

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DE CARAMBOLA (Averrhoa carambola, L.).

Heinz Johann Holschuh

Engenheiro Agrônomo - Mestre em Ciência de Alimentos

Professora Dr^a Gláucia Maria Pastore

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Heinz Johann Holschuh, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de junho de 2000.

Campinas, 28 de junho de 2000.

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


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Campinas

Estado de São Paulo - Brasil

2000

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

200013005

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: I/Unicamp
H741i
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 42135
 PROC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 00,00
 DATA 09/09/00
 N.º CPD

CM-00144240-4

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

H741i

Holschuh, Heinz Johann

Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.) / Heinz Johann Holschuh. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Gláucia Maria Pastore

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Averrhoa carambola*. 2. Peroxidase. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

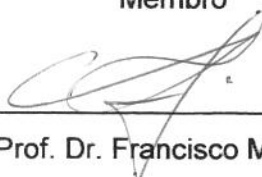


Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro

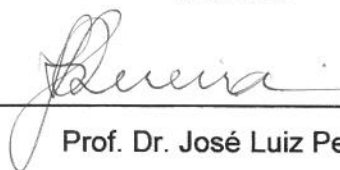
Dra. Vera Lúcia Signorelli Baldini
Membro



Profa. Dra. Hillary Castle de Menezes
Membro



Prof. Dr. Francisco Maugeri
Membro



Prof. Dr. José Luiz Pereira
Membro

Prof. Dr. Youn Koon Park
Membro

Campinas, 28 de junho de 2000

Dedico

A Conceição, minha esposa, pela companhia em todas as horas e aos nossos filhos Henrique, Mariana e Leonardo, que me acompanharam na vinda a essas terras do sul.

In Memoriam

Meus pais Friedrich e Margarethe Holschuh

AGRADECIMENTOS

- Agradeço em primeiro lugar a Conceição, minha esposa, e aos nossos filhos pela paciência nas horas difíceis.
- À Professora Gláucia Maria Pastore pelo acolhimento e pela orientação dessa tese.
- A Reginaldo de Paula pelo incansável fornecimento de carambolas e pela amizade.
- À Professora Hélia Harumi Sato pelas muitas sugestões valiosas.
- A Liana e a Lílian pelo auxílio inicial nas realizações de eletroforese.
- Aos amigos e colegas de sofrimento Ana Maria, Berenice, Elisa e Carlos Alberto, Fabiana, Gisele, Helen, Ivanilton, Joaquim, as duas Lucianas, Margarida, Massaharu, Mercedes, Rogê, Roseli e Severino pelo ótimo convívio.
- Aos funcionários e amigos do laboratório de bioquímica de alimentos Dora, Beatriz e Marcelo por todo apoio e amizade que encontrei.
- À Universidade Federal da Paraíba pela liberação para o Doutorado e à CAPES - PICDT pela bolsa durante 4 anos.
- A todas pessoas não mencionadas, que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

LISTA DE ABREVIATÖES

CM -	Carboximetil -
DEAE -	Dietilaminoetil -
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido etileno-bis-(oxietileno nitrila)tetraacético
HRP	Horseradish peroxidase
IAA -	Ácido 3-indolacético
K_M	Constante de Michaelis-Menten
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
POD	Peroxidase
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
V_{max}	Velocidade máxima

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xv

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
<u>PEROXIDASES</u>	5
Estrutura molecular de peroxidases	5
Peroxidase de raiz forte (horseradish) e de rabanete	5
Citocromo C peroxidase de levedura	9
Peroxidase de amendoim	10
Mecanismo de ação	10
Peroxidases em frutas	15
Localização histoquímica	15
Peroxidase de pêssago	17
Peroxidase de tomate	18
Peroxidase de carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.)	21
Peroxidase de coco	21
Peroxidase em <i>Citrus</i>	22
Peroxidase de maçã (<i>Malus domestica</i> , Borkh)	24
Peroxidase de manga (<i>Mangifera indica</i> , L.)	26
Peroxidase de pera	27
Peroxidase de uva (<i>Vitis vinifera</i>)	28
Peroxidase de mamão (<i>Carica papaya</i>)	29
Peroxidase de kiwi (<i>Actinidia chinensis</i> , Planch)	30
Peroxidase de morango (<i>Fragaria ananasa</i> , Duch.)	30

<u>CARAMBOLA</u>	32
Descrição e origem	32
Produção de carambola	32
Utilização da carambola	33
Manuseio e pós-colheita	35
Amadurecimento e fisiologia pós-colheita de carambola	35
Composição química da carambola	37
Enzimas em carambola	41
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	43
 OBJETIVOS	 59
 CAPÍTULO 2: Peroxidase of carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.) in four states of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.	 60
 Peroxidase of carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.) in four states of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.	 61
ABSTRACT	61
INTRODUCTION	61
MATERIAL AND METHODS	62
Plant material	62
Histochemical localization	62
Peroxidase extraction conditions	63
Peroxidase activity from carambola parts	63
Biochemical characteristics	63
Optimum reaction pH and optimum reaction temperature	63
Peroxidase activity determination	63
RESULTS AND DISCUSSION	64
Histochemical location	64
Peroxidase extraction conditions	64
Peroxidase activity in the parts of carambola	65
Biochemical characteristics	65
ACKNOWLEDGEMENTS	65
REFERENCES	66

CAPÍTULO 3: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA EXTRAÇÃO DA ENZIMA.	74
---	----

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA EXTRAÇÃO DA ENZIMA.	75
---	----

RESUMO	75
--------	----

1 - INTRODUÇÃO	76
----------------	----

2 - MATERIAIS E MÉTODOS	76
-------------------------	----

2.1 - Materiais	76
-----------------	----

2.2 - Métodos	77
---------------	----

2.2.1 - Extração da POD usando aditivos	77
---	----

2.2.2 - Determinação da atividade POD	78
---------------------------------------	----

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
----------------------------	----

4 - CONCLUSÕES	79
----------------	----

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
--------------------------------	----

CAPÍTULO 4: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.	83
---	----

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.	84
---	----

RESUMO	84
--------	----

SUMMARY	85
---------	----

1 - INTRODUÇÃO	85
----------------	----

2 - MATERIAIS E MÉTODOS	86
-------------------------	----

2.1 - Materiais	86
-----------------	----

2.2 - Métodos	86
---------------	----

2.2.1 - Estudo de precipitação da peroxidase	86
--	----

2.2.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD	87
---	----

2.2.3 - Determinação da atividade da POD	87
--	----

2.2.4. - Influência pH do meio reativo na atividade da POD	87
--	----

2.2.5 - Influência da temperatura na atividade da POD	88
2.2.6 - Determinação de proteínas	88
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1- Semi-purificação da peroxidase de carambola	88
3.1.1 - Estudos de precipitação da peroxidase de carambola	88
3.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD	89
3.3 - Caracterização parcial do extrato cetônico	90
3.3.1 - Influência do pH do meio reativo na atividade da POD	90
3.3.2 - Influência da temperatura na atividade da POD	92
4 - CONCLUSÕES	92
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
 CAPÍTULO 5: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH DO EXTRATO CETÔNICO.	 96
 PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH DO EXTRATO CETÔNICO.	 97
RESUMO	97
SUMMARY	98
1 - INTRODUÇÃO	98
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	99
2.1 - Materiais	99
2.2 - Métodos	99
2.2.1 - Temperatura x pH de estabilidade	99
2.2.2. - Inativação térmica	100
2.2.3 - Determinação da atividade da POD	100
2.2.4 - Determinação do teor de proteínas	100
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1 - Influência da temperatura e do pH na estabilidade da POD de carambola	101
3.1.1 - Estabilidade térmica da POD de carambola	101
3.1.2 - pH de estabilidade da POD de carambola	103
3.1.3 - Efeito do tempo de tratamento, pH e temperatura na estabilidade enzimática da POD de carambola.	106

3.1.4 - Inativação da POD cetônica de carambola por tratamento térmico e pH.	111
4 - CONCLUSÕES	113
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
CAPÍTULO 6: Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.):	
Purification and characterization of an anionic isoenzyme.	118
Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): Purification and	
characterization of an anionic isoenzyme.	119
ABSTRACT	120
INTRODUCTION	121
MATERIAL AND METHODS	121
Material	121
Methods	122
Peroxidase purification	122
Molecular weight determination	122
Electrophoresis on polyacrylamide gels	123
Optimum reaction pH	123
Optimum reaction temperature	123
The kinetic parameters K_M and V_{max}	123
Peroxidase activity	123
Protein determination	124
RESULTS AND DISCUSSION	124
Purification of an anionic isoperoxidase from carambola	124
Molecular weight estimation	125
Optimum reaction pH	125
Optimum reaction temperature	126
Kinetic parameters K_M and V_{max}	126
REFERENCES	127
CAPÍTULO 7: Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): Heat and	
pH stability, and inhibition of an anionic isoenzyme.	141

Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): Heat and pH stability, and inhibition of an anionic isoenzyme.	142
ABSTRACT	143
INTRODUCTION	144
MATERIAL AND METHODS	144
Material	144
Methods	145
Heat x pH stability	145
Influence of ions on peroxidase activity	145
Influence of inhibitors on peroxidase activity	146
Determination of peroxidase activity	146
RESULTS AND DISCUSSION	146
Heat and pH stability	146
Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the activity of anionic isoperoxidase from carambola	148
Influence of ions on the anionic isoperoxidase activity of carambola	148
Influence of inhibitors, antioxidants, and chelating agents	150
REFERENCES	151
CONCLUSÕES GERAIS	158

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.)	3
CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica	
Figura 1: Proposta de mecanismo da formação do composto I da peroxidase de raiz forte (HRP-I).	13
Figura 2: Redução do composto I para composto II de peroxidase de raiz forte através da transferência de um elétron.	14
Figura 3: Redução do composto II para peroxidase nativa de raiz forte através da transferência de um elétron.	14
CAPÍTULO 2: Peroxidase of carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.) in four states of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.	
Figure 1: Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): a) green mature, b) ripe, c) full ripe and d) overripe fruits.	69
Figure 2: Histochemical localization of peroxidase activity in green carambola slices	69
Figure 3: Histochemical localization of peroxidase activity in mature-green carambola	70
Figure 4: Histochemical localization of peroxidase activity in overripe carambola	70
Figure 5: Comparative peroxidase staining with guaiacol and hydrogen peroxide on the right; without hydrogen peroxide on the left. Green-mature carambola slices are on bottom and overripe slices on the top. Staining by the reaction solution on top-right was due to greater enzyme solubility in the overripe fruit.	71
Figure 6: Control slices of mature green carambola (right) and overripe fruit (left).	71
Figure 7: Influence of extraction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.	72
Figure 8: Influence of reaction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.	72
Figure 9: Influence of reaction temperature on specific peroxidase activity per mass of carambola.	73

CAPÍTULO 3: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA EXTRAÇÃO DA ENZIMA.

Figura 1: Atividade POD de extratos obtidos com e sem aditivos isolados:	80
Figura 2: Atividade de POD de extratos obtidos com aditivos combinados:	81
Figura 3: Extração de POD Livre, Ionicamente Ligada e Extrato Total	81

CAPÍTULO 4: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.) : CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.

Figura 1: Influência do pH na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.	91
Figura 2: Influência da Temperatura na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.	92

CAPÍTULO 5: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH DO EXTRATO CETÔNICO.

Figura 1: Estabilidade térmica da POD em tampão citrato - fosfato 25 mM, pH 3,0.	101
Figura 2: Estabilidade térmica da POD em tampão fosfato 25 mM, pH 6,0.	102
Figura 3: Estabilidade térmica da POD em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 9,0.	103
Figura 4: pH de Estabilidade de POD de carambola a 0°C.	104
Figura 5: pH de Estabilidade da POD de carambola a 25°C.	104
Figura 6: pH de Estabilidade da POD de carambola a 50°C	105
Figura 7: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.	106
Figura 8: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.	107
Figura 9a: Atividade residual da POD após 3 horas de tratamento: gráfico 3-D. As áreas em tons marrons constituem atividades residuais acima de 80 % da inicial e as verdes entre 40 e 80%.	107

Figura 9b: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento: gráfico de superfície. As áreas em marrom significam atividade residual acima de 80% e as verdes de 40 a 60%.	108
Figura 10: Atividade residual da POD após 24 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.	109
Figura 11: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.	109
Figura 12a: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico 3-D. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.	110
Figura 12b: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico de superfície. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.	111
Figura 13: Inativação Térmica da POD de carambola a 75°C	112
Figura 14: Inativação térmica da POD de carambola em temperatura de ebulição (96,8°C).	112

CAPÍTULO 6: Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.): Purification and characterization of an anionic isoenzyme.

FIGURE 1: Purification of peroxidase from carambola on first DEAE Toyopearl 650 C column.	131
FIGURE 2: Purification of peroxidase from carambola on second DEAE Toyopearl 650 C column.	132
FIGURE 3: Purification of isoperoxidase A2 on Toyopearl HW-55 F gel filtration column.	133
FIGURE 4: Native PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of the purified anionic isoperoxidase.	134
FIGURE 5: Outline of gel filtration chromatography on Sephadex G-100 for the molecular weight determination.	135
FIGURE 6: Molecular weight estimation of an anionic isoperoxidase from carambola	136
FIGURE 7: Optimum reaction pH of the anionic isoperoxidase A2 from carambola	137

FIGURE 8: Optimum reaction temperature of the anionic isoperoxidase A2 from carambola

138

CAPÍTULO 7: Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.): Heat and pH stability, and inhibition of an anionic isoenzyme.

FIGURE 1: Peroxidase stability at 0 °C	152
FIGURE 2: Peroxidase stability at 25 °C	152
FIGURE 3: Peroxidase stability at 50 °C.	153
FIGURE 4: Peroxidase stability at 75 °C	153
FIGURE 5: Peroxidase stability at boiling temperature (96.8 °C)	154
FIGURE 6: Peroxidase stability at pH 3.0	154
FIGURE 7: Peroxidase stability at pH 6.0.	155
FIGURE 8: Peroxidase stability at pH 9.0	155

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2: Peroxidase of carambola (<i>Averrhoa carambola</i> , L.) in four states of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties	
Table 1: Influence of the part of the fruit and maturation on the specific peroxidase activity per mass of carambola or its parts	68
CAPÍTULO 4: PEROXIDASE DE CARAMBOLA (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.	
Tabela 1: Influência do agente precipitante na atividade POD recuperada em relação ao sobrenadante.	88
Tabela 2: Estabilidade do precipitado cetônico de peroxidase de carambola, armazenado a -19°C.	90
CAPÍTULO 6: Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): Purification and characterization of an anionic isoenzyme.	
TABLE 1: PURIFICATION STEPS AND YIELD OF CARAMBOLA PEROXIDASE.	139
TABLE 2: ESTIMATED K_M E V_{MAX} VALUES FOR THE SYSTEMS GUAIACOL : HYDROGEN PEROXIDE AND P-PHENYLENEDIAMINE : HYDROGEN PEROXIDE OF PURIFIED ANIONIC CARAMBOLA PEROXIDASE.	140
CAPÍTULO 7: Peroxidase from carambola fruit (<i>Averrhoa carambola</i> , L.): Thermal and pH stability, and inhibition of an anionic isoenzyme.	
Table 1: Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the anionic carambola isoperoxidase, expressed in residual activity	156
Table 2: Influence of ions on carambola's anionic isoperoxidase activity	156
Table 3: Influence of inhibitors, antioxidants and chelating agents on the anionic carambola isoperoxidase activity	157

RESUMO

Peroxidases (POD, EC 1.11.7.1 doador : peróxido de hidrogênio oxidoreductase) são um grupo de isoenzimas responsabilizadas pelo surgimento de alterações da coloração natural dos alimentos e sabor desagradável; são usadas em análises de alimentos, clínicas, e em conjunto com outras enzimas, na conservação de certos alimentos. Muitas frutas como a carambola (*Averhoa carambola*, L.) ainda não tiveram suas peroxidases avaliadas quanto às suas propriedades bioquímicas. Esse trabalho teve como objetivo isolar, purificar e caracterizar bioquimicamente a peroxidase de carambola. A localização histoquímica da peroxidase realizou-se mergulhando fatias de carambolas verdes, verde-maturas e sobre-maduras em mistura de reação constituída de 1 % de guaiacol em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0, e 0,1 M de peróxido de hidrogênio. A evolução do escurecimento foi acompanhada e fotografada. A localização em frutas verdes e verde-maturas restringiu-se às partes mais fibrosas: junto aos feixes vasculares que atravessam a polpa, ao talo central e gineceu e à casca. Em fatia de carambola sobre-madura a polpa adquiriu coloração do tetraguaiacol e houve extravasamento do composto colorido para o meio de reação, indicando a presença de maior quantidade de enzima solúvel. Partes de carambola, casca, polpa e talo central com gineceu foram analisadas separadamente, após extração da POD com tampão mais eficiente, fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0. Os resultados encontrados na localização histoquímica foram confirmados. Talo central com gineceu apresentaram maior atividade por grama da parte da fruta, seguido pela casca; polpa apresentou atividade considerável apenas em carambolas sobremaduras. Carambolas verdes renderam maior atividade POD por grama, na soma das partes. Foram testados o efeito da adição de 0,2 M de CaCl_2 , 2% de PVP, 2% de PEG, 0,01 M de EDTA e 0,01 M de ácido L-ascórbico, isoladamente ou em combinação ao tampão de extrato fosfato de potássio 0,2 M ou à água destilada, na extração de peroxidase insolúvel de carambola, sendo que a melhor combinação foi tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 , 2% PEG e 0,01 M de EDTA. O extrato total, obtido pela extração com os aditivos acima citados e 0,1% de Triton X-100, rendeu 1,29 vezes mais POD que a soma das extrações em seqüência: 1) Enzima Livre: extraída em água destilada, contendo PEG e EDTA, ressuspendendo e extraíndo o precipitado por duas vezes; 2) Enzima ionicamente ligada: ressuspendendo o último precipitado de (1) em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0, contendo CaCl_2 , repetindo

a operação por duas vezes e, 3) Enzima solúvel com Triton X-100: ressuspensão do último precipitado de (2) no tampão de extração (2), contendo 0,1% de Triton X-100. Nos ensaios de precipitação da peroxidase, sulfato de amônio a 90% de saturação preservou apenas 3% mais atividade por grama de carambola que a adição de 65% de acetona. Precipitação com acetona foi a escolhida pela facilidade de manipulação e conservação do extrato. A purificação da peroxidase de carambola foi feita usando cromatografia de troca iônica em coluna DEAE toyopearl 650-C de 35 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro, sendo eluídas quatro frações. A primeira fração, eluída com o tampão de equilíbrio da coluna, foi denominada C, a segunda e a terceira eluídas com gradiente de 0,14 M de NaCl, chamadas respectivamente A1 e A2 e a quarta fração A3, eluída com 0,3 M de NaCl. A recromatografia em coluna idêntica das frações dialisadas e liofilizadas reunidas resultou em apenas duas frações ativas: C e A2. A cromatografia de exclusão em coluna Toyopearl HW-55 F de 65 x 1,5 cm (comprimento x diâmetro), da isoperoxidase A2 resultou em purificação de 106 vezes com rendimento de 14,5% em relação ao extrato bruto (sobrenadante). A eletroforese nativa (PAGE) da isoperoxidase A2 resultou em uma única banda e SDS-PAGE em uma banda forte e persistente e várias bandas tênues, que desapareceram após o término da revelação. A enzima foi considerada altamente purificada, mas não totalmente pura. O peso molecular foi estimado em 64,5 kDa através de filtração em gel em coluna Sephadex G-100 (65 x 1,5 cm). O extrato bruto de carambola apresentou atividade ótima de peroxidase em pH 5,5; o pó cetônico mostrou uma faixa de atividade ótima entre pH 5,5 e 6,0 e a isoperoxidase purificada A2 entre pH 5,7 e 5,9. Essas três preparações enzimáticas de peroxidase, de diferentes graus de purificação, apresentaram a mesma temperatura ótima de atividade, em torno de 50°C. O pó cetônico armazenado a -19°C perdeu cerca de 50% da sua atividade após um ano da sua produção. Dissolvido em tampões pH 3,0 a 9,0, e submetido a tratamento térmico entre 0 e 60 °C, o extrato cetônico foi estável durante 24 horas a pH 8,0 entre 0 e 60 °C e a 40 °C em pH 6,0 a 9,0. A isoperoxidase A2 purificada demonstrou estabilidade durante 24 horas a 0 °C em pH 4,0 a 9,0 e a 25 °C em pH 6,0 a 9,0. A inativação térmica da peroxidase do pó cetônico foi verificada em pH 3,0 após tratamento a 75 °C durante 15 minutos e em pH 7,0 após 30 minutos. Nos demais valores de pH a inativação ocorreu mais lentamente após tratamento nesta temperatura. A peroxidase do pó cetônico foi inativada após tratamento em ebulição durante 5 minutos, em todos os valores de pH testados. A isoperoxidase purificada A2 de carambola foi inativada em pH 6,0 após 1 hora a 75 °C e em pH 6,0 a 9,0 após 5 minutos de tratamento

em ebulição. Nos outros valores de pH, a inativação da peroxidase nessa temperatura foi mais rápida. A 75 °C, a isoperoxidase A2 mostrou-se mais estável que a enzima do extrato cetônico. A isoperoxidase A2 mostrou maior especificidade a p-fenilenediamina do que a guaiacol e a peróxido de hidrogênio em relação a ambos os doadores de H⁺. Forte inibição foi causada por 0,05 mM de CuSO₄ (92,7%), 0,1 mM de KCN (98,8%), 5 mM de 2-mercaptoetanol (99,9%), de ácido ferúlico (92,4%) e de metabissulfito de sódio (100%) e de 10 mM de Fe₂(SO₄)₃ (98,9%). Cloreto de cálcio em concentração 5 mM causou ativação de enzima purificada em 22,9%.

ABSTRACT

Peroxidases (POD, EC 1.11.7.1 donor : hydrogen peroxide oxydoreductase) are a group of isoenzymes whose action results in discoloration and off-flavours in foods, but are also used in food and clinical analyses, as well as in food conservation, combined with the action of other enzymes. A lot of tropical fruits and vegetables have yet to be biochemically characterised with respect to their peroxidases. This study aimed at to isolating, purifying and characterising the peroxidase from carambola (*Averrhoa carambola*, L.) fruit. The histochemical localisation of peroxidase from carambola was carried out by immersing slices of green, green-mature and overripe carambolas in a reaction mixture of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0 and 0.1 M hydrogen peroxide. The development of browning was observed and photographed. In green and green-mature slices the POD was localised near the fibrous parts such as vascular bundles, internal stem, gynoecium and peel. In overripe slices the colouring of the pulp and the reaction medium could be seen, indicating the presence of greater amounts of soluble POD at this stage of maturation. Separate analysis of POD activity in the parts: internal stem with gynoecium, pulp and peel of carambola, confirmed the findings of the histochemical localisation. The internal stem with gynoecium had the highest activity per gram of fruit part, followed by the peel. The pulp showed appreciable activity only in overripe fruits. Green carambolas showed the highest POD activity in relation to the other maturation stages tested. The best extraction buffer was found to be 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 8.0. The extraction of POD activity with the addition of other chemical substances, showed that the addition of 0.2 M CaCl_2 , 2% PEG and 0.01 M EDTA in 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 8.0, was the best medium for total extraction. The total extract yielded 1.29 times the amount of POD activity as the sum of sequential extractions: Soluble enzyme (three times), Ionically bound enzyme (three times) and Triton X-100 soluble enzyme (an other three times). Precipitation studies using 65% solutions of ethanol or acetone and 90% saturation of ammonium sulphate showed that ammonium sulphate resulted in only 3% more activity per gram of fruit than acetone. Acetone precipitation was selected because it offers less manipulation steps to obtain a dry powder, with better storage conditions. Enzyme purification was effected using anionic exchange chromatography on a 35 x 2.5 cm Toyopearl 650 C column. Four peaks with POD activity were eluted: one with equilibration buffer, named 'C', two with 0.14 M NaCl gradient, named A1 and A2 and one with 0.3 NaCl gradient named A3, in order of elution. The four

peaks were dialysed, lyophilised and dissolved in a small amount of equilibration buffer, and chromatographed for a second time on the same column. Only peaks C and A2 eluted with activity. Peak A2 was submitted to gel filtration chromatography on a 65 x 1.5 cm Toyopearl HW-55 F column, and resulted in 106 fold purified isoperoxidase, yielding 14.5 % of the initial activity (supernatant). The molecular weight was estimated using gel filtration chromatography on a 65 x 1.5 cm Sephadex G-100 column, with standards. Regression analysis indicated a molecular weight of 64.5 kDa. Native PAGE resulted in one band, when coloured with p-phenylenediamine and hydrogen peroxide, whereas SDS-PAGE resulted in one sharp and persistent and several tenuous bands, which disappeared after the conclusion of staining. So we considered isoperoxidase A2 from carambola as being purified POD, but not pure from other proteins. The optimum reaction pH for the crude extract (supernatant) was 5.5; for the acetone powder it was in the range of pH 5.5 to 6.0, and for the purified isoperoxidase A2 it was 5.7 to 5.9. The optimum reaction temperature was 50 °C in all three cases. Nearly 50% of the peroxidase activity of the acetone powder was lost after one year of storage at -19 °C. Dissolved in buffer solutions at pH 3.0 to 9.0 and submitted to heat treatments between 0 and 60 °C for 24 hours, the acetone extract was stable at pH 8.0 between 0 and 60 °C and at 40 °C from pH 6.0 to 9.0. Isoperoxidase A2 from carambola was stable for 24 hours at 0 °C from pH 4.0 to 9.0 and at 25 °C from pH 6.0 to 9.0. Thermal inactivation of the acetone extract was achieved at 75 °C at pH 3.0 after 15 minutes and at pH 7.0 after 30 minutes. At all other pH values inactivation was slower. Under boiling conditions, The acetone extract was inactivated for POD activity in 5 minutes at all pH values. Isoperoxidase A2 was inactivated after one hour at pH 6.0 at 75 °C and after 5 minutes between pH 6.0 and 9.0. At all other pH values inactivation occurred much more rapidly under boiling conditions. Isoperoxidase A2 was more stable at 75 °C than the acetone powder. Higher substrate affinity of isoperoxidase A2 was observed for p-phenylenediamine than for guaiacol and for hydrogen peroxide than for the H⁺ donors. Strong inhibition of the purified isoperoxidase A2 was caused by the addition of 0.05 mM CuSO₄ (92.7%), 0.1 mM KCN (98.8%), 5 mM 2-mercaptoethanol (99.9%), 5 mM ferrulic acid (92.4%), 5 mM sodium metabisulphide (100 %), and 10 mM Fe₂(SO₄)₃ (98.8%). Calcium chloride at a concentration of 5 mM enhanced POD activity by 22.5 %.

INTRODUÇÃO

Peroxidasas (POD, E.C.1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxidoretutase) são um grupo de isoenzimas amplamente difundidas nos reinos animal e vegetal e são encontradas também em fungos (Dunford, 1991). Uma das POD mais estudadas é a extraída da Raiz Forte (*Armoracia lapathifolia*, Gilib.), conhecida na literatura em língua inglesa como "Horseradish" peroxidase (HRP). Um número grande de isoenzimas da peroxidase pode ser extraído de vegetais: em 'callus' e brotos florais e vegetativos de *Nicotiana tabacum*, por exemplo, 47 (quarenta e sete) isoenzimas foram reveladas (Kay & Basile, 1987), sendo que 25 (vinte e cinco) destas tiveram correlação com eventos específicos do desenvolvimento vegetal. Hoyle (1977) relatou 42 isoperoxidasas em mistura feita de três peroxidases comerciais de raiz forte. Em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a POD é tradicionalmente relacionada a reações de escurecimento e alterações organoléticas negativas (Burnette, 1977; Vámos-Vigyázó, 1981). Robinson (1991) e Morales et alii (1993) atribuíram este fato à oxidação de fenóis catalisada por POD. A capacidade da peroxidase promover ligações entre proteínas através da formação de radicais de aminoácidos como a tirosina (Aeschbach et alii, 1976) levou ao uso da enzima em 'Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay' - ELISA, onde a peroxidase tem aplicação em análises de microrganismos patogênicos (Chen and Chang, 1995), de toxinas (Chu and Fan, 1985), ensaios de higiene (Chang and Huang, 1994), autenticidade de alimentos (Anguita et alii, 1997) e mais ainda em análises clínicas. A ação conjugada da glucose oxidase que degrada glucose para glucolactona e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a peroxidase que usa o H_2O_2 está sendo aplicada em análise de alimentos (McClear and Glennie-Holmes, 1985; Casella et alii, 1989). As propriedades reativas da peroxidase com diferentes substratos doadores de H^+ , tornaram-na útil na determinação de componentes de alimentos (Arnao et alii, 1996).

Muitas frutas tropicais ou subtropicais do Brasil ainda não foram, ou foram pouco estudadas quanto às suas características bioquímicas, em específico as da atividade da peroxidase e quanto ao seu potencial como fonte dessa enzima. Frutas de menor expressão comercial são as menos estudadas. Uma delas é a carambola (*Averrhoa carambola*, L.).

A Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) comercializou durante o ano de 1990 cerca de 745 t de carambolas 'in natura', contra 702 t em 1989 (CEAGESP, 1989 e 1990), das quais 12,6% vieram da região de Campinas - SP em 1989 e 23,4% em 1990. Dados estatísticos mais recentes não estiveram disponíveis. Estatísticas relativas à produção desta fruta, ou da sua área de cultivo não foram encontradas, indicando que a fruteira é plantada principalmente em quintais e pequenas propriedades. De acordo com a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (Cati) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Bridi, 1999), as regiões do Estado que mais produzem carambola são Andradina, Lins e Mogi Mirim, pela ordem. Um único produtor do Município de Jaguariuna - São Paulo estimou colher no ano de 1999 cerca de 315 t da fruta, metade da comercializada em 1990 pela CEAGESP. De acordo com Bridi (1999), a maior parte da produção de carambola é comercializada diretamente pelo produtor, alcançando melhores preços: R\$ 1,50 a bandeja individual. No mercado normal a caixa com 15 kg vale R\$ 2,00. Nessa conjuntura, acreditamos que um aproveitamento alternativo da fruta seria desejado, já que a comercialização direta é para poucos, e para as frutas de melhor qualidade. A carambola é usada para o consumo como fruta fresca pelo seu sabor e aroma agradáveis. É usada também em forma de compotas e sucos e sua forma de estrela penta-angular aliada a coloração amarelo-âmbar fazem-na atraente para a confeitaria. Escurecimentos em carambolas foram observados tanto no fruto inteiro como em fatias de 9 (nove) cultivares na Flórida. Correlação positiva foi encontrada entre a degradação do ácido L-ascórbico, a atividade da polifenoloxidase (PPO) e teores em fenóis totais (Weller et alii, 1996 e 1997). No Brasil, carambolas do tipo ácido tiveram propriedades bioquímicas avaliadas por Baldini et alii (1982), entre as quais a atividade da POD. Os autores relataram atividade específica da POD de 34,8 unidades (U) por mg de proteína, sendo 1U igual à quantidade de enzima que produziu aumento em 0,1 unidades de absorbância por minuto a 470 nm com guaiacol como doador de H⁺. A eletroforese desta POD revelou uma única banda e o pH ótimo foi 6.0. Nenhuma referência bibliográfica foi encontrada quanto a outras características bioquímicas da POD de carambola.

Pelo exposto, os objetivos deste trabalho foram o isolamento, a purificação e a caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.).



FIGURA 1: Carambola (*Averrhoa carambola*, L.)¹

¹ Foto Reginaldo

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PEROXIDASES

Peroxidase (POD, E.C. 1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxido-redutase) é encontrada nos reinos animal, em fungos e é universalmente distribuída no reino vegetal. Nos vegetais, a peroxidase pode ser encontrada em todas as partes: em *Nicotiana tabacum* 47 (quarenta e sete) isoperoxidasas foram isoladas de diversas partes da planta (Kay & Basile, 1987).

Estrutura molecular de peroxidases

Poucas peroxidases tiveram a sua estrutura molecular ou cristalina elucidadas: peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase" - HRP) (Welinder et alii, 1972; Welinder & Smillie, 1972; Welinder, 1973; Mauk & Girotti, 1974; Welinder & Mazza, 1975 e 1977; Welinder, 1976, 1979 e 1985; Haschke & Friedhoff, 1978; LaMar et alii, 1980; Hashimoto et alii, 1986; Shiro et alii, 1986 e Kuo & Fridovich, 1988); peroxidase de rabanete (Welinder & Mazza, 1975 e 1977); citocromo C peroxidase de levedura (Poulos et alii, 1980 e Finzel et alii, 1984) e peroxidase de amendoim (Schuller et alii, 1996).

Peroxidase de raiz forte (horseradish) e de rabanete

A peroxidase mais estudada é a extraída da raiz forte (*Armoracea lapathifolia*, Gilib.), conhecida na literatura inglesa como "horseradish" peroxidase (HRP). Welinder et alii (1972) encontraram oito resíduos de cistina na análise de aminoácidos após oxidação com ácido perfórmico em HRP comercial. A enzima foi considerada homogênea após cromatografia em CM-celulose, eletroforese de disco em gel realizada com tampões ácidos e alcalinos, micro-eletrofocalização em sacarose em gradientes de pH 3-10 e análises de aminoácidos e de hexosaminas. Como os autores não encontraram nenhuma S-carboximetilcisteína após tratamento da proteína em 8 M uréia, concluíram que HRP contém 4 pontes de dissulfeto. Na análise das seqüências dos peptídeos obtidos após digestão da proteína livre de heme por tripsina, 21 destes foram completamente e 3 parcialmente seqüenciados. Vários sítios de ligação de carboidratos foram observados. Em outra parte do estudo de seqüenciamento dos aminoácidos da HRP, Welinder &

Smillie (1972) analisaram 120 peptídeos obtidos com termolisina, seguido de fracionamento em coluna Sephadex G-25, e eletroforese de papel de alta voltagem. As seqüências ao redor das quatro pontes de dissulfeto, dos três resíduos de histidina e do único resíduo de triptofano foram elucidados. Welinder (1973) relatou o seqüenciamento de um dos peptídeos, confirmando a presença de pontes de dissulfeto e uma alça interna nesse peptídeo entre dois resíduos de cisteína e de cadeias laterais compostos de mais de uma unidade de glucosamina localizadas em resíduos de asparagina.

Mauk & Girotti (1974) relataram que protoporfirina IX combina estequiometricamente na proporção de 1:1 com a apo-isoenzima C de HRP. Após fotoxidação da apoenzima apenas 25% da atividade da enzima nativa foi recuperada quando combinado com protoporfirina IX. Estudos de mapeamento de peptídeos tripticos indicaram que a fotoxidação resultava na subtração de um resíduo histidil e concluíram que os resultados sugerem que o resíduo histidil está localizado no sítio de ligação da HRP-C.

Welinder & Mazza (1975) isolaram 4 isoperoxidasas de rabanete, denominadas de P₁, P₂, P₃ e P₇, submetendo-as à digestão com tripsina. HRP isoenzima C (HRP-C) foi submetida a tratamento idêntico. A eletroforese de papel de alta voltagem e reações com reagentes como ninidrina, histidina, tirosina, triptofano e arginina foram usadas na confecção do mapa de peptídeos. Resíduos de cistina e cisteína também foram determinados. Todos os resíduos de 1/2 cistina pareceram envolvidas em pontes de dissulfeto. As duas isoenzimas mais ácidas de rabanete (P₁ e P₂), diferem entre si em apenas um aminoácido: um resíduo de asparagina foi trocado por um de lisina. A isoperoxidase P₃, menos ácida que P₁ e P₂, se distingue, embora mantenha semelhanças com as duas anteriores. A HRP-C também pertence a esse grupo, principalmente pelas seqüências dos aminoácidos (AA) ao redor das pontes de dissulfeto. A isoperoxidase P₇ de rabanete difere do grupo em relação à seqüência de aminoácidos ao redor de pelo menos duas pontes de dissulfeto e por isso pode ter estrutura tridimensional diferente das demais. Em todas as cinco isoperoxidasas estudadas, apenas duas seqüências foram altamente homólogas, ambas contendo histidina. Este resultado corrobora com o entendimento de haver duas seqüências com histidina próximo ao sítio ativo. A seqüência completa de aminoácidos da HRP foi publicada por Welinder (1976), relatando que a glicoproteína HRP consiste de 308 resíduos de aminoácidos, um grupo heme e oito

cadeias laterais neutras de carboidratos, ligados a resíduos de asparagina. O peso molecular da cadeia polipeptídica foi calculado pela sequência dos aminoácidos em 33,89 kDa e o da molécula de HRP estimada em 40 a 45 kDa. Em publicação subsequente, Welinder & Mazza (1977) relataram que as sequências de aminoácidos das isoperoxidasas P₁, P₂, P₃ e HRP-C contêm dois resíduos de histidina nas posições 40 e 42 do polipeptídeo, enquanto em P₇ o resíduo 40 é fenilalanina. As isoperoxidasas P₁, P₂ e P₃ contêm vários sítios de ligação com carboidratos como a HRP-C, que contêm oito, enquanto P₇ contém apenas um.

Haschke & Friedhoff (1978) relataram que as isoperoxidasas HRP-C e HRP-A de raiz forte contêm 2,0 e 1,4 moles de Ca²⁺ por mol de enzima, respectivamente. O cálcio pode ser removido por tratamento com hidrocloreto de guanidina 6 M e EDTA 10 mM, pH 7-8 durante 4 horas à temperatura ambiente. A readição de Ca²⁺ restituiu a atividade enzimática à HRP-C, mas não à HRP-A. O entendimento do papel do cálcio na estabilização da estrutura conformacional da HRP foi reforçado pela maior termoestabilidade da enzima com cálcio: HRP sem cálcio foi inativada a 58°C em 30 minutos, enquanto HRP nativa manteve 40% de sua atividade após tratamento idêntico.

A isoperoxidase HRP-C domina quantitativamente entre as isoenzimas da Raiz Forte e seu ponto isoelétrico situou-se perto de pH 9 (Welinder, 1979). A enzima consiste de um grupo prostético de heme, dois íons Ca²⁺ e 308 resíduos de aminoácidos, incluindo 4 pontes de dissulfeto em uma única cadeia polipeptídica, apresentou 8 cadeias laterais de carboidratos e peso molecular de 33,89 kDa. O peso molecular da HRP-C nativa, incluindo as cadeias de carboidratos, foi estimado em 44 kDa (Welinder, 1979).

LaMar et alii (1980) investigaram a estrutura eletrônica e molecular do grupo heme em estado de repouso da HRP, usando "High field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy". Marcação com deutério de posição selecionada de hemina e deutériohemina, reconstituídos na apoenzima, resultaram em padrões de deslocamento hiperfino do grupo prostético, consistente com porfirina férrica, exibindo caráter S=3/2 (3 elétrons não pareados) em estado misto de quantum/spin. Todas as ressonâncias resolvidas apontam para a ligação com porfirina e um grupo imidazol próximo (histidina ¹⁷⁰). Uma sexta ligação do Fe³⁺ com a proteína não pôde ser descartada.

Welinder (1985) relatou que as três apoperoxidases conhecidas (HRP-C, peroxidase de rabanete P₇ (TP-7) e citocromo C peroxidase de levedura) contêm 300 ± 8 resíduos de aminoácidos. As seqüências alinhadas mostraram apenas 18% e 16% de identidade entre a citocromo C peroxidase de levedura e HRP-C e TP-7, respectivamente. Mesmo assim uma única origem evolutiva pode ser assumida, pois: a) hélices previstas em peroxidases de plantas seguem o padrão complexo da estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura; b) seus padrões hidropáticos são similares e concordam com as cadeias peptídicas expostas e escondidas em citocromo C peroxidase; c) os resíduos de cistinas distantes na seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica tornam-se vizinhas no modelo da estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura e, d) a estrutura de dois domínios proposta a partir de proteólise limitada de HRP-C é observada na estrutura cristalina da citocromo C peroxidase.

Hashimoto et alii (1986) em estudos de espectroscopia do composto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) da peroxidase de raiz forte concluíram que uma ponte de hidrogênio entre o $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ e um grupo imidazol de histidina próxima tem papel catalítico importante. A ligação foi encontrada em soluções neutras mas não em básicas, fato que pode explicar a inativação da enzima em soluções alcalinas.

Shiro et alii (1986) removeram Ca^{2+} endógeno de HRP, causando alterações substanciais no espectro de próton NMR da enzima em vários estados de oxidação/spin. Os resultados mostraram que o Ca^{2+} tem como função manter a estrutura conformacional da enzima e do grupo heme, como também o estado spin do ferro em favor da atividade da HRP.

Kuo & Fridovich (1988) estudaram o efeito estimulante de compostos nitrogenados na atividade da peroxidase. A HRP teve seu perfil de atividade versus pH alargado com a adição de compostos nitrogenados. Outras peroxidases, como mieloperoxidase, cloroperoxidase, metahemoglobina e microperoxidase, não foram afetadas. A Citocromo C peroxidase foi afetada em menor extensão que HRP na peroxidação de o-dianisidina. A atividade de HRP frente a fenóis não foi afetada por compostos nitrogenados. Os autores concluíram que compostos nitrogenados aumentam o pKa do grupo distal de histidina e assim alarga o perfil de atividade x pH para substratos anilinas como a o-dianisidina. Os fenóis parecem se ligar com pontes de hidrogênio

diretamente ao $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, deslocando a histidina distal e por isso não foram influenciadas por compostos nitrogenados.

Citocromo C peroxidase de levedura

Poulos et alii (1980) determinaram a estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura, usando mapa de densidade de elétrons de 2,5 Å computadorizado com fases obtidas de dois derivados isomorfos de mercúrio. A ligação do grupo heme com uma histidina próxima foi confirmada, como também a identificação de resíduos de triptofano, histidina e arginina perto da sexta coordenada do Fe^{3+} . Dez segmentos helicoidais contendo cerca da metade dos resíduos de aminoácidos da enzima são as estruturas mais proeminentes do modelo da enzima, o qual ainda contempla três cadeias β -antiparalelas. A enzima é dobrada em dois domínios claramente definidos e o grupo heme ocupa uma fenda entre a hélice B do domínio I e a hélice F do domínio II, deixando apenas um canto do anel pirrol exposto. A fenda é delimitada por cadeias laterais alifáticas e aromáticas, muitas delas em contato com a heme. Há uma interação adicional, que fixa o grupo heme, entre um dos propionatos do grupo heme e um resíduo de treonina partindo de uma cadeia β -antiparalela. Uma molécula de água serve como ligante na sexta coordenada do grupo heme. O átomo de Fe é deslocado do plano do grupo heme por 0,3 a 0,5 Å em direção a histidina próxima. Mioglobina e citocromo C peroxidase têm semelhanças e divergências entre si: ambas contêm, no estado Fe^{3+} , uma molécula de água ligada na posição seis do grupo heme como também uma ponte de hidrogênio ligada à histidina distal. A presença de resíduo de triptofano e de arginina perto da posição seis é único para citocromo C peroxidase de levedura.

Finzel et alii (1984) refinaram a análise da estrutura da citocromo C peroxidase de levedura para 1,7 Å. Os autores indicaram dois fatores que podem contribuir para a estabilização de estados altamente oxidados do Fe-heme durante a catálise: 1) a histidina próxima forma ponte de hidrogênio com um resíduo de ácido aspártico (Asp^{235}) encoberto e 2) o meio ambiente do grupo heme é mais polar que em citocromo C e em globulinas, devido a um resíduo semi-oculto de arginina (Arg^{48}) e cinco moléculas de água ligadas na proximidade do grupo heme, dois dos quais ocupam o sítio presumido da ligação peroxidativa. Há dois resíduos candidatos a formarem radical livre na formação do

composto I: 1) triptofano⁵¹, distante 3,3 Å acima do plano do grupo heme e a 2,7 Å da coordenada seis, e 2) metionina¹⁷² a 3,7 Å do grupo heme. A estabilização nucleofílica do radical metionil pode ser possível via ácido aspártico²³⁵. A histidina¹⁸¹ situa-se coplanar com o grupo heme em um nicho entre dois propionatos perto do sítio de ligação presumido do citocromo C. Uma rede de pontes de hidrogênio pode ser a via de transporte de elétrons preferida entre os grupos heme.

Peroxidase de amendoim

Schuller et alii (1996) elucidaram a estrutura cristalina da peroxidase de amendoim em resolução de 2,7 Å. O polipeptídeo tem 294 resíduos de aminoácidos e é acompanhado de um grupo heme e dois íons Ca^{2+} e há evidência de glicosilação. As dobras helicoidais são semelhantes a outras estruturas de peroxidases conhecidas. De acordo com os autores é a primeira estrutura de peroxidase da classe III desvendada: a classe I compreende peroxidase intracelular encontrada em citosol e cloroplastos e inclui a citocromo C peroxidase; A classe II compreende peroxidases segregadas por fungos e a classe III as peroxidases clássicas segregadas por plantas, contendo 4 pontes de dissulfeto e dois íons Ca^{2+} , sendo que a localização das pontes de dissulfeto as distingue das peroxidases da classe II. Dez hélices conservadas nas classes I e II também foram encontradas em peroxidase de amendoim. Os resíduos chaves do grupo heme e os dois íons de Ca^{2+} são os mesmos da classe II. A peroxidase de amendoim tem três hélices adicionais, duas destas contribuem com a formação do canal de acesso para o grupo heme.

Mecanismo de ação

O primeiro passo da ação catalítica da peroxidase consiste em sua reação com H_2O_2 , transferindo 2 elétrons para o grupo prostético de ferro heme. Dolphin et alii (1971) compararam os espectros óticos da oxidação de dois elétrons de cobalto octaetilporfirina, que resultou em um π -cátion radical estável, com o do composto I de HRP e concluíram que este último também contém um π -cátion radical no grupo heme. Isto explicaria o alto nível de oxidação, o espectro ótico e a estabilidade do composto I.

É aceito convencionalmente que o composto I reage com um doador de H^+ , descendo um grau de sua oxidação, transformando-se no composto II, formando radical livre a partir do doador de H^+ . O composto II por sua vez reage com outro doador de H^+ , voltando ao estado de oxidação inicial de Fe^{3+} , e produzindo mais um radical livre e uma molécula de água. Os radicais livres formados na oxidação do H_2O_2 a partir dos doadores de H^+ , reagem de acordo com a sua natureza química.

A peroxidase é capaz de catalisar também reações de oxidação na ausência de H_2O_2 . Smith et alii (1982) estudaram a oxidação do ácido indol-3-acético catalisado por POD. Dados espectrais e da cinética da enzima indicaram duas vias de oxidação dependendo da razão enzima/substrato empregada. Quando proporções baixas de enzima/substrato foram empregadas, a oxidação procedeu através da peroxidase reduzida $\leftrightarrow$ composto III, e quando razões altas foram empregadas, a peroxidase operou através da via convencionalmente aceita envolvendo peroxidase nativa, composto I e composto II. A ativação da via peroxidase reduzida $\leftrightarrow$ composto III produziu fluxo de radical de ânion superóxido à expensa de oxigênio molecular.

Adediran and Dunford (1983) encontraram a constante de formação de HRP-I (Composto I) de $1,6 \pm 0,1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ para H_2O_2 e usando ácido para-nitrobenzóico constante de segunda ordem de $3,7 \pm 0,2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$. Os autores concluíram que um e apenas um átomo de oxigênio é incorporado do substrato oxidante formando o composto I.

As constantes de redução do composto I para composto II ($1,2 \pm 0,3 \times 10^4 /M \cdot s$) e de $8,1 \pm 1,6 \times 10^2 /M \cdot s$ para composto II a HRP nativa usando ácido p-aminobenzóico como doador de H^+ , ocorrem a taxas baixas (Shiro et alii, 1986), sendo o último passo determinante para a velocidade da reação global.

Pedreño et alii (1987) relataram que peroxidase de parede celular de *Lupinus albus* demonstrou transição de atividade oxidásica para peroxidásica durante a oxidação de NADH. A fase de oxidação representa, segundo os autores, um período de retardamento da reação geral, depende de fenóis e é responsável pela formação de peróxido. Guaiacol e os ácidos p-coumárico, ferrúlico e sinápico, precursores de cinamil-

álcoois, que são substratos da síntese de lignina, afetaram tanto a duração do período de retardamento, quanto a taxa de oxidação da fase da oxidação do NADH. O período de retardamento quase inexistiu quando guaiacol foi adicionado e tendeu ao infinito com ácido sinápico. O efeito de fenóis no período de retardamento foi relacionado com a eficácia da enzima (V_{max}/K_m) quando age neles como peroxidase.

Nakashima & Yamazaki (1987) informaram que quantidades pequenas de tetranitrometano (TNM), seqüestrador de radicais de superóxido aniônicos, inibiram a formação de oxiperoxidase pela reação de ferri-HRP com H_2O_2 . A estequiometria da reação na presença de TNM sugeriu a seguinte via para a formação da oxiperoxidase:



Estudos cinéticos na formação de oxiperoxidase resistente a TNM sugeriram que o oxigênio ligado à posição seis do grupo heme é deslocado pelo H_2O_2 a taxas máximas de 0,048 e 0,054 s^{-1} para HRP-A e HRP-C, a 5°C, respectivamente. Ambas as reações de formação de oxiperoxidase ocorreram paralelamente. Portanto, conclui-se que o composto III é formado pela reação do Composto II com H_2O_2 .

Dunford (1991) descreveu em sua revisão sobre peroxidase de raiz forte um mecanismo de ação tipo puxa-empurra de elétrons na formação do composto I. Nesta ação, grupos distais positivos fornecem o impulso e um resíduo de histidina próxima parcialmente ou totalmente protonizado fornece o impulso, na clivagem da ligação O—O do peróxido com formação de complexo Fe^{3+} -peróxido. Na primeira parte da reação da formação do composto I, um grupo distal recebe um próton do oxigênio α do H_2O_2 durante a formação da ligação α -O-Fe. A formação do composto intermediário Fe-OOH envolve um fluxo de elétron do lado distal do grupo heme para o grupo férrico, facilitado pelo próton no resíduo histidina 170. Na segunda parte da reação, quando ocorre a clivagem da ligação O—O, o fluxo de elétrons ocorre na direção inversa; a ionização de histidina 170 ajuda a providenciar o empurrão de elétrons (Figura 1).

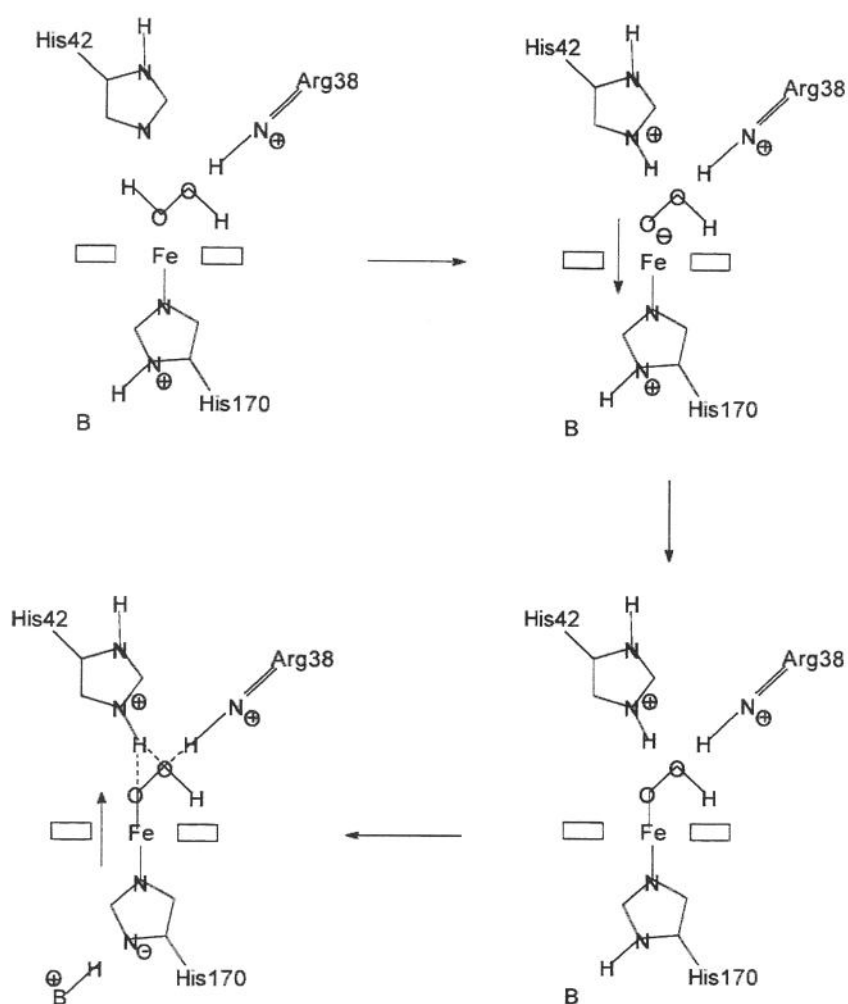


Figura 1: Proposta de mecanismo da formação do composto I da peroxidase de raiz forte (HRP-I).

A figura 2 mostra a proposta da reação do composto I de peroxidase de raiz forte com um fenol ou um enol. A transferência de um elétron do doador para o anel porfirínico faz desaparecer o cátion- π e a transferência de um próton ocorre para um grupo distal básico, provavelmente histidina 42 e o composto II de peroxidase de raiz forte é formado. Um radical fenol ou enol resta da reação.

