atividade da enzima. Os sais MnSO₄, MgSO₄, KCl e Na₂SO₄ inibiram parcialmente a peroxidase de taperebá. O CuSO₄ e o Fe₂(SO₄)₃ inibiram fortemente a enzima na concentração final 10 e 1mM, respectivamente, e o cianeto (KCN) inibiu totalmente a sua atividade catalítica. Segundo

Duarte-Vázquez. *et al.* (2001) o cianeto é inibidor de muitas enzimas que contém ferro e este efeito tem sido observado para peroxidases solúveis obtidas a partir de folhas de chá, batata doce, tomate e a peroxidase ionicamente ligada de mamão (Lourenço & Neves, 1997).

Tabela 2. Efeito de inibidores na atividade da peroxidase purificada

Composto químico	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)	Inibição (%)
Controle	Ausente	100	0
Bissulfito de sódio*	1	42	58
	10	0	100
Metabissulfito de sódio*	1	58	42
	10	0	100
Ácido ascórbico*	1	0	100
	10	0	100
β -mercaptoetanol	1	29	71
	10	0	100
Iodoacetamida	1	64	36
	10	51	49
N-bromosuccinimida	1	78	22
	10	-	-
SDS	1	29	71
	10	24	76
EDTA	1	70	30
	10	60	40

(-) Não realizado

(*) Inibidores usados em alimentos

Tabela 3- Efeito de sais minerais na atividade da peroxidase purificada

Ions	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)	Inibição (%)
NaCl	1	139	0(Ativou)
	10	109	0(Ativou)
CaCl ₂	1	100	0
	10	131	0(Ativou)
KCN	1	0	100
	10	0	100
KCl	1	74	26
	10	63	37
MnSO ₄	1	93	7
	10	56	44
MgSO ₄	1	69	31
	10	42	58
Na ₂ SO ₄	1	33	60
	10	38	62
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1	11	89
	10	-	-
CuSO ₄	1	32	68
	10	9	91

(-) Não realizado

Resultados semelhantes ao da peroxidase do taperebá foram encontrados por Holschuh (2000) no seu estudo com a isoperoxidase purificada de carambola. A enzima foi inibida fortemente por CuSO₄ 0,05mM, KCN 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, metabissulfito de sódio 5 mM e Fe₂(SO₄)₃ 10mM, enquanto que o CaCl₂ na concentração de 5 mM ativou-a.

Santos (2002) também estudou o uso de alguns compostos químicos no controle da atividade da peroxidase parcialmente purificada de açaí. A enzima foi inibida 99,9% em sua atividade pelo uso de metabissulfito de sódio 1 mM e ácido ascórbico 1 mM e foi completamente inibida pela ação de β-mercaptoetanol 10 mM e KCN 1 mM. Estes resultados foram similares ao encontrado para a peroxidase do taperebá, mas para os sais KCl, MnSO₄, e MgSO₄ o efeito de inibição na atividade enzimática foi menos marcante que para a peroxidase do açaí. Ao contrário da peroxidase do taperebá cuja atividade foi ativada

pelos sais NaCl e CaCl₂, a enzima do açai foi inibida por estes compostos na concentração final de 10mM.

4.4.8- Efeito da concentração do substrato na atividade da peroxidase purificada

O efeito da concentração do substrato guaiacol na atividade da peroxidase do taperebá foi determinado de acordo com o item 3.6.8. A peroxidase do taperebá seguiu a cinética de Michaelis-Menten, como mostrado na Figura 18.