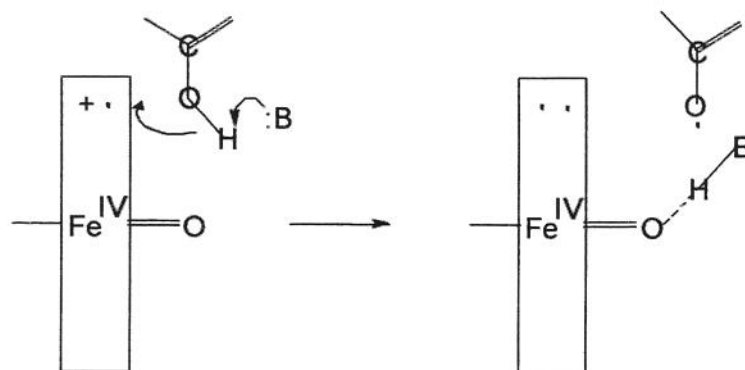


Figura 2: Redução do composto I para composto II de peroxidase de raiz forte através da transferência de um elétron.

A transferência de outro elétron de um fenol ou enol para o composto II, fecha o ciclo e peroxidase nativa de raiz forte é formada (Figura 3). O grupo distal protonado, provavelmente histidina 42, essencial para a atividade catalítica do composto II, é ligado por ponte de hidrogênio ao oxigênio do grupo ferril. Há, portanto, poucas dúvidas de que a atividade catalítica do composto II de peroxidase de raiz forte esteja centrado no grupo ferril. A explicação mais simples para a redução do composto II para peroxidase nativa é a transferência simultânea de um próton e de um elétron para o grupo ferril, reduzindo simultaneamente ferro (IV) a ferro (III) com a formação de água e outro radical fenol ou enol.

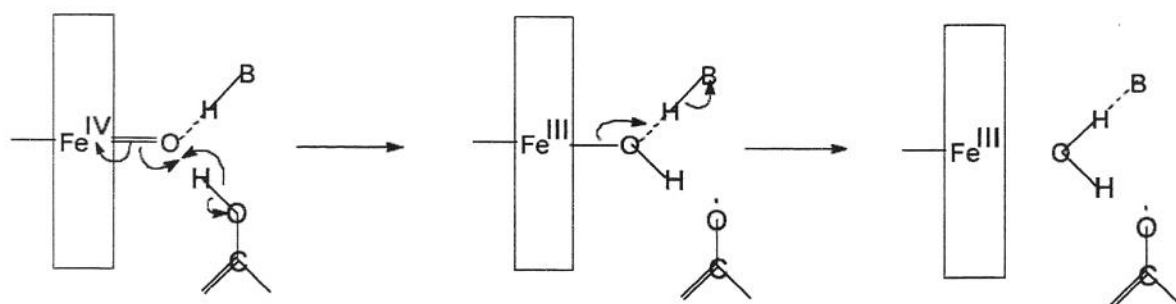


Figura 3: Redução do composto II para peroxidase nativa de raiz forte através da transferência de um elétron.

Peroxidases em frutas

Localização histoquímica

Abeles & Biles (1991) relataram que peroxidases ácidas de endocarpo de pêsegos em lignificação foram similares àquelas do mesocarpo carnudo. O endocarpo teve maior quantidade e número de peroxidases básicas que o mesocarpo. O pH ótimo situou-se entre 4 e 5. A cromatografia em coluna de troca iônica Sephadex Mono-Q equilibrada com tampão Tris 0,02 M pH 7,4, com eluição em gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M, resultou em duas frações ativas, tanto no extrato de mesocarpo, quanto no de endocarpo. A primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio foi uma isoperoxidase básica e a segunda eluída com gradiente de NaCl foi ácida (ou aniônica). Focalização isoeletrica demonstrou a similaridade das isoperoxidases aniônicas de endocarpo e mesocarpo de pêsego, enquanto as isoperoxidases básicas demonstraram diversidade. Peroxidases demonstraram ser de difícil extração do endocarpo em lignificação, também demonstrado por impressão do tecido em papel de nitrocelulose: peroxidases da parte carnosa foram reproduzidas, mas não as do endocarpo. Isso sugere que a técnica de impressão em papel de nitrocelulose pode falhar na demonstração da localização histoquímica de peroxidases.

Miesle et alii (1991) determinaram a atividade e localização das isoenzimas da peroxidases de "Highbush blueberries" (*Vaccinium corymbosum* L.). A atividade peroxidásica total aumentou durante o desenvolvimento do fruto, alcançando o máximo em frutos vermelhos para depois declinar, quando a atividade foi expressa em relação ao peso fresco, sendo que quando expressa por fruto, não houve declínio. A maior parte da enzima é ionicamente ligada às paredes celulares durante o desenvolvimento, com um aumento do número de isoenzimas durante esse período. A localização histoquímica mostrou que a peroxidase está espalhada através do fruto durante o desenvolvimento.

Calderón et alii (1993) fizeram impressão de peroxidase de uvas em membranas de nitrocelulose pela técnica de congelamento - descongelamento, imprimindo as seções descongeladas e revelando a enzima com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Em uvas 'Gamay' maduras a peroxidase localizou-se

principalmente na casca e em menor extensão no pericarpo. Áreas de localização discretas foram achadas nos feixes vasculares. No entanto, em uvas 'Gamay' e 'Grenache' imaturas, a atividade da peroxidase foi menor na casca, semelhante à encontrada no pericarpo. A técnica empregada preservou a integridade dos feixes vasculares. A validade da técnica foi confirmada por fracionamento e determinação da atividade da peroxidase nos tecidos diferentes.

Bernal et alii (1994) determinaram a localização histoquímica de peroxidase em frutos de pimentão (*Capsicum annuum* var, *annuum*). A peroxidase de pimentão é capaz de oxidar capsaicina. Para confirmar que peroxidase tem a capacidade de promover alterações e degradação de capsaicina, a localização histoquímica foi realizada pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membranas de nitrocelulose e revelação com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que peroxidase, da mesma forma que a capsaicina, está localizada principalmente nas camadas celulares epidermais externos, dando suporte ao papel da peroxidase de promover alterações em capsaicina durante o amadurecimento.

Ros Barceló et alii (1994) estudaram a localização histoquímica da peroxidase em uvas 'Thompson' e 'Flame', ambas sem sementes, pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membrana de nitrocelulose e coloração com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que a peroxidase foi localizada principalmente nos tecidos hipodérmicos e secundariamente no mesocarpo. Fracionamento das uvas e determinação da peroxidase nos tecidos confirmaram os resultados. Duas isoenzimas básicas foram encontradas em ambas as variedades.

López-Serrano & Ros Barceló (1995) localizaram peroxidase nos tecidos de morangos imaturos e maduros. Os resultados mostraram a existência de uma única isoenzima de pl básico, localizada em arranjo concêntrico dos tecidos vasculares e de suas ligações com as sementes. A isoenzima isolada não variou em atividade entre frutos verdes e maduros. Essa isoenzima básica pode estar envolvida na lignificação dos tecidos vasculares durante o desenvolvimento do fruto.

Flurkey & Jen (1978) estudaram a atividade da polifenoloxidase (PPO) e da peroxidase (POD) de pêssegos em desenvolvimento. Peroxidase extraída com tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,2, contendo KCl 1 M e 5% de "polyclar AT" (polivinilpirrolidona, PVP), demonstrou atividade 4 vezes maior que POD extraída a partir de pó cetônico de pêssegos. Os dois picos de atividade da peroxidase observados durante o desenvolvimento do fruto corresponderam às duas fases de ganho de peso dos pêssegos.

Abeles & Biles (1991) relataram que peroxidases ácidas de endocarpo de pêssegos em lignificação foram similares àsquelas do mesocarpo carnudo. O endocarpo teve maior quantidade e número de peroxidases básicas que o mesocarpo. O pH ótimo situou-se entre 4 e 5. A cromatografia em coluna Mono-Q equilibrada com tampão tris 0,02 M pH 7,4, com eluição de gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M, resultou em duas frações ativas, tanto no extrato de mesocarpo quanto no de endocarpo. A primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio foi uma isoperoxidase básica e a segunda eluída com gradiente de NaCl foi ácida (ou aniônica). A focalização isoeletrica demonstrou a similaridade das isoperoxidasas aniônicas de endocarpo e mesocarpo de pêssego, enquanto as isoperoxidasas básicas demonstraram diversidade.

Masia et alii (1992) relataram em seu estudo sobre aspectos bioquímicos e de ultra-estrutura no desenvolvimento de pêssegos que a atividade máxima da peroxidase e da ácido indol-3-acético oxidase (IAA-oxidase) ocorreu durante a lignificação do endocarpo.

Tourino et alii (1993) informaram que danos mecânicos induziram aumento de atividade peroxidásica, demonstrando um pico de atividade máxima após 24 horas do início da cura em ambas as cultivares submetidas ao tratamento: "Biuti" e "Real". Estudos histoquímicos revelaram acúmulo de compostos fenólicos, mas não compostos do tipo lignina ou suberina nas paredes celulares adjacentes ao ferimento.

Lourenço & Neves (1997) isolaram peroxidase solúvel de pêssego e purificaram-na por cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose e permeação em gel

Sephadex G-100 e Hidroxiapatita. A eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima 28,9 vezes purificada revelou duas isoenzimas, uma termorresistente e outra termosensível, mas que não foram separadas pela metodologia empregada. A atividade ótima da enzima foi a pH 5,0 e a 40°C. A energia de ativação foi 7,97 kcal/mol e o K_m foi de 5,62 e 10,71 para o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente. Os ácidos caféico, ferrúlico e p-coumárico, ditioeritritol, L-cisteína, Fe^{2+} e KCN inibiram a peroxidase de pêssgo. A inativação térmica seguiu padrão não-linear e foi rápida em temperaturas acima dos 70°C, com perda praticamente total da atividade com tratamento a 80°C durante 30 segundos. Adição de sais ao tratamento térmico resultou em aumento de velocidade da inativação da enzima em temperaturas acima dos 70°C.

Peroxidase de tomate

Kokkinakis & Brooks (1979a) purificaram e caracterizaram a peroxidase de maior atividade encontrada em pericarpo de tomate verde e maduro. A enzima solúvel foi extraída em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, contendo 20 g de PVP e 10 g de ascorbato de sódio. Os sólidos retidos na filtração foram lavados por duas vezes com o meio de extração e, em seguida, ressuspensos em 200 ml de tampão maleato de sódio 0,2 M, pH 6,5, contendo 0,2 M NaCl. A suspensão foi sonicada por 5 minutos e centrifugada. O sobrenadante constituiu a fração ionicamente ligada da peroxidase de tomate e foi dialisado duas vezes contra 4 L de tampão fosfato 5 mM, pH 6,5 por 20 horas. A precipitação da enzima foi efetuada com sulfato de amônio entre 40 e 85% de saturação e o material dialisado. A cromatografia de troca iônica dos dialisados foi feita em colunas (2,5 x 40 cm) de QAE-Sephadex A-50 (aniônica). As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com gradiente linear de NaCl de 0 a 0,4 M. A enzima obtida foi cerca de 85% pura e lembrava HRP em ensaio padronizado e na sua habilidade de ser reduzida a ferro-peroxidase, para ser convertida a oxiferropoxidase (composto III), além de formar complexos com H_2O_2 (compostos I e II). A peroxidase de tomate não catalisou a oxidação aeróbica do ácido indol-3-acético na presença de 2,4-diclorofenol e manganês. A enzima é constituída de duas subunidades não idênticas, enquanto HRP é constituída de uma única unidade polipeptídica. Ditiotretol foi oxidado por peroxidase de tomate e por HRP, sendo ambas as enzimas acumuladas na forma de oxiperoxidase durante a reação de

oxidação. HRP retornou à sua forma nativa após o término da reação, enquanto POD de tomate foi convertida para uma forma que absorve a 442 nm.

A oxidação do ácido indol-3-acético pela peroxidase de tomate foi insignificante, até que a mistura de reação foi suplementada com H_2O_2 (Kokkinakis and Brooks, 1979b). A adição do peróxido de hidrogênio iniciou oxidação rápida do ácido indole-3-acético e absorção de O_2 , até consumo total do H_2O_2 . Nessa reação a formação do composto III (oxiperoxidase) é uma possibilidade, segundo os autores.

Fils et alii (1985) estudaram o sistema da peroxidase de tomate em três estágios de maturação. As proteínas foram extraídas tanto do suco obtido do filtrado de frutos triturados (fração solúvel de peroxidase), quanto do sólido retido na filtração, solubilizados com solução molar de cloreto de sódio (fração ionicamente ligada de peroxidase). Essas frações foram purificadas, usando precipitação fracionada com sulfato de amônio, filtração em Ultrogel AcA 44 e cromatografia em DEAE-Trisacryl M. Uma forma de peroxidase solúvel (S1) e duas ionicamente ligadas (I1 e I2) foram purificadas. O rendimento total obtido para tomate totalmente maduro foi 40 e 50% para as formas solúvel e ionicamente ligadas, respectivamente. O grau de purificação alcançado foi 25, 56 e 7, para as formas S1, I1 e I2, respectivamente. A forma I1 teve comportamento idêntico à forma S1 na cromatografia de troca aniônica final. A eletroforese de disco a pH 8.9 e focalização isoeletrica a pH 3,5 - 10 confirmaram a identidade das duas formas de peroxidase com ponto isoeletrico menor que 3,5, enquanto I2 foi diferente, com ponto isoeletrico perto de 6.7.

Brooks (1986) relatou que a peroxidase aniônica de tomate catalisou reações oxidativas com NADH, glutathione, ditioneitol, oxaloacetato e hidroquinona como substratos, com atividade média de 30% em relação a Horseradish Peroxidase (HRP). A atividade da peroxidase de tomate com Mn^{2+} e fenol como cofatores em atividade de IAA-oxidase foi negligenciável em relação à da HRP. Substituindo Fe^{3+} por Mn^{2+} produziu resposta 18 vezes maior em relação a HRP. Usando 2,4-diclorofenol como cofator, ambas as enzimas responderam com aumento exponencial da atividade em relação ao aumento da concentração do cofator e da enzima. Os resultados em relação à substituição de Fe^{3+} por Mn^{2+} podem estar ligados a um controle semelhante a um controle alostérico. Aqueles com 2,4-diclorofenol contrariam o princípio da taxa de reação ser proporcional à concentração da enzima, o que dificulta qualquer comparação da atividade de enzimas.

(O autor fala nesse artigo em Ce^{3+} , elemento inexistente. Assumimos que se trata de Fe^{3+} pois é o metal ligado a porfirona da HRP).

Rothan & Nicolas (1989) estudaram alterações das atividades das peroxidases aniônica e catiônica de tomate durante o amadurecimento. A atividade peroxidásica foi extraída do pó obtido com nitrogênio líquido, com NaCl (os autores não informaram em que meio líquido). Isoperoxidasas aniônicas e catiônicas foram separadas por cromatografia de troca iônica em gel. Ambas as isoperoxidasas (ácidas e básicas) tiveram atividade máxima durante o climatérico, sendo que as peroxidases básicas tiveram aumento de atividade mais pronunciado. As alterações das atividades peroxidativas, de IAA-oxidase e de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC-oxidase) da peroxidase básica de tomate foram paralelas às alterações da produção de etileno. No entanto, na presença de Ca^{2+} , a atividade da peroxidase foi constante durante o amadurecimento, enquanto a atividade de IAA-oxidase e ACC-oxidase da peroxidase básica foi ativada apenas no estágio vermelho-claro do tomate.

Marangoni et alii (1989) extraíram e caracterizaram parcialmente peroxidase de tomate. Na extração foram usados tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5 com aditivos: EDTA, EGTA, NaCl, Triton X-100, ascorbato, metabissulfito de sódio, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMFS), pepstatina A e PVP insolúvel. O sobrenadante foi ajustado a pH 6,5 com 0,1 N HCl ou 0,1 N NaOH e dialisado contra tampão fosfato 50 mM, pH 6,5, durante 36 horas. O precipitado obtido com sulfato de amônio entre 25 e 85% de saturação foi coletado e dissolvido em 5 ml de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, e dialisado contra o mesmo tampão a 3°C durante 24 horas. Amostras do dialisado foram sonicadas durante 30 segundos e alíquotas de 0,5 ml injetadas em sistema FPLC (Pharmacia) e separadas em coluna MonoQ (HR 5/5) aniônica com fluxo de 1,5 ml/minuto. A eluição da enzima foi realizada com gradiente de 0 a 0,7 M NaCl, com um volume de 50 ml para cada concentração. As frações ativas contendo peroxidase de tomate aniônica foram coletadas, concentradas em filtro molecular de 10 kDa e recromatografadas em coluna idêntica com gradiente mais estreito. Ambas as cromatografias resultaram em uma única fração ativa. A focalização isoeletrica revelou ponto isoeletrico a pH 3,5 e a eletroforese em SDS resultou em três bandas principais, correspondentes a 16,6, 40,0 e 42,0 kDa. A

peroxidase aniônica de tomate demonstrou dependência de Ca^{2+} , tendo a atividade máxima com concentração de cálcio de $1,0 \times 10^{-5}$ M.

Lagrimini et alii (1993) relataram que a composição de lignina em folha, fruto e outras epidermes de tomate transgênico, com gene de superprodução de peroxidase aniônica de tabaco, aumentou respectivamente 20%, 49% e 106%, em relação à de plantas sadias. Em frutos feridos assepticamente e incubados durante 7 dias no escuro, o teor em fenóis aumentou 300% nos tomates transgênicos, mas pouco nos controles; lignina aumentou 20 vezes no tomate transgênico e somente 2 vezes no controle. No entanto, a resistência a organismos patogênicos não aumentou.

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.)

Avaliando carambola, Baldini et alii (1982) extraíram atividade peroxidásica da fruta usando tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,2 na proporção de 1 parte de polpa para 1,5 partes de tampão, contendo 1M de cloreto de potássio e 5% de PVP. O homogenato foi centrifugado a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. A atividade da peroxidase foi medida em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,0 contendo como substratos guaiacol (0,5%) e peróxido de hidrogênio (1%). Uma unidade de peroxidase foi definida como quantidade de enzima que provoca aumento em 0,1 unidade de absorbância a 470 nm por minuto. Os autores relataram 34,8 unidades de peroxidase por mg de proteína. A eletroforese em gel poliacrilamida, a 7% e pH 8,3, do extrato bruto revelou, com guaiacol como corante, uma única banda, portanto uma só isoenzima.

Peroxidase de coco

Peroxidase de coco normal e de coco mutante foi extraída de endosperma congelado (20 g) por Mujer et alii (1983), homogeneizado com 100 ml de acetona gelada em "Waring blender" pré-gelado, por duas vezes. Oito gramas do extrato cetônico foram homogeneizadas com 320 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0, centrifugadas a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado. Esse extrato bruto foi armazenado a -10°C durante vários meses sem perda perceptível de atividade. A semipurificação de enzima foi feita por precipitação com sulfato de amônio de 50 a 95%

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

de saturação. O precipitado foi suspenso em 4 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0 e dialisado duas vezes contra 4 L do mesmo tampão durante 24 horas. A purificação foi realizada por filtração em gel em coluna de Sephadex G-200 (3 x 100 cm) e troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-50 (2,2 x 45 cm). A peroxidase de coco normal foi purificada 14,6 vezes com 44% de recuperação e a de coco mutante 12,8 vezes com 40% de recuperação após filtração em Sephadex G-200. A isoenzima do pico principal da filtração em gel foi submetida a nova cromatografia de exclusão em Sephadex G-200, após ter sido submetida à troca iônica e purificada 17.600 vezes com 20% da enzima recuperada. SDS-PAGE dessa proteína resultou em uma única banda com peso molecular de 55 kDa e foi identificada como subunidade do tetrâmero que constitui a enzima nativa com peso molecular de 196 kDa. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina como doador de H^+ e a absorbância acompanhada a 420 nm. Atividade IAA-oxidásica da peroxidase de coco foi detectada apenas em endosperma de coco normal em desenvolvimento, mas não no maduro.

Peroxidase em *Citrus*

McLellan & Robinson (1984) obtiveram peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada de suco e de albedo de laranja. A fração solúvel do suco foi extraída por prensagem, centrifugação a 15.000 g durante 20 minutos a 4°C, concentração em filtro Amicon com membrana de 10 kDa e diálise contra tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0. A fração foi armazenada a -18°C até seu uso. O precipitado da centrifugação foi lavado duas vezes, suspendendo-se em 60 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0 e centrifugando-se como acima. O resíduo lavado foi considerado livre de peroxidase solúvel e foi suspenso em 60 ml de solução de NaCl 1 M e centrifugado a 15.000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi denominado peroxidase ionicamente ligada do suco e também armazenado a -18°C até seu uso. O albedo foi cuidadosamente separado do endocarpo e do flavedo e foi extraído analogamente ao suco, obtendo-se peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada de albedo de laranja. A atividade da peroxidase foi determinada pelo método da o-dianisidina. A peroxidase de albedo mostrou-se altamente ativa. A inativação térmica seguiu comportamento não linear. Peroxidase ionicamente ligada foi particularmente termoestável e se regenerava quando mantida a 30°C após a inativação.

Catalá & Chamarro (1987) purificaram peroxidase de flavedo de laranja "Valência Late", usando fracionamento com sulfato de amônio de 40 a 90% de saturação, filtração em gel em coluna de Sephadex G-200 (1,7 x 52 cm) e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose Cl-6B. A fração aniônica foi constituída por uma só isoenzima aparentemente homogênea, com ponto isoelétrico (pI) de 2,5, enquanto a fração catiônica foi composta por 3 isoenzimas com pI entre 9,5 e 10,5, determinados por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida e a revelação feita com benzidina : H₂O₂ em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0. A atividade da peroxidase foi determinada usando quatro substratos: benzidina, guaiacol, o-dianisidina e eugenol a 334, 470, 460 e 425 nm, respectivamente. Ambas as frações tiveram pH ótimo ao redor de pH 6,0 com benzidina, 4,5 com eugenol e 5,0 com ácido indol-3-acético na ausência de H₂O₂. A fração aniônica apresentou maior atividade específica com eugenol e guaiacol, constituintes de lignina.

Zheng et alii (1993) extraíram peroxidase de flavedo de 9 cultivares de *Citrus*. O flavedo foi transformado em pó cetônico e posteriormente extraído com tampão fosfato de sódio 67 mM, pH 7,0, contendo 1% PVP e 0,4% Triton X-100. Amostras de 0,05 ml do extrato foram ensaiados em relação à sua atividade peroxidásica em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (3,1 ml) com 1,1 µl de guaiacol e 8 mM de H₂O₂ (0,05 ml). O aumento da absorbância foi acompanhado a 436 nm a 25°C. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi realizada com corrente constante de 20 mA e o guaiacol foi usado para revelar as isoperoxidasas. PAGE revelou três bandas de peroxidases em *Citrus*. Púmelos parecem ter as bandas P1 e P2 como característica genética, enquanto a banda P3 parece ter origem em laranjas doces. Em trabalho posterior, Zheng et alii (1996) realizaram comparação de 72 tipos de *Citrus* usando a metodologia do trabalho anterior. Novamente 3 bandas de isoperoxidasas foram reveladas e uma delas mostrou-se característica para púmelos.

Clemente (1996 e 1998) extraiu e purificou peroxidase de suco de laranja. O suco foi espremido e homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, filtrado e concentrado em filtro Amicon com membrana de 10 kDa, centrifugado a 17.000g durante 15 minutos a 4°C. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina. Amostras

do extrato bruto congelado foram submetidas à diálise contra tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0 por 12 horas a 4°C e 5 ml foram aplicados à coluna de Sephadex S-100 HR (1,6 x 70 cm) e a enzima eluída com tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, em fluxo de 30 ml por hora. Frações ativas foram reunidas e aplicadas a uma coluna de Sephadex G-75 (1,6 x 70 cm). Frações ativas dessa coluna foram fracionadas em FPLC adaptado a uma coluna de troca iônica tipo MonoQ e submetidas à focalização isoeletrica em gel poliacrilamida. Duas isoenzimas catiônicas e três aniônicas foram reveladas. As isoenzimas catiônicas C1 e C2 apresentaram peso molecular de 21 e 40 kDa e as aniônicas A1, A2 e A3, peso molecular de 40, 22 e 26 kDa, respectivamente. Isoperoxidasas catiônicas foram mais termoestáveis que as aniônicas e o extrato bruto.

Peroxidase de maçã (*Malus domestica*, Borkh)

Rychter e Lewak (1971) separaram várias frações de peroxidase por eletroforese de disco de extratos de sementes de maçã. Três dessas frações, as de menor mobilidade, demonstraram pequena especificidade de substrato, não alteraram durante o desenvolvimento da semente e não foram influenciadas por fitohormônios. As peroxidases de maior mobilidade foram estimuladas por giberelina e benziladenina, inibidas por ácido abscísico e coumarina e não afetadas por ácido indolacético.

Korban e Bournival (1987) analisaram a presença de isoenzimas da catalase, da esterase e da peroxidase em cruzamentos de maçã e encontraram diferenças nos padrões das bandas para esterases e peroxidases em folhas e sementes.

Moulding et alii (1987) extraíram peroxidase solúvel e ionicamente ligada de casca e polpa de maçã, variedade Cox's Orange Pippin. Maior atividade foi encontrada na fração solúvel da casca. Peroxidase solúvel foi constituída de peroxidase aniônica e de peroxidase catiônica, enquanto peroxidase ionicamente ligada foi constituída só de peroxidase catiônica. Isoperoxidasas da fração solúvel da polpa foram mais termorresistentes que as demais isoenzimas. Cinco isoperoxidasas foram reveladas por focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida. O pH ótimo para as peroxidases mistas nos extratos situou-se entre pH 5,0 e 6,0. O-dianisidina foi usada como doador de H⁺.

Em outro trabalho, Moulding et alii (1988) relataram sobre a estabilidade térmica de isoperoxidasas da polpa da maçã: Duas isoenzimas aniônicas e uma catiônica foram isoladas. A homogeneidade das isoenzimas purificadas foi determinada por focalização isoeletrica e revelada com o-dianisidina:H₂O₂. As três isoenzimas demonstraram maior afinidade a o-dianisidina do que a guaiacol. Isoenzimas aniônicas foram mais termorresistentes que a catiônica. A peroxidase aniônica recuperou 80% de sua atividade inicial após tratamento de calor a 80-100°C por 2 minutos e repouso a 30°C por 1 hora. A isoenzima catiônica não se regenerou. A filtração em gel (Sephadex G-100) foi seguida de concentração em filtro Amicon e o concentrado dialisado por uma noite contra 2 L de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 a 4°C. O dialisado foi aplicado à coluna de Q-Sepharose (aniônica) e eluída à temperatura ambiente com o tampão da diálise, com gradiente de NaCl de 0 a 0,25 M. A peroxidase foi eluída em três picos separados. A focalização isoeletrica demonstrou uma única isoenzima no primeiro pico, enquanto os picos 2 e 3 constituíram misturas de isoenzimas. Nova cromatografia em coluna Q-Sepharose eluiu um único pico preponderante para ambos os picos 2 e 3 e a focalização isoeletrica confirmou a pureza das isoenzimas eluídas. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina como substrato e lida a 460 nm e temperatura de 25°C, ou com guaiacol a 420 nm a 30°C.

Richard & Nicolas (1989) isolaram e caracterizaram a peroxidase de casca de maçã da variedade Red Delicious, usando cromatografia hidrofóbica seguida por cromatografia de afinidade com Concanavalin A - Agarose substituída (ConA Sepharose). Um peso molecular de 40 kDa foi obtido por filtração em gel. A focalização isoeletrica demonstrou a presença de 4 isoperoxidasas no extrato purificado com pI entre pH 4,6 a 9,8. A atividade principal da peroxidase da casca de maçã (99%) foi de isoperoxidasas catiônicas, cujo pI foi perto de pH 9. A peroxidase da maçã foi capaz de agir nos compostos fenólicos da fruta: catequinas, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. A atividade da peroxidase foi analisada com guaiacol (50 mM):H₂O₂ (10 mM) e a absorbância acompanhada a 470 nm.

Peroxidase de manga (*Mangifera indica*. L.)

Frylinck et alii (1987) relataram que a irradiação de mangas com raios γ resultou em ativação da atividade da peroxidase, a qual aumentou continuamente durante o amadurecimento, até que o climatérico chegasse ao máximo e depois pareceu declinar. Os autores atribuíram o aumento da atividade da peroxidase à produção de peróxidos pela irradiação. A peroxidase de manga foi extraída por precipitação com acetona e redissolução em tampão fosfato seguido de centrifugação. O sobrenadante foi usado na determinação da atividade peroxidásica. A mistura de reação consistiu de 20 ml de tampão acetato 20 mM, pH 5,0, 1 ml de solução de H_2O_2 0,1 M e 1 ml de guaiacol 0,04 M. A 4 ml da mistura reativa, adicionou-se 0,1 ml do extrato e mediu-se a absorbância a 420 nm após 2 minutos a 30°C. Uma unidade (1 Kat) foi definida como quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 mol de H_2O_2 e 1 mol de guaiacol por segundo.

Marin & Cano (1992) relataram que a atividade de peroxidase em mangas das variedades Lippens e Smith aumentou na polpa até o climatérico da fruta. A eletroforese em poliacrilamida revelou três isoperoxidasas que migraram em direção ao ânodo a pH 8,3 em mangas "Smith". Mangas da variedade Lippens revelaram 4 bandas adicionais às já citadas, as quais se moveram mais rapidamente.

Khan & Robinson (1993a) purificaram isoperoxidase aniônica de manga "Chaunsa". A purificação da enzima foi realizada em coluna de Sephadex G-100 (1,6 x 70 cm) seguida de cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose (1,6 x 40 cm) e o peso molecular determinado por filtração em gel (Sephadex G-100). A atividade da peroxidase foi determinada usando H_2O_2 e o-dianisidina. A focalização isoelétrica analítica foi realizada em géis de poliacrilamida de 0,5 mm de espessura contendo anfólitos (pH 3,5 a 10,0 ou 2,7 a 5,0). As bandas de peroxidase foram reveladas com o-dianisidina: H_2O_2 . Os autores afirmam ainda que a coloração das proteínas de peroxidases é difícil usando "Coomasie blue", por isso usaram sais de prata na coloração dos géis para detectá-las. Uma única isoperoxidase aniônica de manga foi purificada com peso molecular aproximado de 40 kDa. Glicina, serina e ácido glutâmico representaram 48% da proteína.

Khan & Robinson (1993b) estudaram a estabilidade térmica de isoperoxidasas ionicamente ligadas de manga. Os autores purificaram pequenas quantidades de isoperoxidasas aniônicas e catiônicas por cromatografia de troca iônica. As isoperoxidasas purificadas mostraram-se mais termoestáveis que a peroxidase do extrato bruto e as ionicamente ligadas mais resistentes ao calor que a peroxidase solúvel. A inativação térmica seguiu padrão não-linear, tanto nas isoperoxidasas purificadas, quanto no extrato bruto. Não houve regeneração de atividade após inativação das isoperoxidasas e do extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a fracionamento por sulfato de amônio, filtração em Sephadex G-100 e em seguida submetido a cromatografia de troca iônica. Frações (5 ml) ativas foram submetidas a focalização isoeletrica para verificação da presença de isoperoxidasas. As frações eluídas com o tampão de equilíbrio, não retidas na coluna aniônica, foram concentradas a cerca de 10 ml em concentrador Amicon com membrana PM10, dialisadas e aplicadas a coluna SP-Trisacryl (1,6 x 40 cm). Três isoperoxidasas catiônicas, além das isoperoxidasas aniônicas, foram purificadas.

Khan & Robinson (1994) estudaram a especificidade de doadores de H^+ da peroxidase de manga. Isoperoxidasas aniônicas e catiônicas catalisaram a oxidação de guaiacol, o-dianisidina e 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfonato (ABTS) a taxas diferentes. Para a isoperoxidase aniônica A1, o-dianisidina foi o melhor substrato, enquanto para a catiônica C1, a oxidação de ABTS foi mais rápida. Em relação à oxidação do IAA, isoperoxidasas aniônicas catalisaram a reação mais rapidamente que as catiônicas. Entre as quatro isoperoxidasas purificadas, a maior atividade de IAA-oxidase foi da A1. O dihidroxifumarato (DHFA) foi oxidado aproximadamente 2 vezes mais rápido por isoperoxidasas catiônicas que por aniônicas. O peso molecular das isoperoxidasas aniônicas, de 40 e 44 kDa para A1 e A2, respectivamente, foi maior que o das catiônicas C1 e C2 com 22 e 27 kDa, respectivamente.

Peroxidase de pera

Moulding et alii (1989) relataram a obtenção de isoperoxidasas solúveis e ionicamente ligadas da polpa e da casca de pera "Conference". A fração solúvel conteve a maior atividade da peroxidase. As peroxidases da casca, tanto as solúveis, quanto as ionicamente ligadas, mostraram-se termorresistentes. A recuperação da atividade, após inativação térmica, foi observada para peroxidase da casca e para peroxidase solúvel da

polpa. A inativação térmica seguiu padrão não-linear. A extração e a determinação da atividade da peroxidase de pera "Conference" seguiu metodologia descrita por Moulding et alii (1987) para maçã.

Peroxidase de uva (*Vitis vinifera*)

Robinson et alii (1989) analisaram a estabilidade térmica de peroxidase de uva "Ohane". Uvas inteiras e sadias (900 g) foram cortadas em pedaços e a peroxidase extraída em 900 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0, gelado. A filtração e a centrifugação foram realizadas de acordo com Moulding et alii (1987). Peroxidase ionicamente ligada foi extraída do resíduo, após seguidas lavagens, com solução 1M de NaCl, gelada. A fração solúvel conteve maior atividade e respondeu por 87% da atividade total. A inativação da enzima seguiu padrão não-linear com 90% de inativação de peroxidase após 10 minutos a 80°C. Focalização isoeletrica revelou 6 isoperoxidasas com pontos isoeletricos entre pH 3,5 e 9,8.

Zapata et alii (1992) analisaram a oxidação de ácidos hidroxibenzóicos naturais de uvas de vinho pela peroxidase da fruta. Dos ácidos hidroxibenzóicos presentes em uvas "Monastrel", apenas os ácidos protocatechúico (3,4-dihidroxibenzóico), vanílico (3-metoxi-4-hidroxibenzóico) e gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) foram oxidados pela peroxidase de uva, enquanto os ácidos p-hidroxibenzóico e siríngico não o foram.

Calderón et alii (1993) fizeram impressão de peroxidase de uvas em membranas de nitrocelulose pela técnica de congelamento - descongelamento, imprimindo as secções descongeladas e revelando a peroxidase com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Em uvas 'Gamay' maduras a peroxidase localizou-se principalmente na casca e em menor extensão no pericarpo. Áreas de localização discretas foram achadas nos feixes vasculares. No entanto, em uvas 'Gamay' e 'Grenache' imaturas, a atividade da peroxidase foi menor na casca, semelhante à achada no pericarpo. A técnica empregada preservou a integridade dos feixes vasculares. A validade da técnica foi confirmada por fracionamento e determinação da atividade da peroxidase nos tecidos diferentes.

Morales et alii (1993) relataram que uvas "Gamay rouge" contém uma isoperoxidase de pl básico, a qual é o componente de peroxidase preponderante do fruto, localizado em vasos de xilema. A enzima foi purificada por focalização isoeletrica preparativa em gradiente de pH 3,0 a 10,0, estabilizado com glicerol e as bandas reveladas com coniferil álcool. A enzima foi capaz de oxidar o substrato entre os pH 3,0 e 6,0 e seu K_M foi 0,149 mM para coniferil álcool e 0,206 para H_2O_2 .

Ros Barceló et alii (1994) estudaram a localização histoquímica da peroxidase em uvas 'Thompson' e 'Flame', ambas sem sementes, pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membrana de nitrocelulose e coloração com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que a peroxidase foi localizada principalmente nos tecidos hipodérmicos e secundariamente no mesocarpo. Fracionamento das uvas e determinação da peroxidase nos tecidos confirmaram os resultados. Duas isoenzimas básicas foram encontradas em ambas as variedades.

Peroxidase de mamão (*Carica papaya*)

A peroxidase solúvel e a ionicamente ligada foram isoladas de mamão por Silva et alii (1990). A purificação foi realizada por fracionamento com sulfato de amônio (30 a 90% de saturação), filtração em gel em coluna de Sephadex G-25 (2,0 x 40 cm), troca ionica em coluna de DEAE-celulose (1,5 x 23 cm) e nova filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 (2,0 x 60 cm). A fração da peroxidase ionicamente ligada foi purificada em coluna Sephadex G-100 (2 x 60 cm) e DEAE-celulose (1,5 x 23 cm), com procedimentos idênticos à purificação da peroxidase solúvel. Esse procedimento resultou em peroxidase solúvel purificada 59 vezes e em peroxidase ionicamente ligada 140 vezes mais purificada. A atividade da peroxidase foi determinada em sistema de o-dianisidina: H_2O_2 . A atividade da peroxidase solúvel aumentou 2,5 vezes e a da ionicamente ligada 4,2 vezes durante o amadurecimento do mamão. O peso molecular foi de 41 kDa para peroxidase solúvel e de 54 kDa para a ionicamente ligada. O pH ótimo das enzimas foi 6,0 para solúvel e 5,5 para ionicamente ligada. A atividade de ambas as frações foi inibida por p-cloromercúriobenzoato, iodoacetamida, N-etilmaleimida, KCN e Fe^{2+} . A peroxidase solúvel foi ativada por sulfato de amônio e essa ativação foi prevenida por KCN.

Lourenço et alii (1995) relataram que a inativação térmica das peroxidases solúvel e ionicamente ligada, purificadas de acordo com os procedimentos descritos por Silva et alii (1990), mostrou comportamento bifásico entre 50 e 80°C. A peroxidase solúvel foi termolábil; o aquecimento a 70°C durante 1 minuto inativou a enzima em 94%. A peroxidase ionicamente ligada reteve 45% de sua atividade inicial após tratamento idêntico. A eletroforese em gel, após o tratamento térmico, revelou três isoenzimas solúveis termolábeis e duas com atividade baixa, além de 2 isoperoxidasas ionicamente ligadas lábeis e outra termorresistente, a qual representou 40% da atividade peroxidásica total.

Peroxidase de kiwi (*Actinidia chinensis*, Planch)

Soda et alii (1991) purificaram peroxidase da polpa de kiwi. A precipitação fracionada foi realizada com sulfato de amônio entre 50 e 85% da saturação e a purificação procedida em coluna SP-Toyopearl (2,8 x 15 cm), coluna Toyopearl AF-blue (2,8 x 6,0 cm), coluna DEAE-Toyopearl (2,2 x 2,3 cm) e coluna Toyopearl HW-55 (2,2 x 90 cm). A fração ativa demonstrou pico simétrico e foi usada para caracterização da enzima. A peroxidase de kiwi foi cerca de 15.000 vezes purificada com 5,3% da enzima recuperada. A peroxidase de kiwi apresentou peso molecular de 29 kDa e atividade ótima em pH 5,5 e 50°C. POD de kiwi teve alta afinidade com os substratos guaiacol, pirogalol e o-dianisidina, mas não com ácido ascórbico, NADH, NADPH e glutatona. A atividade da enzima foi totalmente inibida por KCN 1 mM e os autores sugeriram que peroxidase de kiwi tem um grupo protoheme em seu sítio ativo.

Peroxidase de morango (*Fragaria ananasa*, Duch.)

Civello et alii (1995) purificaram parcialmente a peroxidase de morango e determinaram algumas de suas propriedades. A precipitação da enzima foi feita com sulfato de amônio a 85% de saturação. O precipitado foi dissolvido e aplicado em coluna de Sephacryl S-300 (2,4 x 42 cm). A purificação foi continuada em coluna de troca iônica Pharmacia XK 16/20 preenchida com CM-Sepharose Fast Flow, e o peso molecular foi determinado em coluna de Sephacryl S-200 (1,6 x 30 cm) com padrões de peso molecular

adequados. O grau de purificação alcançado foi perto de 35 vezes. A atividade máxima da enzima foi obtida com pH 6,0 e 30°C. A enzima demonstrou baixa estabilidade térmica, mas manteve atividades acima de 50% na faixa de pH 4 a 11. Duas isoenzimas foram detectadas, ambas básicas, com pI 9,5 e 10,0 e com massa molecular de 58,1 e 65,5 kDa. A atividade da peroxidase decresceu marcadamente durante o amadurecimento do fruto e foi encontrada principalmente na forma ligada à membrana. Os frutos verdes pequenos e grandes apresentaram maior atividade de peroxidase.

López-Serrano & Ros Barceló (1995) localizaram peroxidase nos tecidos de morangos imaturos e maduros. Os resultados mostraram a existência de uma única isoenzima de pI básico, localizada em arranjo concêntrico dos tecidos vasculares e de suas ligações com as sementes. A isoenzima isolada não variou em atividade entre frutos verdes e maduros. Essa isoenzima básica pode estar envolvida na lignificação dos tecidos vasculares durante o desenvolvimento do fruto.

López-Serrano & Ros Barceló (1996) purificaram e caracterizaram uma isoperoxidase básica de morango. Os autores extraíram peroxidase de morangos enlatados. A focalização isoeletrica preparativa foi usada para isolar a isoperoxidase básica, seguindo as instruções do fabricante do Rotofor (Bio-Rad). A isoperoxidase básica foi submetida a purificação adicional por troca iônica em coluna de CM-celulose. Um único pico foi eluído. Essa enzima foi capaz de catalisar a oxidação de fenóis na presença de H_2O_2 , mas não demonstrou atividade tipo catecolase, cresolase ou laccase.

Em trabalho publicado em 1997, López-Serrano & Ros Barceló relataram que uma peroxidase básica de morango, relativamente termoestável, foi capaz de oxidar (+)-catequina ($k_m = 0,57 \mu M^{-1} s^{-1}$) na presença de H_2O_2 com $k_m = 2,63 \mu M^{-1} s^{-1}$. Essa isoperoxidase básica é, portanto, altamente eficaz em oxidar (+)-catequina em baixas concentrações de H_2O_2 .

CARAMBOLA

Descrição e origem

De acordo com Corrêa (1926), a caramboleira (*Averrhoa carambola*, L.) pertence à família das Oxalidaceae. Sua origem, embora não precisamente conhecida, situa-se na Região Indo-Malaica. A caramboleira é uma árvore de pequeno a médio porte e atinge até 8 m de altura, com tronco de até 40 cm de diâmetro, folhas alternadas, imparipinadas e compostas de 5 a 11 folíolos, flores variegadas brancas ou purpúreas. O fruto, a carambola, é oblongo com cinco arestas longitudinais, as quais dão ao fruto forma estrelada na seção transversal. Segundo Corrêa (1926), a caramboleira nunca foi encontrada em estado silvestre. No Brasil, a fruteira foi introduzida pelo agrônomo francês Paul Germain, que a trouxe da Ilha de França para Pernambuco em 1817. A forma estrelada da carambola, sua cor amarelo-âmbar e seu sabor agri-doce fazem-na atraente tanto para o consumo 'in natura', quanto em forma de sucos, doces e confeitos.

Produção de carambola

Green (1987) relatou que plantações que visam comercialização da fruta "in natura" são encontradas principalmente em Taiwan (cerca de 2800 ha), na Malásia (cerca de 120 ha) e na Flórida (também cerca de 120 ha). Nos dois países asiáticos, a estrutura agrícola é de pequenas propriedades familiares. As carambolas são protegidas contra insetos com sacos de papel, nas árvores. Parte das carambolas verdes é retirada, possibilitando a produção de frutos grandes.

De acordo com a Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 1989 e 1990), foram comercializadas através daquela companhia cerca de 702 t da fruta "in natura" em 1989 e 745 t em 1990. A Região de Campinas - SP contribuiu com 12,6% das carambolas comercializadas em 1989 e com 23,4% em 1990, demonstrando aumento da participação da região em carambolas comercializadas através da CEAGESP.

Segundo Campbell (1994), o estado da Flórida produzia em 1986 cerca de 70 t de carambolas e em 1991 ao redor de 2000 t. O aumento dessa produção foi resultado de pesquisas agrícolas e seleção de variedades, estimuladas pelo governo americano. As carambolas são colhidas manualmente e colocadas em caixas plásticas, das quais são transferidas diretamente para caixas de papelão com a finalidade de exportação para outros estados americanos, embora exista tecnologia de manuseio, classificação automática, tratamento pós-colheita contra a mosca das frutas do Caribe e embaladoras automáticas disponíveis nos Estados Unidos.

Bridi (1999) relatou que as regiões maiores produtoras de carambola no Estado de São Paulo são, pela ordem, os Municípios de Andradina, Lins e Mogi Mirim, com uma estimativa de colheita por um único produtor de Mogi Mirim em 1999 de 315 toneladas de carambolas “doces” e “ácidas”, pouco menos da metade comercializada pela CEAGESP em todo 1990. Os preços alcançados por caixa de 15 kg foram baixos: apenas R\$ 2,00 por caixa em plena safra. No início e no final da safra foram alcançados preços de até R\$ 6,00 por caixa. Pequenos produtores de outros Municípios da Região de Campinas - São Paulo optaram pela comercialização direta a hotéis e restaurantes da Região Metropolitana de São Paulo e obtiveram preços melhores: R\$ 8,00 por 20 unidades de carambolas selecionadas, ou em bandejas de 5 a 6 frutos a R\$ 1,50, cada bandeja.

Utilização da carambola

Campbell & Campbell (1983) relataram que carambola pode ser industrializada em forma de produtos desidratados. As carambolas foram higienizadas e cortadas em fatias e, em seguida, desidratadas em secador até que adquiriram aspecto de couro, ou cortadas em cubos e transformadas em purê e secas em tabuleiro de bolo em forno regulado para morno. A avaliação sensorial resultou em notação excelente para a cor, textura, sabor e aroma.

Corydon (1992) relatou que o vinho de carambola é estável, com bastante taninos da casca do fruto, de sabor de fruta, mas pouco doce. O vinho ganhou a

medalha de bronze na competição anual de Atlanta em 1991. Nenhum comentário foi feito neste artigo de divulgação sobre as condições tecnológicas da produção do vinho.

Wu et alii (1993) relataram que carambolas amarelas, mas não totalmente maduras são preferidas. A extração do suco pode ser feita por simples trituração e prensagem das frutas. Rendimento de mais de 60% de suco foi relatado pelos autores. Suco de carambola fermentado geralmente é produzido a partir de carambolas muito ácidas, impróprias para o consumo fresco. Na fermentação, cerca de 10% do suco fresco de carambola é aquecido a 85°C, resfriado e recebe 2% de NaCl. Em seguida é inoculado e mantido sob agitação durante 24 h a 30°C. Os 90% restantes do suco recebem o mesmo tratamento e são inoculados com o inóculo multiplicado e incubado a 30°C em condições aeróbicas por 4 horas, e depois em condições anaeróbicas por 3 dias com pequena quantidade de fonte de nitrogênio. Este suco fermentado seria comparável ao fermentado por métodos tradicionais no oriente. Na produção de néctar não fermentado, os frutos higienizados são prensados, o suco filtrado e recebe como aditivos 5% de sal e 5% de sacarose; a seguir, é pasteurizado e engarrafado. Para o consumo, esse néctar é diluído 5 vezes com água.

Osman et alii (1995) relataram que as carambolas verdes, provenientes do processo de diminuição do número de frutas na árvore, pesaram entre 6 e 20 g, tiveram teor de umidade de 90,17%, baixo Brix (0,8 °Brix) e 0,22% de acidez titulável. O pH medido variou de 3,49 a 3,55. O principal ácido orgânico, determinado por HPLC, foi o ácido oxálico (0,25 a 0,29%), seguido pelo málico (0,03 a 0,05%). O fruto continha 9,4 a 11% de pectina de boa qualidade. Os autores concluíram que essas carambolas verdes, normalmente perdidas no campo, constituem uma boa fonte de pectina para uso industrial.

Costa et alii (1999) saturaram fatias de carambola de 3 mm de espessura com açúcares, mergulhando-as em soluções de concentração crescente de glucose, frutose e sacarose, após inativação de enzimas por branqueamento. Ao final do processo, após 17 dias de tratamento, o xarope usado mediu 72 °Brix, quando as fatias foram imersas em água quente por 30 minutos e drenadas para retirar excessos de açúcares. A secagem em fluxo de ar a 50 °C completou o processamento. Os pedaços

de carambola secos e não pegajosos foram acondicionados em sacos de polietileno e armazenados em temperatura ambiente. O aspecto do produto foi agradável e o sabor característico da fruta. Os autores acreditam que as carambolas saturadas com açúcares podem constituir uma alternativa à comercialização 'in natura' com valor agregado mais alto.

Manuseio e pós-colheita

Campbell et alii (1987) relataram que carambolas são colhidas em estado verde-maturo, quando ainda são firmes e mais resistentes, para reduzir danos mecânicos no manuseio e no transporte. A temperatura de armazenagem ideal do fruto é 5°C. Armazenamento nessa temperatura, seguido por 6 dias à temperatura ambiente não produziu danos pelo frio nas carambolas da Flórida.

Campbell (1994) também relatou que o envolvimento da carambola com cera protege-a contra perda de umidade, evitando a formação de bordas ressecadas e escurecidas. O autor informa ainda que o armazenamento durante 15 dias a 1,1°C foi adotado nos EUA como tratamento de quarentena para carambolas da Flórida, contra a mosca das frutas do Caribe.

Amadurecimento e fisiologia pós-colheita de carambola

Vines & Grierson (1966) relataram que a carambola apresentou respiração com pico climatérico durante o amadurecimento do fruto. A altura do pico foi reduzida por armazenamento em temperaturas baixas e por envolvimento do fruto com camada de cera. Alterações da composição dos ácidos orgânicos foram observadas durante o amadurecimento: frutos verde-maturos tiveram quantidades quase iguais em ácido oxálico (40%) e ácido tartárico (35%), enquanto em carambolas maduras de cor amarela, o ácido oxálico compreendeu 74% dos ácidos e o teor em ácido α -cetoglutárico chegou a surpreendentes 17%. Esse aumento foi explicado pelos autores pela degradação de aminoácidos observada no mesmo período, provavelmente servindo de substrato para processos da respiração da carambola. O teor em ácidos por peso fresco de carambola, no entanto, não alterou durante o amadurecimento.

Liao et alii (1983) relataram taxa de respiração de carambola muito baixa, entre 10-20 mg de $\text{CO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ a 20°C, em padrão não-climatérico. A qualidade da fruta fresca foi preservada a 10°C durante 1 mês.

Oslund & Davenport (1983) encontraram taxa respiratória de carambola em amadurecimento mais baixa que em frutas verdes e atribuíram a quota maior em frutas maduras à ação de microorganismos ou a processos de senescência de tecidos da carambola. O teor em sólidos solúveis aumentou durante o amadurecimento. Os autores consideraram a produção de CO_2 e de etileno e o comportamento no amadurecimento características de fruta não-climatérica.

De acordo com Lam & Wan (1985), o comportamento respiratório de carambola armazenada a 5°C permaneceu uniforme com poucas alterações. Etileno não foi detectado nessa temperatura de armazenamento. As taxas respiratórias da carambola em atmosferas sem etileno, demonstraram tendência negativa, fato semelhante observado em frutas armazenadas em ambiente de baixa e de alta umidade. Não houve produção de etileno autocatalítica, quando os frutos foram tratados com etileno.

Campbell & Koch (1989) relataram que carambolas dos cultivares "Arkin" (doces), e "Golden Star" (ácidas) chegaram à maturidade comercial com 65 e 60 dias após a polinização, respectivamente. O total em sólidos solúveis, principalmente frutose e glucose, foi 25% maior em carambolas "Arkin" ($\cong 27\text{mg g}^{-1}$) que o do cultivar "Golden Star" ($\cong 22\text{mg g}^{-1}$). Na colheita, sacarose representou entre 15 e 20% do total de açúcares. O ácido orgânico predominante em frutas jovens dos dois cultivares foi o ácido oxálico, sendo que as carambolas "Arkin" apresentaram cerca de 1 mg g^{-1} e "Golden Star" em torno de 7 mg g^{-1} . Ácido málico ($<1,5\text{ mg g}^{-1}$) também esteve presente. A acidez diminuiu em carambolas "Arkin" nos estados jovens do desenvolvimento do fruto, enquanto em carambolas "Golden Star" permaneceu alto. O acúmulo de açúcares, a diminuição da acidez e o desenvolvimento da cor continuaram durante mais 7 dias após o início de mudança de cor, enquanto as carambolas permaneciam na árvore. A firmeza dos frutos, no entanto, diminuiu a ponto de prejudicar manuseio e comercialização.

Campbell et alii (1989) relataram que as alterações em açúcares e ácidos orgânicos observados na pós-colheita da carambola foram menores em temperaturas de armazenagem de 5°C que em temperaturas de 10°C. Experimentos que reaqueceram as frutas a 23°C durante seis dias indicaram que carambolas refrigeradas não perderam sua capacidade de amadurecerem normalmente e não apresentaram sintomas de danos causados pelo frio, de modo que carambolas podem ser armazenadas com maior eficiência a 5°C.

Mitcham & McDonald (1991) colheram carambolas em quatro estados de maturação: verde escuro, verde claro, em mudança de cor (tornando amarelo) e maduro. Um lote adicional de frutas maduras foi armazenado a 21°C até se tornarem sobre-maduras. A respiração e a produção de etileno da carambola em diversos estados de maturação sugeriu um possível comportamento climatérico, comportamento esse não conclusivo quando os autores se basearam no monitoramento diário da respiração e da produção de etileno dos frutos armazenados. A parede celular de carambolas verde-escuras foi constituída de 60% de celulose, 27% de hemicelulose e 13% de polímeros de pectina. Durante o amadurecimento, foi observado aumento de pectinas solúveis e diminuição de pectinas covalentemente ligadas. No estado sobre-maduro, o teor de ácidos urônicos totais foi menor que no estado de maturação anterior. A quantidade de hemicelulose diminuiu a partir do estado de mudança de cor, e a proporção de celulose aumentou durante o amadurecimento.

Ghazali & Peng (1993) relataram atividade crescente da poligalacturonase durante o amadurecimento da carambola, acompanhada da diminuição da firmeza dos frutos.

Composição química da carambola

Fonseca et alii (1969) analisaram o teor de ácido ascórbico e de β -caroteno de frutas e hortaliças brasileiras. Os autores relataram que a carambola madura possuía 37 mg/100g de ácido ascórbico e carambola verde 25 mg/100 g. A carambola madura teve teor de β -caroteno de 520 mg/100g.

Singh (1973) relatou que a carambola apresentou teores de 397,1 mg de ácido oxálico, 58,5 mg de cálcio e 145,2 mg de fósforo por 100 g de fruta. A razão cálcio : fósforo foi 0,4 e a razão cálcio : ácido oxálico, 0,1.

Chan & Heu (1975) identificaram e determinaram açúcares em carambola, *Colocarpum viride*, jaca e *Spondias cytherea*. Análises por cromatografia gasosa e por cromatografia de camada delgada resultaram na seguinte composição dos açúcares de carambola: Totais = 3,19%, frutose = 1,15%, α -glucose = 0,69%, β -glucose = 0,94% e sacarose = 0,42%.

Berry (1978) examinou a composição do óleo das sementes de carambola. A composição das sementes foi de 4% de umidade, 73,87% de óleo e 14% de proteína (N x 6,25). As características do óleo foram: índice de refração = 1,4658, índice de iodo = 81,64, índice de saponificação = 197,68, 2,96% de material insaponificável e 0,6% de acidez. Os ácidos graxos insaturados predominaram com 68,44% do total. De acordo com o autor, o óleo de sementes de carambola não tem valor comercial, devido à pequena quantidade de sementes da carambola, apesar de sua qualidade.

Baqar (1980) analisou o teor de Vitamina C de frutas da Papua-Nova Guiné, relatando 25 ± 2 mg/100 g em vitamina C para carambola de cultivar ácida.

Hall et alii (1980) estudaram a composição protéica e de aminoácidos (AA) de dez frutas tropicais usando cromatografia gasosa. Carambolas "Tea Ma" pesaram em média 85 g, 70% dos quais foi porção comestível. A composição da porção comestível relatada foi: 10% em sólidos solúveis, 0,38% (N x 6,25) ou 0,35% (N x 5,7) de proteínas, 362 mg/100 g de AA totais, dos quais 149 mg/100 g (41,4%) foram AA essenciais. Do total de AA, 4,3% foram isoleucina, 7,8% leucina, 7,7% lisina, 2,1% metionina, 0,4% cistina + cisteína, 3,7% fenilalanina, 4,3% tirosina, 4,5% treonina, 5,1% valina, 0,9% histidina, todos considerados essenciais, e 2,1% de arginina, 7,3% de alanina, 10% de ácido aspártico, 14,8% de ácido glutâmico, 5,1% glicina, 5,1% prolina, 8,2% serina e 6,6% hidroxiprolina.

Lund & Smoot (1982) estudaram o conteúdo em fibra dietética de alguns frutos e vegetais tropicais da Flórida. Carambolas "Tean Ma" contiveram 0,46% de celulose, 0,32% de hemicelulose, 0,31% de lignina e 0,014% de cinzas. O cultivar 44 conteve 0,44%, 0,32%, 0,31% e 0,014%, para os componentes acima, respectivamente.

Wilson, III, et alii (1982) quantificaram ácido oxálico em 15 cultivares de carambola da Flórida. O cultivar "Fwang Tung" conteve a menor quantidade de ácido oxálico com 0,08 g por 100 g e os cultivares WA3-24-14 e WA3-24-37 com 0,73 g por 100g a maior quantidade.

Gross et alii (1983) Investigaram o teor e a composição de carotenóides de carambola, encontrando um teor de $22 \mu\text{g g}^{-1}$. Os componentes principais foram identificados como fitoflueno (17%), ξ -caroteno (25%), β -criptoflavina (34%) e mutatoxantina (14%). β -Caroteno, β -apo-8'-carotenal, criptoxantina e luteína foram encontrados em pequenas quantidades.

Wilson III et alii (1985) identificaram 41 componentes voláteis de carambola. O aroma mais proeminente lembrava uva e metil antranilato foi o mais abundante. O aroma forte de fruta dos extratos deveu-se provavelmente aos ésteres e às cetonas.

Wills et alii (1986) estudaram a composição de alimentos da Austrália, especificamente de frutas tropicais e sub-tropicais. De acordo com os autores, a composição da porção comestível de carambola (96%) foi a seguinte: 90,8% de umidade, 0,7% de proteínas, 0,2% de lipídios, 0,9% de glucose, 2,9% de frutose, 8,3% de sacarose, 0,5% de amido, 1,6% de fibra dietética, 0,21% de ácido málico, 0,77% de ácido cítrico, 0,4% de cinzas e um total de energia de 238 kJ/100 g do fruto. Quanto aos teores de vitaminas, para cada 100 g de carambola foram relatados: 35 mg de vitamina C, 0,02 mg de tiamina, 0,04 mg de riboflavina, 0,5 mg de niacina, 0,02 mg de β -caroteno e 0,01 mg de criptoxantina. A composição de minerais da carambola/100 g foi: 110 mg de potássio, 3 mg de sódio, 3 mg de cálcio, 3 mg de magnésio, 0,3 mg de ferro e 0,2 mg de zinco.

Candlish et alii (1987) analisaram o teor de fibra dietética e amido de algumas frutas do sudeste asiático. De acordo com os autores, carambola foi composta de 91% de umidade, 0,16% de amido, 1,1% de polissacarídeos não-celulósicos, 0,5% de celulose e 0,24% de lignina, num total de 1,9% de fibras.

MacLeod & Ames (1990) analisaram componentes voláteis de carambola usando cromatografia gasosa e cromatografia gasosa com espectrometria de massa. Os autores identificaram ao todo 178 componentes positivamente, dos quais 116 pela primeira vez. Outros 31 componentes foram parcialmente caracterizados. Ésteres (57) e lactonas (9) foram os componentes significantes do aroma, em conjunto com vários compostos derivados de precursores de carotenóides.

Nagy et alii (1990) recuperaram essências de carambola de concentrados de suco e as caracterizaram. De acordo com os autores, as essências tiveram aroma que lembrava maçã verde (verde no sentido de imaturo) ou damasco. Cromatografia gasosa com espectrometria de massa revelou etil acetona, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, trans-2-hexenol, n-hexanol e muitos álcoois, ésteres e terpenos menores. O aroma agradável da essência de carambola sugere potencial comercial de sua utilização em sucos e bebidas, de acordo com os autores.

Nahar et alii (1990) analisaram carboidratos de 7 frutas comestíveis de Bangladesh. A carambola apresentou 5,9% de matéria seca, composta de 3,0% de cinzas, 11,2% de lignina e 7,5% de proteína, entre outros. A fruta fresca apresentou traços de glicerol, 7,1 mg g⁻¹ de glucose, 8,6 mg g⁻¹ de frutose, 0,2 mg g⁻¹ de manitol, 0,4 mg g⁻¹ de glucitol, 0,2 mg g⁻¹ de mio-inositol e traços de sacarose, num total de 1,6% de açúcares livres.

Herderich et alii (1992) identificaram C₁₃- Norisoprenóides, precursores de "flavor" em carambolas, usando cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massa. Os constituintes isolados são aclicones, produtos da degradação de carotenóides. Muitos destes componentes são facilmente degradados por calor em condições naturais do pH da polpa, de modo a formarem uma série de compostos aromáticos C₁₃, os quais foram relatados como componentes voláteis de carambola.

Winterhalter et alii (1995) relataram que carambola constitui fonte atrativa de componentes de "flavor" derivados da porção central de carotenóides, que são C₁₃ e C₁₅ nor-isoprenóides.

Enzimas em carambola

Baldini et alii (1982) realizaram uma avaliação bioquímica da carambola em frutas de cultivar ácido não identificado. Os autores relataram atividades de pectinesterase, poligalacturonase, amilase, invertase, catalase e peroxidase (POD). Pectinesterase, poligalacturonase e peroxidase foram estudadas quantitativamente pelos autores, sendo encontradas atividades específicas de 0,08 unidades/mg de proteína para pectinesterase, de 22,2 unidades/mg de proteína para poligalacturonase e de 34,8 unidades/mg de proteína para a peroxidase. A eletroforese em gel de poliacrilamida 7% pH 8,3 para o extrato bruto revelou uma única banda com guaiacol como corante.

Tengku Adnin Bin Tengku Adnan et alii (1986) analisaram polifenoloxidase (PPO) de carambola. A enzima foi purificada cerca de 22 vezes por precipitação com acetona e diálise. O pH 7,2 foi o ótimo com catecol como substrato. A meia vida de inativação da PPO a 75 °C foi 3,1 minutos e o K_m e a V_{max} para catecol foram 0,001 M e 20 U ml⁻¹, respectivamente. Uma U de PPO foi definida como a quantidade de enzima que provocou um aumento de 0,001 de absorbância por minuto a 420 nm.

Ghazali & Leong (1987) obtiveram poligalacturonase de carambola parcialmente purificada por ultrafiltração em filtro Amicon e por filtração em gel de Sephadex G-100 por um fator de 7,8, e pH ótimo aparente de 5,2. Os testes realizados pelos autores revelaram que se trata de exopoligalacturonase, pois retira uma unidade de ácido galacturônico por vez da extremidade não redutora do ácido poligalacturônico.

Schnell & Knight, Jr. (1989) estudaram variações de alelos das isoenzimas de aconitase, glucose-6-fosfato dehidrogenase, glutamato dehidrogenase, isocitrato dehidrogenase, leucina amino-peptidase, malato dehidrogenase, fosfoglucoisomerase, fosfoglucomutase, sorbitol dehidrogenase e triose-fosfato isomerase para avaliar o parentesco de cultivares de carambola na Flórida. Polimorfismo foi encontrado na

população de plantas germinadas para malato desidrogenase, fosfoglucoisomerase e sorbitol desidrogenase. O padrão das bandas de eletroforese indicou presença de alelos nos descendentes que não foram encontrados na suposta genitora "Golden Star". Análises com cruzamentos de "Golden Star x Fwang Tung", plantadas na mesma época, indicaram progenitura mais consistente. Segundo os autores, o trabalho gerou uma base de análise genética da espécie *Averrhoa carambola*.

Ghazali & Peng (1993) relataram que a atividade da poligalacturonase aumenta com o avanço do amadurecimento da carambola. O pH ótimo foi 5,2 em todas as maturações estudadas e uma correlação negativa foi encontrada entre a atividade da poligalacturonase e a firmeza do fruto.

Hong et alii (1996) obtiveram maior atividade da pectinesterase de carambola em meio de extração a pH 8,4 na presença de 2% de PVP e 2,4 M NaCl. A enzima foi purificada cerca de 63 vezes por precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 60 e 90% da saturação, seguido por cromatografia de troca iônica em coluna CM-Sephadex C-50, sendo 21% da atividade recuperada. O K_m da enzima para pectina cítrica foi $0,326 \text{ mg ml}^{-1}$ e $V_{\max}$ foi $207 \text{ moles minuto}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. O pH ótimo encontrado foi 7,5 e a temperatura ótima 70°C .

Weller et alii (1997) relataram acerca da susceptibilidade ao escurecimento e composição de carambola fatiada durante o armazenamento. Nenhuma diferença foi encontrada entre maturações em relação à susceptibilidade ao escurecimento. Carambolas recém-fatiadas escureceram pouco mas, armazenadas a $4,4^\circ\text{C}$ durante seis semanas, escureceram rapidamente, dentro de seis horas de exposição ao ar. O ácido ascórbico diminuiu e a atividade da polifenoloxidase aumentou, tanto em carambolas inteiras quanto nas fatiadas durante o armazenamento. Tratamento com 1 ou 2,5% de ácido cítrico + 0,25% de ácido ascórbico em água antes da embalagem foi muito eficiente na diminuição do escurecimento.

Não tendo sido encontrado nenhum trabalho que relatasse acerca de propriedades bioquímicas da peroxidase desta fruta, propusemos estudar as condições

para o Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase da carambola (*Averrhoa carambola*, L.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 1 ABELES, F. B. and BILES, C. L. Characterisation of Peroxidase in Lignifying Peach Fruit Endocarp. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.95, n.1, p.269-273, 1991.
- 2 ADEDIRAN, S. A. and DUNFORD, H. B. Structure of Horseradish Peroxidase Compound I. Kinetic Evidence for the Incorporation of One Oxygen Atom from the Oxidizing Substrate into the Enzyme. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.132, n.1, p.147-150, 1983.
- 3 ADEDIRAN, S. A. and LAMBEIR, A. M. Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.186, n.3, pp.571-576, 1989.
- 4 AESCHBACH, R.; AMADÒ, R. and NEUKOM, H. Formation of Dityrosine Cross-Links in Proteins by Oxidation of Tyrosine Residues. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.439, n.2, p.292-301, 1976.
- 5 ANGUITA, G.; MARTÍN, R.; GARCÍA, T.; MORALES, P.; HAZA, A. I.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, B. and HERNÁNDEZ, P. E. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine β -Casein. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.1, p.64-66, 1997.

¹ Referentes às secções Introdução e Revisão Bibliográfica

- 6 ARNAO, M. B.; CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. and ACOSTA, M. Inhibition by L-Ascorbic Acid and Other Antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) Oxidation Catalyzed by Peroxidase: A New Approach for Determining Total Antioxidant Status of Foods. **Analytical Biochemistry**, New York, v.236, n.2, p.255-261, 1996.

- 7 BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v.12, p. 283-291, 1982.

- 8 BAQAR, M. R. Technical Note: Vitamin C content of some Papua New Guinean fruits. **Journal of Food Technology**, Chicago, v.15, n.4, p.459-461, 1980.

- 9 BERNAL, M. A.; CÁCERES, F. M. de and ROS BARCELÓ, A. Histochemical Localization of Peroxidase in *Capsicum* Fruits. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London/Zürich, v.27, n.2, p.197-198, 1994.

- 10 BERRY, S. K. The Composition of the Oil of Starfruit (*Averrhoa carambola*, Linn.) Seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.55, n.3, p.340-341, 1978.

- 11 BRIDI, M. Carambola embalada tem melhor preço. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, quarta-feira, 10 de março de 1999.

- 12 BROOKS, J. L. Oxidase Reactions of Tomato Anionic Peroxidase. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.80, n.1, pp.130-133, 1986.

- 13 BURNETTE, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.1, p.1-6, 1977.

- 14 CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; MUÑOZ, R., and ROS BARCELÓ, A. Localization of Peroxidase in Grapes using Nitrocellulose Blotting of Freezing/Thawing Fruits. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.1, pp.38-40, 1993.
- 15 CAMPBELL, B. A. and CAMPBELL, C. W. Preservation of Tropical Fruits by Drying. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.96, p.229-231, 1983.
- 16 CAMPBELL, C. A. Handling of Florida-grown and Imported Tropical Fruits and Vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.9, p.975-978, 1994.
- 17 CAMPBELL, C. A.; HUBER, D. J. and KOCH, K. E. Postharvest Response of Carambolas to Storage at Low Temperature. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.100, p.272-275, 1987.
- 18 CAMPBELL, C. A.; HUBER, D. J. and KOCH, K. E. Postharvest Changes in Sugars, Acids, and Color of Carambola Fruit at Various Temperatures. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.3, p.472-475, 1989.
- 19 CAMPBELL, C. A. and KOCH, K. E. Sugar/Acid Composition and Development of Sweet and Tart Carambola Fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.114, n.3, p.455-457, 1989.
- 20 CANDLISH, J. K.; GOURLEY, L. and LEE, H. P. Dietary Fiber and Starch in some Southeast Asian Fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v.1, n.1, p.81-84, 1987.
- 21 CASELLA, L.; GULLOTTI, M.; NARCHESINI, A. and PETRARULO, M. Rapid Enzymatic Method for Vitamin C Assay in Fruits and Vegetables Using Peroxidase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.2, p.374-375, 378, 1989.

- 22 CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valência, v.27, n.4, p.509-518, 1987.
- 23 CEAGESP - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo **Boletim Anual**, São Paulo : CEAGESP, 1989 e1990.
- 24 CHAN, Jr., H. T. and HEU, R. A. Identification and Determination of Sugars in Starfruit, Sweetsop, Green Sapote, Jack Fruit and Wi Apple. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.6, p.1329-1330, 1975.
- 25 CHANG, T. C. and HUANG, S. H. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed Foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.3, p.184-189, 1994.
- 26 CHEN, C. H. and CHANG, T. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.8, p.873-878, 1995.
- 27 CHU, F. S. and FAN, T. S .L. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. **Journal of the AOAC**, Washington, DC, v.68, n.1, p.13-16, 1985.
- 28 CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- 29 CLEMENTE, E. Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.16, n.1, p.1-5, 1996.

- 30 CLEMENTE, E. Purification and Thermostability of Isoperoxidase from Oranges. **Phytochemistry**, Oxford, v.49, n.1, p.29-36, 1998.
- 31 CORYDON, J. At Eden Winery, the new star is star fruit. **Citrus & Vegetable Magazine**, Tampa, v. 56, n.1, p.68-71, 1992.
- 32 CORRÊA, M. Pio **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1926, reimpresso 1989. p.33
- 33 COSTA, R. P.e SBAA-SRUR, A. U. O. Saturação de carambola (*Averhoa carambola* L.) com açúcares. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, III, Anais, Campinas, reumo 571, p.161, 1999.
- 34 DOLPHIN, D.; FORMAN, A.; BORG, D. C.; FAJER, J. and FELTON, R. H. Compound I of Catalase and Horseradish Peroxidase: π - Cation Radicals. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v.68, n.3, p.614-618, 1971.
- 35 DUNFORD, H. B. Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, E. K. and GRISHAM, M. B. (Editors). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 1991. Volume II, Chapter I, p.1-24.
- 36 FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. **Sciences des Aliments**, Paris, v.5, n.2, p.217-232, 1985.
- 37 FINZEL, B. C.; POULOS, T. L. and KRAUT, J. Crystal Structure of Yeast Cytochrome c Peroxidase Refined at 1.7 Å Resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.259, n.21, p.13027-13036, 1984.

- 38 FLURKEY, W. H. and JEN, J. J. Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Developing Peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.6, p.1826-1828, 1831, 1978.
- 39 FONSECA, H.; NOGUEIRA, J. N. e MARCONDES, A. M. S. Teor de ácido ascórbico e beta-caroteno em frutas e hortaliças brasileiras. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 19, n.1, p.9-16, 1969.
- 40 FRYLINCK, L.; DUBERY, I. A. and SCHABORT, J. C. Biochemical Changes Involved in Stress Response and Ripening Behaviour of γ -Irradiated Mango Fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.3, p.681-686, 1987.
- 41 GHAZALI, H. M. & LEONG, C. K. Poygalacturonase Activity in Starfruit. **Food Chemistry**, Oxford, v.24, n.2, p.147-157, 1987.
- 42 GHAZALI, H. M. and PENG, K. S. Changes in Polygalacturonase Activity and Texture During Ripening of Starfruit. **ASEAN Food Journal**, S.I., v.8, n.4, p.153-156, 1993.
- 43 GREEN, J. G. Carambola Production in Malaysia and Taiwan. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.100, p.275-278, 1987.
- 44 GROSS, J.; IKAN, R. and ECKHARDT, G. Carotenoids of the Fruit of *Averrhoa carambola*. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p.1479-1481, 1983.
- 45 HALL, N. T.; SMOOT, J. M.; KNIGHT, Jr., R. J. and NAGY, S. Protein and Amino Acid Composition of Ten Tropical Fruits by Gas-Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.28, n.6, p.1217-1221, 1980.
- 46 HASCHKE, R. H. and FRIEDHOFF, J. M. Calcium-Related Properties of Horseradish Peroxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.80, n.4, p.1039-1042, 1978.

- 47 HASHIMOTO, S.; TATSUNO, Y. and KITAGAWA, T. Resonance Raman evidence for oxygen exchange between the $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ heme and bulk water during enzymic catalysis of horseradish peroxidase and its relation with the heme-linked ionisation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, DC., v.83, n.8, p. 2417-2421, 1986.

- 48 HERDERICH, M.; NEUBERT, C.; WINTERHALTER, P. and SCHREIER, P. Identification of C_{13} -Norisoprenoid Flavour Precursors in Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) **Flavour and Fragrance Journal**, S.I., v.7, n.4, p.179-185, 1992.

- 49 HORNG, T. S.; ASBI, B. A. and JUNAINAH, A. H. Star Fruit Pectinesterase: Isolation, Purification and Some Characterisation. **Science International**, Lahore, v.8, n.2, p.153-156, 1996.

- 50 HOYLE, M. C. High Resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from Horseradish by Isoelectric Focusing. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.60, n.5, p.787-793, 1977.

- 51 KAY, L. E. and BASILE, D. V. Specific Peroxidase Isoenzymes Are Correlated With Organogenesis. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.84, n. 1, p. 99-105, 1987.

- 52 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). **Food Chemistry**, Oxford, v.46, n.1, p.61-64, 1993a.

- 53 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.47, n.1, p. 53-59, 1993b.

- 54 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.49, n.4, p.407-410, 1994.

- 55 KOKKINAKIS, D. M. and BROOKS, J. L. Tomato Peroxidase. **Plant Physiology**, Wattham/Bethesda, v.63, n.1, p.93-99, 1979a.
- 56 KOKKINAKIS, D. M. and BROOKS, J. L. Hydrogene Peroxide-mediated Oxidation of Indole-3-acetic Acid by Tomato Peroxidase and Molecular Oxygen. **Plant Physiology**, Wattham/Bethesda, v.64, n.2, pp.220-223, 1979b.
- 57 KORBAN, S. S. and BOURNIVAL, B. L. Catalase, Esterase and Peroxidase Enzymes in Seeds and Leaves of *Malus x domestica* Borkh. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.32, n.3/4, p.213-219, 1987.
- 58 KUO, C.-F. and FRIDOVICH, I. Stimulation of the Activity of Horseradish Peroxidase by Nitrogenous Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.263, n.8, p.3811-3817, 1988.
- 59 LAGRIMINI, L. M.; VAUGHN, J.; ERB, W. A., and MILLER, S. A. Peroxidase Overproduction in Tomato: Wound-induced Polyphenol Deposition and Disease Resistance. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.3, pp.218-221, 1993.
- 60 LAM, P. F. and WAN, C. K. Ethylene and carbon dioxide production of starfruits (*Averrhoa carambola* L.) stored at various temperatures and in different gas and relative humidity atmospheres. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.64, n.3, p.181-184, 1985.
- 61 LaMAR, G. N.; ROPP, J. S. de; SMITH, K. M. and LANGRY, K. C. Proton Nuclear Magnetic Resonance Study of the Electronic and Molecular Structure of the Heme Crevise in Horseradish Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 255. n.14, p. 6646-6652, 1980.
- 62 LIAO, M. L.; LIU, M. S. and YANG, J. S. Respiration Measurement of Some Important Fruits in Taiwan. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.138, p.227-246, 1983.

- 63 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Peroxidase in Unripe and processing-ripe strawberries. **Food Chemistry**, Oxford, v.52, n.2, p.157-160, 1995.
- 64 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Purification and characterisation of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. **Food Chemistry**, Oxford, v.55, n.2, p.133-137, 1996.
- 65 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Kinetic Properties of (+)-Catechin Oxidation by a Basic Peroxidase Isoenzyme from Strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.676-679, 1997.
- 66 LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.1, p.42-48, 1997.
- 67 LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. and SILVA, M. A. da Heat Inactivation of Soluble and Bound Peroxidase from Papaya Fruit. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p.155-158, 1995.
- 68 LUND, E. D. and SMOOT, J. M. Dietary Fiber Content of Some Tropical Fruits and Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.30, n.6, p.1123-1127, 1982.
- 69 MacLEOD, G. and AMES, J. M. Volatile Components of Starfruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.1, p. 165-172, 1990.
- 70 McCLEAR, B. V. and GLENNIE-HOLMES, M. Enzymatic Quantification of (1→3) (1→4)-β-D-Glucan in Barley and Malt. **Journal of the Institut of Brewing**, London, v.91, n.5, p.285-295, 1985.

- 71 MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.5, p.1269-1271, 1989.
- 72 MARANGONI, A. G.; JACKMAN, R. L. and STANLEY, D. W. Chilling-Associated Softening of Tomato Fruits is Related to Increased Pectinmethylesterase Activity. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60. n.6, p.1277-1281, 1995.
- 73 MARIN, M. A. and CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.3, p.690-692, 734, 1992.
- 74 MASIA, A.; ZANCHIN, A.; RASCIO, N. and RAMINA, A. Some Biochemical and Ultrastructural Aspects of Peach Fruit Development. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.5, p.808-815, 1992.
- 75 MAUK, M. R. and GIRROTTI, A. W. The Protoporphyrin-Apoperoxidase Complex. Photooxidation Studies. **Biochemistry**, Washington, v.13, n.8, p.1757-1763, 1974.
- 76 MIESLE, T. J. Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 116, n.5, pp.827-830, 1991.
- 77 MITCHAM, E. J. and McDONALD, R. E. Characterization of the Ripening of Carambola (*Averrhoa carambola* L.) Fruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.104, p.104-108, 1991.
- 78 MORALES, M.; PEDREÑO, M. A.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. & CALDERÓN, A. A. Purification and kinetic characterisation of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignification in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. **Food Chemistry**, Oxford, v.48, n. 4, p. 391-394, 1993.

- 79 MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.24, n.3, p.269-275, 1989.
- 80 MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- 81 MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.23, n.4, p. 343-351, 1988.
- 82 MUJER, C. V.; MENDOZA, E. M. T. and RAMIREZ, D. A. Coconut Peroxidase Isoenzymes: Isolation, Partial Purification and Physicochemical Properties. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p.1335-1340, 1983.
- 83 NAGY, S.; BARROS, S. and CARTER, R. Production and Characterization of Carambola Essence. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.103, p.277-279, 1990.
- 84 NAHAR, N.; RAHMAN, S. and MOSIHUZZAMAN, M. Analysis of Carbohydrates in Seven Edible Fruits of Bangladesh. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.51, n.2, p.185-192, 1990.
- 85 NAKASHIMA, R. and YAMAZAKI, I. The Mechanism of Oxyperoxidase Formation from Ferryl Peroxidase and Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.262, n.6, p.2576-2581, 1987.

- 86 OSLUND, C. R. and DAVENPORT, T. L. Ethylene and Carbon Dioxide in Ripening Fruit of *Averrhoa carambola*. **HortScience**, Alexandria, v.18, n.2, p.229-230, 1983.
- 87 OSMAN, A.; LEONG, O. P.; ABDUL-KARIM, M. N. and CHE MAN, Y. B. Utilization of Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) Waste Product from Thinning Process. IFT Annual Meeting, **Book of Abstracts**, Chicago, n.26G-20, p.84, 1995.
- 87 PEDREÑO, M. A.; SABATER, F. ; MUÑOZ, R. and GARCÍA-CARMONA, F. Effect of Different Phenols on the NADH-Oxidation Catalysed by a Peroxidase from Lupin. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.12, p.3133-3136, 1987.
- 89 POULOS, T. L.; FREER, S. T.; ALDEN, R. A.; EDWARDS, S. L.; SKOGLAND, U. TAKIO, K.; ERIKSSON, B.; XUONG, N.-H.; YONETANI, T. and KRAUT, J. The Crystal Structure of Cytochrome c Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.255, n.2, p.575-580, 1980.
- 90 RICHARD, F. and NICOLAS, J. Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. **Sciences des Aliments**, Paris, v.9, n.2, p.335-350, 1989.
- 91 ROBINSON, D. S. Peroxidases and their Significance in Fruits and Vegetables. In: FOX, P. F. Editor, **Food Enzymology**, London and New York, 1991. pp.399-426.
- 92 ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.24, n.6, p.613-618, 1989.
- 93 ROS BARCELÓ, A.; ZAPATA, J. M. and CALDERÓN, A. A. Tissue-specific expression of peroxidase activity in seedless grapes (*Vitis vinifera* cv. Thompson and Flame). **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, València, v.34, n.1, p. 110-116, 1994.

- 94 ROTHAN, C. and NICOLAS, J. Changes in Acidic and Basic Peroxidase Activities during Tomato Fruit Ripening. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p. 340-342, 1989.
- 95 RYCHTER, A. and LEWAK, S. Apple Embryos Peroxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n.11, p.2609-2613, 1971.
- 96 SCHNELL, R. J. and KNIGHT, Jr., R. J. Variation in Isozyme Alleles in *Averrhoa carambola* L. **Proceedings of the Interamerican Society of Tropical Horticulture**, Alexandria, v.33, p.127-132, 1989.
- 97 SCHULLER, D. J.; BAN, N.; HUYSTEE, R. B. van; McPHERSON, A. and POULOS, T. L. The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, Philadelphia, v.4, n.3, p.311-321, 1996.
- 98 SHIRO, Y.; KURONO, M. and MORISHIMA, I. Presence of Endogenous Calcium Ion and Its Functional and Structural Regulation in Horseradish Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.261, n. 20, p. 9382-9390, 1986.
- 99 SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.4, p.1051-1056, 1990.
- 100 SMITH, A. M; MORRISON, W. L. and MILHAM, P. J. Oxidation of Indole-3-acetic Acid by Peroxidase: Involvement of Reduced Peroxidase and Compound III with Superoxide as a Product. **Biochemistry**, Washington, v.21, n.18, p.4414-4419, 1982.
- 101 SINGH, P. P. The Oxalic Acid Content of Indian Foods. **Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabilae**, The Hague, v.22, n. 3-4, p.335-347, 1973.

- 102 SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. and OGURA, N. Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.6, p.1677-1678, 1991.
- 103 TENGKU ADNIN BIN TENGKU ADNAN; AUGUSTIN, M. A. and GHAZALI, H. M. Polyphenoloxidase from Starfruit (*Averrhoa carambola*, L.) **Pertanika**, Kuala Lumpur, v.9, n.2, p.219-224, 1986.
- 104 TOURINO, M. C. C.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. L. F.; MACHADO, J. C. & GAVILANES, M. C. Injúria Mecânica em Tecidos de Frutos de Pessegueiros (*Prunus persica* (L.) Batsch): Mecanismos de Cura. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v.27, n.2, p.69-78, 1993.
- 105 VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.15, p. 49-127, 1981.
- 106 VINES, H. M. and GRIERSIN, W. Handling and Physiological Studies with the Carambola. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.79, p.350-355, 1966.
- 107 WELINDER, K. G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. Tryptic Glycopeptide Containing two Histidine Residues and a Disulfide Bridge. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.30, n.2, p.243-245, 1973.
- 108 WELINDER, K. G. Covalent Structure of the Glycoprotein Horseradish Peroxidase (EC 1.11.1.7) **FEBS Letters**, Amsterdam, v.72, n.1, 1976.
- 109 WELINDER, K.G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.96, p.483-502, 1979.

- 110 WELINDER, K. G. Plant Peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.151, p. 497-504, 1985.
- 111 WELINDER, K. G. and MAZZA, G. Similarities and Differences of Five Peroxidases from Turnip and Horseradish. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.57, p. 415-424, 1975.
- 112 WELINDER, K. G. and MAZZA, G. Amino-Acid Sequences of Heme-Linked, Histidine-Containing Peptides of Five Peroxidases from Horseradish and Turnip. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.73, p.353-358, 1977.
- 113 WELINDER, K. G. and SMILLIE, L. B. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. II. Thermolytic Peptides. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.50, n.1, p.63-69, 1972.
- 114 WELINDER, K. G.; SMILLIE, L. B. and SCHONBAUM, G. R. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. I. Tryptic Peptides. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.50, n.1, p.44-62, 1972.
- 115 WELLER, R. P.; BATES, C. A.; SIMS, C. A. and MATTHEWS, R. F. (1996) Evaluation of Browning Susceptibility in Whole and Sliced Carambola. In: IFT-Annual Meeting 1996, Book of Abstracts, p.99.
- 116 WELLER, A.; SIMS, C. A.; MATHEWS, R. F.; BATES, R. P. and BRECHT, J. K. Browning Susceptibility and Changes in Composition During Storage of Carambola Slices. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.256-260, 1997.
- 117 WILLS, R. B. H. ; LIM, J. S. K. and GREENFIELD, H. Composition of Australian foods. 31. Tropical and sub-tropical fruit. **Food Technology in Australia**, Sydney, v.38, n.3, p.118-123, 1986.

- 118 WILSON, III, C. W.; SHAW, P. E. and KNIGHT, Jr., R. J. Analysis of Oxalic Acid in Carambola (*Averrhoa carambola* L.) and Spinach by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.30, n.6, p.1106-1108, 1982.
- 119 WILSON, III, C. W.; SHAW, P. E.; KNIGHT, Jr., R. J. A; NAGY, S. and KLIM, M. Volatile Constituents of Carambola (*Averrhoa carambola* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.33, n.2, p.199-201, 1985.
- 120 WINTERHALTER, P.; LUTZ, A.; HERDERICH, M. and SCHREIER, P. Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) - Attractive Source for Carotenoid-Derived Flavor Compounds. **ACS-Symposium Series**, Washington - DC, n.596, p. 114-126, 1995.
- 121 WU, J. S.-B.; SHEU, M.-J. and FANG, T.-T. Oriental Fruit Juices: Carambola, Japanese Apricot (Mei), Lychee. In: NAGY, S. CHEN, C. S. and SHAW, P. E. **Fruit Juice Processing Technology**. Anburndale, 1993. p.595-619.
- 122 ZAPATA, J. M.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R. and ROS BARCELÓ, A. Oxidation of Natural Hydroxibenzoic Acids by Grapevine Peroxidases: Kinetic Characteristics and Substrate Specificity. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.43, n.2, p.134-138, 1992.
- 123 ZHENG, X. H.; NISHIOKA, M.; KAWAMURA, A. UKEDA, H. SAWAMURA, M. and KUSUNOSE, H. Cluster Analysis by Measurement of Peroxidase and Esterase from *Citrus* Flavedo. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.60, n.3, p.390-395, 1996.
- 124 ZHENG, X. H.; OOTANI, Y. and SAWAMURA, M. Isozymic Analysis of Peroxidase and Esterase in *Citrus* Flavedo. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.57, n.10, p.1800-1802, 1993.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O trabalho visou estabelecer a ocorrência de atividade de peroxidase em quatro estados de maturação da carambola (verde, verde-matura, amarela-madura e sobremadura), isolá-la, purificá-la e caracterizá-la bioquimicamente.

Objetivos Específicos

- Verificar a atividade da peroxidase da casca, da polpa e do talo central com o gineceu de carambola.
- Estabelecer as condições ótimas de pH, molaridade e aditivos na extração da peroxidase de carambola.
- Estabelecer as condições ótimas de pH e temperatura para a reação da peroxidase de carambola.
- Isolar e purificar peroxidase do fruto da caramboleira.
- Caracterizar bioquimicamente a peroxidase purificada de carambola: pH ótimo e de estabilidade, temperatura ótima e inativação térmica, ativadores e inibidores da atividade da peroxidase, k_m e V_{max} frente a diferentes substratos.

CAPÍTULO 2

Peroxidase of carambola (*Averrhoa carambola*, L.) in four stages of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.¹

¹ Este artigo foi escrito para o periódico: Food Chemistry.

Peroxidase of carambola (*Averrhoa carambola*, L.) in four stages of maturation:
Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.

H. J. Holschuh¹ & G. M. Pastore^{2,1}

¹Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

²Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

ABSTRACT

The peroxidase activity of four maturation stages of Carambola (*Averrhoa carambola*, L.) and its histochemical location was studied. The results showed that peroxidase activity was localised near the vascular vessels. Increased solubility of peroxidase activity was found in overripe carambolas. The best extraction medium was 0.2 M potassium phosphate buffer at pH 8.0 and the best reaction medium was 0.1 M citrate phosphate buffer at pH 5.5 at 50 °C of reaction temperature. The internal stem with the gynoceium at all stages of maturation demonstrated the highest peroxidase activity per gram of fruit part, followed by the peel. The pulp only demonstrated appreciable activity in the overripe fruit. Green fruits yielded more activity per gram than other stages of maturity.

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, E.C.1.11.1.7, donor : H₂O₂ oxydoreductases) are a group of isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. In food science and technology these enzymes are associated with unpleasant organoleptic and colour changes, as well as in quality deterioration (Burnette, 1971; Vámos-Vigyázó, 1981; Robinson, 1991).

¹To whom correspondence should be addressed.

Carambola is one of the two species of the small genero *Averrhoa* whitch produces edible fruits and belongs to the family of Oxalidaceae. It's originated from the Indo - Malayan Region, where carambola has been cultivated for milleniums. No wild carambola cultivars are known. A french agronomist named Paul Germain introduced carambola from "Ille de France" to Pernambuco, Brazil in 1817 (Corrêa, 1926).

Browning of carambola was reported in the whole and sliced fruits of nine cultivars in Florida, associated with polyphenoloxidase (Weller et alii, 1997). Peroxidase activity in carambola was reported by Baldini et alii (1982), producing only one band in disk-electrophoresis. No reports were found about the location of peroxidase in the fruit, neither about its biochemical characterization.

For this reason we investigated the histochemical location of peroxidase in carambola, its extraction and activity in parts of the fruit, and some biochemical characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Carambolas of a tart local cultivar were harvested from an identified tree from a small farm in "Hortolândia" near Campinas, São Paulo State, Brazil, in the green, mature green, mature and overripe maturation stages. The fruits were transported to the laboratory and washed. For the histochemical location and determination of the extraction conditions, the fruits were stored at 4 to 5 °C and analysed in the fresh form. For the peroxidase evaluation in the peel, pulp and internal stem with adjacent gynoecium, the parts were separated with a sharp stainless steel knife, deep frozen in solid carbon-dioxide and stored at -19 °C in a freezer until examined.

Histochemical localization

Three to four mm thick slices from the middle of green, mature and overripe carambolas (Figure 1) were submitted to staining in a reaction system of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0 containing 50 mM guaiacol and 5 mM hydrogen peroxide. The

evolution of the reaction was photographed at intervals of 5 minutes for half an hour. The stained slices were rinsed in distilled water and photographed again.

Peroxidase extraction conditions

Whole carambolas were ground in a domestic blender for three minutes in the presence of cold (4°C) 0.2 M buffers in the pH range from 3.0 to 10.0. The extracts were submitted to centrifugation at 11,000 *g* for 15 minutes at 4°C. The supernatants were taken as peroxidase sources, and the activity determination performed immediately.

Peroxidase activity from carambola parts

Deep frozen carambola parts were extracted separately under the above conditions with 0.2M potassium phosphate buffer, pH 8.0, and the peroxidase activity determined in the supernatant.

Biochemical characteristics

The **optimum reaction pH** was determined in acetate, citrate phosphate, phosphate, and tris-HCl buffers, within their buffer capacities, in the pH ranging from 3.0 to 9.5 with 0.5 intervals and the **optimum reaction temperature** was determined at the optimum pH (citrate-phosphate buffer, pH 5.5) in a temperature range from 10 to 80 °C with 10°C intervals.

Peroxidase activity determination

The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction mixture contained 0.1 ml of enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer and buffer to complete 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, series DU-70. The activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve, between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The results were given as delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the

quantity of enzyme which causes an increase in 0.001 absorbancy units per minute and per ml of enzyme source at 470 nm with guaiacol as H^+ donor or at 485 nm with p-phenylenediamine. The specific activity was expressed in U per g of carambola or its parts.

RESULTS AND DISCUSSION

Histochemical location

The direct dying of the transversal sections of the carambola fruits visualized the localization of the peroxidase close to the vascular tissues and its connections to the gynoecium and seeds and in the skin in all maturation states analysed. No differences were found between the green and ripe fruits with respect to the localization (Figures 2 to 4). This finding was in accordance to that reported by Abeles & Biles (1990) for lignifying peach endocarp, by Miesle et alii (1991) for Highbush Blueberries, and by López-Serrano & Ros Barceló (1995) for strawberries. Calderon et alii (1993) localized greater peroxidase activity in the skin of grapes, as did Bernal et alii (1994) for Capsicum fruits. Rós Barceló et alii (1994) reported hypodermic localization of peroxidase activity for the grape varieties Thompson and Flame. Overripe carambolas developed a darker stain in the dye solution than mature green fruits (Figure 5) suggesting a greater solubility of the peroxidase activity in this maturation state. The "blank" solution with no hydrogen peroxide showed no alteration (Figure 6). Miesle et alii (1991) showed a similar connection between solubility and maturation state in Highbush Blueberries.

Peroxidase extraction conditions

The optimum extraction buffer was found to be 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 8.0 (Figure 7). Other buffer systems resulted in lower peroxidase activity per gram of frozen carambola parts. No study of the optimum extraction conditions has been published in recent papers, but most authors adopted buffers with pH values greater than pH 6.0 (Baldini et alii (1982) in carambola and Moulding et alii (1987) in apple).

Peroxidase activity in the parts of carambola

The activity of the peroxidase extracted from the previously separated and frozen carambola parts using the optimum extraction buffer was highest in the internal stem with the adjacent gynoecium of green carambolas (54,481 U/g) and lowest in the pulp of green and mature fruits (only 371 and 360 U/g, respectively) (Table 1). Green fruits yielded more POD activity per gram of carambola from the sum of parts (Table 1). Moulding et alii (1987) reported the peroxidase activity of the pulp of apples as being 75,7% of that of the peel (1.11 ± 0.07 and $0.84 \pm 0.03 A_{460}(\text{min/ml})$, respectively).

Biochemical characteristics

The best reaction buffer was found to be citrate-phosphate buffer pH 5.5. A pH between 5.0 to 6.0 gave results of above 80% of the best result (Figure 8). The reaction temperature of 50 °C resulted in the highest specific activity; temperatures between 40 and 50 °C resulted in activities higher than 80% of the major activity at 50 °C (Figure 9).

ACKNOWLEDGEMENTS

H. J. Holschuh holds a fellowship from CAPES - PICDT of the Brazilian Ministry of Education.

REFERENCES

- ABELES, F. B. and BILES, C. L. (1991) Characterisation of Peroxidase in Lignifying Peach Fruit Endocarp. Plant Physiology, **95** (1) :269-273,.
- BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. (1982) Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Coletânea do ITAL, **12** :283-291.
- BERNAL, M. A.; CÁCERES, F. M. de and ROS BARCELÓ, A. (1994) Histochemical Localization of Peroxidase in *Capsicum* Fruits. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, **27** (2) :197-198.
- BURNETTE, F. S. (1977) Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science, **42** (1) :1-6.
- CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; MUÑOZ, R., and ROS BARCELÓ, A. (1993) Localization of Peroxidase in Grapes using Nitrocellulose Blotting of Freezing/Thawing Fruits. HortScience, **28** (1) : 38-40.
- CORRÊA, M. Pio (1926) Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Ministério da Agricultura, IBDF : Rio de Janeiro, reimpresso 1989. p.33.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, **49** (4) : 407-410.
- LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. (1995) Peroxidase in Unripe and processing-ripe strawberries. Food Chemistry, **52** (2) :157-160.
- MIESLE, T. J. (1991) Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, **116** (5) :827-830.

- MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1987) Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, **22** (4) : 391-397.
- ROS BARCELÓ, A.; ZAPATA, J. M. and CALDERÓN, A. A. (1994) Tissue-specific expression of peroxidase activity in seedless grapes (*Vitis vinifera* cv. Thompson and Flame). Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, **34** (1) : 110-116.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. (1981) Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **15** : 49-127.
- WELLER, A.; SIMS, C. A.; MATHEWS, R. F.; BATES, R. P. and BRECHT, J. K. Browning Susceptibility and Changes in Composition During Storage of Carambola Slices. Journal of Food Science, Chicago, v.62, n.2, p.256-260, 1997.

APPENDIX

Table 1: Influence of the parts of the fruit and maturation on the specific peroxidase activity per mass of carambola or its parts

	Maturation	Green	Green- mature	Mature	Overripe	Sum of maturation stages
	Statistics					
Peel	mean	14848.0	9184.0	7835.0	10080.0	10544.0 b
	sd ¹	6675.9	3670.2	2569.9	3938.0	5059.7
Pulp	mean	371.0	880.0	360.0	2914.0	1218.0 a
	sd	395.5	574.9	664.5	920.5	1285.0
Internal stem	mean	54481.0	46295.0	24656.0	30884.0	38546.0 c
+ gynoecium	sd	15015.0	18371.0	12227.0	18505.0	19556.5
Sum of	mean	23340.0 B	18789 AB	10950.0 A	14460 AB	16769.0
parts	sd	25245.2	22759.0	12463.6	16058.3	19693.3

¹sd = standard deviation

Different lowercase letters in "Sum of maturation stages" column means a significant statistical difference in Tukey's test ($p=0.05$).

Different uppercase letters in "Sum of parts" row means a significant statistical difference in Tukey's test ($p=0.05$).

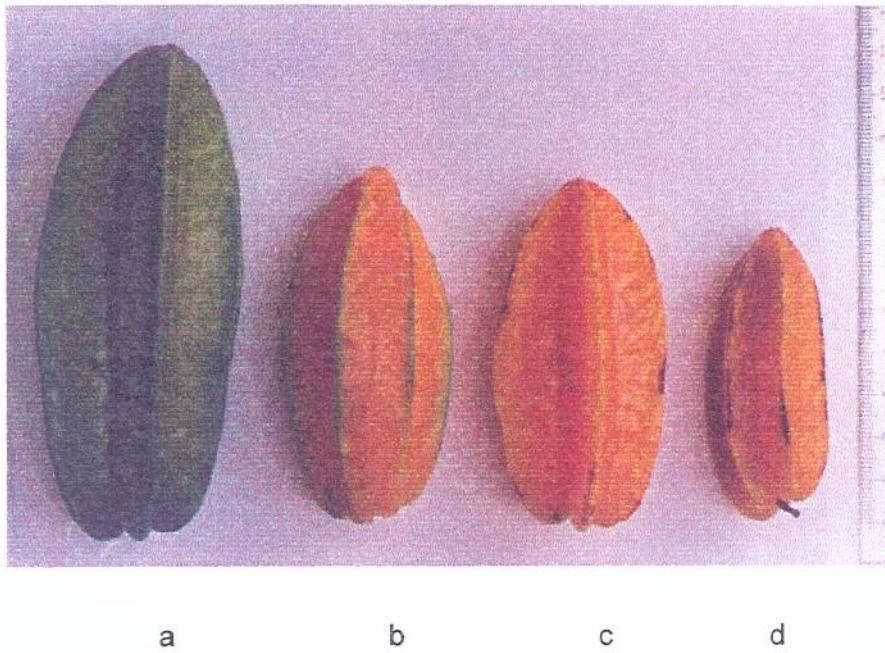


Figure 1: Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): a) green mature, b) ripe, c) full ripe and d) overripe fruits. No green fruits were available.



Figure 2: Histochemical localization of peroxidase activity in green carambola slices

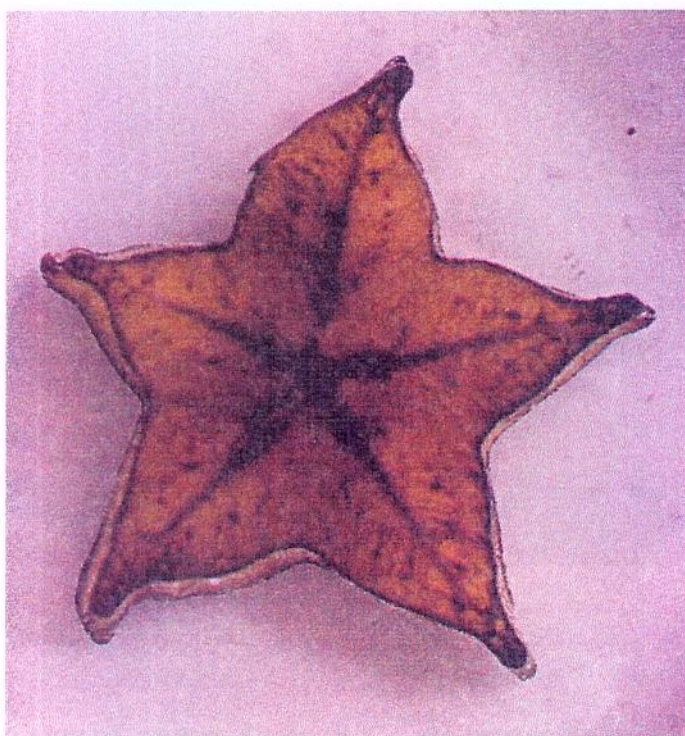


Figure 3: Histochemical localization of peroxidase activity in mature-green carambola

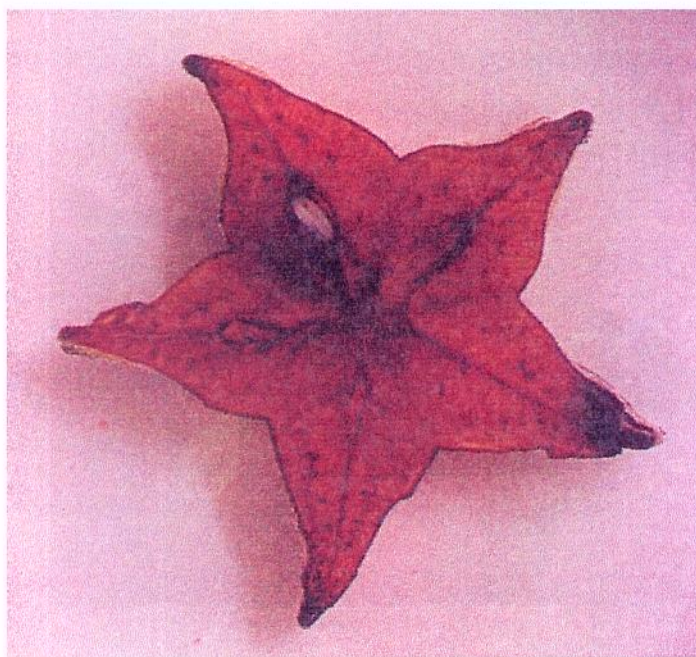


Figure 4: Histochemical localization of peroxidase activity in overripe carambola



Figure 5: Comparative peroxidase staining with guaiacol and hydrogen peroxide on the right; without hydrogen peroxide on the left. Green-mature carambola slices are on bottom and overripe slices on the top. Staining by the reaction solution on top-right was due to greater enzyme solubility in the overripe fruit.



Figure 6: Control slices of mature green carambola (right) and overripe fruit (left).

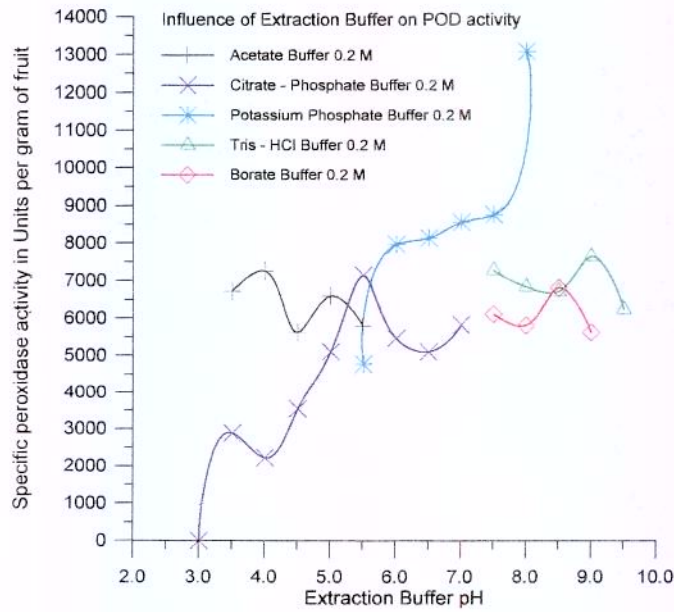


Figure 7: Influence of extraction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.

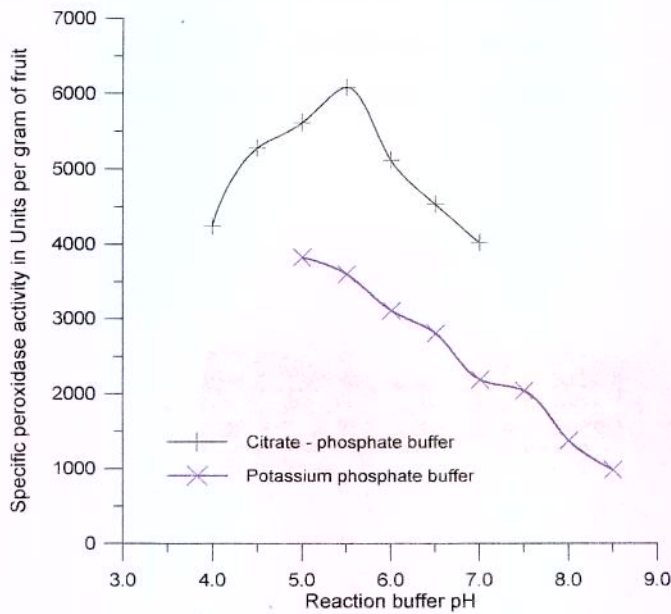


Figure 8: Influence of reaction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.