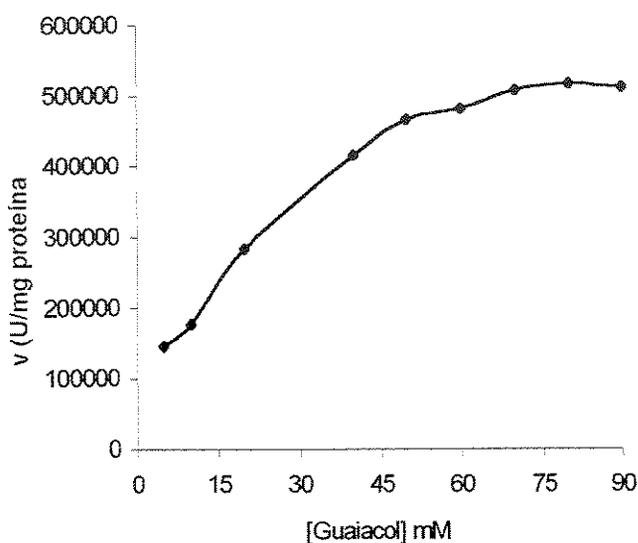


Figura 18. Efeito da concentração de guaiacol na atividade da peroxidase

A constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) da peroxidase foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de Hanes-Woolf (Figura 19), obtendo-se os valores de K_m 20,3 mM e V_{max} 639.367 U/mg proteína para o substrato guaiacol.

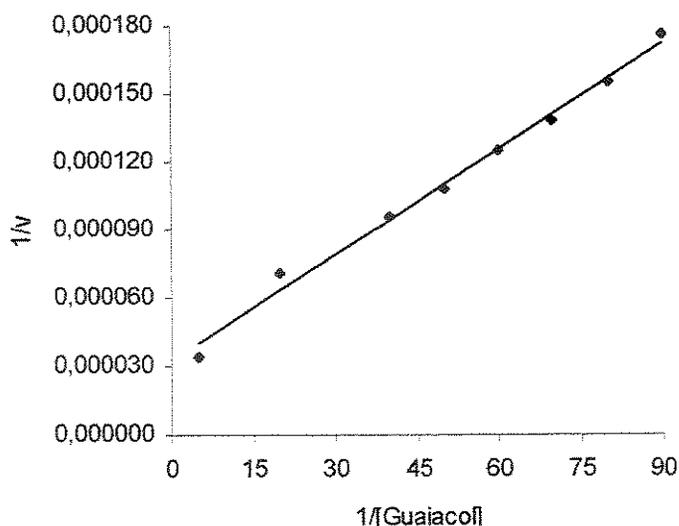


Figura 19. Efeito da concentração de guaiacol na atividade da peroxidase- Gráfico de Hanes-Woolf

O valor de K_m encontrado para a peroxidase do taperebá foi igual ao obtido para a oxidação do guaiacol pela peroxidase de carambola, K_m 20,3 mM (Holschuh, 2000). Os resultados obtidos indicam que a peroxidase do taperebá apresenta menor afinidade ao substrato guaiacol quando comparada as peroxidases de rabanete, K_m 13,8 mM (Lee & Kim, 1994), de ervilhas verdes, K_m 10,2 mM (Halphin *et al.*, 1989), tomate, K_m 10 mM, (Heidrich, 1983), nabo, K_m 3,7 mM (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001), açai, K_m 2,4 mM (Santos 2002) e kiwi, K_m 7,4 mM (Soda *et al.*, 1991).

4.4.9- Determinação da massa molecular da peroxidase purificada

A massa molecular da peroxidase purificada do taperebá foi determinada como mostrado no item 3.6.9. A massa molecular da enzima foi estimada em 28,5 kDa através de filtração em gel Sephacryl S-200 e calculado de acordo com a curva padrão mostrada na Figura 20.

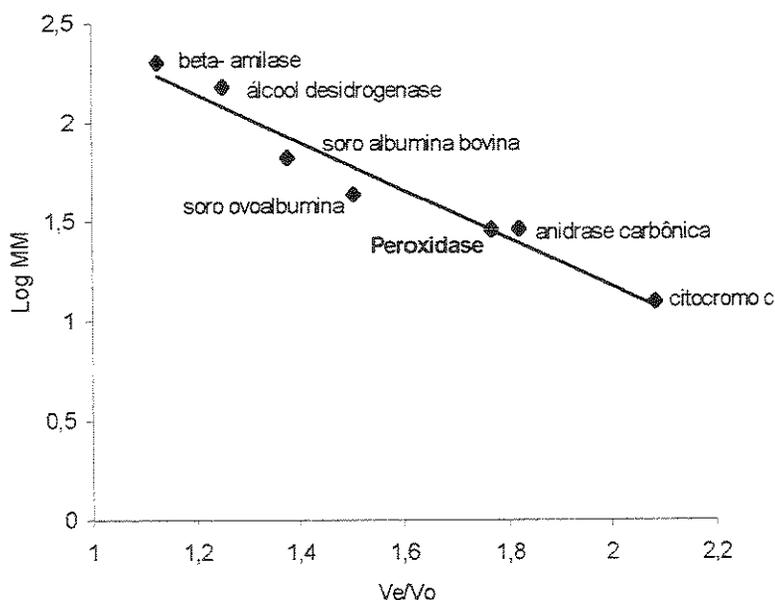


Figura 20. Curva padrão de eluição de proteínas em coluna de filtração em gel Sephacryl S-200