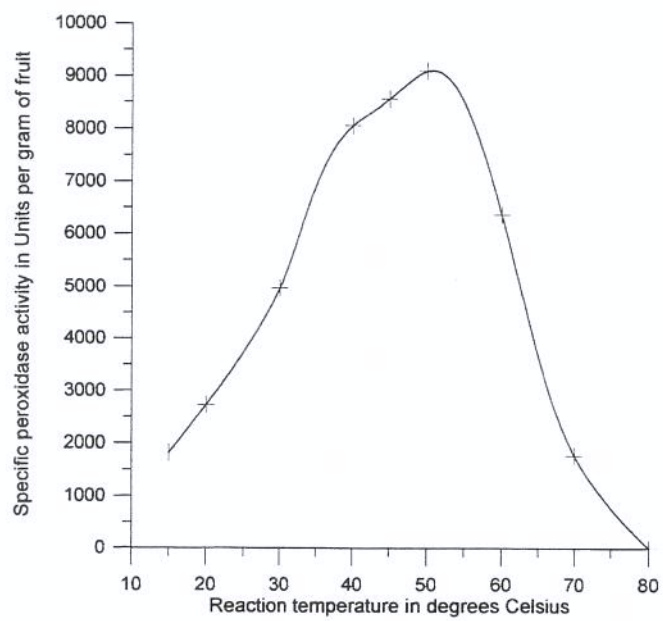


Figure 9: Influence of reaction temperature on specific peroxidase activity per mass of carambola.

CAPÍTULO 3

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Influência de aditivos na extração da enzima.¹

¹ Este artigo foi publicado na íntegra nos Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob o número 580, em forma de CD-ROM, SBCTA, Regional Rio de Janeiro, 15 a 17 de julho de 1998.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA EXTRAÇÃO DA ENZIMA.

HOLSCHUH, H. J.¹ e PASTORE, G. M.²

RESUMO

A peroxidase (POD) de carambolas inteiras foi extraída com água destilada (H₂O) ou tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0, contendo ou não cloreto de cálcio (CaCl₂), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), ácido L-ascórbico e ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) como aditivos, isoladamente ou em combinação. A melhor combinação encontrada na extração seqüenciada foi H₂O contendo PEG e EDTA na extração da enzima livre e tampão fosfato contendo CaCl₂ na extração da enzima ionicamente ligada. O extrato total obtido com tampão fosfato contendo PEG, EDTA, CaCl₂ e Triton X-100 resultou em atividade de POD 1,29 vezes maior que a soma das atividades de POD obtidas na extração seqüenciada (POD livre + POD ionicamente ligada).

Palavras chave: Peroxidase, Carambola, Extração com aditivos

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB. atualmente doutorando na FEA-UNICAMP.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

1 - INTRODUÇÃO

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxidoreductase) são uma família de isoenzimas amplamente distribuída no reino vegetal.

Na conservação de alimentos, a POD é tradicionalmente associada a alterações indesejadas de cor, sabor e odor (7). Escurecimentos em carambolas inteiras ou fatiadas foram observados em nove cultivares na Flórida. Correlação positiva foi relatada entre a degradação do ácido L-ascórbico, atividade polifenoloxidase (PPO) e teor em fenóis totais (8). No Brasil, carambolas do tipo ácido tiveram suas propriedades bioquímicas avaliadas, entre as quais a POD (2). A maior atividade de POD foi encontrada no talo central da fruta, seguido pela casca e pela polpa. A atividade diminuiu durante o amadurecimento da carambola em talo e na casca, aumentando novamente no estado sobre-maduro; a polpa demonstrou maior atividade no estado sobre-maduro da fruta (3).

Aditivos químicos para auxiliar a extração de POD de frutas foram usados por diversos autores: Peroxidase ionicamente ligada foi extraída pela adição de $CaCl_2$, o qual ainda precipita pectinas (1). Triton X-100 foi usado para solubilizar POD ligada à parede celular (5), sequestradores de fenóis (PVP, PEG) com a finalidade de proteger a enzima contra inativação por fenóis ou seus produtos de oxidação (5,4). Ácido L-ascórbico foi adicionado como antioxidante e EDTA como quelante (4).

No presente trabalho investigou-se a influência desses aditivos na atividade da POD, extraída de carambolas inteiras.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Carambolas sobre-maduras foram obtidas de produtor da Região de Campinas, colhidas pela manhã, lavadas e guardadas até a extração no mesmo ou no dia seguinte ao da colheita, sob refrigeração. Todos os reagentes usados no ensaio foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Extração da POD usando aditivos

A extração da POD com ou sem aditivos realizou-se por etapas e em extrações seqüenciadas.

Etapa 1: Na extração, usando os aditivos isoladamente, as carambolas foram homogeneizadas em H₂O gelada (4°C) na proporção de 1:3 (p/v), com o auxílio de liquidificador doméstico em velocidade máxima durante três minutos. O homogenato foi dividido em alíquotas e os aditivos da primeira extração, adicionados. Seguiu-se nova homogeneização por agitação em banho de gelo durante 15 minutos e centrifugação a 12000g durante 15 minutos a 0°C. Os precipitados obtidos na 1ª extração com tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 usando aditivos foram ressuspensos em tampão sem aditivos e aqueles obtidos com tampão sem aditivos foram ressuspensos no mesmo tampão com aditivos, em volume igual ao da 1ª extração. Foram testados os aditivos na concentração final CaCl₂ 0,2M, PVP 2%, PEG 2%, ácido L-ascórbico 0,01M e EDTA 0,01M. Aquelas etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas.

Etapa 2: Nessa etapa os aditivos mais eficientes da etapa anterior foram usados isoladamente e em combinação. Os procedimentos de extração foram idênticos aos da etapa anterior. PEG e EDTA foram adicionados à água destilada. Cloreto de cálcio e tampão fosfato só foram usados na segunda extração, em seqüência, por resultarem em extrato de enzima ionicamente ligada, todos nas concentrações acima indicadas.

Etapa 3: A extração seqüenciada e exaustiva com aditivos foi realizada com base nos procedimentos apresentados por MOULDING et alii (6).

Extração Seqüenciada

Enzima Livre: O meio de extração foi composto de água destilada contendo PEG e EDTA nas concentrações finais 2 % e 0,01 M, respectivamente. A extração foi repetida por mais duas vezes, ressuspendendo-se o precipitado no meio extrativo e recentrifugando a mistura. O terceiro precipitado foi considerado isento de POD livre.

Enzima Ionicamente Ligada: O último precipitado da extração de POD livre foi ressuspendido em tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,2M, homogeneizado e centrifugado como citado anteriormente. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e o terceiro precipitado dessa extração considerado livre de POD ionicamente ligada.

Enzima Solúvel por Triton X-100: O precipitado da última centrifugação da POD ionicamente ligada foi ressuspensionado no tampão da etapa anterior, contendo 0,1 % de Triton X-100, homogeneizado e centrifugado como descrito anteriormente. O procedimento foi repetido, também nessa extração, por mais duas vezes.

Extrato Total: As carambolas foram trituradas em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 contendo todos os aditivos usados na extração seqüenciada, nas concentrações indicadas. Os procedimentos de extração também foram idênticos.

Todos os sobrenadantes foram guardados em banho de gelo e ensaiados quanto à sua atividade de POD.

2.2.2 - Determinação da atividade POD

A determinação da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN e ROBINSON (4) na forma relatada por HOLSCHUH e PASTORE (3). Os resultados apresentados em forma de gráfico representam média de três repetições com os valores tornados relativos ao extrato aquoso ou ao de maior atividade, conforme o caso.

Todos os ensaios foram realizados em pelo menos três repetições.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividades mais altas de POD foram obtidas com os aditivos isolados, nas combinações: **8)** extração com solução aquosa de 0,2 M CaCl_2 , seguida de extração com tampão fosfato 0,2M, pH 8,0; **10)** solução aquosa de 2 % PEG seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **5)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PEG; **9)** solução aquosa de 2 % PVP seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **12)** solução aquosa de 0,01 M EDTA seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **4)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PVP e **3)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 , todos com mais de 1,5 vezes acima da atividade do extrato aquoso (água seguida de água) (Figura 1). Os números em negrito se referem aos números das colunas do gráfico. Na etapa seguinte, além do tampão fosfato 0,2 M pH 8,0, foi usada extração com os aditivos 0,2 M CaCl_2 , 2 % PEG e 0,01 M EDTA combinados.

A melhor **combinação de aditivos** foi solução aquosa contendo 2% PEG e 0,01 M EDTA (primeira extração), seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 (segunda extração), obtendo com essa combinação atividades de POD maiores que os extratos com os respectivos aditivos isoladamente. A atividade de POD extraída da carambola com a melhor combinação de aditivos foi 1,95 vezes maior que a extraída com água destilada (Figura 2). ABELES e BILES (1) relataram que a adição de 0,25 M CaCl_2 ao meio de extração aumentou a atividade de POD extraída de endocarpo de pêssego 2,6 vezes e a extraída de mesocarpo, 1,7 vezes. KHAN e ROBINSON (4) extraíram POD ionicamente ligada com CaCl_2 0,4 M e NaCl 0,8 M; no entanto, só relataram que esses sais foram mais eficientes que MgCl_2 , não indicando resultados precisos. Os demais autores referenciados em material e métodos se limitaram a informar o uso e a concentração dos aditivos.

Comparando-se a Extração Seqüenciada com a Extração Total, a primeira recuperou apenas 77,58% da atividade obtida no Extrato Total. Na extração total com aditivos combinados 0,2 M CaCl_2 , 2% PEG e 0,01 M EDTA foi obtido 94% da enzima POD na 1ª extração, enquanto que na extração da enzima livre e da enzima ionicamente ligada foram obtidos respectivamente 90,7% e 79,67%. Triton X-100 não extraiu nenhuma atividade de POD após a terceira extração iônica (Figura 3). Na extração seqüenciada, a POD solúvel extraída correspondia ao dobro da POD ionicamente ligada (Figura 3). MOULDING et alii (6) usaram extração seqüenciada e exaustiva na extração de POD solúvel e ionicamente ligada de casca e polpa de maçã: a polpa continha 28 vezes mais POD solúvel que a POD ionicamente ligada, e a casca, 6,5 vezes.

4 - CONCLUSÕES

4.1 - A maior atividade de **Peroxidase Livre** foi extraída com solução aquosa de PEG a 2% e EDTA 0,01M.

4.2 - A maior atividade de **Peroxidase Ionicamente Ligada** foi extraída com tampão fosfato de potássio 0,2M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2M.

- 4.3 - A extração com Triton X-100 em tampão fosfato após a extração exaustiva da **Peroxidase Livre**, seguida da extração exaustiva da **Peroxidase Ionicamente Ligada**, não resultou em atividade de POD adicional.
- 4.4 - O **Extrato Total** rendeu 1,29 vezes mais atividade de POD que a soma de todos os extratos de POD livre e POD ionicamente ligada.
- 4.5 - Na **Extrato Total** com todos os aditivos combinados 0,2 M CaCl_2 , 2% PEG e 0,01 M EDTA em tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 foi obtido 94% da peroxidase; na extração da **Peroxidase Livre** com solução aquosa contendo 2% PEG e 0,01 M EDTA foi obtido 90,7% de rendimento enquanto que na extração da **Peroxidase Ionicamente Ligada** foi obtido 79,7%.

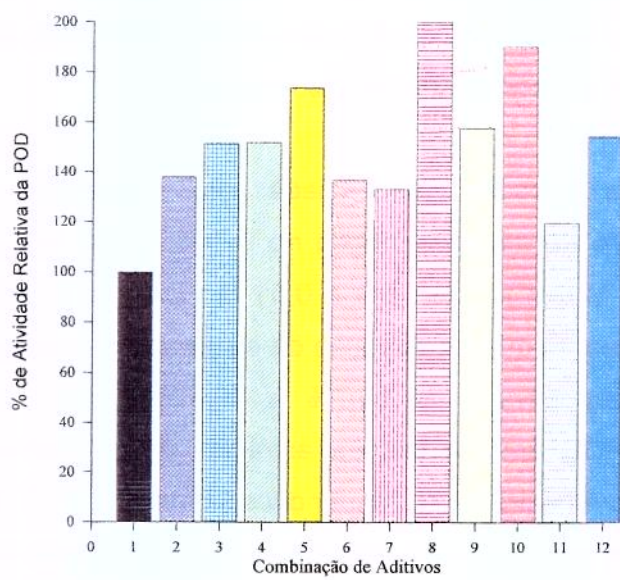


Figura 1: Atividade POD de extratos obtidos com e sem aditivos isolados:

- 1 - Extração com água seguida de extração com água;
- 2 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 3 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 ;
- 4 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PVP;
- 5 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2% PEG;
- 6 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,01 M ácido L-ascórbico;
- 7 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,01 M EDTA;
- 8 - Extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 9 - Extração com solução aquosa de 2% PVP seguida de extração com tampão fosfato 0,2M pH 8,0;
- 10 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 11 - Extração com solução aquosa de ácido L-ascórbico 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 12 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0.

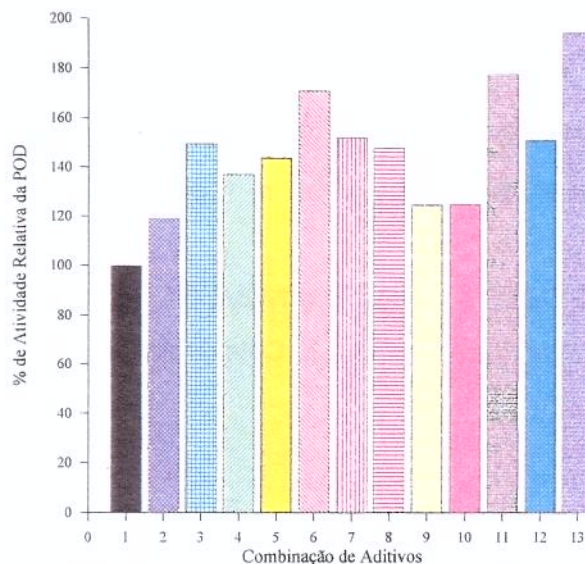


Figura 2: Atividade de POD de extratos obtidos com aditivos combinados:

- 1 - Extração com água seguida de extração com água;
- 2 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2M pH 8,0;
- 3 - Extração com água seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 4 - Extração com água seguida de extração com tampão contendo CaCl_2 0,2 M;
- 5 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 6 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 7 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão contendo 0,2 M CaCl_2 ;
- 8 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 9 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 10 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2 M;
- 11 - Extração com solução aquosa de 2 % PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 12 - Extração com solução aquosa de 2% PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 13 - Extração com solução aquosa de 2% PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2 M.

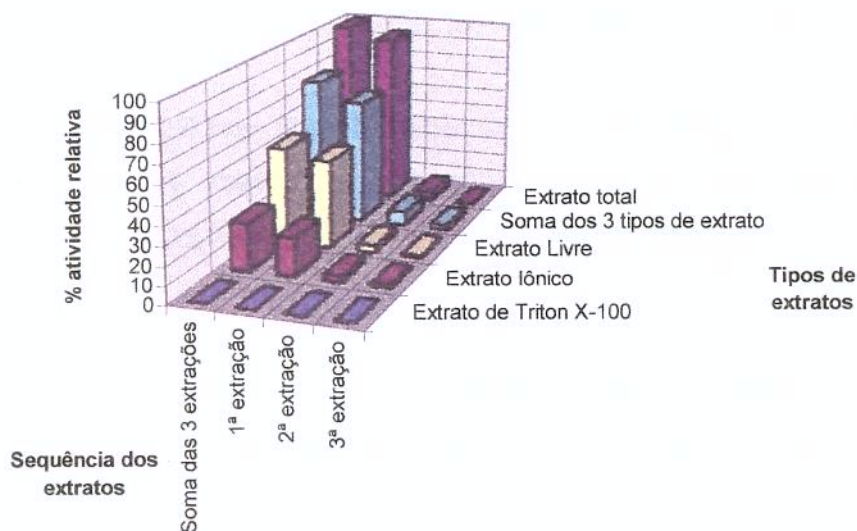


Figura 3: Extração de POD Livre, Ionicamente Ligada e Extrato Total

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ABELES, F. B. and BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v. 95, n. 1, p. 269-273, 1991.
- (2) BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação bioquímica da carambola (*Averrhoa carambola*, L.), **Coletânea do ITAL**, v. 12, p. 283-291, 1982.
- (3) HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.), extração e determinação de atividade em partes da fruta, provenientes de quatro estados de maturação. II **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - Book of Abstracts**, abstract 236, p.93, 1997
- (4) KHAN, A. A. & ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 53-59, 1993.
- (5) MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 690-692, 734, 1992.
- (6) MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**, v.22, n. 4, p.391-397, 1987.
- (7) VÁMOS-VIGYAZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC - Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.
- (8) WELLER, R. P.; BATES, C. A.; SIMS, C. A. and MATTHEWS, R. F. Evaluation of browning susceptibility in whole and sliced carambola. **IFT - Annual Meeting 1996, Book of Abstracts**, p. 99, 1996.

CAPÍTULO 4

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Caracterização parcial do extrato cetônico.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA.

1. The first step is to identify the problem or question that needs to be answered.

2. The second step is to gather relevant information and data.

3. The third step is to analyze the information and data to identify patterns and trends.

4. The fourth step is to draw conclusions and make recommendations based on the analysis.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.

Heinz Johann HOLSCHUH¹ e Gláucia Maria PASTORE²

RESUMO

Estudou-se a obtenção da peroxidase (POD) de carambola usando-se acetona, etanol na concentração final de 66 % e sulfato de amônio a 90% da saturação. Verificou-se que a precipitação das enzimas com acetona e sulfato de amônio preservaram mais a atividade peroxidásica do que etanol. O pó cetônico foi escolhido e caracterizado parcialmente por envolver menor número de operações na sua obtenção que o precipitado de sulfato de amônio. Temperatura e pH ótimos foram determinados na faixa de 0,5 e 80°C e entre pH 3,0 e 8,0. A atividade foi determinada em sistema de H₂O₂:Guaiacol. A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima a 50° C, sendo que na faixa de 40° a 55° C a atividade relativa foi superior a 80 %. A enzima mostrou pH ótimo de atividade na faixa de 5,5 a 6,0 em tampão fosfato 25 mM, pH 6,0. O pó cetônico perdeu cerca de 50% da sua atividade durante um ano de armazenagem a -19 °C.

Palavras chave: peroxidase, características, carambola, *Averrhoa carambola*.

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

SUMMARY

Partial purification of carambola peroxidase was carried out using acetone and ethanol in final concentrations of 66% and ammonium sulphate at 90% of saturation as precipitation agents, always at low temperatures in a ice bath. The precipitate was separated from the liquid portion by centrifugation and then dried in a refrigerated room at low humidity in the cases of the acetone and the ethanol precipitates. Ammonium sulphate precipitate were dialysed against distilled water and then freeze dried. The acetone powders and ammonium sulphate precipitates retained much more peroxidase activity than the ethanol powder. Acetone powders were chosen for characterization, because their obtention involved lesser operation steps than that of the ammonium sulphate precipitate. The optimum reaction temperature was examined in the range from 0.5 to 80 °C, and optimum pH in the range from pH 3.0 to 8.0. The best reaction temperature was 50 °C, but temperatures between 40 and 55 °C showed more than 80% of maximum activity. The optimum reaction pH of the acetone powder was situated between pH 5.5 and 6.0 in 25 mM phosphate buffer. The acetone powder losted nearly 50 % of its activity during storage at -19° C, over nearly one year.

Keywords: Peroxidase, characteristics, carambola, star fruit, *Averrhoa carambola*.

1 - INTRODUÇÃO

Um melhor aproveitamento de frutas tropicais e subtropicais ao natural ou processadas pressupõe o estudo de enzimas como as peroxidases para determinação do pH e temperatura ótimos de reação e estabilidade em estado semi-purificado ou purificado. Peroxidases de flavedo de laranja (CATALÁ y CHAMARRO [2]), de maçã (MOULDING *et alii* [13] [14], RICHARD and NICOLAS [16]), de tomate (LÓPEZ-SERRANO & ROS BARCELÓ [10]), de mamão (SILVA, [17]), de manga (MARIN and CANO [11], KHAN and ROBINSON [6] [7]), de uva (MORALES *et alii* [12]) e de morango (CIVELLO *et alii* [3] e LÓPEZ-SERRANO & ROS BARCELÓ [8]), entre outras, têm sido descritas na literatura. Frutas de menor expressão comercial como a carambola (*Averrhoa carambola*, L.) foram menos ou não estudadas. Acerca da peroxidase de

carambola foram encontrados apenas dados relativos ao sobrenadante (suco centrifugado a baixas temperaturas) (BALDINI, DRAETTA, NOMURA [1]). Este trabalho teve como objetivo uma semi-purificação da peroxidase de carambola e a determinação de algumas das suas características bioquímicas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Carambolas de maturação aparente verde, verde-matura, amarela-madura e sobremadura foram colhidas em chácara de produtor da Região de Campinas - Estado de São Paulo, de cultivar ácida, sempre pela manhã. As frutas sadias e íntegras foram higienizadas com sabão neutro e água potável, imersas em solução de hipoclorito de sódio por 15 minutos e enxaguadas com água destilada. As frutas foram guardadas até o dia seguinte ao da colheita em geladeira a 5°C, quando a POD foi extraída de acordo com HOLSCHUH e PASTORE [5].

Todos os reagentes empregados nesse estudo foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Estudo de precipitação da peroxidase

Peroxidase de carambola foi extraída usando tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 , 2 % PEG e 0,01 M EDTA (HOLSCHUH e PASTORE [5]). O sobrenadante obtido após centrifugação a 11.000 g a 0° C durante 15 minutos foi submetido à precipitação com acetona resfriada a -20°C na proporção 1:2 de sobrenadante : acetona usando metodologia de MARIN & CANO [11]; etanol resfriado a -20° C na mesma proporção e sulfato de amônio até 90% de saturação (MOULDING *et alii* [14]).

2.2.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD

Na ocasião das ressuspensões do precipitado cetônico para as diversas caracterizações e para purificação, a atividade POD e o teor em proteínas foram determinados, de acordo com as metodologias abaixo citadas.

2.2.3 - Determinação da atividade da POD

A medida da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN & ROBINSON [7]. A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,5 ml de solução de guaiacol a 1% em tampão de análise, 0,4 ml de solução de H_2O_2 0,1 M em tampão de análise e tampão de análise (tampão-pH ótimo), completando um total de 3,2 ml. O aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante cinco minutos à temperatura ótima de atividade peroxidásica do sobrenadante (50° C), contra um branco no qual o H_2O_2 foi substituído por tampão, em espectrofotômetro Beckman UV / VIS, série DU-70. A atividade da POD foi calculada usando os dados relativos à porção linear da curva entre 0,1 e 0,7 unidades de absorbância. As leituras foram feitas em triplicata.

Uma Unidade (U) foi definida como quantidade de enzima que causa aumento de absorbância em 0,001 unidades por minuto a 470 nm, tendo guaiacol como doador de H^+ . A atividade específica da peroxidase foi expressa em unidades por mg de proteína ($U \times mg^{-1}$ proteína).

2.2.4 - Influência do pH do meio reativo na atividade da POD

Nesse estudo, soluções de 0,5% do pó cetônico foram feitas com os tampões citrato-fosfato e fosfato 25 mM na faixa de pH 3,0 a 8,0, dentro da capacidade tamponante, com intervalo de 0,5 unidades de pH. A atividade da POD foi medida usando o guaiacol e a água oxigenada diluídas nos respectivos tampões. O tampão em que foi verificada atividade ótima foi utilizado nos estudos subseqüentes.

2.2.5 - Influência da temperatura na atividade da POD

A peroxidase foi analisada na faixa de 0,5 a 80°C, com intervalos 10°C, estreitado para 5°C na zona de atividade ótima, usando-se tampão fosfato 0,1 M pH 6,0.

2.2.6 - Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi estimado através do método de LOWRY et alii [9], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Semi-purificação da peroxidase de carambola

3.1.1 - Estudos de precipitação da peroxidase de carambola

Tabela 1: Influência do agente precipitante na atividade POD recuperada em relação ao sobrenadante.

Data	17/12/97	13/01/98	13/01/98	13/01/98	13/01/98	média
Maturação	verde	verde	verde- maduro	maduro bordas verdes	maduro todo amarelo	
Sobrenadante*	100	100	100	100	100	100
Acetona	28,67	33,19	48,17	59,88	65,06	46,99
Etanol	10,98	12,64	10,97	20,19	37,46	18,45
(NH ₄) ₂ SO ₄ -H ₂ O	27,78	43,95	52,04	61,33	63,51	49,72
(NH ₄) ₂ SO ₄ -KPi**	23,21	46,19	43,95	55,54	37,08	41,19

* A atividade peroxidásica dos sobrenadantes foi adotada como 100% de atividade relativa, inclusive na média das determinações

** KPi = tampão fosfato 25 mM, pH 6,0.

Os ensaios de precipitação da peroxidase visaram determinar entre os agentes precipitantes qual o mais adequado em termos de rendimento, de concentração e de praticidade de conservação da enzima semi-purificada.

A maior taxa de recuperação obtida através da precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), seguido de diálise com água destilada (Millipore) foi apenas 3% maior que a obtida com acetona a 65% (**Tabela 1**). A forma física dos precipitados de acetona e de etanol gelados foi pó, enquanto os precipitados de sulfato de amônio tiveram que ser dialisados para a eliminação do sal, e por isso encontraram-se em forma dissolvida. A forma do pó seco foi mais facilmente manipulável e pode ser armazenado em recipiente hermeticamente fechado, sob congelamento. Carambolas totalmente maduras propiciaram maior concentração de atividade POD em precipitado de acetona, como no de sulfato de amônio dialisado contra H₂O (**Tabela 1**). O precipitado de acetona foi denominado de Pó Cetônico de Peroxidase de Carambola. A maioria dos autores consultados não indica o rendimento de POD obtida após a precipitação, limitando-se a informar a concentração de sulfato de amônio usada. KHAN e ROBINSON [6] indicaram 47% de rendimento de POD de manga 'Chaunsa' após precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação, concordando com os resultados obtidos com POD de carambola. Quanto à utilização de acetona ou etanol resfriados a -19° C para precipitar peroxidase já extraída, nenhuma publicação recente foi encontrada. Aqueles pesquisadores que usaram acetona, usaram-na para produzir pó cetônico da fruta, para posterior extração da enzima (MUJER, MENDOZA, RAMIREZ [15] e CIVELLO *et alii* [3]), sem indicar rendimentos.

3.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD

Flutuações grandes da atividade POD foram observadas durante o armazenamento do pó cetônico, em frasco fechado sob temperaturas de congelamento durante um ano (**Tabela 2**). Essas flutuações de atividade peroxidásica constatadas, entre +2,35 e -1,99 vezes em relação à atividade inicial, foram atribuídas à distribuição não homogênea da enzima no pó tendo em vista as diferenças no teor de proteína/ml entre as amostras ressuspensas, a diferenças de solubilidade entre as amostras

retiradas e à perda de atividade, quando comparadas as atividades específicas da primeira e da última amostra (Tabela 2).

Tabela 2: Estabilidade do precipitado cetônico de peroxidase de carambola, armazenado a -19°C

Data	Peso / Volume	Atividade POD U / ml	Atividade POD U / g	Proteína mg / ml	Atividade específica U / mg proteína	Variação da atividade
22/06/98	1 g / 5 ml	190.000	950.000	6,926	27.433	0
28/10/98	1 g / 5 ml	159.320	796.600	4,326	36.828	1.34
11/12/98	1 g / 15 ml	44.100	661.500	0,790	55.823	2.03
19/01/99	1 g / 10 ml	179.050	1.790.500	2,783	64.337	2.35
23/06/99	1 g / 13 ml	70.470	916.110	5,110	13.790	-1.99

3.3 - Caracterização parcial do extrato cetônico

3.3.1 - Influência do pH do meio reativo na atividade da POD

A peroxidase de carambola mostrou atividade máxima em tampão fosfato pH 5,5 e 6,0. Nestes valores de pH a atividade relativa de peroxidase foi cerca de 10% menor usando-se tampão citrato-fosfato. A presença de um ombro em pH 4,0 na curva de pH de atividade da peroxidase parece indicar a presença de isoenzimas. Na faixa de pH 4,0 a 7,0, a peroxidase apresentou atividade relativa superior a 50 % (**Figura 1**). A enzima ficou com mais de 50 % da sua atividade entre os pH 4,0 e 7,0. BALDINI, DRAETTA, NOMURA [1] não fizeram referência ao pH ótimo da reação da POD de carambola, no entanto adotaram tampão fosfato de potássio, pH 6,0 na determinação da

mesma. FILS, SAUVAGE, NICOLAS [4] verificaram que as isoperoxidasas de tomate apresentaram atividade ótima em pH 6,0 a 6,2, enquanto MARANGONI *et alii* [10] verificaram maior atividade em pH 5,0 a 5,2. CATALÁ e CHAMARRO [2] relataram um pH ótimo entre pH 4,0 e 6,2 para isoperoxidasas aniônicas e catiônicas de flavedo de laranja 'Valencia Late', dependendo do doador de H⁺. Com Guaiacol, as isoperoxidasas aniônicas apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e 5,5, enquanto as catiônicas em pH 4,5. Analisando as peroxidases solúvel e ionicamente ligada de maçã, MOULDING *et alii* [13] encontraram em maçã dois picos para peroxidase solúvel da polpa (pH 5,5 e 6,0), ionicamente ligada da polpa (5,2 e 5,6), solúvel da casca (5,4 e 5,6) e ionicamente ligada da casca (5,0 e 5,4). RICHARD e NICOLAS [16] relataram pH 5,8 como ótimo da POD de casca de maçã. Analisando peroxidase de mamão SILVA, LOURENÇO, NEVES [18] encontraram 6,8 como o pH ótimo. Para morango, CIVELLO *et alii* [3] observaram pH 6,0 como o ótimo no extrato bruto obtido a partir do pó cetônico da fruta.

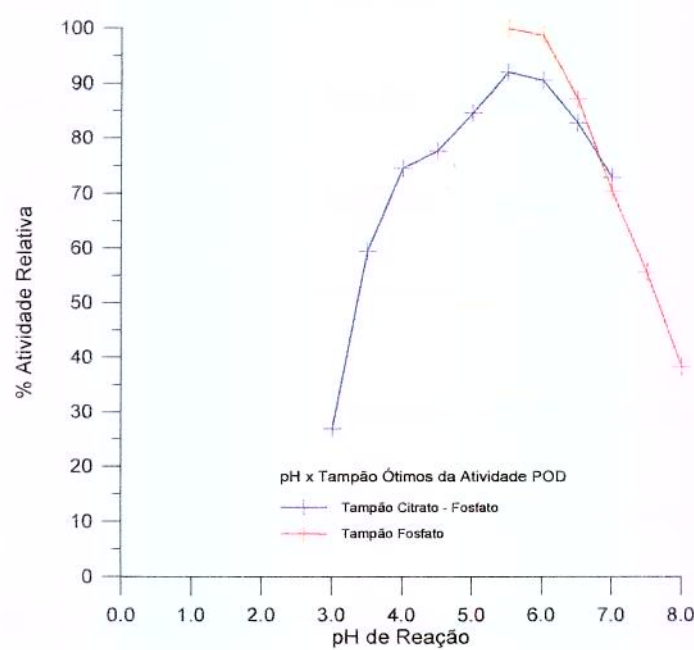


Figura 1: Influência do pH na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.

3.3.2 - Influência da temperatura na atividade da POD

A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima a 50° C (**Figura 2**). A presença de um pico de atividade na temperatura de 25° C parece indicar a existência de isoenzimas de peroxidase na carambola. SILVA [17] verificou que POD solúvel de mamão mostrou atividade ótima a 40° C enquanto a POD ionicamente ligada a 50° C. CIVELLO *et alii* [3] relataram 30 °C como a temperatura ótima da POD de morango, bem mais baixa que a encontrada para o pó cetônico de carambola. Nenhum dado foi encontrado na literatura sobre a temperatura ótima da POD de carambola.

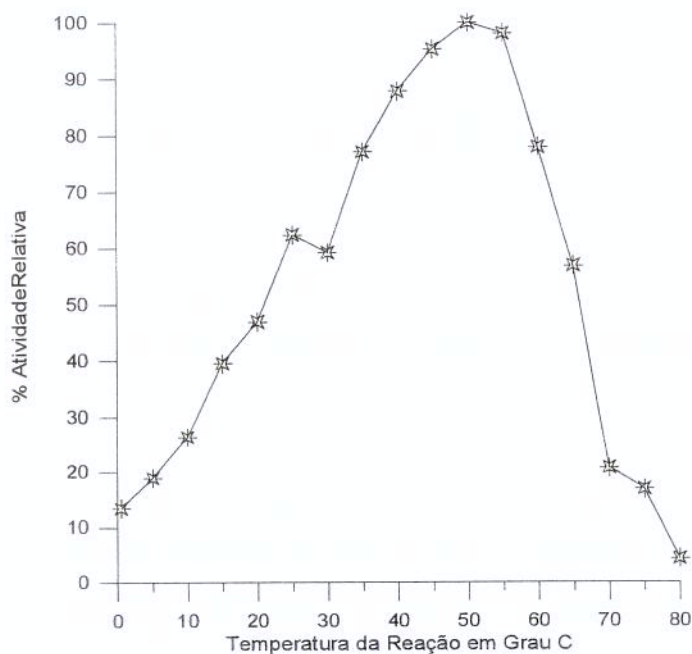


Figura 2: Influência da Temperatura na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.

4 - CONCLUSÕES

- 1 - Maior rendimento de precipitado semi-purificado de peroxidase de carambola foi obtido com acetona e sulfato de amônio com diálise em água Milli-Q (18 Ω cm). O pó cetônico foi escolhido pelo número menor de operações até chegar à forma de pó seco.

- 2 - O pó cetônico perdeu cerca de 50% de atividade durante um ano de estocagem a -19° C.
- 3 - A temperatura ótima de atividade peroxidásica do pó cetônico de carambola foi 50 °C.
- 4 - A atividade peroxidásica do pó cetônico manteve-se acima dos 80% da atividade máxima entre 40 e 55 °C.
- 5 - A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,0.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Coletânea do ITAL, Campinas - SP, v.12, p. 283-291, 1982.
- [2] CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valência, v.27, n.4, p.509-518, 1987.
- [3] CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- [4] FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. Sciences des Aliments, Paris, v.5, n.2, p.217-232, 1985.

- [5] HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Influência de Aditivos na Extração da Enzima. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15 a 17 de julho de 1998, Anais, Rio de Janeiro, 1998, CD-ROM.
- [6] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, Oxford, v.46, n.1, p.61-64, 1993.
- [7] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford, v.49, n.4, p.407-410, 1994.
- [8] LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Purification and characterisation of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. Food Chemistry, Oxford, v.55, n.2, p.133-137, 1996.
- [9] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- [10] MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. Journal of Food Science, Chicago, v.54, n.5, p.1269-1271, 1989.
- [11] MARIN, M. A. and CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. Journal of Food Science, Chicago, v.57, n.3, p.690-692, 734, 1992.
- [12] MORALES, M.; PEDREÑO, M. A.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. & CALDERÓN, A. A. Purification and kinetic characterisation of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignification in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. Food Chemistry, Oxford, v.48, n. 4, p. 391-394, 1993.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- [13] MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- [14] MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.23, n.4, p.343-351, 1988.
- [15] MUJER, C. V.; MENDOZA, E. M. T. and RAMIREZ, D. A. Coconut Peroxidase Isoenzymes: Isolation, Partial Purification and Physicochemical Properties. Phytochemistry, Oxford, v.22, n.6, p.1335-1340, 1983.
- [16] RICHARD, F. and NICOLAS, J. Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. Sciences des Aliments, Paris, v.9, n.2, p.335-350, 1989.
- [17] SILVA, E. Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Tese de Doutorado, São Paulo : Universidade de São Paulo, 1987. 127 pp.
- [18] SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, v.29, n.4, p.1051-1056, 1990.

CAPÍTULO 5

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Estabilidade térmica e ao pH do extrato cetônico.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH DO EXTRATO CETÔNICO.

Heinz Johann HOLSCHUH¹ e Gláucia Maria PASTORE²

RESUMO

O pó cetônico de peroxidase (POD) de carambola foi redissolvido em solução tampão com valores de pH 3,0 a 9,0 e submetido a tratamento térmico a 0, 25, 40, 50 e 60 °C durante 24 horas. A atividade de POD residual foi medida no início dos tratamentos e após 3, 6, 12 e 24 horas. Nos tratamentos térmicos adicionais de 75°C e ebulição, a atividade residual foi determinada a 0 e após 5, 15, 30 e 60 minutos. A atividade foi determinada em sistema de H₂O₂ : Guaiacol e o aumento da absorbância monitorado durante 5 minutos. A 0°C, a POD de carambola foi estável em todos os valores de pH durante 24 horas, exceto em pH 3,0, no qual a enzima perdeu atividade, atingindo 70% de sua atividade inicial após 24 horas. Na temperatura ótima de reação, 50°C, foi observada inativação em dois estágios nos pH 3,0 a 6,0, enquanto uma ativação inicial da enzima pôde ser observada nos pH 8,0 e 9,0 (Tris-HCl 25 mM). POD cetônica de carambola foi totalmente instável em pH 3,0 em todas as temperaturas ensaiadas durante 24 horas. Após 3 horas de tratamento, 80% das combinações de pH - temperatura mantiveram mais de 90% da atividade inicial. Após 24 horas apenas 40% das combinações mantiveram a mesma condição. A maior estabilidade foi determinada em pH 8,0 entre 0 e 40 °C e a 40 °C entre pH 5,0 e 9,0, com mais de 80% da atividade inicial após 24 horas de tratamento. Inativação da enzima foi alcançada a 75 °C em pH 3,0 após 5 minutos e em pH 7,0 após 15 minutos. Foi verificada a inativação da peroxidase em quase todos os valores de pH após 5 minutos de tratamento térmico em temperatura de ebulição; apenas em pH 6,0 foi verificada atividade residual em torno de 4%.

Palavras chave: Peroxidase, carambola, *Averrhoa carambola*, estabilidade térmica e ao pH.

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

SUMMARY

Aliquots of acetone extract were redissolved in buffers from pH 3.0 to 9.0 at intervals of 1.0 pH units. These enzyme dilutions were submitted to heat treatments at 0, 25, 40, 50 and 60 °C for 0, 3, 6, 12 and 24 hours. Peroxidase activity was measured in a H_2O_2 : Guaiacol system and the results expressed in percent of the initial activity. Additional heat treatments were done at 75 °C and at the boiling point. In these cases, residual activities were determined at 0, 5, 15, 30 and 60 minutes. At zero degrees Celsius, peroxidase was stable for 24 hours, except at pH 3.0, a condition under which the enzyme retained only 70% of its initial activity. At the optimal reaction temperature (50°C) the peroxidase was inactivated in a two step reaction at pH 3.0 to 6.0, while at pH 8.0 and 9.0 an initial activation could be observed. The cetonc powder of peroxidase was totally instable at pH 3.0 at all temperatures after 24 hours of treatment. After 3 hours 80% of all the treatment combinations retained 90% or more of the initial activity whereas after 24 hours only 40% of the combinations maintained this condition. The greatest stability conditions were at pH 8.0 between 0 and 40 °C and at pH 5.0 to 9.0 at 40 °C, retaining more than 80% of the initial activity after 24 hours. Enzyme inactivation was obtained at 75 °C at pH 3.0 after 5 minutes of treatment and at pH 7.0, after 15 minutes. At boiling temperatures, the peroxidase of carambola was inactivated after 5 minutes at most pH solutions. At pH 6.0 about 4% of the residual activity was still found.

Keywords: Peroxidase, carambola, star fruit, *Averrhoa carambola*, thermal and pH stability.

1 - INTRODUÇÃO

Peroxidases (POD, E.C.1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxidoreductase) são conhecidas pela sua alta termorresistência e por isso são usadas como parâmetro da eficiência de tratamentos térmicos de frutas e hortaliças, nos quais são tradicionalmente relacionadas a reações de escurecimento e a alterações organoléticas negativas (BURNETTE [2]; VÁMOZ-VIGYÁZÓ [21]). Esse aspecto e a utilidade da POD em ELISA

(Enzyme-linked immuno-sorbent assays), onde a peroxidase tem aplicação em análises de microrganismos patogênicos (CHEN e CHANG [5]), de toxinas (CHU e FAN [6]) de higiene (CHANG e HUANG [4]), de autenticidade de alimentos (ANGUITA *et alii* [1]) e mais ainda em análises clínicas, determinam a necessidade de se conhecer a estabilidade da enzima em diferentes condições de pH e temperatura. A ação conjugada da glucose oxidase, que degrada glucose para gluconolactona e H_2O_2 , e a peroxidase, que usa o peróxido de hidrogênio, vêm sendo aplicada em análise de alimentos (McCLEAR e GLENNIE-HOLMES [15] e CASELLA *et alii* [3]). Esse trabalho teve como objetivo o estudo da estabilidade térmica e ao pH, bem como da inativação térmica da POD de carambola (*Averrhoa carambola*, L.) em pó cetônico semipurificado.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Usou-se o pó cetônico da peroxidase de carambola obtido por precipitação de proteínas, contidas no sobrenadante, com acetona em temperatura baixa (0 °C). O precipitado foi separado por centrifugação a 11.000 g a 4 °C durante 10 minutos, secado em ambiente gelado e de baixa umidade, triturado em almofariz e armazenado em temperaturas de congelamento (-19 °C).

Todos os reagentes empregados nesse estudo foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Temperatura x pH de estabilidade

O pó cetônico foi dissolvido na concentração de 0,5 g/100 ml, em soluções tampão com valores de pH de 3,0 a 9,0, com intervalo de 1 unidade de pH, todos 25 mM, e incubado em temperaturas de 0, 25, 40, 50 e 60 °C durante 0, 3, 6, 12 e 24 h, e sua atividade residual determinada.

2.2.2. - Inativação térmica

Nos ensaios de inativação térmica, o pó cetônico foi dissolvido na mesma concentração, nas mesmas soluções-tampão do ensaio anterior e submetido a temperaturas de 75 °C e de ebulição, durante 0, 5, 15, 30 e 60 minutos, e suas atividades residuais determinadas.

2.2.3 - Determinação da atividade da POD

A determinação da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN & ROBINSON [11]. A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,5 ml de solução de guaiacol a 1% em tampão de análise, 0,4 ml de solução de H_2O_2 0,1 M em tampão de análise e tampão de análise para completar um total de 3,2 ml. O aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante cinco minutos, contra um branco no qual o H_2O_2 foi substituído por tampão, em espectrofotômetro Beckman UV / VIS, série DU-70. A atividade da POD foi calculada usando os dados relativos à porção linear da curva entre 0,1 e 0,7 unidades de absorbância. As leituras foram feitas em triplicata.

Uma Unidade (U) foi definida como quantidade de enzima que causa um aumento de absorbância de 0,001 unidades por minuto e ml de solução enzimática a 470 nm, tendo guaiacol como doador de H^+ . A atividade específica da peroxidase foi expressa em unidades por mg de proteína ($U \times mg^{-1}$ proteína).

2.2.4 - Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi estimado através do método de LOWRY *et alii* [14], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Influência da temperatura e do pH na estabilidade da POD de carambola

3.1.1 - Estabilidade térmica da POD de carambola

Em tampão citrato - fosfato 25 mM, pH 3,0, a POD reteve 72,44% da sua atividade inicial após 24 horas a 0 °C, 65% a 25 °C, 24% a 40 °C e apenas 16% a 50 °C e 11% a 60 °C. Nas temperaturas mais altas (40 a 60 °C), uma perda de atividade em duas fases pôde ser observada: bem acentuada nas primeiras 3 horas e menos acentuada nas horas seguintes (**Figura1**).

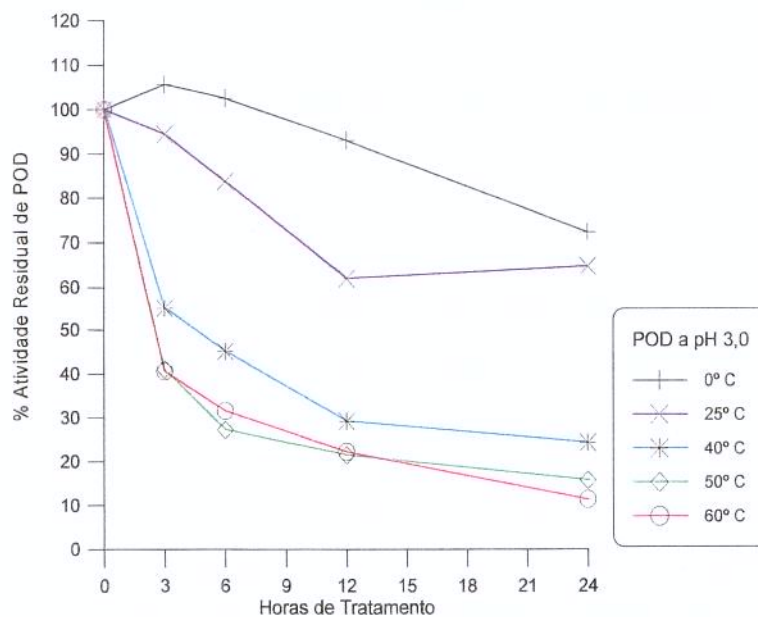


Figura1: Estabilidade térmica da POD em tampão citrato - fosfato 25 mM, pH 3,0.

Em tampão fosfato de potássio pH 6,0, a peroxidase cetônica de carambola mostrou-se estável durante 24 horas em todas as temperaturas até 40 °C, mantendo mais de 80% de sua atividade inicial. A 50 °C, a atividade residual ainda foi de 78% e a 60 °C foi 59% (**Figura 2**).

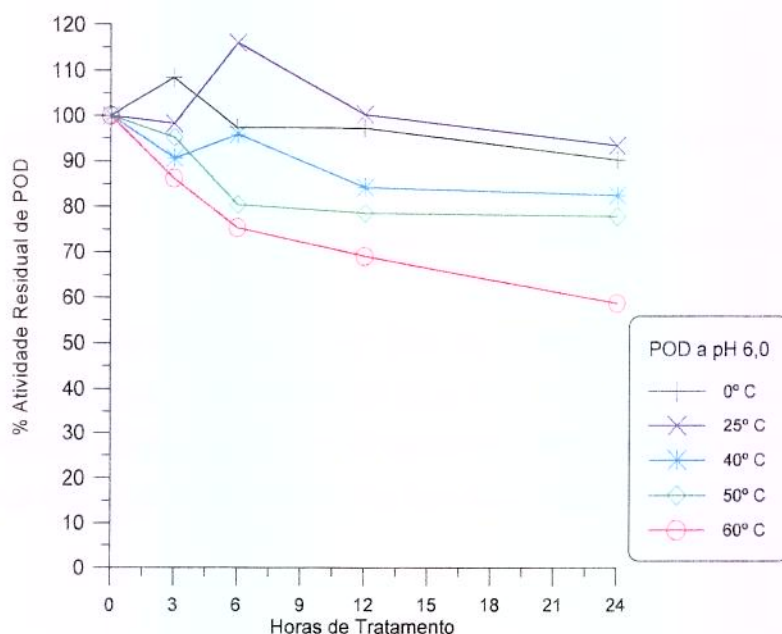


Figura 2: Estabilidade térmica da POD em tampão fosfato 25 mM, pH 6,0.

Uma diminuição acentuada da atividade da POD pôde ser observada nas temperaturas de 50 e 60 °C após 12 horas de tratamento em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 9,0. Nas demais temperaturas e tempos de tratamento, a enzima mostrou-se estável nesse pH (**Figura 3**).

CIVELLO *et alii* [7] relataram que peroxidase de morango reteve atividade residual de 20 % após 5 minutos a 60 °C, 10 % após 10 minutos e cerca de 5 % após 20 minutos de incubação do extrato enzimático em tampão fosfato de sódio 0,08 M, pH 6,0, atividade residual essa muito menor que a da POD cetônica de carambola.

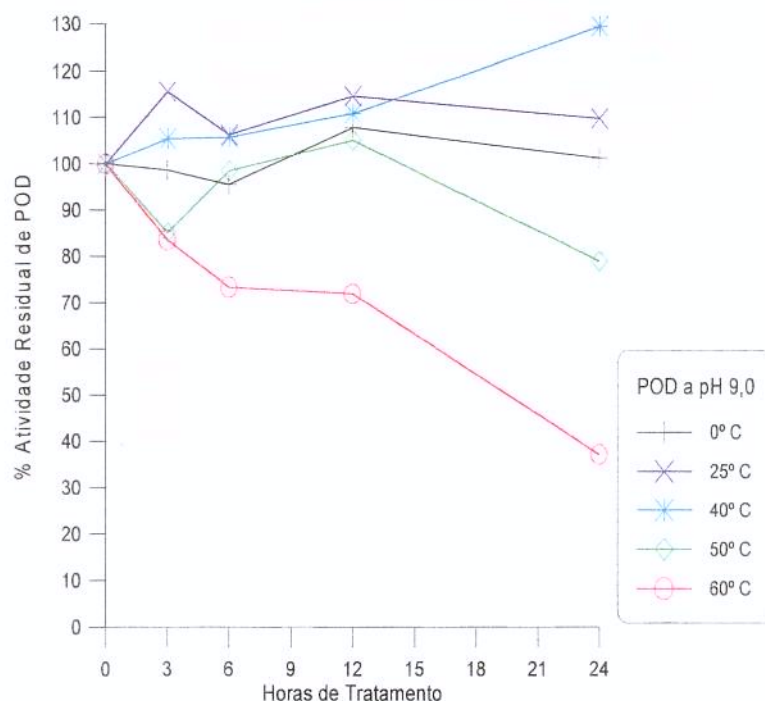


Figura 3: Estabilidade térmica da POD em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 9,0.

3.1.2 - pH de estabilidade da POD de carambola

A 0°C a atividade da POD manteve-se estável durante 12 horas em todos os valores de pH com atividade residual acima dos 80 % da inicial. A exceção foi pH 3,0, no qual a atividade da POD decresceu após 6 horas até o final do ensaio, a 24 horas (Figura 4).

Comparando a atividade residual da POD submetida a 25 °C durante 24 horas, foi observada estabilidade nos valores de pH 6,0 e 7,0, ambos com tampão fosfato de potássio, e em tampão Tris - HCl pH 8,0 e 9,0, com atividades residuais perto da atividade inicial. Em pH 4,0, a inativação ocorreu em duas ou mais fases: a mais severa nas primeiras três horas, enquanto em pH 5,0 a fase severa de inativação iniciou após 6 horas de tratamento. Nos demais valores de pH, inativação em fases não foi observada (Figura 5).

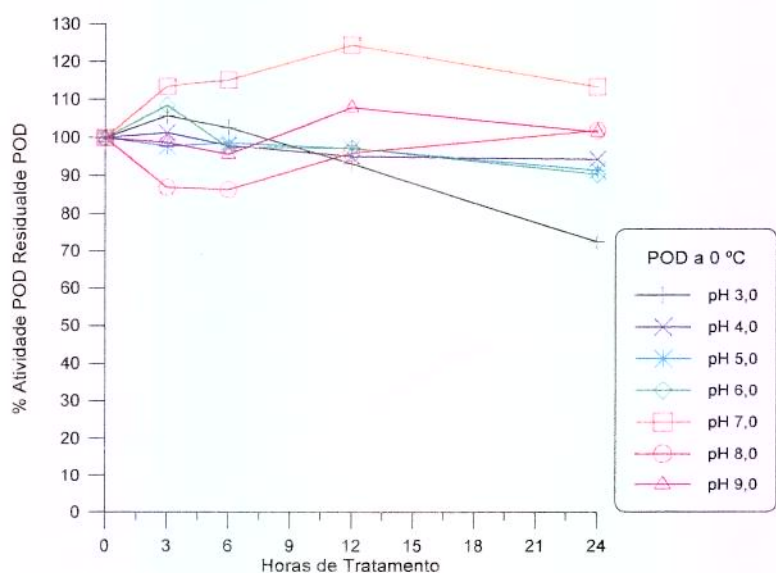


Figura 4: pH de Estabilidade da POD de carambola a 0°C.

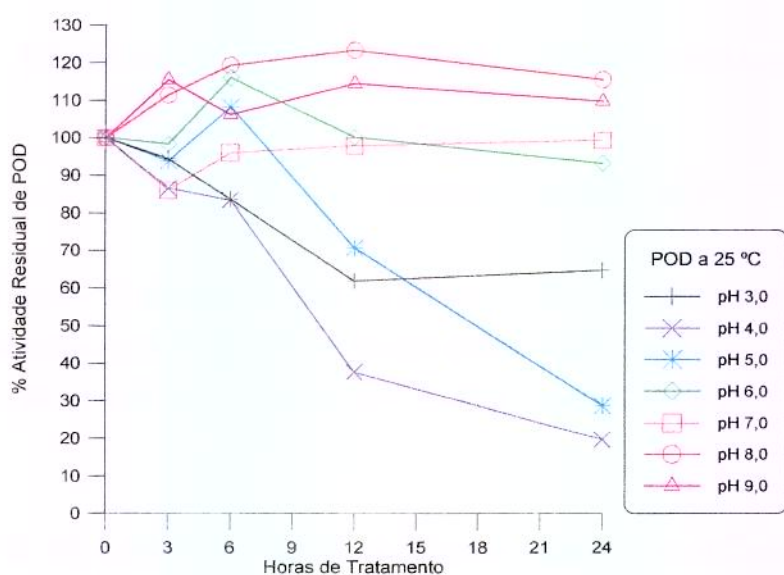


Figura 5: pH de Estabilidade da POD de carambola a 25°C.

A atividade da POD de carambola mostrou-se estável durante 24 horas a 50 °C apenas em tampão tris-HCl pH 8,0, e em pH 9,0 do mesmo tampão até 12 horas, bem como em pH 7,0 de tampão fosfato de potássio até 12 horas. Nos demais valores de

pH, a inativação da POD em duas ou mais fases foi observada após 3 horas de tratamento. A atividade residual mais baixa após 24 horas foi em pH 3,0 com 16 %, enquanto em pH 4,0 a atividade ainda foi de 46 %. Em pH 5,0 e 6,0, a atividade peroxidásica comportou-se de forma quase idêntica; foi estável durante 3 horas, teve a inativação acelerada até 6 horas de tratamento, permanecendo no patamar de cerca de 80% de atividade residual até 24 horas (**Figura 6**).

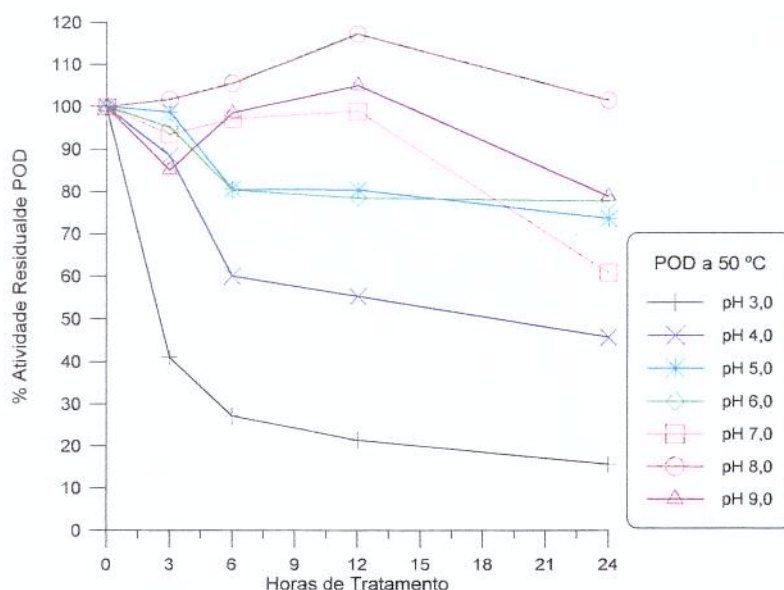


Figura 6: pH de Estabilidade da POD de carambola a 50°C

CIVELLO *et alii* [7] relataram boa estabilidade da POD de morango entre os pH 4,0 e 11, quando incubada durante 30 minutos a 20 °C. LOURENÇO e NEVES [12] incubaram POD solúvel de pêssago em pH 3 a 8 durante duas horas a 30 °C, não encontrando perda de atividade. A instabilidade da POD em pH abaixo de 4,0 pode ser atribuída à perda do grupo heme (BURNETTE [3]). Os resultados relatados por esses autores estão de acordo com os obtidos para carambola, no que tange à estabilidade em pH 3,0 e até 3 horas de tratamento.

3.1.3 - Efeito do tempo de tratamento, pH e temperatura na estabilidade enzimática da POD de carambola.

Após 3 horas de tratamento, a POD de carambola demonstrou atividade residual mais baixa em pH 3,0 nas temperaturas de 50 e 60 °C, com cerca de 40% da atividade inicial, seguido de 40 °C com 55% de atividade residual, aproximadamente. A 60 °C a atividade residual foi abaixo de 80% também nos valores de pH 4,0 e 5,0. Nas demais combinações de tratamentos, a peroxidase de carambola mostrou-se estável nessas três horas (**Figura 7**).

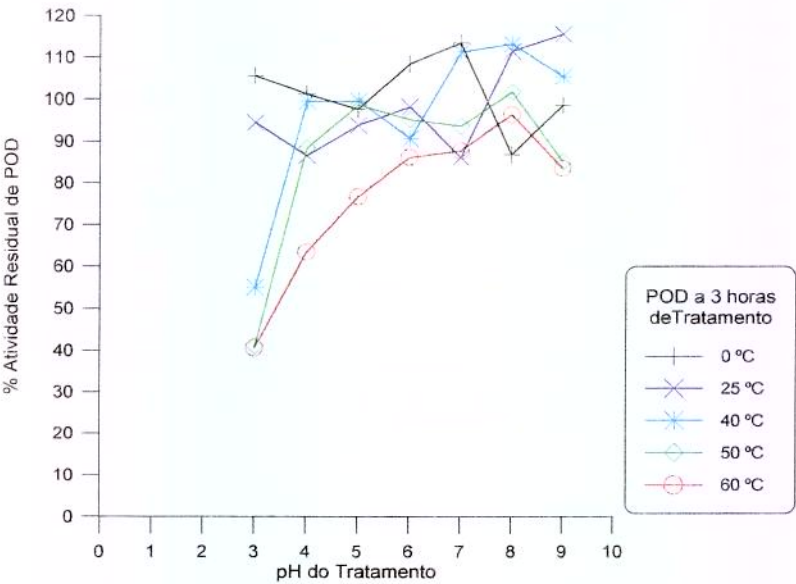


Figura 7: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.

Analisando a **Figura 8**, o tratamento a pH 3,0 resultou em atividade residual entre 40 e 60% nas temperaturas de 40 a 60 °C, e menos de 80 % nos tratamentos a pH 4,0 e 5,0 na temperatura de 60 °C. Nas demais combinações de temperatura x pH a POD de carambola foi estável, com pequena tendência de diminuição da atividade com o aumento da temperatura.

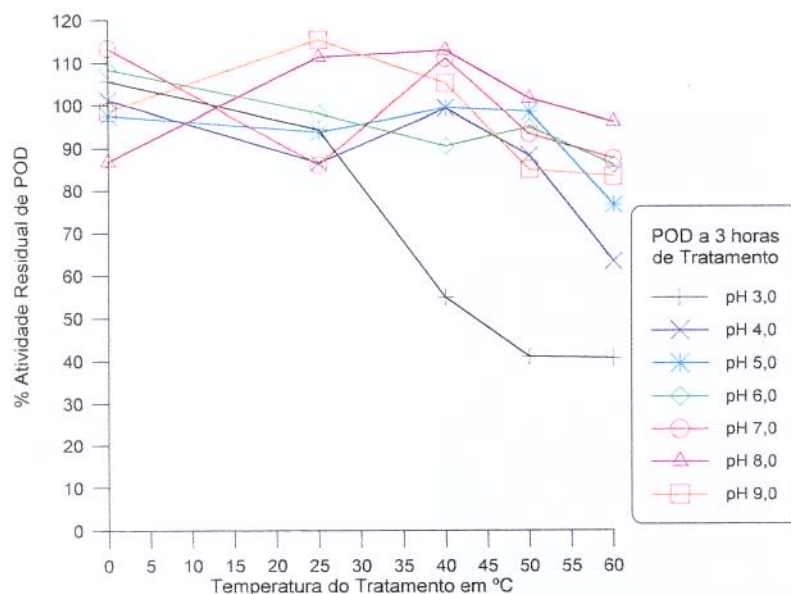


Figura 8: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.

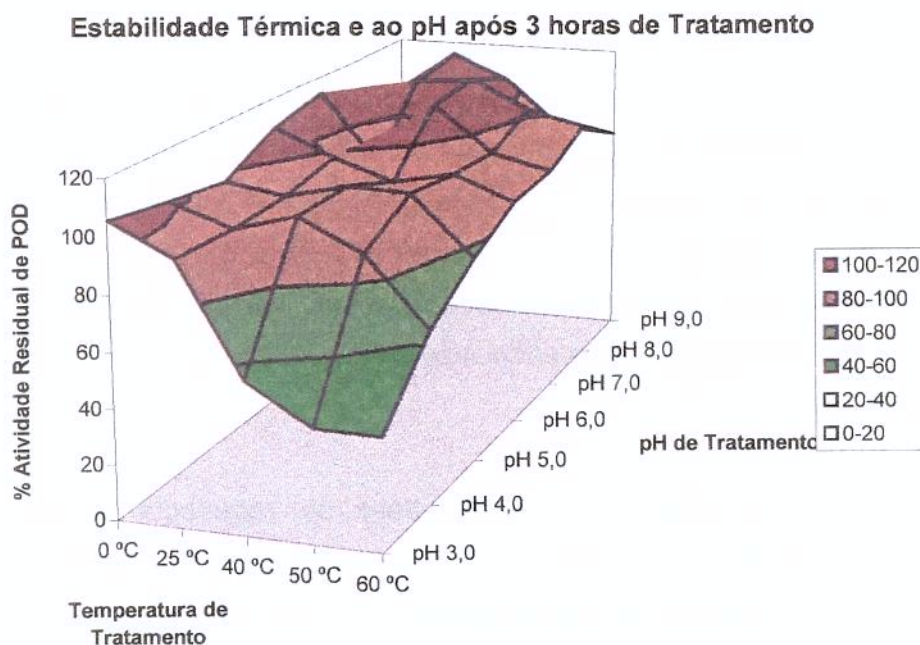


Figura 9a: Atividade residual da POD após 3 horas de tratamento: gráfico 3-D. As áreas em tons marrons constituem atividades residuais acima de 80 % da inicial e as verdes entre 40 e 80%.

Estabilidade Térmica e ao pH após 3 horas de Tratamento

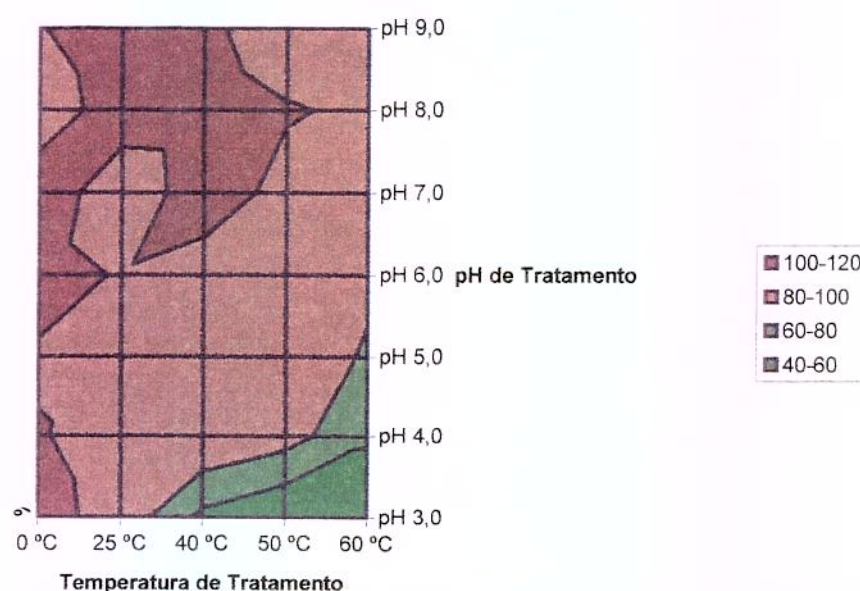


Figura 9b: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento: gráfico de superfície. As áreas em marrom significam atividade residual acima de 80% e as verdes de 40 a 60%.

Os gráficos 3-D e de superfície evidenciam a influência conjunta de pH e temperatura na estabilidade da peroxidase de carambola. O gráfico 3-D ilustra bem a amplitude entre a atividade residual menor após tratamento de 3 horas em pH 3,0 a 60°C, e a maior em pH 9,0 a 25° C ou pH 7,0 e 8,0 a 40° C (Figura 9a). A área abrangida com atividade residual acima de 80 %, de tonalidades marrons, encobre quase 90 % do gráfico de superfície, representando os tratamentos nos quais a enzima mostrou-se estável após 3 horas (Figura 9b).

A **Figura 10** ilustra que a peroxidase de carambola mostrou-se mais termossensível em pH ácido após 24 horas de tratamento. A atividade residual após esse tempo a 40°, 50° e 60° C em pH 3,0 foi respectivamente 25%, 15% e 12%.

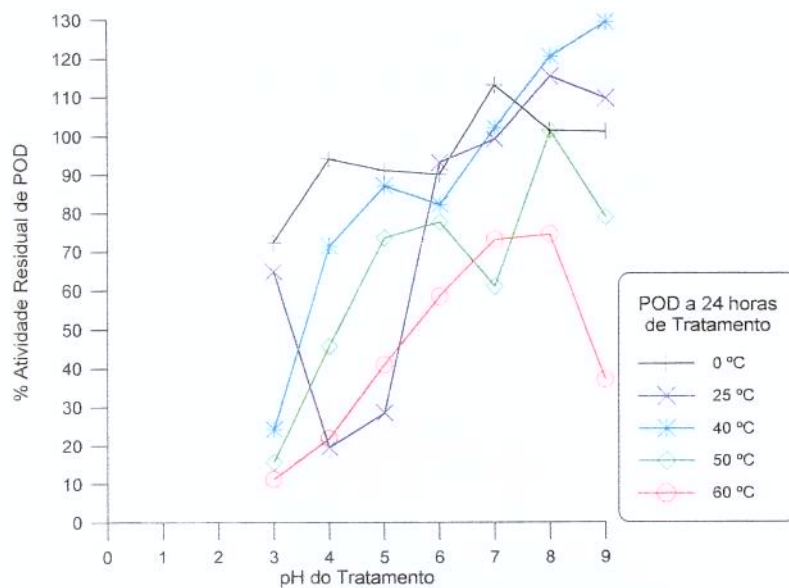


Figura 10: Atividade residual da POD após 24 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.

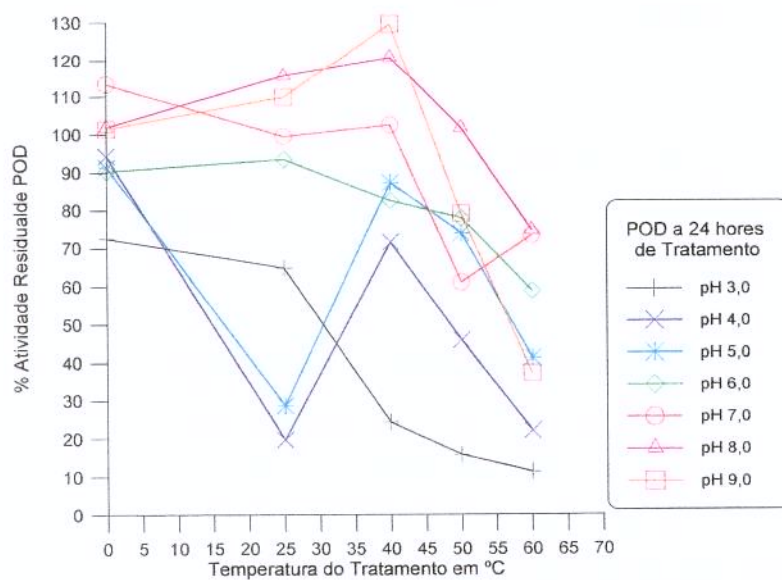


Figura 11: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.

A Figura 11 ilustra uma tendência geral de diminuição da atividade da POD cetônica de carambola com o aumento da temperatura após 24 horas de tratamento. A queda da atividade a 25 °C em pH 4,0 e 5,0 ficou evidenciada. A enzima pode ser considerada estável em temperaturas até 40 °C em pH 6,0 a 9,0 (Figura 11).

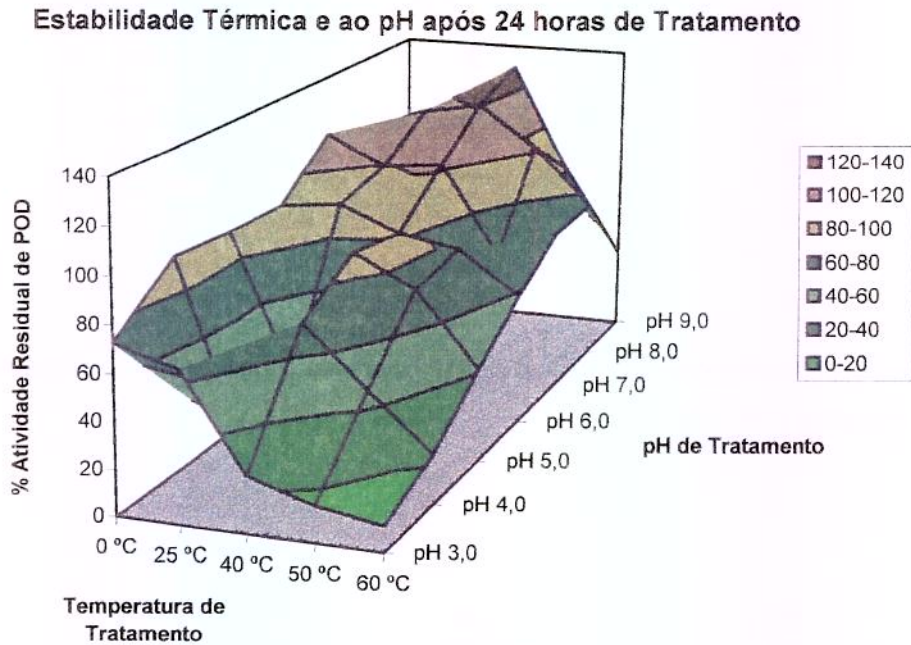


Figura 12a: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico 3-D. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.

A figura 12a mostra que a peroxidase de carambola foi instável após 24 horas em tratamentos de pH baixo (pH 3 e 4) em temperaturas acima de 25°C. Maior estabilidade após 24 horas foi verificada em tratamentos de pH 9,0 a 40° C. Analisando o gráfico de superfície da atividade residual após 24 horas de tratamento (Figura 12b), a área com atividade residual acima de 80%, cores bege e marrons, ocupa cerca de 40 % da área do gráfico, menos da metade da ocupada após 3 horas de tratamento (Figura 9). Embora a linha de 80% atravessasse o gráfico diagonalmente, maior estabilidade da POD cetônica de carambola verificou-se a 40 °C entre os pH 5,0 e 9,0 e a pH 8,0 entre 0 e quase 60 °C (Figura 12b).

Estabilidade Térmica e ao pH após 24 horas de Tratamento

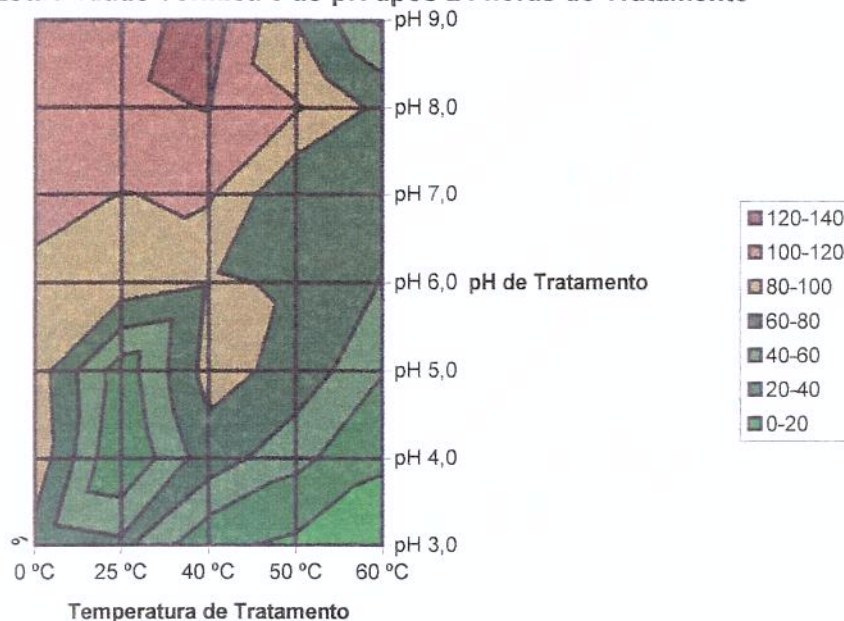


Figura 12b: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico de superfície. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.

3.1.4 - Inativação da POD cetônica de carambola por tratamento térmico e pH.

A Figura 13 ilustra a maior termossensibilidade da peroxidase da carambola em pH 3,0. A enzima foi totalmente inativada em pH 3,0 após 15 minutos de tratamento a 75° C. No estudo do efeito do pH na inativação térmica da peroxidase a 75°, verificou-se que a enzima foi mais estável em pH 6,0. A atividade residual após 60 minutos de tratamento térmico a 75° C em pH 6,0 foi aproximadamente 50 %. A peroxidase de carambola mostrou-se mais instável em pH 7,0 que em pH 6,0, 8,0 e 9,0 a 75° C, constituindo dois picos de atividade residual no estudo do efeito da influência do pH, o que pode ser um indício da presença de isoenzimas no pó cetônico.

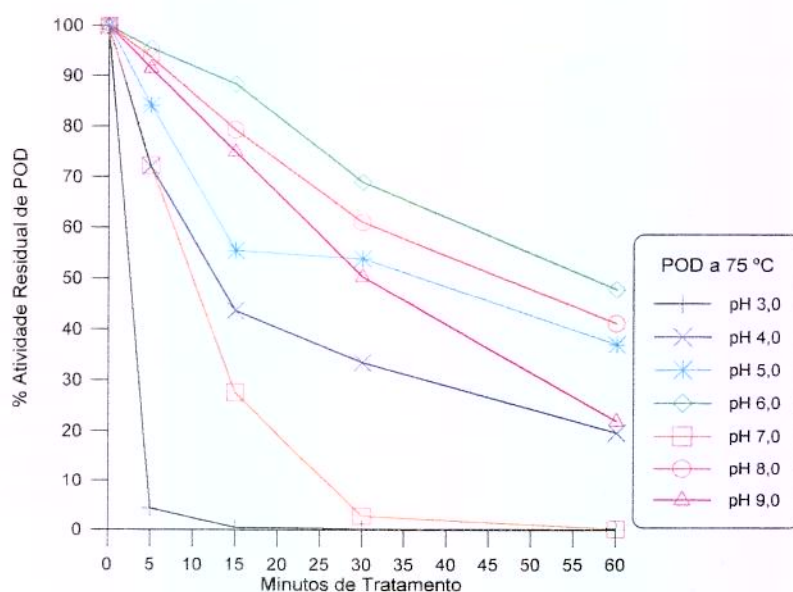


Figura 13: Inativação Térmica da POD de carambola a 75°C.

Em tratamento de ebulição a 96,8 °C, a POD cetônica de carambola ficou praticamente inativada nos primeiros 5 minutos em todos os valores de pH, exceto em pH 6,0, no qual tornou-se praticamente inativa após 15 minutos (**Figura 14**).

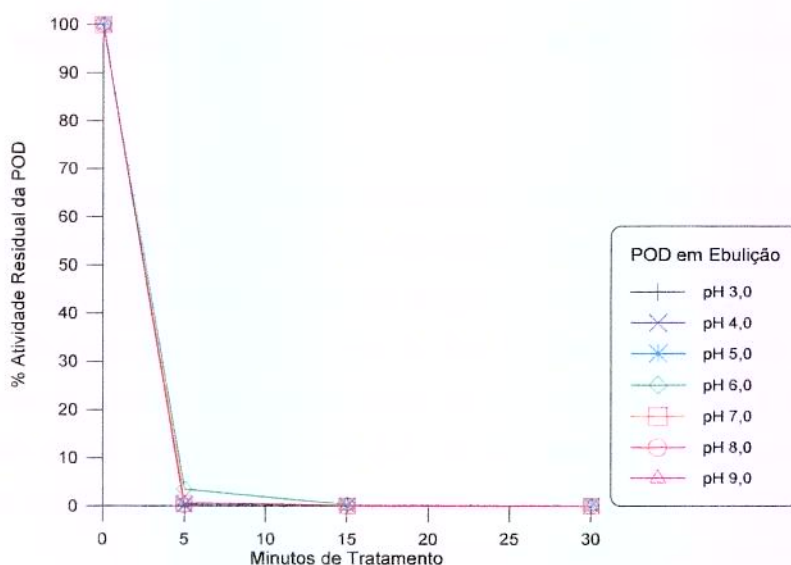


Figura 14: Inativação térmica da POD de carambola em temperatura de ebulição (96,8°C).

KHAN e ROBINSON [10] encontraram maior estabilidade térmica em POD ionicamente ligada de manga que em POD livre nos estágios iniciais do tratamento de calor a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. Foi verificado 10% de atividade residual após 2 minutos de tratamento a 75 °C da peroxidase solúvel e cerca de 15% de atividade residual de peroxidase ionicamente ligada. Peroxidase solúvel de mamão foi totalmente inativada a 80°C após 3 minutos e a 70 °C após 8 minutos, enquanto a ionicamente ligada foi inativada após 9 minutos a 80 °C e reteve atividade residual de 30% após 15 minutos a 70°C (LOURENÇO, NEVES, SILVA [13]). CLEMENTE [8] [9] relatou que POD bruta de laranja foi mais rapidamente inativada a 70 °C que suas isoperoxidasas. Após 10 minutos de tratamento da POD bruta, menos de 40% da atividade inicial permaneceram, enquanto nas isoenzimas purificadas essa atividade residual ainda foi de mais de 60%, no mesmo período. O autor não indicou o pH dos extratos enzimáticos. A POD de carambola por nós analisada quase não perdeu atividade no mesmo período, assumindo pH 6,0 para comparação. LOURENÇO e NEVES [12] trataram POD solúvel de pêssego a 60, 65, 70, 75 e 80 °C e vários tempos, relatando estabilidade a 60 °C e inativação considerável em temperaturas acima dos 70 °C, como já relatado para laranjas por McLELLAN e ROBINSON [16], por MOULDING *et alii* [18] [19] para maçã e para pera [17] e por ROBINSON, BREATHERICK, DONNELLY [20] para POD de uva "Ohane".

4 - CONCLUSÕES

- 4.1 - POD de carambola do pó cetônico foi mais estável em pH 6,0 em todas as temperaturas ensaiadas por 24 horas. Em pH 3,0 a enzima foi instável.
- 4.2 - A 0°C a peroxidase do pó cetônico de carambola mostrou-se estável em todos os valores de pH ensaiados; em pH 3,0 houve decréscimo da atividade para aproximadamente 70% da atividade inicial.
- 4.3 - A 50 °C, diminuição da atividade residual da POD de carambola pôde ser observada em dois estágios nos pH 3,0 a 6,0. Em pH 8,0 e 9,0, no entanto, uma ativação inicial pôde ser notada, nesta temperatura.

- 4.4 - Após 3 horas, cerca de 90% das combinações de tratamentos demonstraram atividade residual acima de 80%, indicando estabilidade da enzima nesses tratamentos.
- 4.5 - Após 24 horas de tratamento, apenas 40% das combinações de pH e temperatura demonstraram atividade residual acima de 80 %. A maior estabilidade após 24 horas de tratamento foi verificada em pH 8,0 entre 0° e quase 60 °C e a 40 °C entre pH 5,0 e 9,0.
- 4.6 - A Peroxidase semi-purificada de carambola foi inativada após 15 minutos de tratamento a 75 °C em pH 3,0 e após 30 minutos em pH 7,0. Nos demais pH a inativação foi mais lenta.
- 4.7 - A atividade residual menor em pH 7,0 que em pH 6,0, 8,0 e 9,0 em tratamento a 75°C, indica a possível existência de isoperoxidasas no pó cetônico de carambola.
- 4.8 - A peroxidase de carambola foi inativada após 5 minutos de tratamento em temperaturas de ebulição, em praticamente todos os valores de pH testados.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANGUITA, G.; MARTÍN, R.; GARCÍA, T.; MORALES, P.; HAZA, A. I.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, B. and HERNÁNDEZ, P. E. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine β -Casein. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.60, n.1, p.64-66, 1997.
- [2] BURNETTE, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science, Chicago : IFT, v.42, n.1, p.1-6, 1977.

- [3] CASELLA, L.; GULLOTTI, M.; NARCHESINI, A. and PETRARULO, M. Rapid Enzymatic Method for Vitamin C Assay in Fruits and Vegetables Using Peroxidase. Journal of Food Science, Chicago : IFT, v.54, n.2, p.374-375, 378, 1989.
- [4] CHANG, T. C. and HUANG, S. H. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed Foods. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.57, n.3, p.184-189, 1994.
- [5] CHEN, C. H. and CHANG, T. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.58, n.8, p.873-878, 1995.
- [6] CHU, F. S. and FAN, T. S .L. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. Journal of the AOAC, Washington, DC : Association of Official Analytical Chemists, v.68, n.1, p.13-16, 1985.
- [7] CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC : American Chemical Society, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- [8] CLEMENTE, E. Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP : SBCTA, v.16, n.1, p.1-5, 1996.
- [9] CLEMENTE, E. Purification and Thermostability of Isoperoxidase from Oranges. Phytochemistry, Oxford : Pergamon Press, v.49, n.1, p.29-36, 1998.

- [10] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.47, n.1, p. 53-59, 1993.
- [11] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.49, n.4, p.407-410, 1994.
- [12] LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas : SBCTA, v.17, n.1, p.42-48, 1997.
- [13] LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. and SILVA, M. A. da Heat Inactivation of Soluble and Bound Peroxidase from Papaya Fruit. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas : SBCTA, v.29, n.2, p.155-158, 1995.
- [14] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- [15] McCLEAR, B. V. and GLENNIE-HOLMES, M. Enzymatic Quantification of (1→3) (1→4)-β-D-Glucan in Barley and Malt. Journal of the Institut of Brewing, London, v.91, n.5, p.285-295, 1985.
- [16] McLELLAN, K. M. & ROBINSON, D. S. Heat Stability of Peroxidases from Orange. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.13, n.2, p.139-147, 1984.
- [17] MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.24, n.3, p.269-275, 1989.

- [18] MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- [19] MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.23, n.4, p. 343-351, 1988.
- [20] ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.24, n.6, p.613-618, 1989.
- [21] VÁMOZ-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Cleveland, v.15, p. 49-127, 1981.

CAPÍTULO 6

**Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*,
L.):**

Purification and characterization of an anionic isoenzyme.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Journal of Biochemistry, Westport : Food & Nutrition Press, Inc..

Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.):

Purification and characterization of an anionic isoenzyme.

HEINZ JOHANN HOLSCHUH

Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba,
Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

and

GLÁUCIA MARIA PASTORE

Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino
Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

Running Title: Purification of carambola peroxidase

Address: Gláucia Maria Pastore
Department of Food Science
College of Food Engineering
State University of Campinas - UNICAMP
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas - SP
13081-970
Brazil
E-mail: Glaupast @ FEA.UNICAMP.BR

ABSTRACT

Peroxidase from *Averrhoa carambola*, L. fruit was purified. Four peaks with activity were eluted by anion-exchange chromatography, and the strongest (A2) was purified by gel filtration chromatography, obtaining a purification degree of 106 with a yield of 14.5% in relation to the crude extract. The optimum reaction pH values were between 5.7 and 5.9 and the optimum reaction temperature was 50 °C. The apparent Michaelis-Menten constant (K_M) for guaiacol was 20.28×10^{-3} M and for hydrogen peroxide it was 12.75×10^{-3} M for this reaction system. The maximum reaction velocity (V_{max}) was estimated as 8,210 Units per millilitre (U/ml) for guaiacol and 11,635 U/ml for hydrogen peroxide. For p-phenylenediamine, K_M was 3.26×10^{-3} M and for hydrogen peroxide it was 1.85×10^{-3} M; V_{max} estimated was 15,937 U/ml and 19,702 U/ml, respectively. Native polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE) resulted in one band when stained with p-phenylenediamine and hydrogen peroxide, and SDS-PAGE demonstrated one well defined band after staining with silver salts.

Keywords: Peroxidase, carambola, *Averrhoa carambola*, L., purification

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, donor : hydrogen peroxide oxidoreductases) are isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. The investigation of this group of enzymes may be of interest, not only for its negative effects on colour (browning) and flavour, degradations of pigments and nutritional value, but also for its positive effects on the brown colour and reinforcement of texture caused by protein crosslinking (Matheis and Withaker 1984 and 1987). Isoperoxidases occur in discreet manner, soluble in protoplasm or linked to the cell walls (McLellan and Robinson 1983; Moulding et alii 1987 and 1989; Robinson et alii 1989; Khan and Robinson 1993). It is of general acceptance that isoenzymes differ with respect to charges in electric fields, catalytic properties, molecular size, thermal stability, regeneration properties, amino acid composition and carbohydrate content. In this work, carambola peroxidase was purified and an anionic isoenzyme characterized for its pH and temperature optima, and the kinetic parameters K_M and V_{max} of two H^+ donors (guaiacol and p-phenylenediamine), and hydrogen peroxide in the two reaction systems.

MATERIAL AND METHODS

Material

Semi-purified peroxidase, obtained from precipitation of the supernatant with a concentration of 65% of acetone, drying and grinding, stored under freezing temperatures (-19 °C) was the material investigated. All chemical reactants were from Merck or Sigma.

Methods

Peroxidase purification: Adequate quantities of acetone powder were dissolved in 0.025 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, identical to the equilibration buffer of the anionic exchange column. The solution was submitted to 40 °C for 30 minutes in a water bath to dissociate the pectin agglutinated to the enzyme (Silva 1987) and then centrifuged at 11,000 *g* at 4 °C for 15 minutes to clear the solution. Ten to fifteen millilitres were added to the DEAE Toyopearl 650-C (2.5 x 35 cm) column (Toiguchi et alii 1989). Fractions of 3.2 ml were collected at a rate of 24 ml per hour. The adsorbed proteins were eluted using a NaCl gradient between 0.14 and 0.40 M with intervals of 0.02 M. The protein concentration was measured at 280 nm in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, DU-70 serie. Peaks with POD activity were pooled, identified in order of elution (Khan & Robinson, 1993), dialysed against water (Millipore 18 MΩcm), concentrated by freeze drying and dissolved in a minimum of the above buffer for rechromatography on an identical column. Active fractions of the rechromatography column were pooled, dialysed and freeze dried as above. The pool of the strongest peak was dissolved in 0.025 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 and submitted to gel filtration chromatography (Toyopearl HW-55 F column, 1.5 x 65 cm) (Soda et alii 1991). The peak with POD activity was pooled and used for enzyme characterization. Native PAGE and SDS-PAGE of the purified anionic isoperoxidase were performed according to Davis (1964) and Laemmli (1970) respectively, for determination of the purity.

Molecular weight determination: Gel filtration chromatography of the strongest pool from the anion exchange chromatography was performed on a Sephadex G-100 column (1.5x65 cm), using blue dextran for the void volume determination and Cytochrome-C (12,400 Da), Carbonic anhydrase (29,000 Da) and Bovine Serum Albumin

- BSA (67,000 Da) as standards. The molecular weights of the peroxidase and of the two inactive protein peaks were calculated from a regression curve, where $\log_{10}$ of the molecular weights of standards were plotted against the ratio of the elution volumes of the standards and the void volume of the column.

Electrophoresis on polyacrylamide gels: Native PAGE was carried out according to Davis (1964) and SDS-PAGE according to Laemmli (1970). Enzyme-substrate staining of the native PAGE gels carried out using guaiacol : hydrogen peroxide (Gove and Hoyle 1975) or p-phenylenediamine : hydrogen peroxide (Marin and Cano 1992). SDS-PAGE gels were stained with silver salts (Morrissey 1981).

Optimum reaction pH: Purified anionic carambola isoperoxidase was submitted to reaction in buffer solutions from pH 3.0 to 9.0 with intervals of 0.5 units. In the optimum pH region between pH 5.5 and 6.5 the intervals were 0.1 pH units.

Optimum reaction temperature: The purified anionic isoperoxidase was submitted to reaction under the optimum pH conditions at 10, 25, 40, 45, 50, 55, 60 and 70° C.

The kinetic parameters K_M and V_{max} : These parameters were estimated using the Michaelis-Menten plot, calculating the values using linear regression for the systems guaiacol : hydrogen peroxide and p-phenylenediamine : hydrogen peroxide.

Peroxidase activity: The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction mixture contained 0.1 ml of

enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer and buffer to complete 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in Beckman UV/VIS spectrophotometer, DU-70 serie. Activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The results were given as the delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the quantity of enzyme which causes an increase in 0.001 absorbancy units per minute at 470 nm with guaiacol as H⁺ donor or at 485 nm with p-phenylenediamine. The specific peroxidase activity was expressed as units per mg of protein.

Protein determination: The protein content was estimated using the method of Lowry et alii (1951) and bovine serum albumin (BSA) as the standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of an anionic isoperoxidase from carambola.

The purification was carried out using the methodology described above. The chromatography scheme can be seen in Table 1. The anion exchange chromatography resulted in 4 (four) peaks: peak 1 (C) eluted with equilibration buffer, peak 2 (A1) and peak 3 (A2) with a 0.14 M salt (NaCl) gradient and peak 4 (A3) with a 0.3 NaCl gradient (Figure 1). Rechromatography after dialysing and freeze drying of the pools (Figure 2), resulted in a loss of specific activity by all peaks (Table 1). Both ion exchange chromatography steps caused a loss in yield: 28% in the first column and 43.5 % in the

second anionic exchange column. Peak A2 from the rechromatography column was submitted to gel filtration chromatography in a Toyopearl HW-55 F column (1.5 x 65 cm) and a single peak was obtained (Figure 3) with a purification factor of nearly 106 and yield of about 14.5 %, in relation to the total activity in the supernatant (Table 1). Native PAGE of the purified anionic isoperoxidase from carambola with p-phenylenediamine : hydrogen peroxide staining gave only one band (Figure 4a) and SDS-PAGE of the same isoperoxidase with silver salt staining gave one strong band and several very weak bands, which disappeared after the conclusion of the staining process (Figure 4b), indicating that the enzyme was not completely pure.

Molecular weight estimation

The Molecular weight was estimated using gel filtration chromatography in a Sephadex G-100 (65 x 1.5 cm) column. The anionic carambola isoperoxidase A2 eluted between the two peaks of protein, in the region near the elution of bovine serum albumin, one of the standards (Figure 5). The molecular weight of the anionic isoperoxidase A2 was estimated as 64.5 kDa by regression analysis and the results were in good accordance with those reported by Civello et alii (1995) for cationic isoperoxidases from strawberry (58.1 and 65.5 kDa). The molecular weights of the isoperoxidases of orange juice, as related by Clemente (1996) were much lower, being situated between 21.0 and 40.0 kDa.

Optimum reaction pH:

The optimum reaction pH of the anionic isoperoxidase A2 from carambola was situated between 5.7 and 5.9 for guaiacol as H⁺ donor. The activity was higher than 80% of

the maximum between pH 5.0 and 7.0 (Figure 7). In accordance with Catalá and Chamarro (1987), the pH optimum depends on the H^+ donor used: pH 4.5 to 5.5 for guaiacol, 5.0 to 5.5 for o-dianisidine for the two anionic and cationic isoperoxidases of orange flavedo, and pH 6.2 for benzidine and the anionic isoperoxidase. The pH optimum reported for apple peel (pH 5.8) by Richard and Nicolas (1989) was in good agreement with our findings for the anionic carambola isoperoxidase A2, while that related by Silva et alii (1990) for papaya peroxidase (pH 6.8) was much higher, from which we conclude that the optimum pH is dependant on the peroxidase source as well.

Optimum reaction temperature

The optimum reaction temperature was clearly at 50 °C (Figure 8). This finding was different from that related by Civello et alii (1995), who gave 30 °C as the optimum for the cationic isoperoxidase of strawberry.

Kinetic parameters K_M and V_{max}

In the system guaiacol : hydrogen peroxide the K_M for guaiacol was estimated as 20.28×10^{-3} M and for hydrogen peroxide as 12.75×10^{-3} M. V_{max} was estimated as 8,210 U / ml and 11,635 U / ml, respectively for guaiacol and hydrogen peroxide in this system. Determining the two parameters in a system with p-phenylenediamine and hydrogen peroxide, K_M was estimated as 3.62×10^{-3} M for the first and 1.85×10^{-3} M for the second. V_{max} was estimated as 15,937 U / ml for p-phenylenediamine and 19,702 U / ml for hydrogen peroxide (Table 2). The relation V_{max} / K_M shows that p-phenylenediamine was the preferred substrate for anionic isoperoxidase A2 from carambola (Table 2). Silva

(1987) related a K_M of 3.07×10^{-3} M for soluble and 7.40×10^{-3} M for bound peroxidases of papaya, using guaiacol as substrate. For p-phenylenediamine the values reported were 10.0×10^{-3} M and 7.2×10^{-3} M, respectively. These data were very different from our findings for the anionic carambola isoperoxidase. Our findings for the ratio V_{max} / K_M for p-phenylenediamine were comparable to those related by Silva (1987) for o-dianisidine and the soluble peroxidase from papaya.

REFERENCES

- ANDREWS, P. (1965) The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. Biochemical Journal, 96 (), 595-605.
- CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. (1987) Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valência, 27 (4), 509-518.
- CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. (1995) Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, American Chemical Society, 43 (10), 2596-2601.
- CLEMENTE, E. (1996) Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP, SBCTA, 16 (1), 1-5.
- DAVIS, B. J. (1964/65) Disk Electrophoresis - II Method and Application to Human Serum Proteins. Annals of the New York Academy of Science, New York, , 121 (), 404-427.
- FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. (1985) Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. Sciences des Aliments, Paris, 5 (2), 217-232.

- GOVE, J. P. and HOYLE, M. C. (1975) The Isozymic Similarity of Indolacetic Acid Oxidase to Peroxidase in Birch and Horseradish. Plant Physiology, Waltham / Bethesda, American Society of Plant Physiologists, 56 (4), 684-687.
- HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. (1998) Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Influência de Aditivos na Extração da Enzima. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15 a 17 de julho de 1998, Anais, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nº 580, CD-ROM.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1993) Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, Oxford, 46 (1), 61-64.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford, 49 (4), 407-410.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, London, 227,(8), 680-685.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, 193, 265-275.
- McLELLAN, K. M. & ROBINSON, D. S. (1984) Heat Stability of Peroxidases from Orange. Food Chemistry, Oxford, 13, (2), 139-147.
- MARIN, M. A. and CANO, M. P. (1992) Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. Journal of Food Science, Chicago, IFT, 57 (3), 690-692, 734.
- MATHEIS, G. and WHITAKER, J. R. (1984) Modification of Proteins by Polyphenol Oxidase and Peroxidase and their Products. Journal of Food Biochemistry, Westport, Food & Nutrition Press, Inc., 8 (3), 137-162.

- MATHEIS, G. and WHITAKER, J. R. (1987) A Review: Enzymatic Cross-Linking of Proteins Applicable to Foods. Journal of Food Biochemistry, Westport Food & Nutrition Press, Inc., 11 (4), 309-327.
- MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1989) The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 24 (3) 269-275.
- MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1987) Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 22(4), 391-397.
- MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1988) Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 23 (4), 343-351.
- RICHARD, F. and NICOLAS, J. (1989) Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. Sciences des Aliments, Paris, 9(2), 335-350,
- ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. (1989) The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 24 (6), 613-618.
- SILVA, E. da (1987) Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Doctor Thesis, 127 pp.: University of São Paulo, São Paulo.
- SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. (1990) Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, Pergamon Press, 29 (4), 1051-1056.

- SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. and OGURA, N. (1991) Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 55 (6), 1677-1678.
- TOIGUCHI, S.; HAYASHI, K.; ADACHI, Y.; MOTOKI, M. and HARAGUCHI, K. (1989) Purification and Characterization of Soybean Oxidase. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, Japanese Society of Food Science and Technology, Tokyo, 36 (7), 597-602.
- WHITAKER, J. R. (1963) Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. Analytical Chemistry, -/[35 (12), 1950-1953.

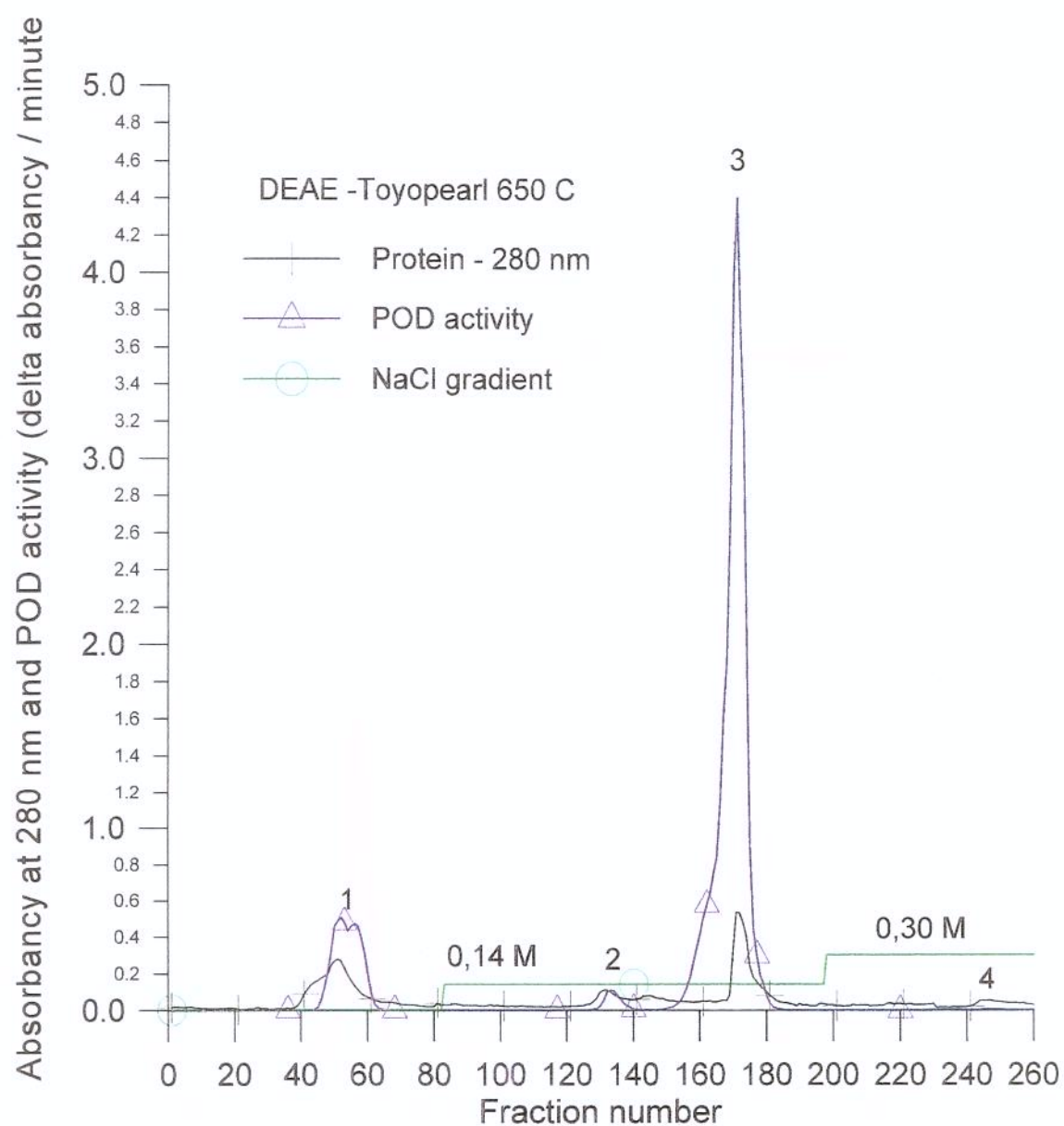


FIGURE 1: Purification of peroxidase from carambola on first DEAE Toyopearl 650 C column. Active POD peaks are numbered from 1 to 4.

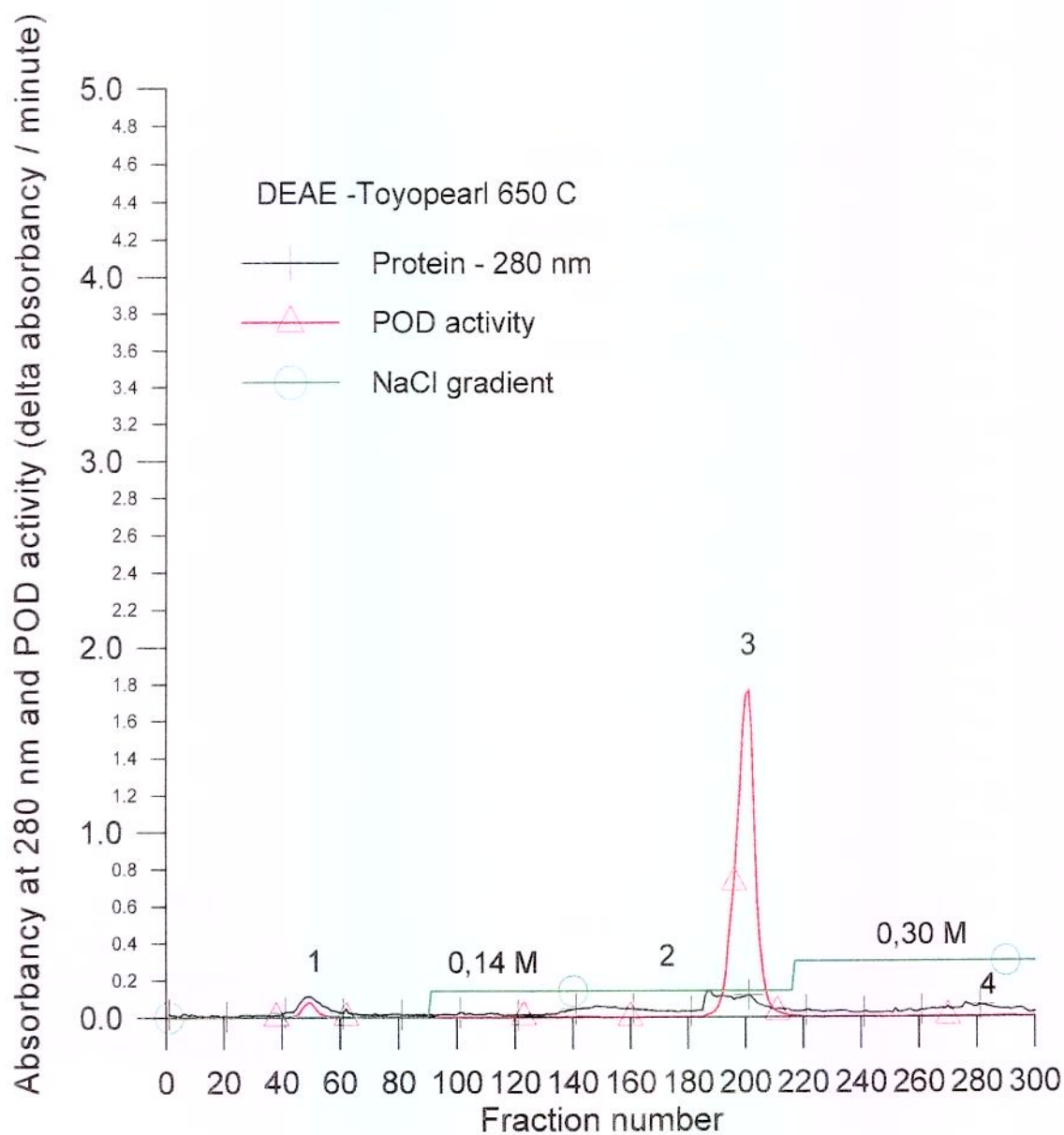


FIGURE 2: Purification of peroxidase from carambola on second DEAE Toyopearl 650 C column. Protein peaks are numbered from 1 to 4.

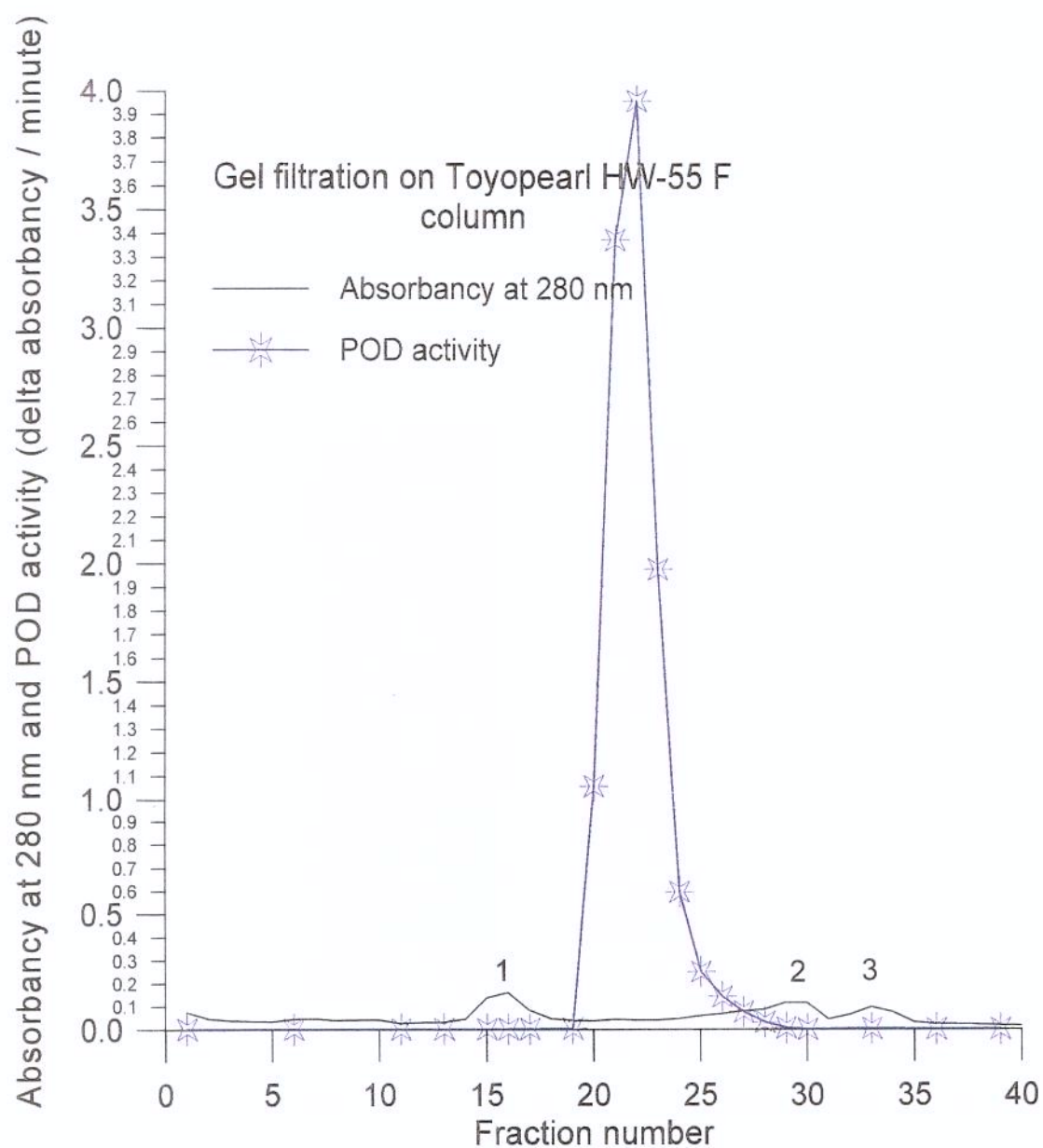


FIGURE 3: Purification of isoperoxidase A2 on Toyopearl HW-55 F gel filtration column.