Em particular, a massa molecular da peroxidase obtida é consideravelmente mais baixa que os valores relatados para peroxidases de plantas. Os valores das massas moleculares das peroxidases de várias frutas e vegetais foram encontrados na faixa de 30-60 kDa (Srivastava & van Husytee, citado por Duarte-Vázquez *et al.*, 2001), mas valores similares foram encontrados para uma isoenzima obtida de manga com massa molecular igual 27 kDa (Khan & Robinson, 1994) e para peroxidase do fruto kiwi com massa molecular igual a 29 kDa (Soda *et al.*, 1991).

De acordo com Van Huystee *et al.* (citado por Duarte-Vázquez *et al.*, 2001), a variação na massa molecular das peroxidases obtidas a partir de várias fontes é atribuída a mudanças translacionais da cadeia polipeptídica incluindo o número e composição de cadeias de glucana presente nas enzimas de plantas. Segundo Kim & Kim (1996), as peroxidases de plantas são glicoproteínas que contém cadeias de oligossacarídeos. Os autores também descreveram que ao contrário da cadeia polipeptídica de uma glicoproteína,

que exibe uma homologia na sequência e comprimento da cadeia de aminoácidos, a molécula de carboidrato mostra heterogeneidade no conteúdo, número e grau de ramificação, e na distribuição ao longo da cadeia polipeptídica.

4.4.10- Determinação do ponto isoelétrico da peroxidase purificada

O ponto isoelétrico da peroxidase purificada do taperebá foi determinado como descrito no item 3.6.10. A Figura 21 ilustra a isoeletrofocalização da peroxidase do taperebá.

Uma banda extremamente forte, corada com comassieblue, foi encontrada no gel de poliacrilamida, indicando a presença de uma forma molecular de peroxidase (Figura 21). Bandas bem fracas parecem indicar a presença de outras isoformas e isto seria esperado porque as peroxidases de plantas parecem existir como isoenzimas com pontos isoelétricos variando aproximadamente de 3,5 a 10. Khan & Robinson (1994) relataram que os principais grupos de isoperoxidasas de raiz forte são ácidas ou aniônicas, neutras e básicas ou catiônicas, com valores de pI na faixa de 4-5, 6-7 e 7-10, respectivamente.

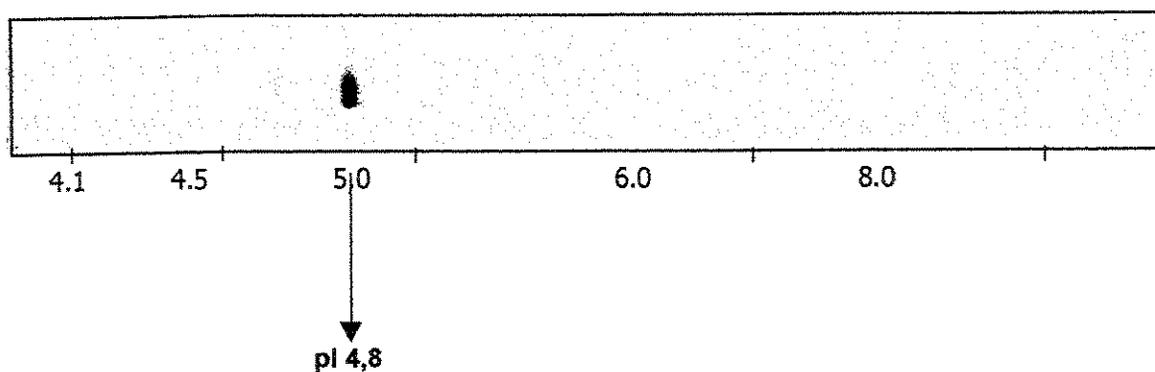


Figura 21. Isoeletrofocalização da peroxidase de *Spondias lutea* L.

De acordo com as técnicas de extração, purificação e detecção da atividade enzimática adotadas, foi obtida uma isoperoxidase de característica ácida com o pI igual a 4,8.

4.4.11- Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese da peroxidase purificada em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada como descrito no item 3.6.11.1. A Figura 22 mostra que a peroxidase purificada apresentou massa molecular estimada em 29kDa. Este valor é similar ao valor de 28,5kDa estimado por filtração em gel Sephacryl S-200 (Figura 20).

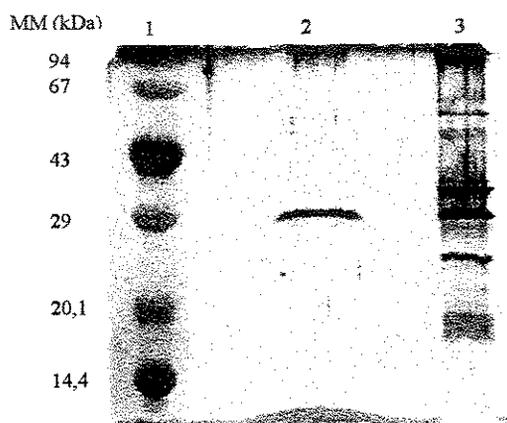


Figura 22. SDS-PAGE da peroxidase purificada de *Spondias lutea* L. em gel gradiente 12%. Coloração com prata. Linha 1, padrões de proteínas; linha 2, enzima purificada; linha 3, enzima bruta. Os pesos moleculares (kDa) dos padrões (topo para a base) foram fosforilase b (94), soro albumina bovina (67), albumina de ovo (43), anidrase carbônica (29), inibidor de tripsina (20,1), α -lactoalbumina (14,4)

A Figura 23 ilustra a eletroforese da peroxidase purificada em gel PAGE-nativo no qual a enzima foi detectada utilizando-se os substratos guaiacol e peróxido de hidrogênio, como descrito no item 3.6.11.2.

A peroxidase do taperebá foi purificada até a homogeneidade aparente como indicado pelo SDS-PAGE (Figura 22) e pelo PAGE-Nativo (Figura 23). Cada ensaio

eletroforético mostrou uma única banda de proteína corada para atividade de peroxidase e pela técnica sensível de coloração com prata.



Figura 23. PAGE-Nativo da peroxidase purificada de *Spondias lutea* L. em gel gradiente 12%. Enzima corada com o substrato guaiacol.

A Figura 24 ilustra a eletroforese da peroxidase purificada em gel de SDS-poliacrilamida para detecção da natureza glicoprotéica, como descrito no item 3.6.11.3.

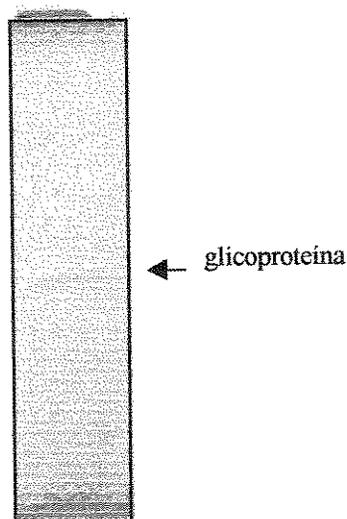


Figura 24. SDS-PAGE da peroxidase purificada de *Spondias lutea* L. em gel gradiente 12%. Enzima corada com o reagente de Schiff para detecção da natureza glicoprotéica.

Após a coloração do gel, foi obtida uma banda de proteína de cor rosa, característica de uma glicoproteína (Figura 24). De acordo com Kim & Kim (1996) e Banci (1997), as peroxidases obtidas a partir de plantas são caracterizadas pela presença de carboidratos na superfície da proteína. Duarte-Vázquez *et al.*(2001) verificaram em seus estudos sobre a purificação e propriedades da isoperoxidase neutra do nabo que a enzima é uma glicoproteína monomérica com 9,1% de carboidrato em sua constituição.

5- CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesta tese sobre purificação e caracterização da peroxidase do taperebá (*Spondias lutea* L.), pode-se concluir que:

- 1- O taperebá é um fruto que contém peroxidase na forma ionicamente ligada, com atividade em torno de 88.700 U/g de polpa.
- 2- A peroxidase bruta do taperebá apresenta atividade máxima em tampão acetato pH 4,5 a 35°C e estabilidade numa ampla faixa de pH (2,6-10) após 3h a 30°C e 24h a 5°C e em temperaturas inferiores a 50°C após 1h de tratamento térmico.
- 3- A peroxidase encontrada no fruto taperebá foi purificada através da precipitação com acetona e cromatografia de permeação em gel Sephacryl S-200 em sistema FPLC. A enzima foi purificada 31,2 vezes a partir do extrato bruto com um rendimento final de 6,5% em relação ao extrato cetônico. A peroxidase purificada de *Spondias lutea* L. apresentou 514.320 U/mg de proteína.
- 4- A peroxidase purificada apresenta atividade ótima na faixa de pH 5,0-5,5 a 35°C. A enzima é estável numa ampla faixa de pH (2,6-10) após 24h a 5°C e 3h a 30°C e é termoestável, mantendo mais que 80% de sua atividade enzimática original após 1 hora de tratamento térmico a 60°C e em torno de 65% a 70°C.
- 5- A peroxidase é totalmente inativada a 90°C durante 2 minutos de tratamento térmico e não é regenerada quando estocada por 24h a 30°C ou 24h a 5°C.
- 6- Dentre os inibidores permitidos para uso em alimentos, a atividade da peroxidase purificada é inibida totalmente pelo ácido ascórbico na concentração final de 1mM, sulfito de sódio e metabissulfito de sódio, ambos a 10mM.

- 7- A atividade da peroxidase purificada é ativada pelo CaCl_2 na concentração final 10mM e NaCl na concentração final 1mM cerca de 30% e 40%, respectivamente. A enzima é fortemente inibida pelo CuSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ na concentração final 10mM e 1mM, respectivamente, e completamente inibida pelo KCN na concentração final 1mM. A isoenzima purificada é parcialmente afetada pelos sais MnSO_4 , MgSO_4 , KCl , e Na_2SO_4 na concentração final 1mM.
- 8- A peroxidase é inibida parcialmente pelos compostos químicos SDS, EDTA, N-bromosuccinimida e iodoacetamida na concentração final 1mM. A atividade da enzima é totalmente inibida pelo β -mercaptoetanol 10mM.
- 9- Os valores de K_m e V_{max} para o substrato guaiacol foram iguais a 20,3 mM e 639.367 U/mg proteína.
- 10- A peroxidase purificada apresenta um peso molecular igual a 28,5 kDa e a 29 kDa , estimado pela cromatografia de permeação em gel e eletroforese em gel de SDS poliacrilamida, respectivamente.
- 11- Por focalização isoeétrica, a peroxidase purificada é uma enzima de natureza aniônica cujo pI é igual a 4,8.
- 12- A peroxidase purificada é uma enzima de natureza glicoprotéica.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.B. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. **Food Chemistry**, v.60, n.2, p. 201-206, 1997
- AGUIAR, S.F.; NUNES, A.S.S.; HOLLAND, N.; NASCIMENTO, M.A.; BANDEIRA, A.V.M.; ALMEIDA, M.G. Avaliação da atividade antioxidante do fruto cajá (*Spondias mombin* L.). In: IV SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. **Livro de Resumos**, p.131, 2001
- ALEGRONI, G.; BARBENI, M. **Flavour Frag. J.**, v.7, p. 337, 1997. Apud: **Journal of Chromatography A**, 873, p. 117-127, 2000
- ALVIM, K.C.; CLEMENTE, E. Estudo da termoestabilidade de peroxidases extraídas da polpa e casca de mexerica (*Cirus deliciosa*). **Acta Scientiarium**, v.20, n.2, p.201-205, 1998
- ASHIE, I.N.A.; SIMPSON, B.K.; SMITH, J.P. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v.36, n.1&2, p. 1-30, 1996
- AUGUSTO, f.; VALENTE, A.L.P.; TADA E.S.; RIVELINO, S.R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v.873, p.117-127, 2000
- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**. v.53, p.253-263, 1997
- BARBOSA, W.C.; NAZARÉ, R.F.R.; HASHIMOTO,K. Estudo bromatológico e tecnológico da graviola e do taperebá. **Boletim de Pesquisa, Embrapa Agropecuária do Trópico Úmido**, n 32, p.1-16, 1981
- BORA, P.S.; NARAIN, N.; HOLSCHUH, H.J.; VASCONCELOS, M.A.S. Changes in physical and chemical composition during maturation of yellow mombim (*Spondias mombin*), **Food Chemistry**, v.41, p.341-348, 1991
- BOUEL, G.; BAUW, G.; LEGRAND, B.; RAMBOUR, S. Purification and characterization of a absic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. **Plant Physiol. Biochem.** v.38, n.3, p. 217-224, 2000