Protein peaks are numbered from 1 to 3.

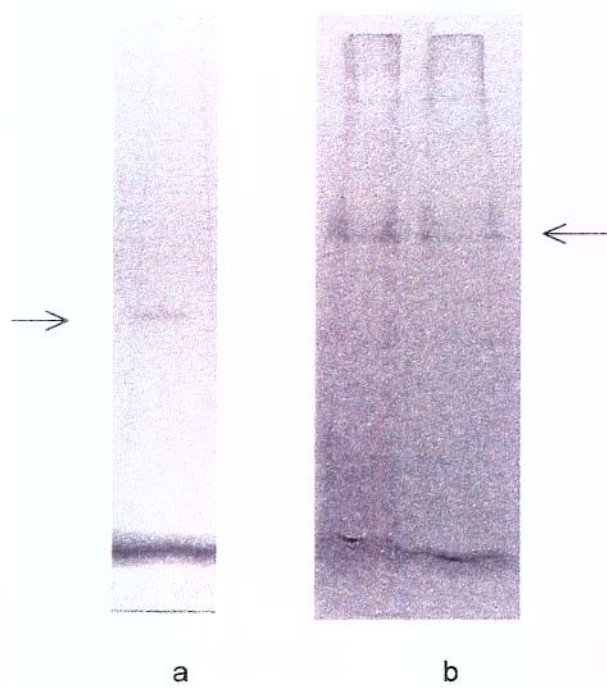


FIGURE 4: Native PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of the purified anionic isoperoxidase. The arrows indicate the POD-band in a and protein-band in b.

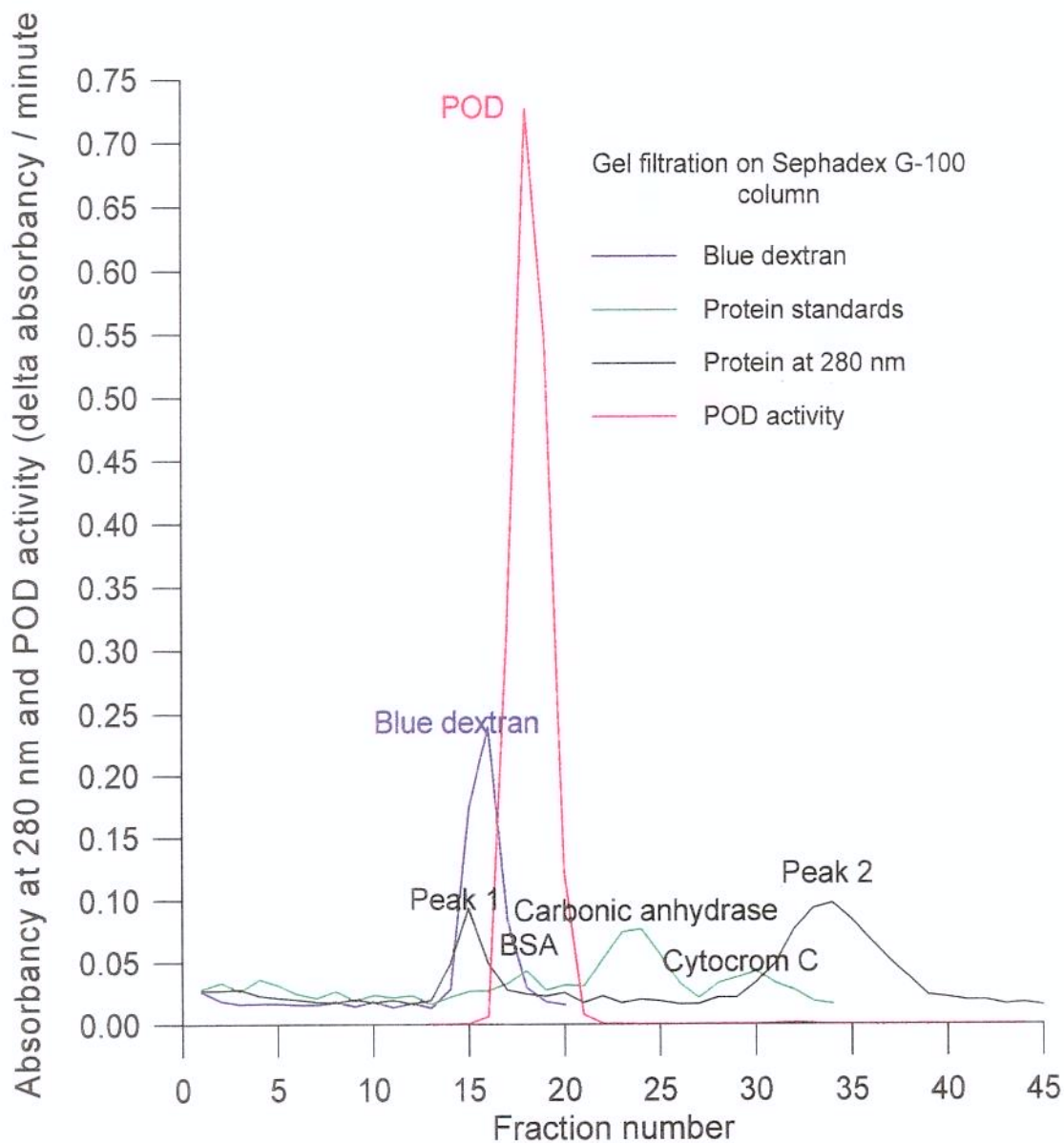


FIGURE 5: Outline of gel filtration chromatography on Sephadex G-100 for the molecular weight determination.

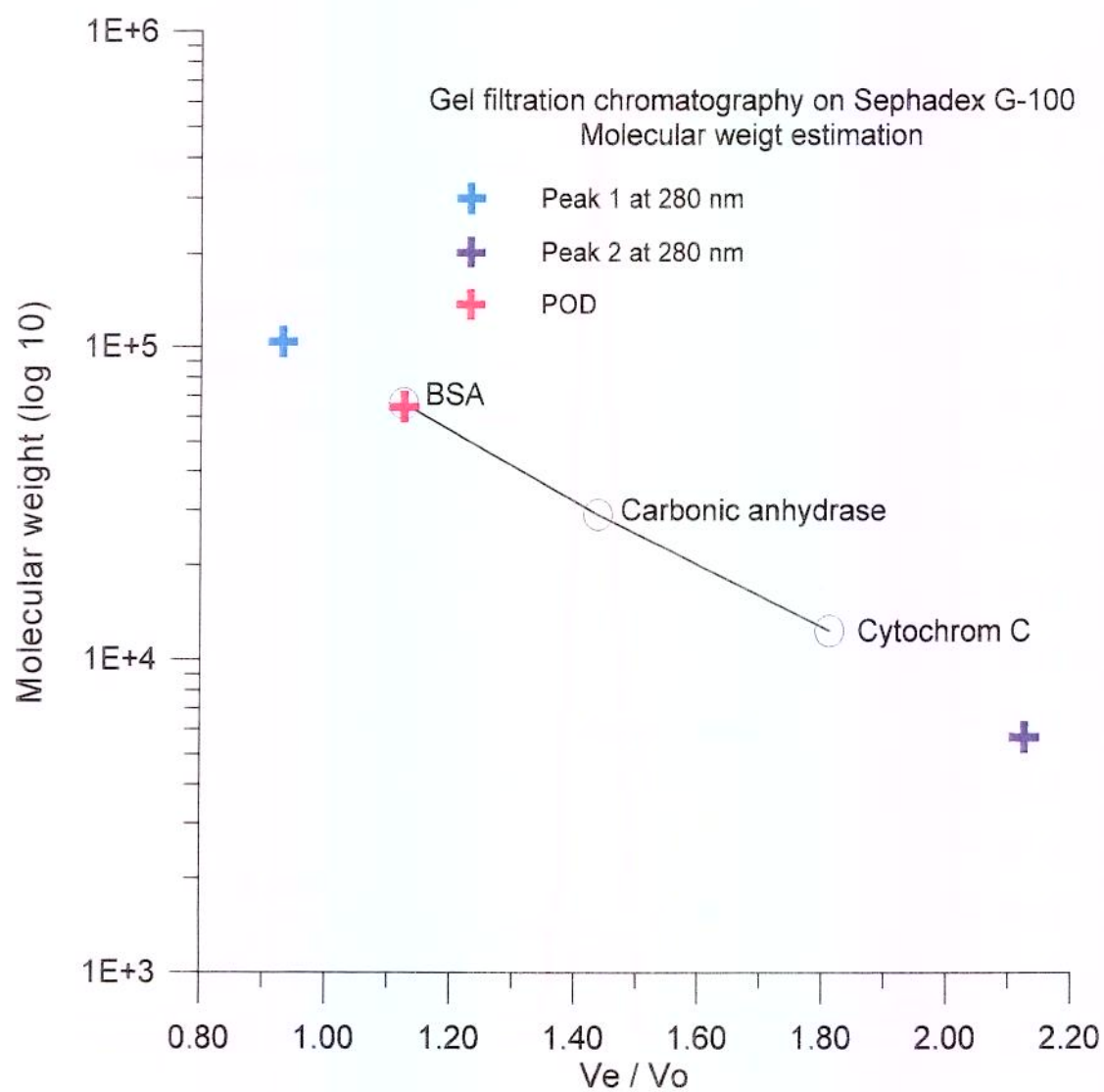


FIGURE 6: Molecular weight estimation of an anionic isoperoxidase from carambola

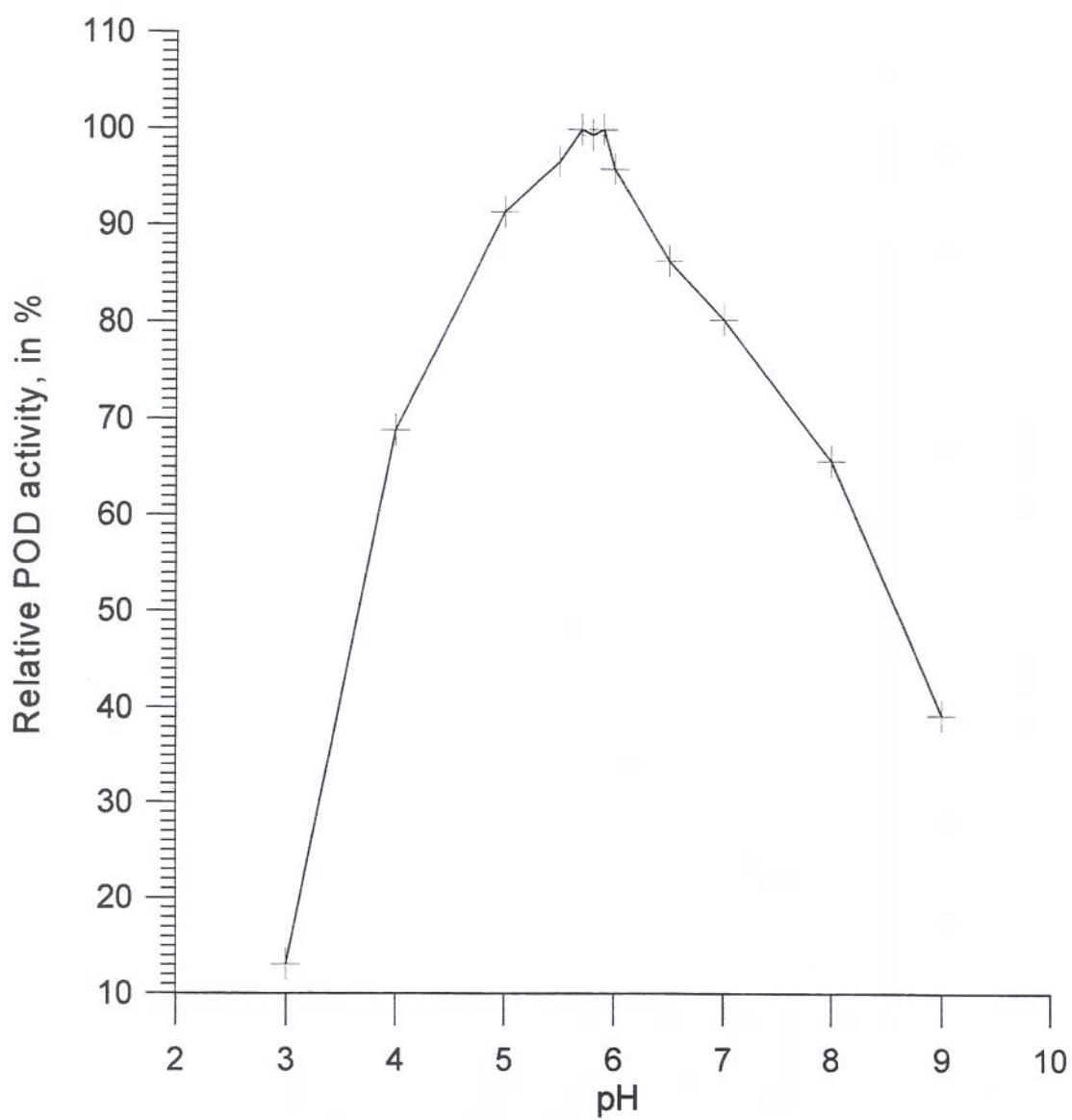


FIGURE 7: Optimum reaction pH of the anionic isoperoxidase A2 from carambola

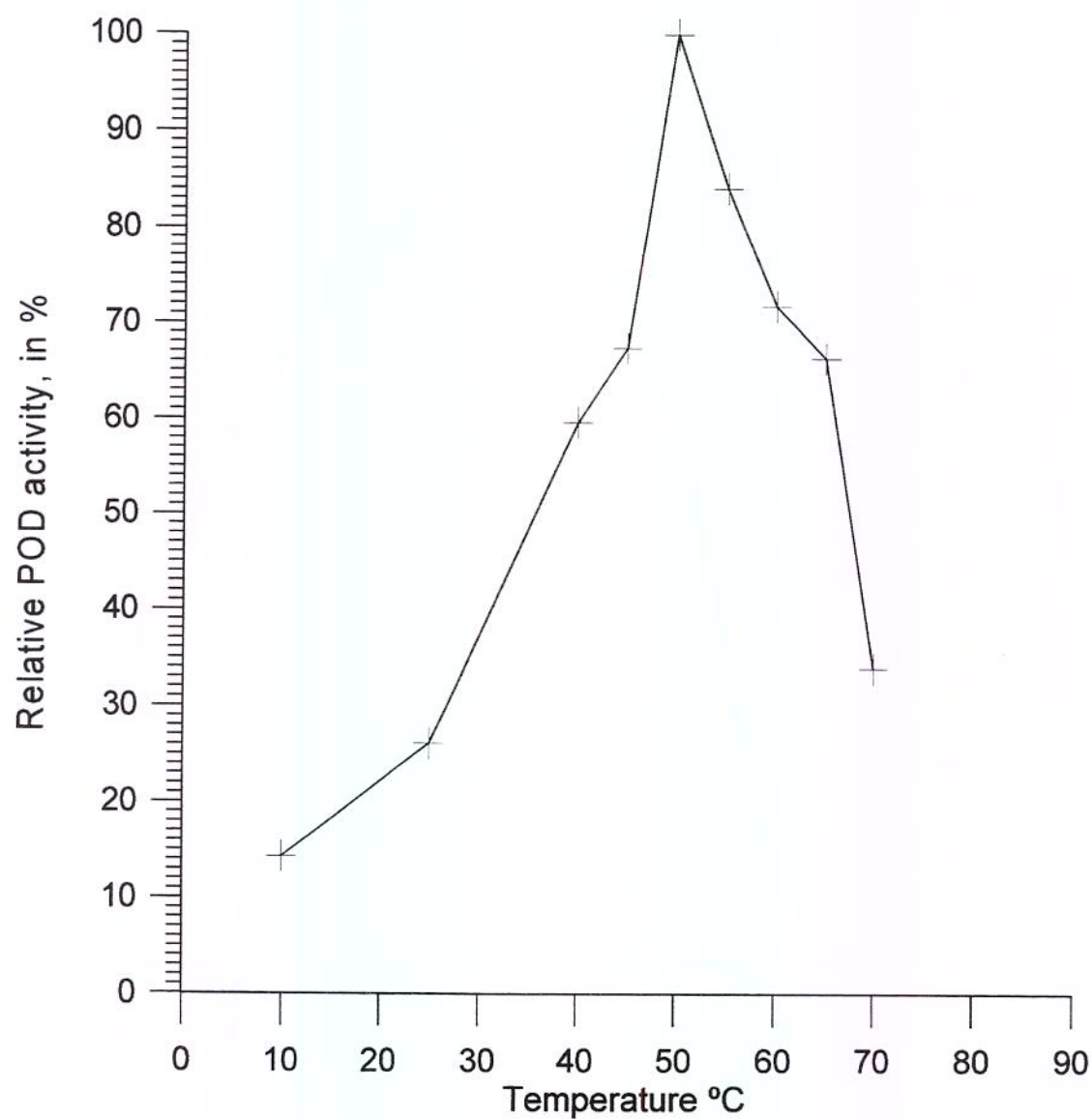


FIGURE 8: Optimum reaction temperature of the anionic isoperoxidase A2 from carambola

TABLE 1.
PURIFICATION STEPS AND YIELD OF CARAMBOLA PEROXIDASE.

Purification step	Quantity	POD activity U/ml	Total activity U x 10 ³	Protein mg/ml	Specific activity U/mgprotein	Yield (%)	Purification factor
Carambola	626.500g						
Supernatant	2,300 ml	10,640	24,472.00	2.034	5,207.01	100.00	1
Acetone powder	17.89g	1,291,290	23,099.80	1.068	132,827.86	94.32	25.51
Acetone powder add to Column 1	1g in 8.1 ml	141,900	20,562.59	1.068	132,827.86	94.32	25.51
Pool 1 freeze dried	4.0 ml	44,420	3,178.70	0.987	45,018.75	14.53	8.65
Pool 2 freeze dried	4.0 ml	16,660	1,192.19	0.309	54,073.35	5.47	10.38
Pool 3 freeze dried	4.0 ml	137,550	9,843.08	0.335	411,087.87	45.15	78.95
Pool 4 freeze dried	4.0 ml	3,565	255.11	0.102	34,916.75	1.17	6.71
Pools 1 to 4 applied to column 2	12.0 ml	7,530	14,469.07	0.422	17,860.53	66.37	3.43
Pool 1 freeze dried	6.5 ml	2,613	303.86	0.207	12,623.19	1.39	2.42
Pool 3 freeze dried	6.5 ml	40,250	4,680.47	0.126	320,206.84	21.47	61.50
Pool 3 applied to column 3	5.0 ml	40,250	3,600.36	0.126	320,206.84	22.86	61.50
Pool eluted	30.0 ml	6,610	3,547.59	0.012	555,833.33	14.50	106.26

Observation: The pool numbers were maintained throughout the purification scheme, so pools 2 and 4 eluted from column 2 without POD activity (Figure 2).

TABLE 2.

ESTIMATED K_M E V_{MAX} VALUES FOR THE SYSTEMS GUAIACOL : HYDROGEN PEROXIDE AND P-PHENYLENEDIAMINE : HYDROGEN PEROXIDE OF PURIFIED ANIONIC CARAMBOLA PEROXIDASE.

Substrate	K_M	V_{max}	V_{max} / K_M
Guaiacol	20.28 mM	8,210 U / ml	404.83 U/ml•mM
hydrogen peroxide	12.75 mM	11,635 U / ml	912.55 U/ml•mM
p-Phenylenediamine	3.62 mM	15,937 U / ml	4.402.49 U/ml•mM
hydrogen peroxide	1.85 mM	19,702 U / ml	10.649.73 U/ml•mM

CAPÍTULO 7

**Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*,
L.):**

Heat and pH stability and inhibition of an anionic isoperoxidase.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Journal of Biochemistry, Westport : Food & Nutrition Press, Inc..

Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.):

Heat and pH stability and inhibition of an anionic isoenzyme.

HEINZ JOHANN HOLSCHUH

Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba,
Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

and

GLÁUCIA MARIA PASTORE

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp,
Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

Running Title: Heat stability, and inactivation of carambola peroxidase

Address: Gláucia Maria Pastore
Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas - SP
CEP 13081-970
Brasil
E-mail: Glaupast@FEA.UNICAMP.BR

ABSTRACT

Thermal and pH stability of a purified anionic isoperoxidase from carambola fruit was determined using temperatures between 0 and 60°C, in buffer solutions between pH 3.0 and 9.0, with pH intervals of 1.0 for 24 hours. For 75°C and boiling temperatures, the treatment times were up to 60 minutes. Different potential inhibitors were added to the reaction mixture at different concentrations. In pH 3.0 buffer, the enzyme activity was inhibited at all time x temperature treatment combinations. Peroxidase was stable for 24 hours at 0°C at pH values from 4.0 to 9.0, and at 25°C from pH 6.0 to 9.0. Inactivation was obtained after 1 hour at pH 6.0 at 75 °C. Under boiling conditions inactivation was achieved at pH 6.0 to 9.0 after 5 minutes. Strong inhibitors of enzyme activity were 0.05mM CuSO₄ (92.7%), 0.1mM KCN (98.8%), 2-mercaptoethanol (99.9%), ferrulic acid (92.4%), sodium metabisulphide (100%) all in 5mM concentration and 10mM Fe₂(SO₄)₃ (98.9%). Strong enhancement of the activity was caused by 5mM CaCl₂ (22.9%).

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, donor : hydrogen peroxide oxidoreductases) are isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. These enzymes are known to be very heat resistant and so peroxidase is used in the food industry as an indicator for optimal heat treatments, enzyme inactivation with minimal organoleptic and nutritional quality modifications. On the other hand, if there is to preserve peroxidase activity for some application, thermal and pH stability will be of interest. No work on the heat and pH stability nor susceptibility to heat or chemical inactivation of the peroxidase from carambola fruit has been reported upto now. Our work examined these aspects for a purified anionic isoperoxidase from carambola.

MATERIAL AND METHODS

Material

Purified anionic isoperoxidase from carambola was obtained purifying the dry acetone precipitate from the supernatant, using anionic exchange chromatography on a DEAE Toyopearl G-250 column (2.5 x 35 cm) twice, followed by gel filtration chromatography on a Toyopearl HW-55 F column (1.5 x 65 cm). The pool of a 106 fold purified enzyme was used for characterization. All reagents were of analytical grade, from Merck or Sigma.

Methods

Heat x pH stability: Aliquots of 0.2 ml of purified anionic isoperoxidase from carambola fruit were diluted to 1.3 ml with buffer in the pH range from 3.0 to 9.0, with intervals of 1.0 pH units, and submitted to heat treatment for 0, 3, 6, 12, and 24 hours in Eppendorf tubes. Heat treatments were carried out at 0, 25, 40, 50, and 60 °C. For the temperatures of 75 ° and boiling (96.8 °C) treatment times were 0, 5, 15, 30, and 60 minutes. The peroxidase activity was determined in 0.2 M potassium phosphate buffer (reaction buffer), pH 6.0 at 50 °C, in a reaction medium of 1.3 ml of treated enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in the reaction buffer and 0.4 ml of 0.1 M hydrogen peroxide solution in the reaction buffer, in a total of 3.2 ml. Increasing absorbancy was measured for 3 minutes at 470 nm in a Beckmann UV/VIS spectrophotometer, series DU-70, and the linear part of the curve used to calculate the peroxidase activity. One unit was defined as the amount of enzyme which caused an increase of 0.001 absorbancy units per minute.

Influence of ions on peroxidase activity

The influence of ions on the peroxidase activity was investigated, replacing 0.2 ml of reaction buffer by the same amount of different ion solutions in the salt form. The concentrations were those to reach 0.05 mM, 0.10 mM, 0.50 mM, 1.0 mM, 5.0 mM, and 10.0 mM, except for potassium cyanide, where a concentration of 0.25 mM was used instead of 10.0 mM in the reaction medium of 3.2 ml. All of them were diluted in the reaction buffer of 0.1 M potassium phosphate, pH 6.0. Peroxidase was determined as described in the pertinent section.

Influence of inhibitors on peroxidase activity

For supposed inhibitory substances, the same molar concentrations were used as for ions, using the same analytical procedures.

Determination of peroxidase activity

The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction was started with the addition of 0.1 ml of enzyme solution to the reaction mixture containing 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, and 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer giving a total of 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, series DU-70. The activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The result was given as the delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the quantity of enzyme which caused an increase in 0.001 absorbancy units per minute at 470 nm with guaiacol or at 485 nm with p-phenylenediamine as H^+ donors.

RESULTS AND DISCUSSION

Heat and pH stability

The anionic isoperoxidase from carambola fruit, submitted to heat treatment at 0 °C was stable for 24 hours in all pH solutions tested, except pH 3.0, in which the residual activity decreased rapidly to a level below 30% after 3 hours (Figure 1). At 25 °C, enzyme

activity was stable for 24 hours at pH 6.0 to 9.0, with residual activities higher than 80%. In the other pH solutions a gradual reduction of activity was observed with decreasing pH. In solutions at pH 3.0 the peroxidase activity was nearly zero after 3 hours (Figure 2). Only pH 7.0 demonstrated stability for peroxidase activity at 50 °C, for 24 hours. In solutions at pH 6.0, 8.0 and 9.0, about 30% residual activity was retained after 24 hours and all other pH values resulted in inactivation after 3 hours (Figure 3). At 75 °C anionic isoperoxidase from carambola was stable at pH 8.0 and 9.0, for 15 minutes and pH 6.0 retained 55% of the initial activity. Inactivation was achieved at pH 3.0 after 15 seconds, pH 4.0 and pH 5.0 after 5 minutes, and pH 6.0 after 1 hour (Figure 4). Anionic isoperoxidase from carambola was inactivated by treatment at boiling temperatures (96.8 °C) after 15 seconds at pH 3.0, 1 minute at pH 4.0 and 5.0 and after 5 minutes at all other pH values (Figure 5). Analysing the results from the pH point of view, at pH 3.0 the anionic isoperoxidase from carambola was unstable at all treatment temperatures (Figure 6). In pH 6.0 solutions, stability was found at 0 and 25 °C for 24 hours and at 40 °C for 12 hours (Figure 7), whereas at pH 9.0, stability occurred at 0, 25 and 40 °C for 24 hours. At 50 °C only 30% of the activity was retained after 24 hours and 60 °C nearly inactivated the peroxidase activity in 12 hours at this pH (Figure 8). The findings of Civello et alii (1995) of good stability for cationic peroxidase from strawberry fruit in the pH range from 4.0 to 11.0, for 30 minutes at 20 °C, are in good agreement with our findings at 25 °C for pH 4.0 to 9.0. Lourêngo and Neves (1997) reported that soluble peach peroxidase suffered no loss in activity at pH 3.0 to 8.0 for 2 hours at 30° C, like our isoperoxidase at pH 5.0 to 9.0. The instability of peroxidases at pH values below 4.0 may be due to the loss of the heme-group under these conditions (Burnette 1977), a possible reason for the loss of activity of the anionic isoperoxidase from carambola fruit at pH 3.0. Khan and Robinson (1993) reported greater heat stability for ionically bound peroxidase than for

soluble peroxidase from mango 'chaunsa' in the initial stages of heat treatments at 60, 65, 70, 75 and 80 °C, but after 2 minutes, only 10 and 15 % of the initial activity was found for soluble and bound peroxidase, respectively, both lower in activity than our findings for the anionic isoperoxidase of carambola, which was stable at 75 °C for 5 minutes at pH 6.0, still retaining 55 % of its initial activity after 15 minutes under the same conditions.

Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the activity of anionic isoperoxidase from carambola

The addition of Indole-3-acetic acid (IAA) to the reaction medium caused little inactivation: 7.3 % at a concentration of 5.0 mM (Table 1). The highest inactivation was obtained using 5 mM of ferrulic acid, retaining only 7.6 % residual activity, followed by caffeic acid (24.2 %) and p-coumaric acid with 51.9 % residual activity (Table 1). Prabha and Patwardhan (1986) reported an activation effect of 248 for p-coumaric acid, 700 for caffeic acid and 1500 for ferrulic acid on the peroxidase activity of mango pulp, contrary to our findings of inactivation of our anionic isoperoxidase from carambola with the same reagents. Silva (1987) reported that 0.16 μ M of ferrulic acid inhibited 96 % of the soluble and ionically bound peroxidase activity from papaya, showing a much higher efficiency than in our findings with the anionic isoperoxidase from carambola.

Influence of ions on the anionic isoperoxidase activity of carambola

Strong inactivation was caused by potassium cyanide (KCN): 0.1 mM resulted in 1.2 % of residual activity (Table 2), an indication of a heme group at the active site.

Copper sulphate inhibited the anionic isoperoxidase more than KCN: the same concentration causing negative results, explained by the clarification of the reaction mixture (Table 2). The addition of 10 mM potassium chloride (KCl) resulted in 94.6 % and the same amount of sodium chloride (NaCl), 87.9 % of residual activity. NaCl in 0.1 mM concentration resulted in 6.3 % activation (Table 2). Magnesium sulphate (MgSO_4) demonstrated an activation effect up to 1 mM (8.8%) and inactivation of 7.3 % in 10 mM concentration (Table 2), whereas manganese sulphate (MnSO_4) showed an activation effect of 6.4 % at a concentration of 5 mM and inactivation effect of 59.5 % at a concentration of 10 mM (Table 2). Light inactivation of 4.8 % was caused by Iron (III) sulphate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) up to 1 mM, and a heavy inactivation of 98.9 % by a concentration of 5 mM. The Fe^{+++} ion may be oxidized to Fe_2O_3 by hydrogen peroxide, clarifying the reaction solution by precipitation. Calcium chloride demonstrated an activation influence of 22.9 % at a concentration of 5 mM and an inhibition effect of 21.2 % at a concentration of 10 mM, whereas sodium sulphate demonstrated no influence on the activity (Table 2). Silva (1987) indicated 60% inhibition of soluble and 80% inhibition of bound peroxidase from papaya by 0.16 μM KCN, much stronger inhibition than our findings for the anionic isoperoxidase from carambola. The same author reported 60 % inhibition caused by 4.0 μM sodium sulphate and no inhibition by 1.0 μM of copper sulphate, manganese sulphate or calcium chloride, whereas Lourenço and Neves (1997) related 89.5 % of inhibition by ferrous sulphate, 12.4 % by calcium chloride, 8.5 % by manganese sulphate, 6.5 % by sodium chloride and 12.0 % by sodium sulphate, all at a concentration of 10 mM, for the peroxidase from peach, these results being very different from ours for the anionic isoperoxidase from carambola.

Sodium dodecyl sulphate (SDS) showed increasing inactivation with increasing concentration up to 25.5 % at a concentration of 5.0 mM (Table 3). Nearly total inhibition was caused by 2-mercaptoethanol at the same concentration, indicating the rupture of disulphide bonds and disorganization of the enzyme molecule. p-Mercuribenzoate is known to react with cysteiy groups, so the inactivation of 31.9 % by a concentration of 5 mM and 72.7 % by a concentration of 10 mM may signify that such groups participates in the stabilization of the enzyme. N-bromosuccinimide inhibited 69.9 % of the activity at a concentration of 5 mM. This reagent reacts with cysteiy, tyrosyl and histidyl groups, so the inactivation may be due to one or more of these groups being involved in the catalytic or binding site or in the stabilization of enzyme conformation. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is a well known chelating agent and caused 16.4 % inhibition at a concentration of 5 mM (Table 3). The antioxidants sodium metabisulfite and L-ascorbic acid, each at a concentration of 5 mM, inhibited 100 % and 65 % of the enzyme activity, respectively (Table 3). Silva et alii (1990), reported 51 % and 19 % inhibition for soluble and bound peroxidase from papaya in a 1 mM solution of o-chloromercuribenzoate, whereas Lourenço and Neves (1997), studying peach peroxidase, found inhibition of 6.5 % by p-chloromercuribenzoate in a 1 mM solution.

REFERENCES

- BURNETTE, F. S. (1977) Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science : Chicago, IFC, 42 (1), 1-6.
- CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. (1995) Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, American Chemical Society, 43 (10), 2596-2601.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1993) Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, 46 (1), 61-64.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, 49 (4), 407-410.
- LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. (1997) Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, SBCTA, 17 (1), 42-48.
- PRABHA, T. N. and PATWARDHAN, M. V. (1986) In Vitro Effect of Polyphenols on Some Enzyme Systems. Acta Alimentaria, Akadémiai Kiadó, Budapest, 15 (2), 129-135.
- SILVA, E. da (1987) Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Doctor Thesis, 127 pp.: University of São Paulo, São Paulo.
- SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. (1990) Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, Pergamon Press, 29 (4), 1051-1056.

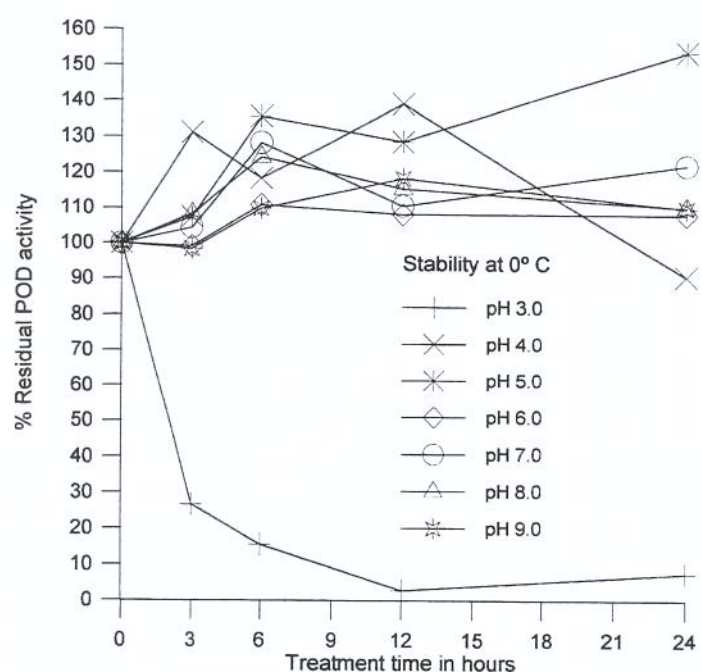


FIGURE 1: Peroxidase stability at 0 °C

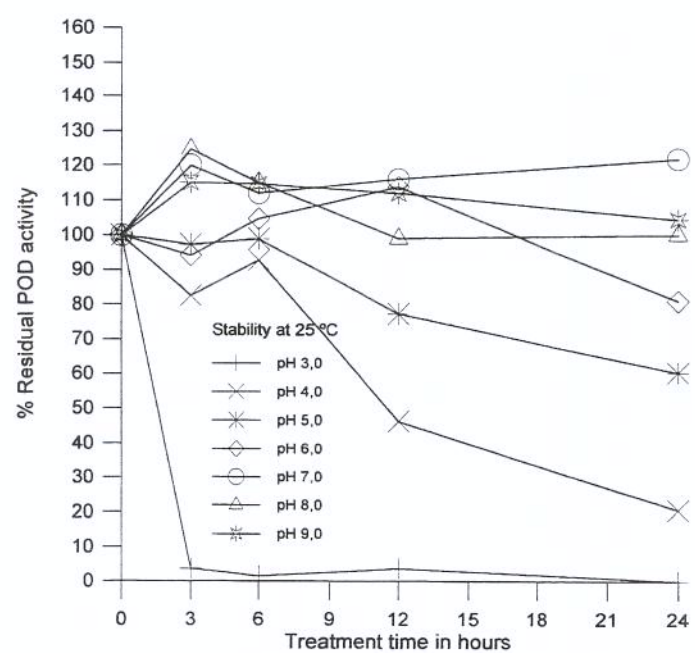


FIGURE 2: Peroxidase stability at 25 °C

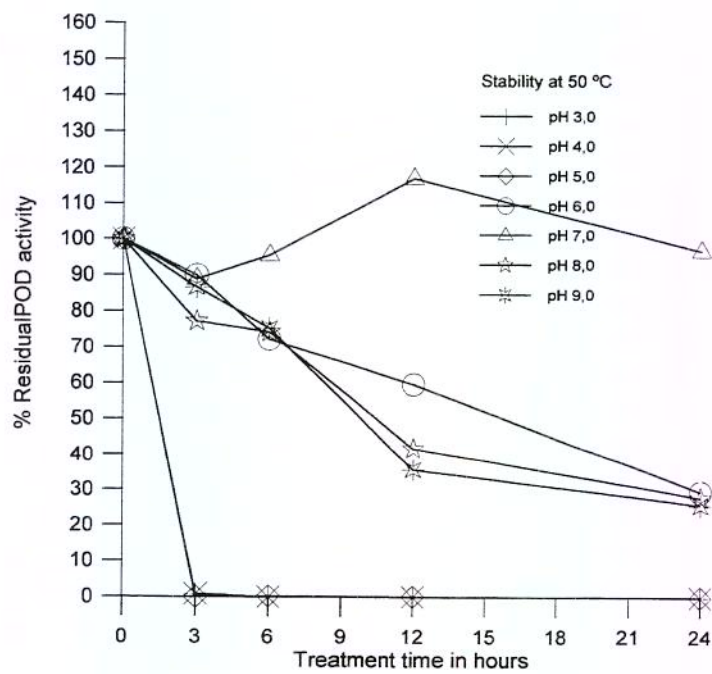


FIGURE 3: Peroxidase stability at 50 °C.

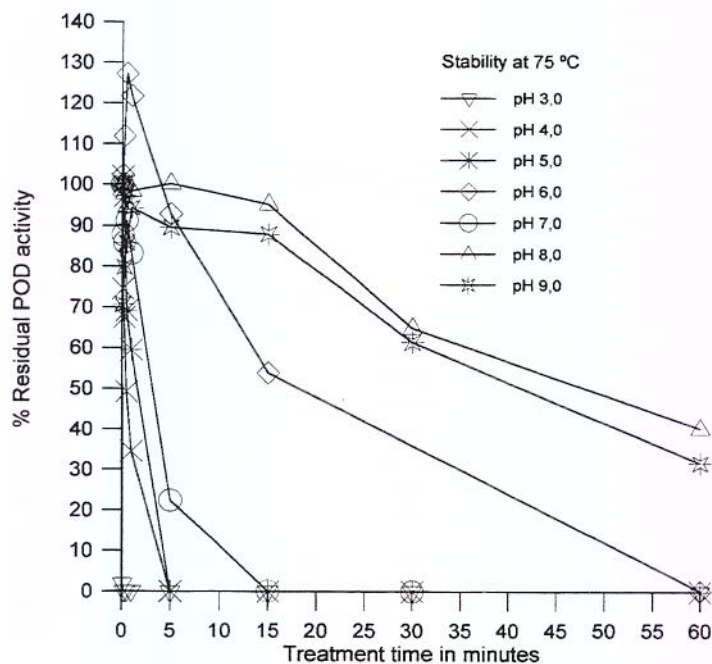


FIGURE 4: Peroxidase stability at 75 °C

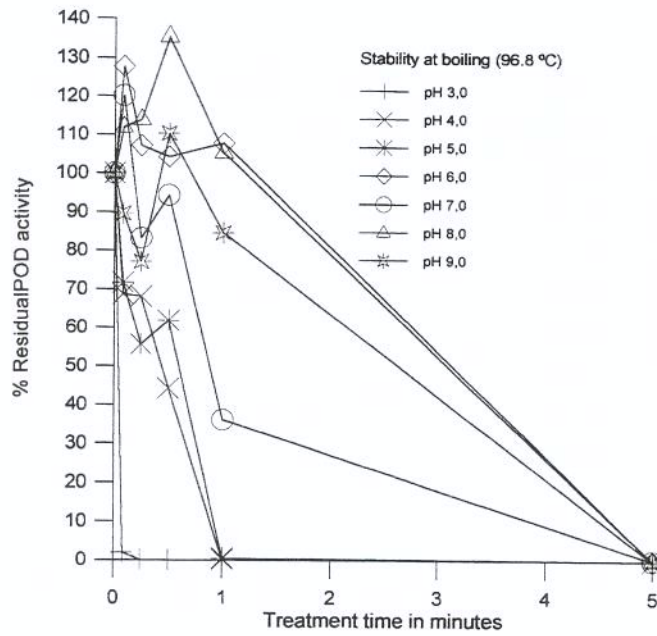


FIGURE 5: Peroxidase stability at boiling temperature (96.8 °C)

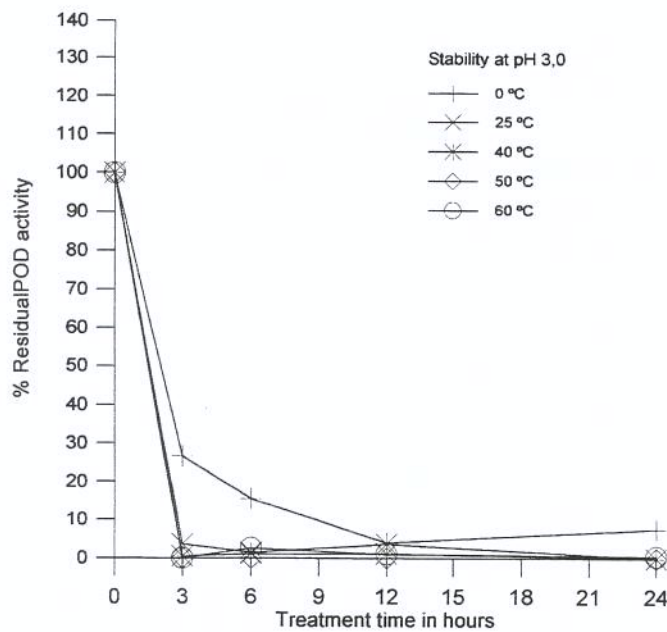


FIGURE 6: Peroxidase stability at pH 3.0

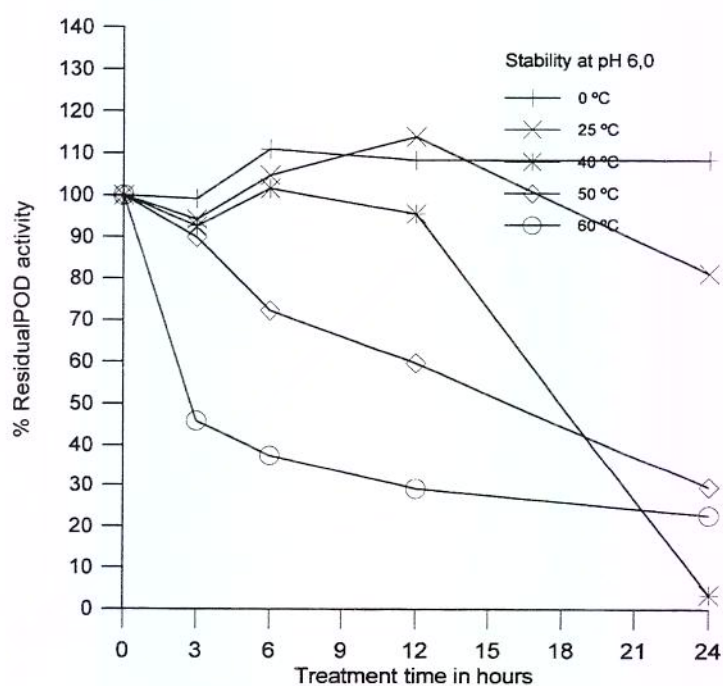


FIGURE 7: Peroxidase stability at pH 6.0.

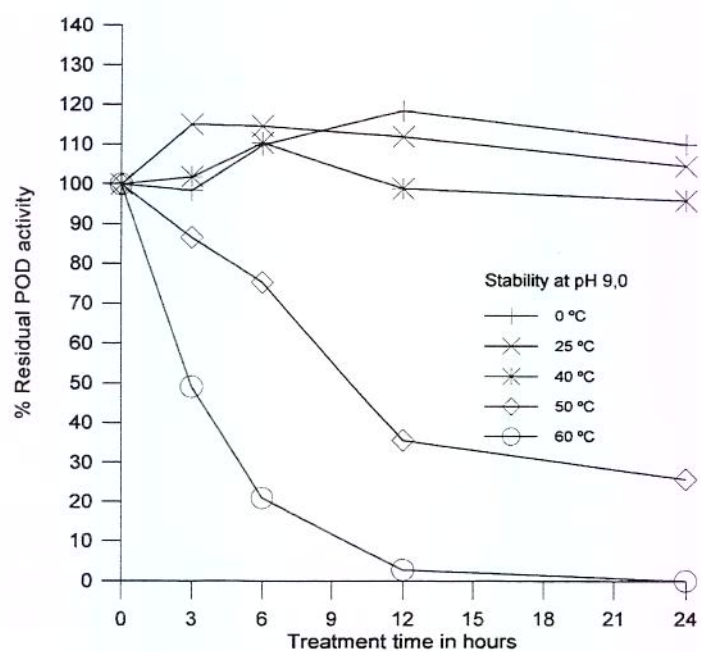


FIGURE 8: Peroxidase stability at pH 9.0

Table 1

Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the anionic carambola isoperoxidase, expressed in residual activity

Inhibitor	% Residual POD activity					
	Inhibitor concentration in mM					
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00
IAA	100	91.8	98.9	92.2	95.7	95.9
caffeic acid	100	70.5	50.8	21.8	23.2	24.2
p-coumaric acid	100	92.9	93.3	88.8	77.3	51.9
ferrulic acid	100	68.8	41.8	17.0	12.9	07.6

Table 2

Influence of ions on the anionic carambola isoperoxidase activity

Ion	% Residual POD activity						
	Ion concentration in mM						
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
Potassium cyanide	100	22.0	1.2	-	-	-	-
Potassium chloride	100	99.9	98.1	99.3	98.1	99.0	94.6
Sodium chloride	100	100.3	106.3	100.0	99.7	104.2	87.9
Copper sulphate	100	7.3	-5.3	-15.6	-0.6	-85.5	-
Magnesium sulphate	100	96.4	103.4	100.6	108.8	106.1	92.7
Manganese sulphate	100	97.9	91.9	103.5	99.1	106.4	40.5
Iron ^{III} sulphate	100	98.7	99.6	96.4	95.2	1.1	-4.5
Calcium chloride	100	101.0	107.4	99.4	100.2	122.9	78.8
Sodium sulphate	100	90.5	91.6	99.9	103.1	100.9	98.9

Table 3

Influence of inhibitors, antioxidants and chelating agents on the anionic carambola
isoperoxidase activity

Inhibitor	% Residual POD activity						
	Inhibitor concentration in mM						
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
Sodium dodecyl							
sulphate (SDS)	100	97.8	101.6	84.8	80.9	74.5	-
4-chloromercuri-							
benzoate	100	101.5	100.1	96.4	95.7	68.1	27.3
2-mercaptoethanol	100	76.7	64.4	15.4	6.4	0.1	0.2
N-bromosuccinimide	100	100.6	99.6	95.3	91.7	30.1	-
Sodium							
metabisulfide	100	62.3	73.7	68.8	62.9	0.0	-
L-ascorbic acid	100	99.0	95.6	85.5	109.4	37.3	47.9
Ethylenediamine-							
tetraacetic acid	100	95.4	90.2	89.7	85.8	83.6	88.3

CONCLUSÕES GERAIS

- A localização histoquímica mostrou que a peroxidase de carambola está mais concentrada junto aos feixes vasculares, ao talo central e ao gineceu, portanto ligada a tecidos mais fibrosos. Em carambolas sobremaduras houve extravazamento do tetraguaiacol, produto da reação da peroxidase com guaiacol e peróxido de hidrogênio, para o meio reativo, indicando a presença de maior quantidade de peroxidase solúvel. A extração da peroxidase de partes da fruta confirmou esses resultados: o talo central com gineceu demonstrou a maior atividade, seguido pela casca; a polpa só teve atividade expressiva em carambolas sobremaduras.
- O melhor tampão para extração da peroxidase de carambola foi tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0.
- O melhor meio de reação da peroxidase bruta (sobrenadante) foi tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5 e a temperatura ótima foi 50 °C.
- A adição de 2% polietilenoglicol (PEG), 0,01 M ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e 0,2 M de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao tampão de extração (fosfato de potássio, 0,2 M, pH 8,0) trouxe o melhor rendimento de extração por grama de carambola.
- No estudo de precipitação da peroxidase, a adição de sulfato de amônio a 90% da saturação preservou 49,7 % da atividade inicial enquanto que a adição de 65 % de acetona preservou cerca de 46,9 %. O estado físico da enzima foi líquido no caso do sulfato de amônio e pó seco no caso da acetona, fato que nos levou a adotar a precipitação da peroxidase com acetona.
- A temperatura ótima de reação da peroxidase cetônica foi 50 °C, igual a do extrato bruto e o pH ótimo de reação foi na faixa de pH 5,5 a 6,0, em tampão fosfato de potássio 25 mM.
- A peroxidase do extrato cetônico mostrou maior estabilidade em pH 8,0 na faixa de temperatura entre 0 e 60 °C e na faixa de pH 5,0 a 9,0 na temperatura de 40 °C.
- A peroxidase do extrato cetônico de carambola foi inativado em pH 3,0 após 15 minutos de tratamento a 75° C e em pH 7,0 após 30 minutos. A enzima foi inativada após 5 minutos de tratamento térmico de ebulição, em todos os pH.

- A purificação da peroxidase de carambola resultou em 4 isoenzimas, identificadas como C, A1, A2 e A3, de acordo com sua ordem de eluição da coluna de troca aniônica (DEAE Toyopearl G-250, 35 x 2,5 cm). A isoenzima A2, a de maior reatividade, foi purificada com um fator de 106 e rendimento de 14.5 %, após duas passagens pela coluna acima e uma filtração em gel (Toyopearl HW-55 F, 65 x 1,5 cm). PAGE nativa da isoperoxidase A2, corada com p-fenilenediamina e peróxido de hidrogênio, resultou em uma única banda, mas SDS-PAGE, corado com sais de prata, resultou em uma banda forte e outras tênues, que desapareceram ao interromper a coloração com ácido cítrico. Concluímos que a isoperoxidase A2 de carambola não foi totalmente purificada.
- As condições ótimas de reação da isoperoxidase A2 de carambola foram pH 5,7 a pH 5,9 a 50 °C.
- A isoperoxidase A2 foi estável durante 24 horas a 0°C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25° C na faixa de pH 6,0 a 9,0.
- Inativação da isoperoxidase A2 foi verificada após 1 hora de tratamento a 75 °C em pH 6,0 em e após 5 minutos de tratamento em temperatura de ebulição na faixa de pH 6,0 a 9,0. Nos demais valores de pH, a inativação foi mais rápida em ambas as temperaturas.
- A isoperoxidase A2 de carambola mostrou maior afinidade em relação a p-fenilenediamina, se comparada com guaiacol. A eficiência da enzima ($V_{\max} / K_M$) foi 404,8 U/ml•mM e 4.402,5U/ml•mM para guaiacol e p-fenilenediamina, respectivamente. Dentro de cada sistema de reação, a eficiência maior foi para o peróxido de hidrogênio, seu substrato primário: 912,6 U/ml•mM com guaiacol e 10.649,7 U/ml•mM com p-fenilenediamina.
- Os compostos CuSO_4 (0,05 mM), KCN (0,1 mM), 2-mercaptoetanol (5 mM), ácido ferrúlico (5 mM), metabisulfito de sódio (5 mM) e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (10 mM) inibiram respectivamente 92,7 %, 98,8 %, 99,9 %, 92,4 %, 100 % e 98,9 % a isoperoxidase A2 de carambola.
- O cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração 5 mM ativou a peroxidase purificada cerca de 22,9 %.



FIGURA 1: Carambola (*Averrhoa carambola*, L.)¹

¹ Foto Reginaldo

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PEROXIDASES

Peroxidase (POD, E.C. 1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxido-redutase) é encontrada nos reinos animal, em fungos e é universalmente distribuída no reino vegetal. Nos vegetais, a peroxidase pode ser encontrada em todas as partes: em *Nicotiana tabacum* 47 (quarenta e sete) isoperoxidasas foram isoladas de diversas partes da planta (Kay & Basile, 1987).

Estrutura molecular de peroxidases

Poucas peroxidases tiveram a sua estrutura molecular ou cristalina elucidadas: peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase" - HRP) (Welinder et alii, 1972; Welinder & Smillie, 1972; Welinder, 1973; Mauk & Girotti, 1974; Welinder & Mazza, 1975 e 1977; Welinder, 1976, 1979 e 1985; Haschke & Friedhoff, 1978; LaMar et alii, 1980; Hashimoto et alii, 1986; Shiro et alii, 1986 e Kuo & Fridovich, 1988); peroxidase de rabanete (Welinder & Mazza, 1975 e 1977); citocromo C peroxidase de levedura (Poulos et alii, 1980 e Finzel et alii, 1984) e peroxidase de amendoim (Schuller et alii, 1996).