- BOYES, S.; CHEVIS, P.; PERERA, C. Peroxidase isoforms of corn kernels and corn on the cob: preparation and characteristics. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v.30, p. 192-201, 1997
- BRITO, C.A. **Estudo bioquímico das peroxidases brutas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill): Cultivar IAC gomo-de-mel e clone IAC-1.** Campinas, 2002. 81p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: review, **Journal of Food Science**, v.42, p.1-6, 1977
- CANO, M.P.; LOBO, M.G., DE ANCOS, B. Peroxidase and polyphenol oxidase in long-term frozen stored papaya slices. Differences among hermaphrodite and female papaya fruits. **J. Sci. Food Agric.** v.76, p. 135-141, 1998
- CIVELLO, P.M.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; ANON, M.C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.). **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p. 2596-2601, 1995
- CLEMENTE, E. Isolamento, purificação e termoestabilidade da isoperoxidase do suco de laranja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.16, n.1, p.1-5, 1996
- CLEMENTE, E.; PASTORE, G.M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Bol. SBCTA**, v.32, n.2, p.167-171, 1998
- CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.29-36, 1998
- CORTHOOT, J.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v.30, n.4, p.1129-1130, 1991
- DA SILVA, A.P.V.; OLIVEIRA, G.A.; FIGUEIREDO, G.S.F.; BRASIL, R.W.; MONTENEGRO, I. Características de qualidade do suco polposo de cajá (*Spondias lutea* L.) obtido por extração mecânico-enzimática. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n.3, p.233-236, 1997
- DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. London: Logman Group Ltd., p.54-166, 1971
- DOONAN, S. **Protein Purification Protocols**. Towota: Humana Press, v.59, 405p., 1996

- DUARTE-VÁZQUEZ, M.A.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; REGALADO, C.; WHITAKER, J.R. Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica nabus* L. var. purple top white globe) roots. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p. 4450-4456, 2001
- DUNFORD, H.B. **Heme Peroxidases**. Canada: Wiley-VCH, 507 p., 1999
- FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I.C. L-Ascorbic Acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.11, n.4, 2000
- FORSYTH, J.L.; ROBINSON, D.S. Purification of brussels sprout isoperoxidases. **Food Chemistry**, v.63, n.2, p. 227-234, 1998
- FORSYTH, J.L.; OWUSU APENTEN, R.K.; ROBINSON, D.S. The thermostability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. *gemmifera*. **Food Chemistry**, v.65, p. 99-109, 1999
- FUKUCHI, K.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, T.; HATANO, T.; TANUMA, S.; KONNO, K. **Antiv. Res.**, v.11, p.285, 1989. Apud: PADETEC. Disponível em: <www.padetec.ufc.br/pherpiz-k.htm>. Acesso em 25 set. 2002
- FURTUNATO, A.A.; MAGALHÃES, M.M.; COSTA, J.M.C.; DUARTE, W.K.C. Determinação da atividade enzimática de enzimas termorresistentes (Pectinesterase e peroxidase) presentes em algumas frutas tropicais nordestinas. In: IV SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. **Livro de Resumos**, p.487, 2001
- GOVE, J.P.; HOYLE, M.C. The isozymic similarity of indolacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. **Plant Physiology**, v.56, n.4, p 694-687, 1975
- HALPIN, B.; PRESSEY, R.; JEN, J.; MONDY, N. Purification and characterization of peroxidase isoenzyme from green peas (*Pisum sativum*). **Journal of Food Science**. v.54, n.3, 1989
- HAARD, N.F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. In: ORY, R.L.; St. ANGELOS, A.J. (Ed). **Enzymes in Food and Beverage Processing**. American Chemical Society. Washington, 1977. Apud: **Am. J. Enol. Vitic.**, v.34, n.2, p. 128-129, 1983