Peroxidase de raiz forte (horseradish) e de rabanete

A peroxidase mais estudada é a extraída da raiz forte (*Armoracea lapathifolia*, Gilib.), conhecida na literatura inglesa como "horseradish" peroxidase (HRP). Welinder et alii (1972) encontraram oito resíduos de cistina na análise de aminoácidos após oxidação com ácido perfórmico em HRP comercial. A enzima foi considerada homogênea após cromatografia em CM-celulose, eletroforese de disco em gel realizada com tampões ácidos e alcalinos, micro-eletrofocalização em sacarose em gradientes de pH 3-10 e análises de aminoácidos e de hexosaminas. Como os autores não encontraram nenhuma S-carboximetilcisteína após tratamento da proteína em 8 M uréia, concluíram que HRP contém 4 pontes de dissulfeto. Na análise das seqüências dos peptídeos obtidos após digestão da proteína livre de heme por tripsina, 21 destes foram completamente e 3 parcialmente seqüenciados. Vários sítios de ligação de carboidratos foram observados. Em outra parte do estudo de seqüenciamento dos aminoácidos da HRP, Welinder &

Smillie (1972) analisaram 120 peptídeos obtidos com termolisina, seguido de fracionamento em coluna Sephadex G-25, e eletroforese de papel de alta voltagem. As seqüências ao redor das quatro pontes de dissulfeto, dos três resíduos de histidina e do único resíduo de triptofano foram elucidados. Welinder (1973) relatou o seqüenciamento de um dos peptídeos, confirmando a presença de pontes de dissulfeto e uma alça interna nesse peptídeo entre dois resíduos de cisteína e de cadeias laterais compostos de mais de uma unidade de glucosamina localizadas em resíduos de asparagina.

Mauk & Girotti (1974) relataram que protoporfirina IX combina estequiometricamente na proporção de 1:1 com a apo-isoenzima C de HRP. Após fotoxidação da apoenzima apenas 25% da atividade da enzima nativa foi recuperada quando combinado com protoporfirina IX. Estudos de mapeamento de peptídeos tripticos indicaram que a fotoxidação resultava na subtração de um resíduo histidil e concluíram que os resultados sugerem que o resíduo histidil está localizado no sítio de ligação da HRP-C.

Welinder & Mazza (1975) isolaram 4 isoperoxidasas de rabanete, denominadas de P₁, P₂, P₃ e P₇, submetendo-as à digestão com tripsina. HRP isoenzima C (HRP-C) foi submetida a tratamento idêntico. A eletroforese de papel de alta voltagem e reações com reagentes como ninidrina, histidina, tirosina, triptofano e arginina foram usadas na confecção do mapa de peptídeos. Resíduos de cistina e cisteína também foram determinados. Todos os resíduos de 1/2 cistina pareceram envolvidas em pontes de dissulfeto. As duas isoenzimas mais ácidas de rabanete (P₁ e P₂), diferem entre si em apenas um aminoácido: um resíduo de asparagina foi trocado por um de lisina. A isoperoxidase P₃, menos ácida que P₁ e P₂, se distingue, embora mantenha semelhanças com as duas anteriores. A HRP-C também pertence a esse grupo, principalmente pelas seqüências dos aminoácidos (AA) ao redor das pontes de dissulfeto. A isoperoxidase P₇ de rabanete difere do grupo em relação à seqüência de aminoácidos ao redor de pelo menos duas pontes de dissulfeto e por isso pode ter estrutura tridimensional diferente das demais. Em todas as cinco isoperoxidasas estudadas, apenas duas seqüências foram altamente homólogas, ambas contendo histidina. Este resultado corrobora com o entendimento de haver duas seqüências com histidina próximo ao sítio ativo. A seqüência completa de aminoácidos da HRP foi publicada por Welinder (1976), relatando que a glicoproteína HRP consiste de 308 resíduos de aminoácidos, um grupo heme e oito

cadeias laterais neutras de carboidratos, ligados a resíduos de asparagina. O peso molecular da cadeia polipeptídica foi calculado pela sequência dos aminoácidos em 33,89 kDa e o da molécula de HRP estimada em 40 a 45 kDa. Em publicação subsequente, Welinder & Mazza (1977) relataram que as sequências de aminoácidos das isoperoxidasas P₁, P₂, P₃ e HRP-C contêm dois resíduos de histidina nas posições 40 e 42 do polipeptídeo, enquanto em P₇ o resíduo 40 é fenilalanina. As isoperoxidasas P₁, P₂ e P₃ contêm vários sítios de ligação com carboidratos como a HRP-C, que contêm oito, enquanto P₇ contém apenas um.

Haschke & Friedhoff (1978) relataram que as isoperoxidasas HRP-C e HRP-A de raiz forte contêm 2,0 e 1,4 moles de Ca²⁺ por mol de enzima, respectivamente. O cálcio pode ser removido por tratamento com hidrocloreto de guanidina 6 M e EDTA 10 mM, pH 7-8 durante 4 horas à temperatura ambiente. A readição de Ca²⁺ restituiu a atividade enzimática à HRP-C, mas não à HRP-A. O entendimento do papel do cálcio na estabilização da estrutura conformacional da HRP foi reforçado pela maior termoestabilidade da enzima com cálcio: HRP sem cálcio foi inativada a 58°C em 30 minutos, enquanto HRP nativa manteve 40% de sua atividade após tratamento idêntico.

A isoperoxidase HRP-C domina quantitativamente entre as isoenzimas da Raiz Forte e seu ponto isoelétrico situou-se perto de pH 9 (Welinder, 1979). A enzima consiste de um grupo prostético de heme, dois íons Ca²⁺ e 308 resíduos de aminoácidos, incluindo 4 pontes de dissulfeto em uma única cadeia polipeptídica, apresentou 8 cadeias laterais de carboidratos e peso molecular de 33,89 kDa. O peso molecular da HRP-C nativa, incluindo as cadeias de carboidratos, foi estimado em 44 kDa (Welinder, 1979).

LaMar et alii (1980) investigaram a estrutura eletrônica e molecular do grupo heme em estado de repouso da HRP, usando "High field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy". Marcação com deutério de posição selecionada de hemina e deutériohemina, reconstituídos na apoenzima, resultaram em padrões de deslocamento hiperfino do grupo prostético, consistente com porfirina férrica, exibindo caráter S=3/2 (3 elétrons não pareados) em estado misto de quantum/spin. Todas as ressonâncias resolvidas apontam para a ligação com porfirina e um grupo imidazol próximo (histidina ¹⁷⁰). Uma sexta ligação do Fe³⁺ com a proteína não pôde ser descartada.

Welinder (1985) relatou que as três apoperoxidases conhecidas (HRP-C, peroxidase de rabanete P₇ (TP-7) e citocromo C peroxidase de levedura) contêm 300 ± 8 resíduos de aminoácidos. As seqüências alinhadas mostraram apenas 18% e 16% de identidade entre a citocromo C peroxidase de levedura e HRP-C e TP-7, respectivamente. Mesmo assim uma única origem evolutiva pode ser assumida, pois: a) hélices previstas em peroxidases de plantas seguem o padrão complexo da estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura; b) seus padrões hidropáticos são similares e concordam com as cadeias peptídicas expostas e escondidas em citocromo C peroxidase; c) os resíduos de cistinas distantes na seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica tornam-se vizinhas no modelo da estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura e, d) a estrutura de dois domínios proposta a partir de proteólise limitada de HRP-C é observada na estrutura cristalina da citocromo C peroxidase.

Hashimoto et alii (1986) em estudos de espectroscopia do composto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) da peroxidase de raiz forte concluíram que uma ponte de hidrogênio entre o $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ e um grupo imidazol de histidina próxima tem papel catalítico importante. A ligação foi encontrada em soluções neutras mas não em básicas, fato que pode explicar a inativação da enzima em soluções alcalinas.

Shiro et alii (1986) removeram Ca^{2+} endógeno de HRP, causando alterações substanciais no espectro de próton NMR da enzima em vários estados de oxidação/spin. Os resultados mostraram que o Ca^{2+} tem como função manter a estrutura conformacional da enzima e do grupo heme, como também o estado spin do ferro em favor da atividade da HRP.

Kuo & Fridovich (1988) estudaram o efeito estimulante de compostos nitrogenados na atividade da peroxidase. A HRP teve seu perfil de atividade versus pH alargado com a adição de compostos nitrogenados. Outras peroxidases, como mieloperoxidase, cloroperoxidase, metahemoglobina e microperoxidase, não foram afetadas. A Citocromo C peroxidase foi afetada em menor extensão que HRP na peroxidação de o-dianisidina. A atividade de HRP frente a fenóis não foi afetada por compostos nitrogenados. Os autores concluíram que compostos nitrogenados aumentam o pKa do grupo distal de histidina e assim alarga o perfil de atividade x pH para substratos anilinas como a o-dianisidina. Os fenóis parecem se ligar com pontes de hidrogênio

diretamente ao $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, deslocando a histidina distal e por isso não foram influenciadas por compostos nitrogenados.

Citocromo C peroxidase de levedura

Poulos et alii (1980) determinaram a estrutura cristalina da citocromo C peroxidase de levedura, usando mapa de densidade de elétrons de 2,5 Å computadorizado com fases obtidas de dois derivados isomorfos de mercúrio. A ligação do grupo heme com uma histidina próxima foi confirmada, como também a identificação de resíduos de triptofano, histidina e arginina perto da sexta coordenada do Fe^{3+} . Dez segmentos helicoidais contendo cerca da metade dos resíduos de aminoácidos da enzima são as estruturas mais proeminentes do modelo da enzima, o qual ainda contempla três cadeias β -antiparalelas. A enzima é dobrada em dois domínios claramente definidos e o grupo heme ocupa uma fenda entre a hélice B do domínio I e a hélice F do domínio II, deixando apenas um canto do anel pirrol exposto. A fenda é delimitada por cadeias laterais alifáticas e aromáticas, muitas delas em contato com a heme. Há uma interação adicional, que fixa o grupo heme, entre um dos propionatos do grupo heme e um resíduo de treonina partindo de uma cadeia β -antiparalela. Uma molécula de água serve como ligante na sexta coordenada do grupo heme. O átomo de Fe é deslocado do plano do grupo heme por 0,3 a 0,5 Å em direção a histidina próxima. Mioglobina e citocromo C peroxidase têm semelhanças e divergências entre si: ambas contêm, no estado Fe^{3+} , uma molécula de água ligada na posição seis do grupo heme como também uma ponte de hidrogênio ligada à histidina distal. A presença de resíduo de triptofano e de arginina perto da posição seis é único para citocromo C peroxidase de levedura.

Finzel et alii (1984) refinaram a análise da estrutura da citocromo C peroxidase de levedura para 1,7 Å. Os autores indicaram dois fatores que podem contribuir para a estabilização de estados altamente oxidados do Fe-heme durante a catálise: 1) a histidina próxima forma ponte de hidrogênio com um resíduo de ácido aspártico (Asp^{235}) encoberto e 2) o meio ambiente do grupo heme é mais polar que em citocromo C e em globulinas, devido a um resíduo semi-oculto de arginina (Arg^{48}) e cinco moléculas de água ligadas na proximidade do grupo heme, dois dos quais ocupam o sítio presumido da ligação peroxidativa. Há dois resíduos candidatos a formarem radical livre na formação do

composto I: 1) triptofano⁵¹, distante 3,3 Å acima do plano do grupo heme e a 2,7 Å da coordenada seis, e 2) metionina¹⁷² a 3,7 Å do grupo heme. A estabilização nucleofílica do radical metionil pode ser possível via ácido aspártico²³⁵. A histidina¹⁸¹ situa-se coplanar com o grupo heme em um nicho entre dois propionatos perto do sítio de ligação presumido do citocromo C. Uma rede de pontes de hidrogênio pode ser a via de transporte de elétrons preferida entre os grupos heme.

Peroxidase de amendoim

Schuller et alii (1996) elucidaram a estrutura cristalina da peroxidase de amendoim em resolução de 2,7 Å. O polipeptídeo tem 294 resíduos de aminoácidos e é acompanhado de um grupo heme e dois íons Ca^{2+} e há evidência de glicosilação. As dobras helicoidais são semelhantes a outras estruturas de peroxidases conhecidas. De acordo com os autores é a primeira estrutura de peroxidase da classe III desvendada: a classe I compreende peroxidase intracelular encontrada em citosol e cloroplastos e inclui a citocromo C peroxidase; A classe II compreende peroxidases segregadas por fungos e a classe III as peroxidases clássicas segregadas por plantas, contendo 4 pontes de dissulfeto e dois íons Ca^{2+} , sendo que a localização das pontes de dissulfeto as distingue das peroxidases da classe II. Dez hélices conservadas nas classes I e II também foram encontradas em peroxidase de amendoim. Os resíduos chaves do grupo heme e os dois íons de Ca^{2+} são os mesmos da classe II. A peroxidase de amendoim tem três hélices adicionais, duas destas contribuem com a formação do canal de acesso para o grupo heme.

Mecanismo de ação

O primeiro passo da ação catalítica da peroxidase consiste em sua reação com H_2O_2 , transferindo 2 elétrons para o grupo prostético de ferro heme. Dolphin et alii (1971) compararam os espectros óticos da oxidação de dois elétrons de cobalto octaetilporfirina, que resultou em um π -cátion radical estável, com o do composto I de HRP e concluíram que este último também contém um π -cátion radical no grupo heme. Isto explicaria o alto nível de oxidação, o espectro ótico e a estabilidade do composto I.

É aceito convencionalmente que o composto I reage com um doador de H^+ , descendo um grau de sua oxidação, transformando-se no composto II, formando radical livre a partir do doador de H^+ . O composto II por sua vez reage com outro doador de H^+ , voltando ao estado de oxidação inicial de Fe^{3+} , e produzindo mais um radical livre e uma molécula de água. Os radicais livres formados na oxidação do H_2O_2 a partir dos doadores de H^+ , reagem de acordo com a sua natureza química.

A peroxidase é capaz de catalisar também reações de oxidação na ausência de H_2O_2 . Smith et alii (1982) estudaram a oxidação do ácido indol-3-acético catalisado por POD. Dados espectrais e da cinética da enzima indicaram duas vias de oxidação dependendo da razão enzima/substrato empregada. Quando proporções baixas de enzima/substrato foram empregadas, a oxidação procedeu através da peroxidase reduzida $\leftrightarrow$ composto III, e quando razões altas foram empregadas, a peroxidase operou através da via convencionalmente aceita envolvendo peroxidase nativa, composto I e composto II. A ativação da via peroxidase reduzida $\leftrightarrow$ composto III produziu fluxo de radical de ânion superóxido à expensa de oxigênio molecular.

Adediran and Dunford (1983) encontraram a constante de formação de HRP-I (Composto I) de $1,6 \pm 0,1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ para H_2O_2 e usando ácido para-nitrobenzóico constante de segunda ordem de $3,7 \pm 0,2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$. Os autores concluíram que um e apenas um átomo de oxigênio é incorporado do substrato oxidante formando o composto I.

As constantes de redução do composto I para composto II ($1,2 \pm 0,3 \times 10^4 /M \cdot s$) e de $8,1 \pm 1,6 \times 10^2 /M \cdot s$ para composto II a HRP nativa usando ácido p-aminobenzóico como doador de H^+ , ocorrem a taxas baixas (Shiro et alii, 1986), sendo o último passo determinante para a velocidade da reação global.

Pedreño et alii (1987) relataram que peroxidase de parede celular de *Lupinus albus* demonstrou transição de atividade oxidásica para peroxidásica durante a oxidação de NADH. A fase de oxidação representa, segundo os autores, um período de retardamento da reação geral, depende de fenóis e é responsável pela formação de peróxido. Guaiacol e os ácidos p-coumárico, ferrúlico e sinápico, precursores de cinamil-

álcoois, que são substratos da síntese de lignina, afetaram tanto a duração do período de retardamento, quanto a taxa de oxidação da fase da oxidação do NADH. O período de retardamento quase inexistiu quando guaiacol foi adicionado e tendeu ao infinito com ácido sinápico. O efeito de fenóis no período de retardamento foi relacionado com a eficácia da enzima (V_{max}/K_m) quando age neles como peroxidase.

Nakashima & Yamazaki (1987) informaram que quantidades pequenas de tetranitrometano (TNM), seqüestrador de radicais de superóxido aniônicos, inibiram a formação de oxiperoxidase pela reação de ferri-HRP com H_2O_2 . A estequiometria da reação na presença de TNM sugeriu a seguinte via para a formação da oxiperoxidase:



Estudos cinéticos na formação de oxiperoxidase resistente a TNM sugeriram que o oxigênio ligado à posição seis do grupo heme é deslocado pelo H_2O_2 a taxas máximas de 0,048 e 0,054 s^{-1} para HRP-A e HRP-C, a 5°C, respectivamente. Ambas as reações de formação de oxiperoxidase ocorreram paralelamente. Portanto, conclui-se que o composto III é formado pela reação do Composto II com H_2O_2 .

Dunford (1991) descreveu em sua revisão sobre peroxidase de raiz forte um mecanismo de ação tipo puxa-empurra de elétrons na formação do composto I. Nesta ação, grupos distais positivos fornecem o impulso e um resíduo de histidina próxima parcialmente ou totalmente protonizado fornece o impulso, na clivagem da ligação O—O do peróxido com formação de complexo Fe^{3+} -peróxido. Na primeira parte da reação da formação do composto I, um grupo distal recebe um próton do oxigênio α do H_2O_2 durante a formação da ligação α -O-Fe. A formação do composto intermediário Fe-OOH envolve um fluxo de elétron do lado distal do grupo heme para o grupo férrico, facilitado pelo próton no resíduo histidina 170. Na segunda parte da reação, quando ocorre a clivagem da ligação O—O, o fluxo de elétrons ocorre na direção inversa; a ionização de histidina 170 ajuda a providenciar o empurrão de elétrons (Figura 1).

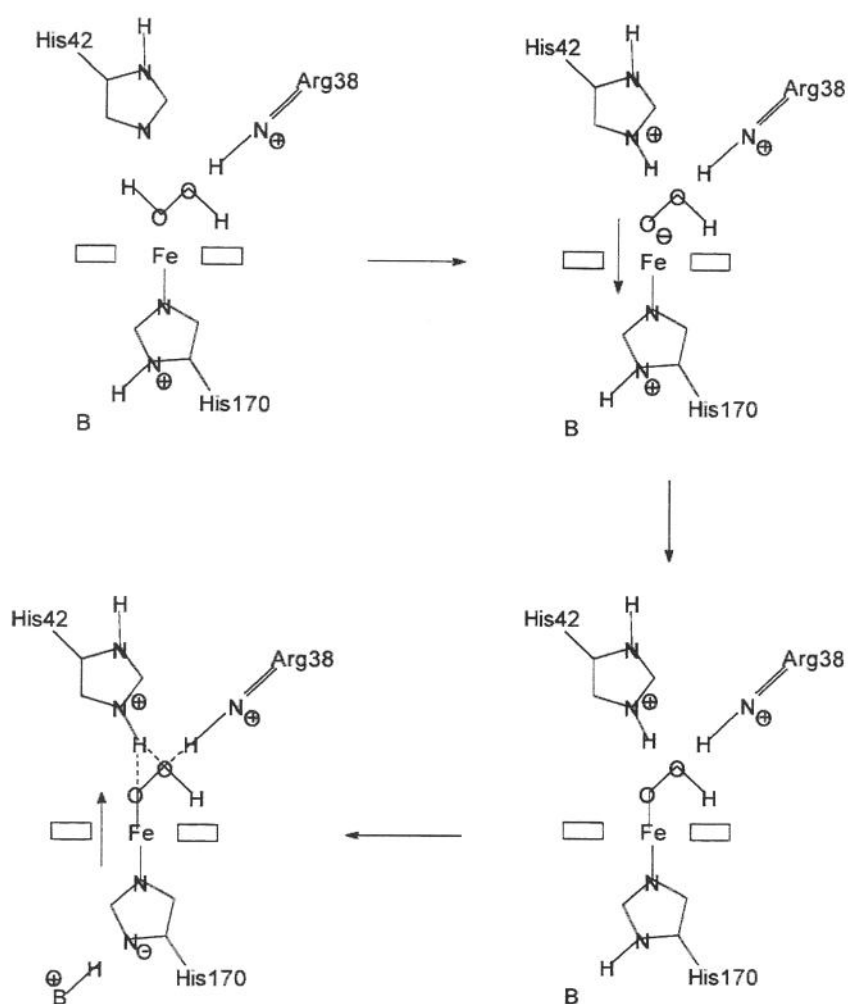


Figura 1: Proposta de mecanismo da formação do composto I da peroxidase de raiz forte (HRP-I).

A figura 2 mostra a proposta da reação do composto I de peroxidase de raiz forte com um fenol ou um enol. A transferência de um elétron do doador para o anel porfirínico faz desaparecer o cátion- π e a transferência de um próton ocorre para um grupo distal básico, provavelmente histidina 42 e o composto II de peroxidase de raiz forte é formado. Um radical fenol ou enol resta da reação.

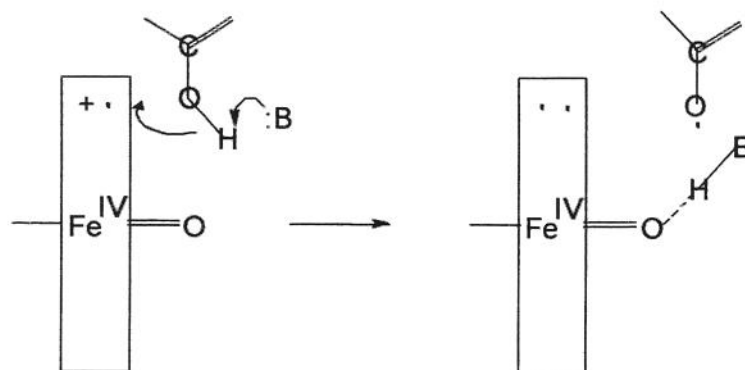


Figura 2: Redução do composto I para composto II de peroxidase de raiz forte através da transferência de um elétron.

A transferência de outro elétron de um fenol ou enol para o composto II, fecha o ciclo e peroxidase nativa de raiz forte é formada (Figura 3). O grupo distal protonado, provavelmente histidina 42, essencial para a atividade catalítica do composto II, é ligado por ponte de hidrogênio ao oxigênio do grupo ferril. Há, portanto, poucas dúvidas de que a atividade catalítica do composto II de peroxidase de raiz forte esteja centrado no grupo ferril. A explicação mais simples para a redução do composto II para peroxidase nativa é a transferência simultânea de um proton e de um elétron para o grupo ferril, reduzindo simultaneamente ferro (IV) a ferro (III) com a formação de água e outro radical fenol ou enol.

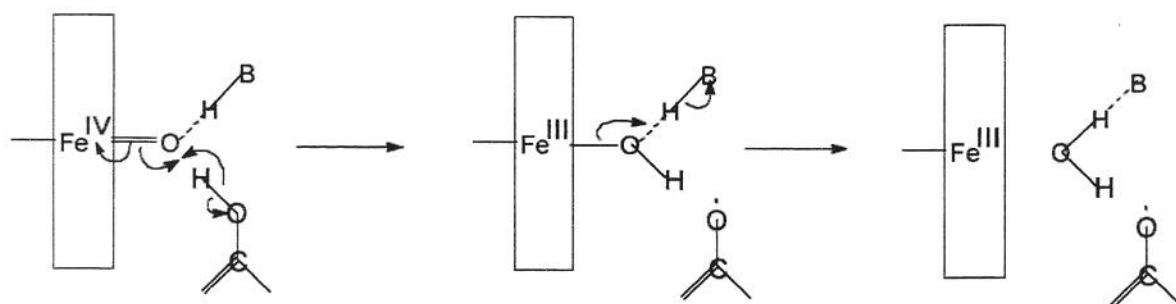


Figura 3: Redução do composto II para peroxidase nativa de raiz forte através da transferência de um elétron.

Peroxidases em frutas

Localização histoquímica

Abeles & Biles (1991) relataram que peroxidases ácidas de endocarpo de pêsegos em lignificação foram similares àquelas do mesocarpo carnudo. O endocarpo teve maior quantidade e número de peroxidases básicas que o mesocarpo. O pH ótimo situou-se entre 4 e 5. A cromatografia em coluna de troca iônica Sephadex Mono-Q equilibrada com tampão Tris 0,02 M pH 7,4, com eluição em gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M, resultou em duas frações ativas, tanto no extrato de mesocarpo, quanto no de endocarpo. A primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio foi uma isoperoxidase básica e a segunda eluída com gradiente de NaCl foi ácida (ou aniônica). Focalização isoeletrica demonstrou a similaridade das isoperoxidases aniônicas de endocarpo e mesocarpo de pêsego, enquanto as isoperoxidases básicas demonstraram diversidade. Peroxidases demonstraram ser de difícil extração do endocarpo em lignificação, também demonstrado por impressão do tecido em papel de nitrocelulose: peroxidases da parte carnosa foram reproduzidas, mas não as do endocarpo. Isso sugere que a técnica de impressão em papel de nitrocelulose pode falhar na demonstração da localização histoquímica de peroxidases.

Miesle et alii (1991) determinaram a atividade e localização das isoenzimas da peroxidases de "Highbush blueberries" (*Vaccinium corymbosum* L.). A atividade peroxidásica total aumentou durante o desenvolvimento do fruto, alcançando o máximo em frutos vermelhos para depois declinar, quando a atividade foi expressa em relação ao peso fresco, sendo que quando expressa por fruto, não houve declínio. A maior parte da enzima é ionicamente ligada às paredes celulares durante o desenvolvimento, com um aumento do número de isoenzimas durante esse período. A localização histoquímica mostrou que a peroxidase está espalhada através do fruto durante o desenvolvimento.

Calderón et alii (1993) fizeram impressão de peroxidase de uvas em membranas de nitrocelulose pela técnica de congelamento - descongelamento, imprimindo as seções descongeladas e revelando a enzima com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Em uvas 'Gamay' maduras a peroxidase localizou-se

principalmente na casca e em menor extensão no pericarpo. Áreas de localização discretas foram achadas nos feixes vasculares. No entanto, em uvas 'Gamay' e 'Grenache' imaturas, a atividade da peroxidase foi menor na casca, semelhante à encontrada no pericarpo. A técnica empregada preservou a integridade dos feixes vasculares. A validade da técnica foi confirmada por fracionamento e determinação da atividade da peroxidase nos tecidos diferentes.

Bernal et alii (1994) determinaram a localização histoquímica de peroxidase em frutos de pimentão (*Capsicum annuum* var, *annuum*). A peroxidase de pimentão é capaz de oxidar capsaicina. Para confirmar que peroxidase tem a capacidade de promover alterações e degradação de capsaicina, a localização histoquímica foi realizada pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membranas de nitrocelulose e revelação com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que peroxidase, da mesma forma que a capsaicina, está localizada principalmente nas camadas celulares epidermais externos, dando suporte ao papel da peroxidase de promover alterações em capsaicina durante o amadurecimento.

Ros Barceló et alii (1994) estudaram a localização histoquímica da peroxidase em uvas 'Thompson' e 'Flame', ambas sem sementes, pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membrana de nitrocelulose e coloração com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que a peroxidase foi localizada principalmente nos tecidos hipodérmicos e secundariamente no mesocarpo. Fracionamento das uvas e determinação da peroxidase nos tecidos confirmaram os resultados. Duas isoenzimas básicas foram encontradas em ambas as variedades.

López-Serrano & Ros Barceló (1995) localizaram peroxidase nos tecidos de morangos imaturos e maduros. Os resultados mostraram a existência de uma única isoenzima de pl básico, localizada em arranjo concêntrico dos tecidos vasculares e de suas ligações com as sementes. A isoenzima isolada não variou em atividade entre frutos verdes e maduros. Essa isoenzima básica pode estar envolvida na lignificação dos tecidos vasculares durante o desenvolvimento do fruto.

Flurkey & Jen (1978) estudaram a atividade da polifenoloxidase (PPO) e da peroxidase (POD) de pêssegos em desenvolvimento. Peroxidase extraída com tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,2, contendo KCl 1 M e 5% de "polyclar AT" (polivinilpirrolidona, PVP), demonstrou atividade 4 vezes maior que POD extraída a partir de pó cetônico de pêssegos. Os dois picos de atividade da peroxidase observados durante o desenvolvimento do fruto corresponderam às duas fases de ganho de peso dos pêssegos.

Abeles & Biles (1991) relataram que peroxidases ácidas de endocarpo de pêssegos em lignificação foram similares àsquelas do mesocarpo carnudo. O endocarpo teve maior quantidade e número de peroxidases básicas que o mesocarpo. O pH ótimo situou-se entre 4 e 5. A cromatografia em coluna Mono-Q equilibrada com tampão tris 0,02 M pH 7,4, com eluição de gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M, resultou em duas frações ativas, tanto no extrato de mesocarpo quanto no de endocarpo. A primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio foi uma isoperoxidase básica e a segunda eluída com gradiente de NaCl foi ácida (ou aniônica). A focalização isoeletrica demonstrou a similaridade das isoperoxidasas aniônicas de endocarpo e mesocarpo de pêssego, enquanto as isoperoxidasas básicas demonstraram diversidade.

Masia et alii (1992) relataram em seu estudo sobre aspectos bioquímicos e de ultra-estrutura no desenvolvimento de pêssegos que a atividade máxima da peroxidase e da ácido indol-3-acético oxidase (IAA-oxidase) ocorreu durante a lignificação do endocarpo.

Tourino et alii (1993) informaram que danos mecânicos induziram aumento de atividade peroxidásica, demonstrando um pico de atividade máxima após 24 horas do início da cura em ambas as cultivares submetidas ao tratamento: "Biuti" e "Real". Estudos histoquímicos revelaram acúmulo de compostos fenólicos, mas não compostos do tipo lignina ou suberina nas paredes celulares adjacentes ao ferimento.

Lourenço & Neves (1997) isolaram peroxidase solúvel de pêssego e purificaram-na por cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose e permeação em gel

Sephadex G-100 e Hidroxiapatita. A eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima 28,9 vezes purificada revelou duas isoenzimas, uma termorresistente e outra termosensível, mas que não foram separadas pela metodologia empregada. A atividade ótima da enzima foi a pH 5,0 e a 40°C. A energia de ativação foi 7,97 kcal/mol e o K_m foi de 5,62 e 10,71 para o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente. Os ácidos caféico, ferrúlico e p-coumárico, ditioeritritol, L-cisteína, Fe^{2+} e KCN inibiram a peroxidase de pêssgo. A inativação térmica seguiu padrão não-linear e foi rápida em temperaturas acima dos 70°C, com perda praticamente total da atividade com tratamento a 80°C durante 30 segundos. Adição de sais ao tratamento térmico resultou em aumento de velocidade da inativação da enzima em temperaturas acima dos 70°C.

Peroxidase de tomate

Kokkinakis & Brooks (1979a) purificaram e caracterizaram a peroxidase de maior atividade encontrada em pericarpo de tomate verde e maduro. A enzima solúvel foi extraída em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, contendo 20 g de PVP e 10 g de ascorbato de sódio. Os sólidos retidos na filtração foram lavados por duas vezes com o meio de extração e, em seguida, ressuspensos em 200 ml de tampão maleato de sódio 0,2 M, pH 6,5, contendo 0,2 M NaCl. A suspensão foi sonicada por 5 minutos e centrifugada. O sobrenadante constituiu a fração ionicamente ligada da peroxidase de tomate e foi dialisado duas vezes contra 4 L de tampão fosfato 5 mM, pH 6,5 por 20 horas. A precipitação da enzima foi efetuada com sulfato de amônio entre 40 e 85% de saturação e o material dialisado. A cromatografia de troca iônica dos dialisados foi feita em colunas (2,5 x 40 cm) de QAE-Sephadex A-50 (aniônica). As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com gradiente linear de NaCl de 0 a 0,4 M. A enzima obtida foi cerca de 85% pura e lembrava HRP em ensaio padronizado e na sua habilidade de ser reduzida a ferro-peroxidase, para ser convertida a oxiferropoxidase (composto III), além de formar complexos com H_2O_2 (compostos I e II). A peroxidase de tomate não catalisou a oxidação aeróbica do ácido indol-3-acético na presença de 2,4-diclorofenol e manganês. A enzima é constituída de duas subunidades não idênticas, enquanto HRP é constituída de uma única unidade polipeptídica. Ditiotretol foi oxidado por peroxidase de tomate e por HRP, sendo ambas as enzimas acumuladas na forma de oxiperoxidase durante a reação de

oxidação. HRP retornou à sua forma nativa após o término da reação, enquanto POD de tomate foi convertida para uma forma que absorve a 442 nm.

A oxidação do ácido indol-3-acético pela peroxidase de tomate foi insignificante, até que a mistura de reação foi suplementada com H_2O_2 (Kokkinakis and Brooks, 1979b). A adição do peróxido de hidrogênio iniciou oxidação rápida do ácido indole-3-acético e absorção de O_2 , até consumo total do H_2O_2 . Nessa reação a formação do composto III (oxiperoxidase) é uma possibilidade, segundo os autores.

Fils et alii (1985) estudaram o sistema da peroxidase de tomate em três estágios de maturação. As proteínas foram extraídas tanto do suco obtido do filtrado de frutos triturados (fração solúvel de peroxidase), quanto do sólido retido na filtração, solubilizados com solução molar de cloreto de sódio (fração ionicamente ligada de peroxidase). Essas frações foram purificadas, usando precipitação fracionada com sulfato de amônio, filtração em Ultrogel AcA 44 e cromatografia em DEAE-Trisacryl M. Uma forma de peroxidase solúvel (S1) e duas ionicamente ligadas (I1 e I2) foram purificadas. O rendimento total obtido para tomate totalmente maduro foi 40 e 50% para as formas solúvel e ionicamente ligadas, respectivamente. O grau de purificação alcançado foi 25, 56 e 7, para as formas S1, I1 e I2, respectivamente. A forma I1 teve comportamento idêntico à forma S1 na cromatografia de troca aniônica final. A eletroforese de disco a pH 8.9 e focalização isoeletrica a pH 3,5 - 10 confirmaram a identidade das duas formas de peroxidase com ponto isoeletrico menor que 3,5, enquanto I2 foi diferente, com ponto isoeletrico perto de 6.7.

Brooks (1986) relatou que a peroxidase aniônica de tomate catalisou reações oxidativas com NADH, glutationa, ditiotretol, oxaloacetato e hidroquinona como substratos, com atividade média de 30% em relação a Horseradish Peroxidase (HRP). A atividade da peroxidase de tomate com Mn^{2+} e fenol como cofatores em atividade de IAA-oxidase foi negligenciável em relação à da HRP. Substituindo Fe^{3+} por Mn^{2+} produziu resposta 18 vezes maior em relação a HRP. Usando 2,4-diclorofenol como cofator, ambas as enzimas responderam com aumento exponencial da atividade em relação ao aumento da concentração do cofator e da enzima. Os resultados em relação à substituição de Fe^{3+} por Mn^{2+} podem estar ligados a um controle semelhante a um controle alostérico. Aqueles com 2,4-diclorofenol contrariam o princípio da taxa de reação ser proporcional à concentração da enzima, o que dificulta qualquer comparação da atividade de enzimas.

(O autor fala nesse artigo em Ce^{3+} , elemento inexistente. Assumimos que se trata de Fe^{3+} pois é o metal ligado a porfirona da HRP).

Rothan & Nicolas (1989) estudaram alterações das atividades das peroxidases aniônica e catiônica de tomate durante o amadurecimento. A atividade peroxidásica foi extraída do pó obtido com nitrogênio líquido, com NaCl (os autores não informaram em que meio líquido). Isoperoxidasas aniônicas e catiônicas foram separadas por cromatografia de troca iônica em gel. Ambas as isoperoxidasas (ácidas e básicas) tiveram atividade máxima durante o climatérico, sendo que as peroxidases básicas tiveram aumento de atividade mais pronunciado. As alterações das atividades peroxidativas, de IAA-oxidase e de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC-oxidase) da peroxidase básica de tomate foram paralelas às alterações da produção de etileno. No entanto, na presença de Ca^{2+} , a atividade da peroxidase foi constante durante o amadurecimento, enquanto a atividade de IAA-oxidase e ACC-oxidase da peroxidase básica foi ativada apenas no estágio vermelho-claro do tomate.

Marangoni et alii (1989) extraíram e caracterizaram parcialmente peroxidase de tomate. Na extração foram usados tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5 com aditivos: EDTA, EGTA, NaCl, Triton X-100, ascorbato, metabissulfito de sódio, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMFS), pepstatina A e PVP insolúvel. O sobrenadante foi ajustado a pH 6,5 com 0,1 N HCl ou 0,1 N NaOH e dialisado contra tampão fosfato 50 mM, pH 6,5, durante 36 horas. O precipitado obtido com sulfato de amônio entre 25 e 85% de saturação foi coletado e dissolvido em 5 ml de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, e dialisado contra o mesmo tampão a 3°C durante 24 horas. Amostras do dialisado foram sonicadas durante 30 segundos e alíquotas de 0,5 ml injetadas em sistema FPLC (Pharmacia) e separadas em coluna MonoQ (HR 5/5) aniônica com fluxo de 1,5 ml/minuto. A eluição da enzima foi realizada com gradiente de 0 a 0,7 M NaCl, com um volume de 50 ml para cada concentração. As frações ativas contendo peroxidase de tomate aniônica foram coletadas, concentradas em filtro molecular de 10 kDa e recromatografadas em coluna idêntica com gradiente mais estreito. Ambas as cromatografias resultaram em uma única fração ativa. A focalização isoeletrica revelou ponto isoeletrico a pH 3,5 e a eletroforese em SDS resultou em três bandas principais, correspondentes a 16,6, 40,0 e 42,0 kDa. A

peroxidase aniônica de tomate demonstrou dependência de Ca^{2+} , tendo a atividade máxima com concentração de cálcio de $1,0 \times 10^{-5}$ M.

Lagrimini et alii (1993) relataram que a composição de lignina em folha, fruto e outras epidermes de tomate transgênico, com gene de superprodução de peroxidase aniônica de tabaco, aumentou respectivamente 20%, 49% e 106%, em relação à de plantas saudáveis. Em frutos feridos assepticamente e incubados durante 7 dias no escuro, o teor em fenóis aumentou 300% nos tomates transgênicos, mas pouco nos controles; lignina aumentou 20 vezes no tomate transgênico e somente 2 vezes no controle. No entanto, a resistência a organismos patogênicos não aumentou.

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.)

Avaliando carambola, Baldini et alii (1982) extraíram atividade peroxidásica da fruta usando tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,2 na proporção de 1 parte de polpa para 1,5 partes de tampão, contendo 1M de cloreto de potássio e 5% de PVP. O homogenato foi centrifugado a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. A atividade da peroxidase foi medida em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,0 contendo como substratos guaiacol (0,5%) e peróxido de hidrogênio (1%). Uma unidade de peroxidase foi definida como quantidade de enzima que provoca aumento em 0,1 unidade de absorbância a 470 nm por minuto. Os autores relataram 34,8 unidades de peroxidase por mg de proteína. A eletroforese em gel poliacrilamida, a 7% e pH 8,3, do extrato bruto revelou, com guaiacol como corante, uma única banda, portanto uma só isoenzima.

Peroxidase de coco

Peroxidase de coco normal e de coco mutante foi extraída de endosperma congelado (20 g) por Mujer et alii (1983), homogeneizado com 100 ml de acetona gelada em "Waring blender" pré-gelado, por duas vezes. Oito gramas do extrato cetônico foram homogeneizadas com 320 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0, centrifugadas a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado. Esse extrato bruto foi armazenado a -10°C durante vários meses sem perda perceptível de atividade. A semipurificação de enzima foi feita por precipitação com sulfato de amônio de 50 a 95%

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

de saturação. O precipitado foi suspenso em 4 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0 e dialisado duas vezes contra 4 L do mesmo tampão durante 24 horas. A purificação foi realizada por filtração em gel em coluna de Sephadex G-200 (3 x 100 cm) e troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-50 (2,2 x 45 cm). A peroxidase de coco normal foi purificada 14,6 vezes com 44% de recuperação e a de coco mutante 12,8 vezes com 40% de recuperação após filtração em Sephadex G-200. A isoenzima do pico principal da filtração em gel foi submetida a nova cromatografia de exclusão em Sephadex G-200, após ter sido submetida à troca iônica e purificada 17.600 vezes com 20% da enzima recuperada. SDS-PAGE dessa proteína resultou em uma única banda com peso molecular de 55 kDa e foi identificada como subunidade do tetrâmero que constitui a enzima nativa com peso molecular de 196 kDa. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina como doador de H⁺ e a absorbância acompanhada a 420 nm. Atividade IAA-oxidásica da peroxidase de coco foi detectada apenas em endosperma de coco normal em desenvolvimento, mas não no maduro.

Peroxidase em *Citrus*

McLellan & Robinson (1984) obtiveram peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada de suco e de albedo de laranja. A fração solúvel do suco foi extraída por prensagem, centrifugação a 15.000 g durante 20 minutos a 4°C, concentração em filtro Amicon com membrana de 10 kDa e diálise contra tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0. A fração foi armazenada a -18°C até seu uso. O precipitado da centrifugação foi lavado duas vezes, suspendendo-se em 60 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0 e centrifugando-se como acima. O resíduo lavado foi considerado livre de peroxidase solúvel e foi suspenso em 60 ml de solução de NaCl 1 M e centrifugado a 15.000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi denominado peroxidase ionicamente ligada do suco e também armazenado a -18°C até seu uso. O albedo foi cuidadosamente separado do endocarpo e do flavedo e foi extraído analogamente ao suco, obtendo-se peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada de albedo de laranja. A atividade da peroxidase foi determinada pelo método da o-dianisidina. A peroxidase de albedo mostrou-se altamente ativa. A inativação térmica seguiu comportamento não linear. Peroxidase ionicamente ligada foi particularmente termoestável e se regenerava quando mantida a 30°C após a inativação.

Catalá & Chamarro (1987) purificaram peroxidase de flavedo de laranja "Valência Late", usando fracionamento com sulfato de amônio de 40 a 90% de saturação, filtração em gel em coluna de Sephadex G-200 (1,7 x 52 cm) e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose Cl-6B. A fração aniônica foi constituída por uma só isoenzima aparentemente homogênea, com ponto isoelétrico (pI) de 2,5, enquanto a fração catiônica foi composta por 3 isoenzimas com pI entre 9,5 e 10,5, determinados por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida e a revelação feita com benzidina : H₂O₂ em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0. A atividade da peroxidase foi determinada usando quatro substratos: benzidina, guaiacol, o-dianisidina e eugenol a 334, 470, 460 e 425 nm, respectivamente. Ambas as frações tiveram pH ótimo ao redor de pH 6,0 com benzidina, 4,5 com eugenol e 5,0 com ácido indol-3-acético na ausência de H₂O₂. A fração aniônica apresentou maior atividade específica com eugenol e guaiacol, constituintes de lignina.

Zheng et alii (1993) extraíram peroxidase de flavedo de 9 cultivares de *Citrus*. O flavedo foi transformado em pó cetônico e posteriormente extraído com tampão fosfato de sódio 67 mM, pH 7,0, contendo 1% PVP e 0,4% Triton X-100. Amostras de 0,05 ml do extrato foram ensaiados em relação à sua atividade peroxidásica em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (3,1 ml) com 1,1 µl de guaiacol e 8 mM de H₂O₂ (0,05 ml). O aumento da absorbância foi acompanhado a 436 nm a 25°C. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi realizada com corrente constante de 20 mA e o guaiacol foi usado para revelar as isoperoxidasas. PAGE revelou três bandas de peroxidases em *Citrus*. Púmelos parecem ter as bandas P1 e P2 como característica genética, enquanto a banda P3 parece ter origem em laranjas doces. Em trabalho posterior, Zheng et alii (1996) realizaram comparação de 72 tipos de *Citrus* usando a metodologia do trabalho anterior. Novamente 3 bandas de isoperoxidasas foram reveladas e uma delas mostrou-se característica para púmelos.

Clemente (1996 e 1998) extraiu e purificou peroxidase de suco de laranja. O suco foi espremido e homogeneizado com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, filtrado e concentrado em filtro Amicon com membrana de 10 kDa, centrifugado a 17.000g durante 15 minutos a 4°C. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina. Amostras

do extrato bruto congelado foram submetidas à diálise contra tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0 por 12 horas a 4°C e 5 ml foram aplicados à coluna de Sephadex S-100 HR (1,6 x 70 cm) e a enzima eluída com tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, em fluxo de 30 ml por hora. Frações ativas foram reunidas e aplicadas a uma coluna de Sephadex G-75 (1,6 x 70 cm). Frações ativas dessa coluna foram fracionadas em FPLC adaptado a uma coluna de troca iônica tipo MonoQ e submetidas à focalização isoeletrica em gel poliacrilamida. Duas isoenzimas catiônicas e três aniônicas foram reveladas. As isoenzimas catiônicas C1 e C2 apresentaram peso molecular de 21 e 40 kDa e as aniônicas A1, A2 e A3, peso molecular de 40, 22 e 26 kDa, respectivamente. Isoperoxidasas catiônicas foram mais termoestáveis que as aniônicas e o extrato bruto.

Peroxidase de maçã (*Malus domestica*, Borkh)

Rychter e Lewak (1971) separaram várias frações de peroxidase por eletroforese de disco de extratos de sementes de maçã. Três dessas frações, as de menor mobilidade, demonstraram pequena especificidade de substrato, não alteraram durante o desenvolvimento da semente e não foram influenciadas por fitohormônios. As peroxidases de maior mobilidade foram estimuladas por giberelina e benziladenina, inibidas por ácido abscísico e coumarina e não afetadas por ácido indolacético.

Korban e Bournival (1987) analisaram a presença de isoenzimas da catalase, da esterase e da peroxidase em cruzamentos de maçã e encontraram diferenças nos padrões das bandas para esterases e peroxidases em folhas e sementes.

Moulding et alii (1987) extraíram peroxidase solúvel e ionicamente ligada de casca e polpa de maçã, variedade Cox's Orange Pippin. Maior atividade foi encontrada na fração solúvel da casca. Peroxidase solúvel foi constituída de peroxidase aniônica e de peroxidase catiônica, enquanto peroxidase ionicamente ligada foi constituída só de peroxidase catiônica. Isoperoxidasas da fração solúvel da polpa foram mais termorresistentes que as demais isoenzimas. Cinco isoperoxidasas foram reveladas por focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida. O pH ótimo para as peroxidases mistas nos extratos situou-se entre pH 5,0 e 6,0. O-dianisidina foi usada como doador de H⁺.

Em outro trabalho, Moulding et alii (1988) relataram sobre a estabilidade térmica de isoperoxidasas da polpa da maçã: Duas isoenzimas aniônicas e uma catiônica foram isoladas. A homogeneidade das isoenzimas purificadas foi determinada por focalização isoeletrica e revelada com o-dianisidina:H₂O₂. As três isoenzimas demonstraram maior afinidade a o-dianisidina do que a guaiacol. Isoenzimas aniônicas foram mais termorresistentes que a catiônica. A peroxidase aniônica recuperou 80% de sua atividade inicial após tratamento de calor a 80-100°C por 2 minutos e repouso a 30°C por 1 hora. A isoenzima catiônica não se regenerou. A filtração em gel (Sephadex G-100) foi seguida de concentração em filtro Amicon e o concentrado dialisado por uma noite contra 2 L de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 a 4°C. O dialisado foi aplicado à coluna de Q-Sepharose (aniônica) e eluída à temperatura ambiente com o tampão da diálise, com gradiente de NaCl de 0 a 0,25 M. A peroxidase foi eluída em três picos separados. A focalização isoeletrica demonstrou uma única isoenzima no primeiro pico, enquanto os picos 2 e 3 constituíram misturas de isoenzimas. Nova cromatografia em coluna Q-Sepharose eluiu um único pico preponderante para ambos os picos 2 e 3 e a focalização isoeletrica confirmou a pureza das isoenzimas eluídas. A atividade da peroxidase foi determinada com o-dianisidina como substrato e lida a 460 nm e temperatura de 25°C, ou com guaiacol a 420 nm a 30°C.

Richard & Nicolas (1989) isolaram e caracterizaram a peroxidase de casca de maçã da variedade Red Delicious, usando cromatografia hidrofóbica seguida por cromatografia de afinidade com Concanavalin A - Agarose substituída (ConA Sepharose). Um peso molecular de 40 kDa foi obtido por filtração em gel. A focalização isoeletrica demonstrou a presença de 4 isoperoxidasas no extrato purificado com pI entre pH 4,6 a 9,8. A atividade principal da peroxidase da casca de maçã (99%) foi de isoperoxidasas catiônicas, cujo pI foi perto de pH 9. A peroxidase da maçã foi capaz de agir nos compostos fenólicos da fruta: catequinas, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis. A atividade da peroxidase foi analisada com guaiacol (50 mM):H₂O₂ (10 mM) e a absorbância acompanhada a 470 nm.

Peroxidase de manga (*Mangifera indica*. L.)

Frylinck et alii (1987) relataram que a irradiação de mangas com raios γ resultou em ativação da atividade da peroxidase, a qual aumentou continuamente durante o amadurecimento, até que o climatérico chegasse ao máximo e depois pareceu declinar. Os autores atribuíram o aumento da atividade da peroxidase à produção de peróxidos pela irradiação. A peroxidase de manga foi extraída por precipitação com acetona e redissolução em tampão fosfato seguido de centrifugação. O sobrenadante foi usado na determinação da atividade peroxidásica. A mistura de reação consistiu de 20 ml de tampão acetato 20 mM, pH 5,0, 1 ml de solução de H_2O_2 0,1 M e 1 ml de guaiacol 0,04 M. A 4 ml da mistura reativa, adicionou-se 0,1 ml do extrato e mediu-se a absorbância a 420 nm após 2 minutos a 30°C. Uma unidade (1 Kat) foi definida como quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 mol de H_2O_2 e 1 mol de guaiacol por segundo.

Marin & Cano (1992) relataram que a atividade de peroxidase em mangas das variedades Lippens e Smith aumentou na polpa até o climatérico da fruta. A eletroforese em poliacrilamida revelou três isoperoxidasas que migraram em direção ao ânodo a pH 8,3 em mangas "Smith". Mangas da variedade Lippens revelaram 4 bandas adicionais às já citadas, as quais se moveram mais rapidamente.

Khan & Robinson (1993a) purificaram isoperoxidase aniônica de manga "Chaunsa". A purificação da enzima foi realizada em coluna de Sephadex G-100 (1,6 x 70 cm) seguida de cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose (1,6 x 40 cm) e o peso molecular determinado por filtração em gel (Sephadex G-100). A atividade da peroxidase foi determinada usando H_2O_2 e o-dianisidina. A focalização isoelétrica analítica foi realizada em géis de poliacrilamida de 0,5 mm de espessura contendo anfólitos (pH 3,5 a 10,0 ou 2,7 a 5,0). As bandas de peroxidase foram reveladas com o-dianisidina: H_2O_2 . Os autores afirmam ainda que a coloração das proteínas de peroxidases é difícil usando "Coomasie blue", por isso usaram sais de prata na coloração dos géis para detectá-las. Uma única isoperoxidase aniônica de manga foi purificada com peso molecular aproximado de 40 kDa. Glicina, serina e ácido glutâmico representaram 48% da proteína.

Khan & Robinson (1993b) estudaram a estabilidade térmica de isoperoxidasas ionicamente ligadas de manga. Os autores purificaram pequenas quantidades de isoperoxidasas aniônicas e catiônicas por cromatografia de troca iônica. As isoperoxidasas purificadas mostraram-se mais termoestáveis que a peroxidase do extrato bruto e as ionicamente ligadas mais resistentes ao calor que a peroxidase solúvel. A inativação térmica seguiu padrão não-linear, tanto nas isoperoxidasas purificadas, quanto no extrato bruto. Não houve regeneração de atividade após inativação das isoperoxidasas e do extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a fracionamento por sulfato de amônio, filtração em Sephadex G-100 e em seguida submetido a cromatografia de troca iônica. Frações (5 ml) ativas foram submetidas a focalização isoeletrica para verificação da presença de isoperoxidasas. As frações eluídas com o tampão de equilíbrio, não retidas na coluna aniônica, foram concentradas a cerca de 10 ml em concentrador Amicon com membrana PM10, dialisadas e aplicadas a coluna SP-Trisacryl (1,6 x 40 cm). Três isoperoxidasas catiônicas, além das isoperoxidasas aniônicas, foram purificadas.

Khan & Robinson (1994) estudaram a especificidade de doadores de H⁺ da peroxidase de manga. Isoperoxidasas aniônicas e catiônicas catalisaram a oxidação de guaiacol, o-dianisidina e 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfonato (ABTS) a taxas diferentes. Para a isoperoxidase aniônica A1, o-dianisidina foi o melhor substrato, enquanto para a catiônica C1, a oxidação de ABTS foi mais rápida. Em relação à oxidação do IAA, isoperoxidasas aniônicas catalisaram a reação mais rapidamente que as catiônicas. Entre as quatro isoperoxidasas purificadas, a maior atividade de IAA-oxidase foi da A1. O dihidroxifumarato (DHFA) foi oxidado aproximadamente 2 vezes mais rápido por isoperoxidasas catiônicas que por aniônicas. O peso molecular das isoperoxidasas aniônicas, de 40 e 44 kDa para A1 e A2, respectivamente, foi maior que o das catiônicas C1 e C2 com 22 e 27 kDa, respectivamente.

Peroxidase de pera

Moulding et alii (1989) relataram a obtenção de isoperoxidasas solúveis e ionicamente ligadas da polpa e da casca de pera "Conference". A fração solúvel conteve a maior atividade da peroxidase. As peroxidases da casca, tanto as solúveis, quanto as ionicamente ligadas, mostraram-se termorresistentes. A recuperação da atividade, após inativação térmica, foi observada para peroxidase da casca e para peroxidase solúvel da

polpa. A inativação térmica seguiu padrão não-linear. A extração e a determinação da atividade da peroxidase de pera "Conference" seguiu metodologia descrita por Moulding et alii (1987) para maçã.