- HAISMAN, D.R.; The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues. **J. Sci. Food Agric.**, v.25, p. 803, 1974
- HARTREE, E.F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p. 422-427, 1972
- HEIDRICH, E.; LORENZ, G.; SCHREIER, P. Ultrathin-layer isoelectric focusing of partially purified peroxidase from tomato fruit. **Food Chemistry**, v. 10, p. 285-296, 1983
- HINER, A.N.P.; HÉRNANDEZ-RUIZ, J.; WILLIAMS, G.A.; ARNAO, M.B.; GÁRCIA-CÁRNOVAS, F.; ACOSTA, M. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalysed reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.392, n.2, p.295-302, 2001
- HOLSCHUH, H.J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.)**. Campinas, 2000, p. 156. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas
- KHAN, A. A., ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases, **Food Chemistry**, v.47, p. 53-59, 1993
- KHAN, A. A., ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases, **Food Chemistry**, v.49, p.407-410, 1994
- KIM, S.H.; KIM, S.S. Carbohydrate moieties of three radish peroxidases, **Phytochemistry**, v.42, n.2, p. 287-290, 1996
- KORN, E.D., WRIGHT, P.L. Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 248, p. 439-447, 1973
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 680-685, 1970
- LEE, M.Y.; KIM, S.S. Characteristics of six isoperoxidases from korean radish roots. **Phytochemistry**, v.35, p. 287-290, 1994
- LEE, H.C.; KLEIN, B.P. A simple method of identifying peroxidase isoenzymes from crude pea seed extracts. **Food Chemistry**, v.29, p. 275-282, 1988
- LEE, C.Y; PENESSI,A.P.; SMITH, N.L. Purification and some properties of peroxidase from de chaunac grapes. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.34, n.2, p. 128-129, 1983

- LÓPEZ-SERRANO, M.; RÓS-BARCELÓ, A. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. **Food Chemistry**, v. 55, n.2, p.133-137, 1996
- LOURENÇO, E.; NEVES, V.A. Peroxidase solúvel de pêsego: purificação parcial e propriedades. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n.1, p.42-48, 1997
- LOUGHLIN, W.A. Biotransformation in organic synthesis, **Bioresource Technology**, v. 74, p. 49-62, 2000
- LU, A.L.; WHITAKER, J.R. Some factors affecting of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 1173-1178, 1974
- MARANGONI, A.G.; BROWN, E.D.; SATNLEY, D.W.; YADA, R.Y. Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization. **Journal of Food Science**, v.54, n.5, p. 1269-1271, 1989
- MATOS, F.J.A. "Farmácias Vivas". 2a. Ed. Fortaleza: UFC, 1994. Apud: <www.padetec.ufc.br/pherpiz-k.htm>. Acesso em 25 set. 2002
- MCLELLAN, M.K.; ROBINSON, D.S. Heat stability of peroxidases from orange. **Food Chemistry**, v.13, p. 139-147, 1984
- MELLO, E.T.; CLEMENTE, E. Thermostability of crude extract of peroxidase from pineapple. **Revista Unimar**, v.18, n.4, p.757-763, 1996
- MILAND, E.; SMYTH, M.R.; FÁGÁIN, C. O. Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: Effects on molecular stability, **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 242-249, 1996
- MORIMOTO, S.; SUEMORI, K.; MORIWAKI, J.; TAURA, F.; TANAKA, H.; ASO, M.; TANAKA, M.; SUEMUNE, H.; SHIMOHIGASHI, Y. Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.41, p.38179-38184, 2001
- MOULDING, P.H.; GRANT, H.F.; MCLELLAN, K.M.; ROBINSON, D.S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**, v.22, p. 391-397, 1987
- NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.; GOUPY, P.; AMIOT, M.J.; AUPERT, S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut.** v.34, n.2, p. 109-157, 1994

- OLIVEIRA, G.S.; NARAIN, N.; CHAW, G.T.M. Componentes voláteis na polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). In: IV SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. **Livro de Resumos**, p.45, 2001
- PADETEC. Extração vegetal de cajazeiras - *Spondias mombim* Disponível em: <www.padetek.ufc.br/pherpiz-k.htm>. Acesso em 25 set. 2002
- POMAR, F.; BERNAL, A; DÍAZ, J.; MERINO, F. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. **Phytochemistry**, v.46, n.8, p.1313-1317, 1997
- RICHARD-FORGET, F.C.; GAUILLARD, F.A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenoloxydase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.2472-2476, 1997
- ROBINSON, D.S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: FOX, P.F. (Ed.). **Food Enzymology**. Elsevier applied science, v.1, p.399-426, 1991
- RODRIGO, C.; RODRIGO, M.; ALVARRUIZ, A.; FRÍGOLA, A. Inactivation and regeneration kinetics of horseradish peroxidase heated at high temperatures. **Journal of Food Protection**, v.60, n.8, p. 961-966, 1997
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M. Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.9, n.2, p.148-162, 1989
- SANCHEZ-ROMERO, C.; GARCIA-GOMEZ, M.L.; PLIEGO-ALFARO, F.; HERNEDIA, A. Effect of partial deglycosilation on catalytic characteristics of an avocado peroxidase. **Physiologia Planta**, v.92, p. 97-101, 1994. Apud: **Food Chemistry**, v.65, p. 99-109, 1999
- SANTOS, E.R. **Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*)**. Campinas, 2002. 104p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- SILVA, E. **Estudo da atividade enzimática da polifenoloxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças *in natura* e processadas**. Piracicaba, 1981. 108 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

- SILVA, E.D.; LOURENÇO, E.J.; NEVES, V.A. Soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Phytochemistry**, v. 29, n.4, p. 1051-6, 1990
- SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T.; OGURA, N. Purification and some properties of peroxidase from kiwifruit. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.6, p.1677-1678, 1991
- SOUZA, A.G.C.; SOUSA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; CANTO, A.C.; CRUZ, L.A.A. **Fruteiras da Amazônia**, Manaus: Embrapa, 204 p, 1996
- SOUZA, F.X.; INNECCO, R.; ARAÚJO, C.A.T. Métodos de enxertia recomendadas para a produção de mudas de cajazeira e de outras fruteiras do gênero *Spondias*. **Comunicado Técnico, Embrapa Agroindustrial Tropical**, n.37, p. 1-8, 1999
- SRIVASTAVA, O.M.; VAN HUYSTEE, R.B. IAA oxidase and polyphenoloxidase activities of peanut peroxidase isoenzymes. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1527-1530, 1977
- TAMS, J.W.; WELINDER, K.G. Glycosylation and thermodynamic versus kinetic of horseradish peroxidase. **FEBS Letts.**, v.421, p. 234-236, 1998
- TAMURA, Y.; MORITA, Y. Thermal denaturation and regeneration of Japanese-radish peroxidase. **J. Biochem.**, v.78, p.561-567, 1975
- TONG,Z.; QINGXIANG, Z.; HUI, H.; QIN, L.; YI, Z. Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. **Chemosphere**, v.34, n.4, p. 893-903, 1997
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**, v.15, p.49-127, 1981
- VAN HUYSTEE, R.B.; SESTO, P.A.; O'DONELL, J.P. Number and size of oligossacharides linked to peanut peroxidase. **Plant Peroxidase**, v. 30, p.147-152, 1992. Apud: **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p. 4450-4456, 2001
- WEBER, K.; OSBORN, M. The reability of weight molecular determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.16, p. 4406-4412, 1969
- WHITAKER, J.R. Catalase and Peroxidase. In: **Principles of enzymology for the food sciences**, 2ed., Marcel Dekker-INC, New York, v.26, p.565-577, 1994

WILLIAMS, D.C.; LIM, M.H.; CHEN, O.A.; PANGBORN, R.M.; WHITAKER, J.R.
Blanching of vegetables for freezing. Which indicator to choose? **Food Technology**,
v.40, p. 130-140, 1985