Peroxidase de uva (*Vitis vinifera*)

Robinson et alii (1989) analisaram a estabilidade térmica de peroxidase de uva "Ohane". Uvas inteiras e sadias (900 g) foram cortadas em pedaços e a peroxidase extraída em 900 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0, gelado. A filtração e a centrifugação foram realizadas de acordo com Moulding et alii (1987). Peroxidase ionicamente ligada foi extraída do resíduo, após seguidas lavagens, com solução 1M de NaCl, gelada. A fração solúvel conteve maior atividade e respondeu por 87% da atividade total. A inativação da enzima seguiu padrão não-linear com 90% de inativação de peroxidase após 10 minutos a 80°C. Focalização isoeletrica revelou 6 isoperoxidasas com pontos isoeletricos entre pH 3,5 e 9,8.

Zapata et alii (1992) analisaram a oxidação de ácidos hidroxibenzóicos naturais de uvas de vinho pela peroxidase da fruta. Dos ácidos hidroxibenzóicos presentes em uvas "Monastrel", apenas os ácidos protocatechúico (3,4-dihidroxibenzóico), vanílico (3-metoxi-4-hidroxibenzóico) e gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) foram oxidados pela peroxidase de uva, enquanto os ácidos p-hidroxibenzóico e siríngico não o foram.

Calderón et alii (1993) fizeram impressão de peroxidase de uvas em membranas de nitrocelulose pela técnica de congelamento - descongelamento, imprimindo as secções descongeladas e revelando a peroxidase com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Em uvas 'Gamay' maduras a peroxidase localizou-se principalmente na casca e em menor extensão no pericarpo. Áreas de localização discretas foram achadas nos feixes vasculares. No entanto, em uvas 'Gamay' e 'Grenache' imaturas, a atividade da peroxidase foi menor na casca, semelhante à achada no pericarpo. A técnica empregada preservou a integridade dos feixes vasculares. A validade da técnica foi confirmada por fracionamento e determinação da atividade da peroxidase nos tecidos diferentes.

Morales et alii (1993) relataram que uvas "Gamay rouge" contém uma isoperoxidase de pl básico, a qual é o componente de peroxidase preponderante do fruto, localizado em vasos de xilema. A enzima foi purificada por focalização isoeletrica preparativa em gradiente de pH 3,0 a 10,0, estabilizado com glicerol e as bandas reveladas com coniferil álcool. A enzima foi capaz de oxidar o substrato entre os pH 3,0 e 6,0 e seu K_M foi 0,149 mM para coniferil álcool e 0,206 para H_2O_2 .

Ros Barceló et alii (1994) estudaram a localização histoquímica da peroxidase em uvas 'Thompson' e 'Flame', ambas sem sementes, pela técnica de congelamento - descongelamento, impressão em membrana de nitrocelulose e coloração com 4-metoxi- α -naftol e peróxido de hidrogênio. Os resultados revelaram que a peroxidase foi localizada principalmente nos tecidos hipodérmicos e secundariamente no mesocarpo. Fracionamento das uvas e determinação da peroxidase nos tecidos confirmaram os resultados. Duas isoenzimas básicas foram encontradas em ambas as variedades.

Peroxidase de mamão (*Carica papaya*)

A peroxidase solúvel e a ionicamente ligada foram isoladas de mamão por Silva et alii (1990). A purificação foi realizada por fracionamento com sulfato de amônio (30 a 90% de saturação), filtração em gel em coluna de Sephadex G-25 (2,0 x 40 cm), troca ionica em coluna de DEAE-celulose (1,5 x 23 cm) e nova filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 (2,0 x 60 cm). A fração da peroxidase ionicamente ligada foi purificada em coluna Sephadex G-100 (2 x 60 cm) e DEAE-celulose (1,5 x 23 cm), com procedimentos idênticos à purificação da peroxidase solúvel. Esse procedimento resultou em peroxidase solúvel purificada 59 vezes e em peroxidase ionicamente ligada 140 vezes mais purificada. A atividade da peroxidase foi determinada em sistema de o-dianisidina: H_2O_2 . A atividade da peroxidase solúvel aumentou 2,5 vezes e a da ionicamente ligada 4,2 vezes durante o amadurecimento do mamão. O peso molecular foi de 41 kDa para peroxidase solúvel e de 54 kDa para a ionicamente ligada. O pH ótimo das enzimas foi 6,0 para solúvel e 5,5 para ionicamente ligada. A atividade de ambas as frações foi inibida por p-cloromercúriobenzoato, iodoacetamida, N-etilmaleimida, KCN e Fe^{2+} . A peroxidase solúvel foi ativada por sulfato de amônio e essa ativação foi prevenida por KCN.

Lourenço et alii (1995) relataram que a inativação térmica das peroxidases solúvel e ionicamente ligada, purificadas de acordo com os procedimentos descritos por Silva et alii (1990), mostrou comportamento bifásico entre 50 e 80°C. A peroxidase solúvel foi termolábil; o aquecimento a 70°C durante 1 minuto inativou a enzima em 94%. A peroxidase ionicamente ligada reteve 45% de sua atividade inicial após tratamento idêntico. A eletroforese em gel, após o tratamento térmico, revelou três isoenzimas solúveis termolábeis e duas com atividade baixa, além de 2 isoperoxidasas ionicamente ligadas lábeis e outra termorresistente, a qual representou 40% da atividade peroxidásica total.

Peroxidase de kiwi (*Actinidia chinensis*, Planch)

Soda et alii (1991) purificaram peroxidase da polpa de kiwi. A precipitação fracionada foi realizada com sulfato de amônio entre 50 e 85% da saturação e a purificação procedida em coluna SP-Toyopearl (2,8 x 15 cm), coluna Toyopearl AF-blue (2,8 x 6,0 cm), coluna DEAE-Toyopearl (2,2 x 2,3 cm) e coluna Toyopearl HW-55 (2,2 x 90 cm). A fração ativa demonstrou pico simétrico e foi usada para caracterização da enzima. A peroxidase de kiwi foi cerca de 15.000 vezes purificada com 5,3% da enzima recuperada. A peroxidase de kiwi apresentou peso molecular de 29 kDa e atividade ótima em pH 5,5 e 50°C. POD de kiwi teve alta afinidade com os substratos guaiacol, pirogalol e o-dianisidina, mas não com ácido ascórbico, NADH, NADPH e glutatona. A atividade da enzima foi totalmente inibida por KCN 1 mM e os autores sugeriram que peroxidase de kiwi tem um grupo protoheme em seu sítio ativo.

Peroxidase de morango (*Fragaria ananasa*, Duch.)

Civello et alii (1995) purificaram parcialmente a peroxidase de morango e determinaram algumas de suas propriedades. A precipitação da enzima foi feita com sulfato de amônio a 85% de saturação. O precipitado foi dissolvido e aplicado em coluna de Sephacryl S-300 (2,4 x 42 cm). A purificação foi continuada em coluna de troca iônica Pharmacia XK 16/20 preenchida com CM-Sepharose Fast Flow, e o peso molecular foi determinado em coluna de Sephacryl S-200 (1,6 x 30 cm) com padrões de peso molecular

adequados. O grau de purificação alcançado foi perto de 35 vezes. A atividade máxima da enzima foi obtida com pH 6,0 e 30°C. A enzima demonstrou baixa estabilidade térmica, mas manteve atividades acima de 50% na faixa de pH 4 a 11. Duas isoenzimas foram detectadas, ambas básicas, com pI 9,5 e 10,0 e com massa molecular de 58,1 e 65,5 kDa. A atividade da peroxidase decresceu marcadamente durante o amadurecimento do fruto e foi encontrada principalmente na forma ligada à membrana. Os frutos verdes pequenos e grandes apresentaram maior atividade de peroxidase.

López-Serrano & Ros Barceló (1995) localizaram peroxidase nos tecidos de morangos imaturos e maduros. Os resultados mostraram a existência de uma única isoenzima de pI básico, localizada em arranjo concêntrico dos tecidos vasculares e de suas ligações com as sementes. A isoenzima isolada não variou em atividade entre frutos verdes e maduros. Essa isoenzima básica pode estar envolvida na lignificação dos tecidos vasculares durante o desenvolvimento do fruto.

López-Serrano & Ros Barceló (1996) purificaram e caracterizaram uma isoperoxidase básica de morango. Os autores extraíram peroxidase de morangos enlatados. A focalização isoeletrica preparativa foi usada para isolar a isoperoxidase básica, seguindo as instruções do fabricante do Rotofor (Bio-Rad). A isoperoxidase básica foi submetida a purificação adicional por troca iônica em coluna de CM-celulose. Um único pico foi eluído. Essa enzima foi capaz de catalisar a oxidação de fenóis na presença de H_2O_2 , mas não demonstrou atividade tipo catecolase, cresolase ou laccase.

Em trabalho publicado em 1997, López-Serrano & Ros Barceló relataram que uma peroxidase básica de morango, relativamente termoestável, foi capaz de oxidar (+)-catequina ($k_m = 0,57 \mu M^{-1} s^{-1}$) na presença de H_2O_2 com $k_m = 2,63 \mu M^{-1} s^{-1}$. Essa isoperoxidase básica é, portanto, altamente eficaz em oxidar (+)-catequina em baixas concentrações de H_2O_2 .

CARAMBOLA

Descrição e origem

De acordo com Corrêa (1926), a caramboleira (*Averrhoa carambola*, L.) pertence à família das Oxalidaceae. Sua origem, embora não precisamente conhecida, situa-se na Região Indo-Malaica. A caramboleira é uma árvore de pequeno a médio porte e atinge até 8 m de altura, com tronco de até 40 cm de diâmetro, folhas alternadas, imparipinadas e compostas de 5 a 11 folíolos, flores variegadas brancas ou purpúreas. O fruto, a carambola, é oblongo com cinco arestas longitudinais, as quais dão ao fruto forma estrelada na seção transversal. Segundo Corrêa (1926), a caramboleira nunca foi encontrada em estado silvestre. No Brasil, a fruteira foi introduzida pelo agrônomo francês Paul Germain, que a trouxe da Ilha de França para Pernambuco em 1817. A forma estrelada da carambola, sua cor amarelo-âmbar e seu sabor agri-doce fazem-na atraente tanto para o consumo 'in natura', quanto em forma de sucos, doces e confeitos.

Produção de carambola

Green (1987) relatou que plantações que visam comercialização da fruta "in natura" são encontradas principalmente em Taiwan (cerca de 2800 ha), na Malásia (cerca de 120 ha) e na Flórida (também cerca de 120 ha). Nos dois países asiáticos, a estrutura agrícola é de pequenas propriedades familiares. As carambolas são protegidas contra insetos com sacos de papel, nas árvores. Parte das carambolas verdes é retirada, possibilitando a produção de frutos grandes.

De acordo com a Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 1989 e 1990), foram comercializadas através daquela companhia cerca de 702 t da fruta "in natura" em 1989 e 745 t em 1990. A Região de Campinas - SP contribuiu com 12,6% das carambolas comercializadas em 1989 e com 23,4% em 1990, demonstrando aumento da participação da região em carambolas comercializadas através da CEAGESP.

Segundo Campbell (1994), o estado da Flórida produzia em 1986 cerca de 70 t de carambolas e em 1991 ao redor de 2000 t. O aumento dessa produção foi resultado de pesquisas agrícolas e seleção de variedades, estimuladas pelo governo americano. As carambolas são colhidas manualmente e colocadas em caixas plásticas, das quais são transferidas diretamente para caixas de papelão com a finalidade de exportação para outros estados americanos, embora exista tecnologia de manuseio, classificação automática, tratamento pós-colheita contra a mosca das frutas do Caribe e embaladoras automáticas disponíveis nos Estados Unidos.

Bridi (1999) relatou que as regiões maiores produtoras de carambola no Estado de São Paulo são, pela ordem, os Municípios de Andradina, Lins e Mogi Mirim, com uma estimativa de colheita por um único produtor de Mogi Mirim em 1999 de 315 toneladas de carambolas “doces” e “ácidas”, pouco menos da metade comercializada pela CEAGESP em todo 1990. Os preços alcançados por caixa de 15 kg foram baixos: apenas R\$ 2,00 por caixa em plena safra. No início e no final da safra foram alcançados preços de até R\$ 6,00 por caixa. Pequenos produtores de outros Municípios da Região de Campinas - São Paulo optaram pela comercialização direta a hotéis e restaurantes da Região Metropolitana de São Paulo e obtiveram preços melhores: R\$ 8,00 por 20 unidades de carambolas selecionadas, ou em bandejas de 5 a 6 frutos a R\$ 1,50, cada bandeja.

Utilização da carambola

Campbell & Campbell (1983) relataram que carambola pode ser industrializada em forma de produtos desidratados. As carambolas foram higienizadas e cortadas em fatias e, em seguida, desidratadas em secador até que adquiriram aspecto de couro, ou cortadas em cubos e transformadas em purê e secas em tabuleiro de bolo em forno regulado para morno. A avaliação sensorial resultou em notação excelente para a cor, textura, sabor e aroma.

Corydon (1992) relatou que o vinho de carambola é estável, com bastante taninos da casca do fruto, de sabor de fruta, mas pouco doce. O vinho ganhou a

medalha de bronze na competição anual de Atlanta em 1991. Nenhum comentário foi feito neste artigo de divulgação sobre as condições tecnológicas da produção do vinho.

Wu et alii (1993) relataram que carambolas amarelas, mas não totalmente maduras são preferidas. A extração do suco pode ser feita por simples trituração e prensagem das frutas. Rendimento de mais de 60% de suco foi relatado pelos autores. Suco de carambola fermentado geralmente é produzido a partir de carambolas muito ácidas, impróprias para o consumo fresco. Na fermentação, cerca de 10% do suco fresco de carambola é aquecido a 85°C, resfriado e recebe 2% de NaCl. Em seguida é inoculado e mantido sob agitação durante 24 h a 30°C. Os 90% restantes do suco recebem o mesmo tratamento e são inoculados com o inóculo multiplicado e incubado a 30°C em condições aeróbicas por 4 horas, e depois em condições anaeróbicas por 3 dias com pequena quantidade de fonte de nitrogênio. Este suco fermentado seria comparável ao fermentado por métodos tradicionais no oriente. Na produção de néctar não fermentado, os frutos higienizados são prensados, o suco filtrado e recebe como aditivos 5% de sal e 5% de sacarose; a seguir, é pasteurizado e engarrafado. Para o consumo, esse néctar é diluído 5 vezes com água.

Osman et alii (1995) relataram que as carambolas verdes, provenientes do processo de diminuição do número de frutas na árvore, pesaram entre 6 e 20 g, tiveram teor de umidade de 90,17%, baixo Brix (0,8 °Brix) e 0,22% de acidez titulável. O pH medido variou de 3,49 a 3,55. O principal ácido orgânico, determinado por HPLC, foi o ácido oxálico (0,25 a 0,29%), seguido pelo málico (0,03 a 0,05%). O fruto continha 9,4 a 11% de pectina de boa qualidade. Os autores concluíram que essas carambolas verdes, normalmente perdidas no campo, constituem uma boa fonte de pectina para uso industrial.

Costa et alii (1999) saturaram fatias de carambola de 3 mm de espessura com açúcares, mergulhando-as em soluções de concentração crescente de glucose, frutose e sacarose, após inativação de enzimas por branqueamento. Ao final do processo, após 17 dias de tratamento, o xarope usado mediu 72 °Brix, quando as fatias foram imersas em água quente por 30 minutos e drenadas para retirar excessos de açúcares. A secagem em fluxo de ar a 50 °C completou o processamento. Os pedaços

de carambola secos e não pegajosos foram acondicionados em sacos de polietileno e armazenados em temperatura ambiente. O aspecto do produto foi agradável e o sabor característico da fruta. Os autores acreditam que as carambolas saturadas com açúcares podem constituir uma alternativa à comercialização 'in natura' com valor agregado mais alto.

Manuseio e pós-colheita

Campbell et alii (1987) relataram que carambolas são colhidas em estado verde-maturo, quando ainda são firmes e mais resistentes, para reduzir danos mecânicos no manuseio e no transporte. A temperatura de armazenagem ideal do fruto é 5°C. Armazenamento nessa temperatura, seguido por 6 dias à temperatura ambiente não produziu danos pelo frio nas carambolas da Flórida.

Campbell (1994) também relatou que o envolvimento da carambola com cera protege-a contra perda de umidade, evitando a formação de bordas ressecadas e escurecidas. O autor informa ainda que o armazenamento durante 15 dias a 1,1°C foi adotado nos EUA como tratamento de quarentena para carambolas da Flórida, contra a mosca das frutas do Caribe.

Amadurecimento e fisiologia pós-colheita de carambola

Vines & Grierson (1966) relataram que a carambola apresentou respiração com pico climatérico durante o amadurecimento do fruto. A altura do pico foi reduzida por armazenamento em temperaturas baixas e por envolvimento do fruto com camada de cera. Alterações da composição dos ácidos orgânicos foram observadas durante o amadurecimento: frutos verde-maturos tiveram quantidades quase iguais em ácido oxálico (40%) e ácido tartárico (35%), enquanto em carambolas maduras de cor amarela, o ácido oxálico compreendeu 74% dos ácidos e o teor em ácido α -cetoglutárico chegou a surpreendentes 17%. Esse aumento foi explicado pelos autores pela degradação de aminoácidos observada no mesmo período, provavelmente servindo de substrato para processos da respiração da carambola. O teor em ácidos por peso fresco de carambola, no entanto, não alterou durante o amadurecimento.

Liao et alii (1983) relataram taxa de respiração de carambola muito baixa, entre 10-20 mg de $\text{CO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ a 20°C, em padrão não-climatérico. A qualidade da fruta fresca foi preservada a 10°C durante 1 mês.

Oslund & Davenport (1983) encontraram taxa respiratória de carambola em amadurecimento mais baixa que em frutas verdes e atribuíram a quota maior em frutas maduras à ação de microorganismos ou a processos de senescência de tecidos da carambola. O teor em sólidos solúveis aumentou durante o amadurecimento. Os autores consideraram a produção de CO_2 e de etileno e o comportamento no amadurecimento características de fruta não-climatérica.

De acordo com Lam & Wan (1985), o comportamento respiratório de carambola armazenada a 5°C permaneceu uniforme com poucas alterações. Etileno não foi detectado nessa temperatura de armazenamento. As taxas respiratórias da carambola em atmosferas sem etileno, demonstraram tendência negativa, fato semelhante observado em frutas armazenadas em ambiente de baixa e de alta umidade. Não houve produção de etileno autocatalítica, quando os frutos foram tratados com etileno.

Campbell & Koch (1989) relataram que carambolas dos cultivares "Arkin" (doces), e "Golden Star" (ácidas) chegaram à maturidade comercial com 65 e 60 dias após a polinização, respectivamente. O total em sólidos solúveis, principalmente frutose e glucose, foi 25% maior em carambolas "Arkin" ($\cong 27\text{mg g}^{-1}$) que o do cultivar "Golden Star" ($\cong 22\text{mg g}^{-1}$). Na colheita, sacarose representou entre 15 e 20% do total de açúcares. O ácido orgânico predominante em frutas jovens dos dois cultivares foi o ácido oxálico, sendo que as carambolas "Arkin" apresentaram cerca de 1 mg g^{-1} e "Golden Star" em torno de 7 mg g^{-1} . Ácido málico ($<1,5\text{ mg g}^{-1}$) também esteve presente. A acidez diminuiu em carambolas "Arkin" nos estados jovens do desenvolvimento do fruto, enquanto em carambolas "Golden Star" permaneceu alto. O acúmulo de açúcares, a diminuição da acidez e o desenvolvimento da cor continuaram durante mais 7 dias após o início de mudança de cor, enquanto as carambolas permaneciam na árvore. A firmeza dos frutos, no entanto, diminuiu a ponto de prejudicar manuseio e comercialização.

Campbell et alii (1989) relataram que as alterações em açúcares e ácidos orgânicos observados na pós-colheita da carambola foram menores em temperaturas de armazenagem de 5°C que em temperaturas de 10°C. Experimentos que reaqueceram as frutas a 23°C durante seis dias indicaram que carambolas refrigeradas não perderam sua capacidade de amadurecerem normalmente e não apresentaram sintomas de danos causados pelo frio, de modo que carambolas podem ser armazenadas com maior eficiência a 5°C.

Mitcham & McDonald (1991) colheram carambolas em quatro estados de maturação: verde escuro, verde claro, em mudança de cor (tornando amarelo) e maduro. Um lote adicional de frutas maduras foi armazenado a 21°C até se tornarem sobre-maduras. A respiração e a produção de etileno da carambola em diversos estados de maturação sugeriu um possível comportamento climatérico, comportamento esse não conclusivo quando os autores se basearam no monitoramento diário da respiração e da produção de etileno dos frutos armazenados. A parede celular de carambolas verde-escuras foi constituída de 60% de celulose, 27% de hemicelulose e 13% de polímeros de pectina. Durante o amadurecimento, foi observado aumento de pectinas solúveis e diminuição de pectinas covalentemente ligadas. No estado sobre-maduro, o teor de ácidos urônicos totais foi menor que no estado de maturação anterior. A quantidade de hemicelulose diminuiu a partir do estado de mudança de cor, e a proporção de celulose aumentou durante o amadurecimento.

Ghazali & Peng (1993) relataram atividade crescente da poligalacturonase durante o amadurecimento da carambola, acompanhada da diminuição da firmeza dos frutos.

Composição química da carambola

Fonseca et alii (1969) analisaram o teor de ácido ascórbico e de β -caroteno de frutas e hortaliças brasileiras. Os autores relataram que a carambola madura possuía 37 mg/100g de ácido ascórbico e carambola verde 25 mg/100 g. A carambola madura teve teor de β -caroteno de 520 mg/100g.

Singh (1973) relatou que a carambola apresentou teores de 397,1 mg de ácido oxálico, 58,5 mg de cálcio e 145,2 mg de fósforo por 100 g de fruta. A razão cálcio : fósforo foi 0,4 e a razão cálcio : ácido oxálico, 0,1.

Chan & Heu (1975) identificaram e determinaram açúcares em carambola, *Colocarpum viride*, jaca e *Spondias cytherea*. Análises por cromatografia gasosa e por cromatografia de camada delgada resultaram na seguinte composição dos açúcares de carambola: Totais = 3,19%, frutose = 1,15%, α -glucose = 0,69%, β -glucose = 0,94% e sacarose = 0,42%.

Berry (1978) examinou a composição do óleo das sementes de carambola. A composição das sementes foi de 4% de umidade, 73,87% de óleo e 14% de proteína (N x 6,25). As características do óleo foram: índice de refração = 1,4658, índice de iodo = 81,64, índice de saponificação = 197,68, 2,96% de material insaponificável e 0,6% de acidez. Os ácidos graxos insaturados predominaram com 68,44% do total. De acordo com o autor, o óleo de sementes de carambola não tem valor comercial, devido à pequena quantidade de sementes da carambola, apesar de sua qualidade.

Baqar (1980) analisou o teor de Vitamina C de frutas da Papua-Nova Guiné, relatando 25 ± 2 mg/100 g em vitamina C para carambola de cultivar ácida.

Hall et alii (1980) estudaram a composição protéica e de aminoácidos (AA) de dez frutas tropicais usando cromatografia gasosa. Carambolas "Tea Ma" pesaram em média 85 g, 70% dos quais foi porção comestível. A composição da porção comestível relatada foi: 10% em sólidos solúveis, 0,38% (N x 6,25) ou 0,35% (N x 5,7) de proteínas, 362 mg/100 g de AA totais, dos quais 149 mg/100 g (41,4%) foram AA essenciais. Do total de AA, 4,3% foram isoleucina, 7,8% leucina, 7,7% lisina, 2,1% metionina, 0,4% cistina + cisteína, 3,7% fenilalanina, 4,3% tirosina, 4,5% treonina, 5,1% valina, 0,9% histidina, todos considerados essenciais, e 2,1% de arginina, 7,3% de alanina, 10% de ácido aspártico, 14,8% de ácido glutâmico, 5,1% glicina, 5,1% prolina, 8,2% serina e 6,6% hidroxiprolina.

Lund & Smoot (1982) estudaram o conteúdo em fibra dietética de alguns frutos e vegetais tropicais da Flórida. Carambolas "Tean Ma" contiveram 0,46% de celulose, 0,32% de hemicelulose, 0,31% de lignina e 0,014% de cinzas. O cultivar 44 conteve 0,44%, 0,32%, 0,31% e 0,014%, para os componentes acima, respectivamente.

Wilson, III, et alii (1982) quantificaram ácido oxálico em 15 cultivares de carambola da Flórida. O cultivar "Fwang Tung" conteve a menor quantidade de ácido oxálico com 0,08 g por 100 g e os cultivares WA3-24-14 e WA3-24-37 com 0,73 g por 100g a maior quantidade.

Gross et alii (1983) Investigaram o teor e a composição de carotenóides de carambola, encontrando um teor de $22 \mu\text{g g}^{-1}$. Os componentes principais foram identificados como fitoflueno (17%), ξ -caroteno (25%), β -criptoflavina (34%) e mutatoxantina (14%). β -Caroteno, β -apo-8'-carotenal, criptoxantina e luteína foram encontrados em pequenas quantidades.

Wilson III et alii (1985) identificaram 41 componentes voláteis de carambola. O aroma mais proeminente lembrava uva e metil antranilato foi o mais abundante. O aroma forte de fruta dos extratos deveu-se provavelmente aos ésteres e às cetonas.

Wills et alii (1986) estudaram a composição de alimentos da Austrália, especificamente de frutas tropicais e sub-tropicais. De acordo com os autores, a composição da porção comestível de carambola (96%) foi a seguinte: 90,8% de umidade, 0,7% de proteínas, 0,2% de lipídios, 0,9% de glucose, 2,9% de frutose, 8,3% de sacarose, 0,5% de amido, 1,6% de fibra dietética, 0,21% de ácido málico, 0,77% de ácido cítrico, 0,4% de cinzas e um total de energia de 238 kJ/100 g do fruto. Quanto aos teores de vitaminas, para cada 100 g de carambola foram relatados: 35 mg de vitamina C, 0,02 mg de tiamina, 0,04 mg de riboflavina, 0,5 mg de niacina, 0,02 mg de β -caroteno e 0,01 mg de criptoxantina. A composição de minerais da carambola/100 g foi: 110 mg de potássio, 3 mg de sódio, 3 mg de cálcio, 3 mg de magnésio, 0,3 mg de ferro e 0,2 mg de zinco.

Candlish et alii (1987) analisaram o teor de fibra dietética e amido de algumas frutas do sudeste asiático. De acordo com os autores, carambola foi composta de 91% de umidade, 0,16% de amido, 1,1% de polissacarídeos não-celulósicos, 0,5% de celulose e 0,24% de lignina, num total de 1,9% de fibras.

MacLeod & Ames (1990) analisaram componentes voláteis de carambola usando cromatografia gasosa e cromatografia gasosa com espectrometria de massa. Os autores identificaram ao todo 178 componentes positivamente, dos quais 116 pela primeira vez. Outros 31 componentes foram parcialmente caracterizados. Ésteres (57) e lactonas (9) foram os componentes significantes do aroma, em conjunto com vários compostos derivados de precursores de carotenóides.

Nagy et alii (1990) recuperaram essências de carambola de concentrados de suco e as caracterizaram. De acordo com os autores, as essências tiveram aroma que lembrava maçã verde (verde no sentido de imaturo) ou damasco. Cromatografia gasosa com espectrometria de massa revelou etil acetona, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, trans-2-hexenol, n-hexanol e muitos álcoois, ésteres e terpenos menores. O aroma agradável da essência de carambola sugere potencial comercial de sua utilização em sucos e bebidas, de acordo com os autores.

Nahar et alii (1990) analisaram carboidratos de 7 frutas comestíveis de Bangladesh. A carambola apresentou 5,9% de matéria seca, composta de 3,0% de cinzas, 11,2% de lignina e 7,5% de proteína, entre outros. A fruta fresca apresentou traços de glicerol, 7,1 mg g⁻¹ de glucose, 8,6 mg g⁻¹ de frutose, 0,2 mg g⁻¹ de manitol, 0,4 mg g⁻¹ de glucitol, 0,2 mg g⁻¹ de mio-inositol e traços de sacarose, num total de 1,6% de açúcares livres.

Herderich et alii (1992) identificaram C₁₃- Norisoprenóides, precursores de "flavor" em carambolas, usando cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massa. Os constituintes isolados são aclicones, produtos da degradação de carotenóides. Muitos destes componentes são facilmente degradados por calor em condições naturais do pH da polpa, de modo a formarem uma série de compostos aromáticos C₁₃, os quais foram relatados como componentes voláteis de carambola.

Winterhalter et alii (1995) relataram que carambola constitui fonte atrativa de componentes de "flavor" derivados da porção central de carotenóides, que são C₁₃ e C₁₅ nor-isoprenóides.

Enzimas em carambola

Baldini et alii (1982) realizaram uma avaliação bioquímica da carambola em frutas de cultivar ácido não identificado. Os autores relataram atividades de pectinesterase, poligalacturonase, amilase, invertase, catalase e peroxidase (POD). Pectinesterase, poligalacturonase e peroxidase foram estudadas quantitativamente pelos autores, sendo encontradas atividades específicas de 0,08 unidades/mg de proteína para pectinesterase, de 22,2 unidades/mg de proteína para poligalacturonase e de 34,8 unidades/mg de proteína para a peroxidase. A eletroforese em gel de poliacrilamida 7% pH 8,3 para o extrato bruto revelou uma única banda com guaiacol como corante.

Tengku Adnin Bin Tengku Adnan et alii (1986) analisaram polifenoloxidase (PPO) de carambola. A enzima foi purificada cerca de 22 vezes por precipitação com acetona e diálise. O pH 7,2 foi o ótimo com catecol como substrato. A meia vida de inativação da PPO a 75 °C foi 3,1 minutos e o K_m e a V_{max} para catecol foram 0,001 M e 20 U ml⁻¹, respectivamente. Uma U de PPO foi definida como a quantidade de enzima que provocou um aumento de 0,001 de absorbância por minuto a 420 nm.

Ghazali & Leong (1987) obtiveram poligalacturonase de carambola parcialmente purificada por ultrafiltração em filtro Amicon e por filtração em gel de Sephadex G-100 por um fator de 7,8, e pH ótimo aparente de 5,2. Os testes realizados pelos autores revelaram que se trata de exopoligalacturonase, pois retira uma unidade de ácido galacturônico por vez da extremidade não redutora do ácido poligalacturônico.

Schnell & Knight, Jr. (1989) estudaram variações de alelos das isoenzimas de aconitase, glucose-6-fosfato dehidrogenase, glutamato dehidrogenase, isocitrato dehidrogenase, leucina amino-peptidase, malato dehidrogenase, fosfoglucoisomerase, fosfoglucomutase, sorbitol dehidrogenase e triose-fosfato isomerase para avaliar o parentesco de cultivares de carambola na Flórida. Polimorfismo foi encontrado na

população de plantas germinadas para malato desidrogenase, fosfoglucoisomerase e sorbitol desidrogenase. O padrão das bandas de eletroforese indicou presença de alelos nos descendentes que não foram encontrados na suposta genitora "Golden Star". Análises com cruzamentos de "Golden Star x Fwang Tung", plantadas na mesma época, indicaram progenitura mais consistente. Segundo os autores, o trabalho gerou uma base de análise genética da espécie *Averrhoa carambola*.

Ghazali & Peng (1993) relataram que a atividade da poligalacturonase aumenta com o avanço do amadurecimento da carambola. O pH ótimo foi 5,2 em todas as maturações estudadas e uma correlação negativa foi encontrada entre a atividade da poligalacturonase e a firmeza do fruto.

Hong et alii (1996) obtiveram maior atividade da pectinesterase de carambola em meio de extração a pH 8,4 na presença de 2% de PVP e 2,4 M NaCl. A enzima foi purificada cerca de 63 vezes por precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 60 e 90% da saturação, seguido por cromatografia de troca iônica em coluna CM-Sephadex C-50, sendo 21% da atividade recuperada. O K_m da enzima para pectina cítrica foi $0,326 \text{ mg ml}^{-1}$ e V_{max} foi $207 \text{ moles minuto}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. O pH ótimo encontrado foi 7,5 e a temperatura ótima 70°C .

Weller et alii (1997) relataram acerca da susceptibilidade ao escurecimento e composição de carambola fatiada durante o armazenamento. Nenhuma diferença foi encontrada entre maturações em relação à susceptibilidade ao escurecimento. Carambolas recém-fatiadas escureceram pouco mas, armazenadas a $4,4^\circ\text{C}$ durante seis semanas, escureceram rapidamente, dentro de seis horas de exposição ao ar. O ácido ascórbico diminuiu e a atividade da polifenoloxidase aumentou, tanto em carambolas inteiras quanto nas fatiadas durante o armazenamento. Tratamento com 1 ou 2,5% de ácido cítrico + 0,25% de ácido ascórbico em água antes da embalagem foi muito eficiente na diminuição do escurecimento.

Não tendo sido encontrado nenhum trabalho que relatasse acerca de propriedades bioquímicas da peroxidase desta fruta, propusemos estudar as condições

para o Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase da carambola (*Averrhoa carambola*, L.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 1 ABELES, F. B. and BILES, C. L. Characterisation of Peroxidase in Lignifying Peach Fruit Endocarp. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.95, n.1, p.269-273, 1991.
- 2 ADEDIRAN, S. A. and DUNFORD, H. B. Structure of Horseradish Peroxidase Compound I. Kinetic Evidence for the Incorporation of One Oxygen Atom from the Oxidizing Substrate into the Enzyme. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.132, n.1, p.147-150, 1983.
- 3 ADEDIRAN, S. A. and LAMBEIR, A. M. Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.186, n.3, pp.571-576, 1989.
- 4 AESCHBACH, R.; AMADÒ, R. and NEUKOM, H. Formation of Dityrosine Cross-Links in Proteins by Oxidation of Tyrosine Residues. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.439, n.2, p.292-301, 1976.
- 5 ANGUITA, G.; MARTÍN, R.; GARCÍA, T.; MORALES, P.; HAZA, A. I.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, B. and HERNÁNDEZ, P. E. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine β -Casein. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.1, p.64-66, 1997.

¹ Referentes às secções Introdução e Revisão Bibliográfica

- 6 ARNAO, M. B.; CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. and ACOSTA, M. Inhibition by L-Ascorbic Acid and Other Antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) Oxidation Catalyzed by Peroxidase: A New Approach for Determining Total Antioxidant Status of Foods. **Analytical Biochemistry**, New York, v.236, n.2, p.255-261, 1996.

- 7 BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v.12, p. 283-291, 1982.

- 8 BAQAR, M. R. Technical Note: Vitamin C content of some Papua New Guinean fruits. **Journal of Food Technology**, Chicago, v.15, n.4, p.459-461, 1980.

- 9 BERNAL, M. A.; CÁCERES, F. M. de and ROS BARCELÓ, A. Histochemical Localization of Peroxidase in *Capsicum* Fruits. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London/Zürich, v.27, n.2, p.197-198, 1994.

- 10 BERRY, S. K. The Composition of the Oil of Starfruit (*Averrhoa carambola*, Linn.) Seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.55, n.3, p.340-341, 1978.

- 11 BRIDI, M. Carambola embalada tem melhor preço. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, quarta-feira, 10 de março de 1999.

- 12 BROOKS, J. L. Oxidase Reactions of Tomato Anionic Peroxidase. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.80, n.1, pp.130-133, 1986.

- 13 BURNETTE, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.1, p.1-6, 1977.

- 14 CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; MUÑOZ, R., and ROS BARCELÓ, A. Localization of Peroxidase in Grapes using Nitrocellulose Blotting of Freezing/Thawing Fruits. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.1, pp.38-40, 1993.
- 15 CAMPBELL, B. A. and CAMPBELL, C. W. Preservation of Tropical Fruits by Drying. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.96, p.229-231, 1983.
- 16 CAMPBELL, C. A. Handling of Florida-grown and Imported Tropical Fruits and Vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.9, p.975-978, 1994.
- 17 CAMPBELL, C. A.; HUBER, D. J. and KOCH, K. E. Postharvest Response of Carambolas to Storage at Low Temperature. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.100, p.272-275, 1987.
- 18 CAMPBELL, C. A.; HUBER, D. J. and KOCH, K. E. Postharvest Changes in Sugars, Acids, and Color of Carambola Fruit at Various Temperatures. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.3, p.472-475, 1989.
- 19 CAMPBELL, C. A. and KOCH, K. E. Sugar/Acid Composition and Development of Sweet and Tart Carambola Fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.114, n.3, p.455-457, 1989.
- 20 CANDLISH, J. K.; GOURLEY, L. and LEE, H. P. Dietary Fiber and Starch in some Southeast Asian Fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v.1, n.1, p.81-84, 1987.
- 21 CASELLA, L.; GULLOTTI, M.; NARCHESINI, A. and PETRARULO, M. Rapid Enzymatic Method for Vitamin C Assay in Fruits and Vegetables Using Peroxidase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.2, p.374-375, 378, 1989.

- 22 CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valência, v.27, n.4, p.509-518, 1987.
- 23 CEAGESP - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo **Boletim Anual**, São Paulo : CEAGESP, 1989 e1990.
- 24 CHAN, Jr., H. T. and HEU, R. A. Identification and Determination of Sugars in Starfruit, Sweetsop, Green Sapote, Jack Fruit and Wi Apple. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.6, p.1329-1330, 1975.
- 25 CHANG, T. C. and HUANG, S. H. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed Foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.3, p.184-189, 1994.
- 26 CHEN, C. H. and CHANG, T. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.8, p.873-878, 1995.
- 27 CHU, F. S. and FAN, T. S .L. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. **Journal of the AOAC**, Washington, DC, v.68, n.1, p.13-16, 1985.
- 28 CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- 29 CLEMENTE, E. Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.16, n.1, p.1-5, 1996.

- 30 CLEMENTE, E. Purification and Thermostability of Isoperoxidase from Oranges. **Phytochemistry**, Oxford, v.49, n.1, p.29-36, 1998.
- 31 CORYDON, J. At Eden Winery, the new star is star fruit. **Citrus & Vegetable Magazine**, Tampa, v. 56, n.1, p.68-71, 1992.
- 32 CORRÊA, M. Pio **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1926, reimpresso 1989. p.33
- 33 COSTA, R. P.e SBAA-SRUR, A. U. O. Saturação de carambola (*Averhoa carambola* L.) com açúcares. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, III, Anais, Campinas, reumo 571, p.161, 1999.
- 34 DOLPHIN, D.; FORMAN, A.; BORG, D. C.; FAJER, J. and FELTON, R. H. Compound I of Catalase and Horseradish Peroxidase: π - Cation Radicals. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v.68, n.3, p.614-618, 1971.
- 35 DUNFORD, H. B. Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, E. K. and GRISHAM, M. B. (Editors). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 1991. Volume II, Chapter I, p.1-24.
- 36 FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. **Sciences des Aliments**, Paris, v.5, n.2, p.217-232, 1985.
- 37 FINZEL, B. C.; POULOS, T. L. and KRAUT, J. Crystal Structure of Yeast Cytochrome c Peroxidase Refined at 1.7 Å Resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.259, n.21, p.13027-13036, 1984.

- 38 FLURKEY, W. H. and JEN, J. J. Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities in Developing Peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.6, p.1826-1828, 1831, 1978.
- 39 FONSECA, H.; NOGUEIRA, J. N. e MARCONDES, A. M. S. Teor de ácido ascórbico e beta-caroteno em frutas e hortaliças brasileiras. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 19, n.1, p.9-16, 1969.
- 40 FRYLINCK, L.; DUBERY, I. A. and SCHABORT, J. C. Biochemical Changes Involved in Stress Response and Ripening Behaviour of γ -Irradiated Mango Fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.3, p.681-686, 1987.
- 41 GHAZALI, H. M. & LEONG, C. K. Poygalacturonase Activity in Starfruit. **Food Chemistry**, Oxford, v.24, n.2, p.147-157, 1987.
- 42 GHAZALI, H. M. and PENG, K. S. Changes in Polygalacturonase Activity and Texture During Ripening of Starfruit. **ASEAN Food Journal**, S.I., v.8, n.4, p.153-156, 1993.
- 43 GREEN, J. G. Carambola Production in Malaysia and Taiwan. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.100, p.275-278, 1987.
- 44 GROSS, J.; IKAN, R. and ECKHARDT, G. Carotenoids of the Fruit of *Averrhoa carambola*. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p.1479-1481, 1983.
- 45 HALL, N. T.; SMOOT, J. M.; KNIGHT, Jr., R. J. and NAGY, S. Protein and Amino Acid Composition of Ten Tropical Fruits by Gas-Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.28, n.6, p.1217-1221, 1980.
- 46 HASCHKE, R. H. and FRIEDHOFF, J. M. Calcium-Related Properties of Horseradish Peroxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.80, n.4, p.1039-1042, 1978.

- 47 HASHIMOTO, S.; TATSUNO, Y. and KITAGAWA, T. Resonance Raman evidence for oxygen exchange between the $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ heme and bulk water during enzymic catalysis of horseradish peroxidase and its relation with the heme-linked ionisation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, DC., v.83, n.8, p. 2417-2421, 1986.

- 48 HERDERICH, M.; NEUBERT, C.; WINTERHALTER, P. and SCHREIER, P. Identification of C_{13} -Norisoprenoid Flavour Precursors in Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) **Flavour and Fragrance Journal**, S.I., v.7, n.4, p.179-185, 1992.

- 49 HORNG, T. S.; ASBI, B. A. and JUNAINAH, A. H. Star Fruit Pectinesterase: Isolation, Purification and Some Characterisation. **Science International**, Lahore, v.8, n.2, p.153-156, 1996.

- 50 HOYLE, M. C. High Resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from Horseradish by Isoelectric Focusing. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.60, n.5, p.787-793, 1977.

- 51 KAY, L. E. and BASILE, D. V. Specific Peroxidase Isoenzymes Are Correlated With Organogenesis. **Plant Physiology**, Watham/Bethesda, v.84, n. 1, p. 99-105, 1987.

- 52 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). **Food Chemistry**, Oxford, v.46, n.1, p.61-64, 1993a.

- 53 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.47, n.1, p. 53-59, 1993b.

- 54 KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.49, n.4, p.407-410, 1994.

- 55 KOKKINAKIS, D. M. and BROOKS, J. L. Tomato Peroxidase. **Plant Physiology**, Wattham/Bethesda, v.63, n.1, p.93-99, 1979a.
- 56 KOKKINAKIS, D. M. and BROOKS, J. L. Hydrogene Peroxide-mediated Oxidation of Indole-3-acetic Acid by Tomato Peroxidase and Molecular Oxygen. **Plant Physiology**, Wattham/Bethesda, v.64, n.2, pp.220-223, 1979b.
- 57 KORBAN, S. S. and BOURNIVAL, B. L. Catalase, Esterase and Peroxidase Enzymes in Seeds and Leaves of *Malus x domestica* Borkh. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.32, n.3/4, p.213-219, 1987.
- 58 KUO, C.-F. and FRIDOVICH, I. Stimulation of the Activity of Horseradish Peroxidase by Nitrogenous Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.263, n.8, p.3811-3817, 1988.
- 59 LAGRIMINI, L. M.; VAUGHN, J.; ERB, W. A., and MILLER, S. A. Peroxidase Overproduction in Tomato: Wound-induced Polyphenol Deposition and Disease Resistance. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.3, pp.218-221, 1993.
- 60 LAM, P. F. and WAN, C. K. Ethylene and carbon dioxide production of starfruits (*Averrhoa carambola* L.) stored at various temperatures and in different gas and relative humidity atmospheres. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.64, n.3, p.181-184, 1985.
- 61 LaMAR, G. N.; ROPP, J. S. de; SMITH, K. M. and LANGRY, K. C. Proton Nuclear Magnetic Resonance Study of the Electronic and Molecular Structure of the Heme Crevise in Horseradish Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 255. n.14, p. 6646-6652, 1980.
- 62 LIAO, M. L.; LIU, M. S. and YANG, J. S. Respiration Measurement of Some Important Fruits in Taiwan. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.138, p.227-246, 1983.

- 63 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Peroxidase in Unripe and processing-ripe strawberries. **Food Chemistry**, Oxford, v.52, n.2, p.157-160, 1995.
- 64 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Purification and characterisation of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. **Food Chemistry**, Oxford, v.55, n.2, p.133-137, 1996.
- 65 LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Kinetic Properties of (+)-Catechin Oxidation by a Basic Peroxidase Isoenzyme from Strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.676-679, 1997.
- 66 LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.1, p.42-48, 1997.
- 67 LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. and SILVA, M. A. da Heat Inactivation of Soluble and Bound Peroxidase from Papaya Fruit. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p.155-158, 1995.
- 68 LUND, E. D. and SMOOT, J. M. Dietary Fiber Content of Some Tropical Fruits and Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.30, n.6, p.1123-1127, 1982.
- 69 MacLEOD, G. and AMES, J. M. Volatile Components of Starfruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.1, p. 165-172, 1990.
- 70 McCLEAR, B. V. and GLENNIE-HOLMES, M. Enzymatic Quantification of (1→3) (1→4)-β-D-Glucan in Barley and Malt. **Journal of the Institut of Brewing**, London, v.91, n.5, p.285-295, 1985.

- 71 MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.5, p.1269-1271, 1989.
- 72 MARANGONI, A. G.; JACKMAN, R. L. and STANLEY, D. W. Chilling-Associated Softening of Tomato Fruits is Related to Increased Pectinmethylesterase Activity. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60. n.6, p.1277-1281, 1995.
- 73 MARIN, M. A. and CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.3, p.690-692, 734, 1992.
- 74 MASIA, A.; ZANCHIN, A.; RASCIO, N. and RAMINA, A. Some Biochemical and Ultrastructural Aspects of Peach Fruit Development. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.5, p.808-815, 1992.
- 75 MAUK, M. R. and GIRROTTI, A. W. The Protoporphyrin-Apoperoxidase Complex. Photooxidation Studies. **Biochemistry**, Washington, v.13, n.8, p.1757-1763, 1974.
- 76 MIESLE, T. J. Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 116, n.5, pp.827-830, 1991.
- 77 MITCHAM, E. J. and McDONALD, R. E. Characterization of the Ripening of Carambola (*Averrhoa carambola* L.) Fruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.104, p.104-108, 1991.
- 78 MORALES, M.; PEDREÑO, M. A.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. & CALDERÓN, A. A. Purification and kinetic characterisation of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignification in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. **Food Chemistry**, Oxford, v.48, n. 4, p. 391-394, 1993.

- 79 MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.24, n.3, p.269-275, 1989.
- 80 MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- 81 MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.23, n.4, p. 343-351, 1988.
- 82 MUJER, C. V.; MENDOZA, E. M. T. and RAMIREZ, D. A. Coconut Peroxidase Isoenzymes: Isolation, Partial Purification and Physicochemical Properties. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p.1335-1340, 1983.
- 83 NAGY, S.; BARROS, S. and CARTER, R. Production and Characterization of Carambola Essence. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.103, p.277-279, 1990.
- 84 NAHAR, N.; RAHMAN, S. and MOSIHUZZAMAN, M. Analysis of Carbohydrates in Seven Edible Fruits of Bangladesh. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.51, n.2, p.185-192, 1990.
- 85 NAKASHIMA, R. and YAMAZAKI, I. The Mechanism of Oxyperoxidase Formation from Ferryl Peroxidase and Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.262, n.6, p.2576-2581, 1987.

- 86 OSLUND, C. R. and DAVENPORT, T. L. Ethylene and Carbon Dioxide in Ripening Fruit of *Averrhoa carambola*. **HortScience**, Alexandria, v.18, n.2, p.229-230, 1983.
- 87 OSMAN, A.; LEONG, O. P.; ABDUL-KARIM, M. N. and CHE MAN, Y. B. Utilization of Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) Waste Product from Thinning Process. IFT Annual Meeting, **Book of Abstracts**, Chicago, n.26G-20, p.84, 1995.
- 87 PEDREÑO, M. A.; SABATER, F. ; MUÑOZ, R. and GARCÍA-CARMONA, F. Effect of Different Phenols on the NADH-Oxidation Catalysed by a Peroxidase from Lupin. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.12, p.3133-3136, 1987.
- 89 POULOS, T. L.; FREER, S. T.; ALDEN, R. A.; EDWARDS, S. L.; SKOGLAND, U. TAKIO, K.; ERIKSSON, B.; XUONG, N.-H.; YONETANI, T. and KRAUT, J. The Crystal Structure of Cytochrome c Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.255, n.2, p.575-580, 1980.
- 90 RICHARD, F. and NICOLAS, J. Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. **Sciences des Aliments**, Paris, v.9, n.2, p.335-350, 1989.
- 91 ROBINSON, D. S. Peroxidases and their Significance in Fruits and Vegetables. In: FOX, P. F. Editor, **Food Enzymology**, London and New York, 1991. pp.399-426.
- 92 ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.24, n.6, p.613-618, 1989.
- 93 ROS BARCELÓ, A.; ZAPATA, J. M. and CALDERÓN, A. A. Tissue-specific expression of peroxidase activity in seedless grapes (*Vitis vinifera* cv. Thompson and Flame). **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, València, v.34, n.1, p. 110-116, 1994.

- 94 ROTHAN, C. and NICOLAS, J. Changes in Acidic and Basic Peroxidase Activities during Tomato Fruit Ripening. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p. 340-342, 1989.
- 95 RYCHTER, A. and LEWAK, S. Apple Embryos Peroxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n.11, p.2609-2613, 1971.
- 96 SCHNELL, R. J. and KNIGHT, Jr., R. J. Variation in Isozyme Alleles in *Averrhoa carambola* L. **Proceedings of the Interamerican Society of Tropical Horticulture**, Alexandria, v.33, p.127-132, 1989.
- 97 SCHULLER, D. J.; BAN, N.; HUYSTEE, R. B. van; McPHERSON, A. and POULOS, T. L. The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, Philadelphia, v.4, n.3, p.311-321, 1996.
- 98 SHIRO, Y.; KURONO, M. and MORISHIMA, I. Presence of Endogenous Calcium Ion and Its Functional and Structural Regulation in Horseradish Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.261, n. 20, p. 9382-9390, 1986.
- 99 SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.4, p.1051-1056, 1990.
- 100 SMITH, A. M; MORRISON, W. L. and MILHAM, P. J. Oxidation of Indole-3-acetic Acid by Peroxidase: Involvement of Reduced Peroxidase and Compound III with Superoxide as a Product. **Biochemistry**, Washington, v.21, n.18, p.4414-4419, 1982.
- 101 SINGH, P. P. The Oxalic Acid Content of Indian Foods. **Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabilae**, The Hague, v.22, n. 3-4, p.335-347, 1973.

- 102 SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. and OGURA, N. Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.6, p.1677-1678, 1991.
- 103 TENGKU ADNIN BIN TENGKU ADNAN; AUGUSTIN, M. A. and GHAZALI, H. M. Polyphenoloxidase from Starfruit (*Averrhoa carambola*, L.) **Pertanika**, Kuala Lumpur, v.9, n.2, p.219-224, 1986.
- 104 TOURINO, M. C. C.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. L. F.; MACHADO, J. C. & GAVILANES, M. C. Injúria Mecânica em Tecidos de Frutos de Pessegueiros (*Prunus persica* (L.) Batsch): Mecanismos de Cura. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v.27, n.2, p.69-78, 1993.
- 105 VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.15, p. 49-127, 1981.
- 106 VINES, H. M. and GRIERSIN, W. Handling and Physiological Studies with the Carambola. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v.79, p.350-355, 1966.
- 107 WELINDER, K. G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. Tryptic Glycopeptide Containing two Histidine Residues and a Disulfide Bridge. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.30, n.2, p.243-245, 1973.
- 108 WELINDER, K. G. Covalent Structure of the Glycoprotein Horseradish Peroxidase (EC 1.11.1.7) **FEBS Letters**, Amsterdam, v.72, n.1, 1976.
- 109 WELINDER, K.G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.96, p.483-502, 1979.

- 110 WELINDER, K. G. Plant Peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.151, p. 497-504, 1985.
- 111 WELINDER, K. G. and MAZZA, G. Similarities and Differences of Five Peroxidases from Turnip and Horseradish. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.57, p. 415-424, 1975.
- 112 WELINDER, K. G. and MAZZA, G. Amino-Acid Sequences of Heme-Linked, Histidine-Containing Peptides of Five Peroxidases from Horseradish and Turnip. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.73, p.353-358, 1977.
- 113 WELINDER, K. G. and SMILLIE, L. B. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. II. Thermolytic Peptides. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.50, n.1, p.63-69, 1972.
- 114 WELINDER, K. G.; SMILLIE, L. B. and SCHONBAUM, G. R. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. I. Tryptic Peptides. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.50, n.1, p.44-62, 1972.
- 115 WELLER, R. P.; BATES, C. A.; SIMS, C. A. and MATTHEWS, R. F. (1996) Evaluation of Browning Susceptibility in Whole and Sliced Carambola. In: IFT-Annual Meeting 1996, Book of Abstracts, p.99.
- 116 WELLER, A.; SIMS, C. A.; MATHEWS, R. F.; BATES, R. P. and BRECHT, J. K. Browning Susceptibility and Changes in Composition During Storage of Carambola Slices. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.256-260, 1997.
- 117 WILLS, R. B. H. ; LIM, J. S. K. and GREENFIELD, H. Composition of Australian foods. 31. Tropical and sub-tropical fruit. **Food Technology in Australia**, Sydney, v.38, n.3, p.118-123, 1986.

- 118 WILSON, III, C. W.; SHAW, P. E. and KNIGHT, Jr., R. J. Analysis of Oxalic Acid in Carambola (*Averrhoa carambola* L.) and Spinach by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.30, n.6, p.1106-1108, 1982.
- 119 WILSON, III, C. W.; SHAW, P. E.; KNIGHT, Jr., R. J. A; NAGY, S. and KLIM, M. Volatile Constituents of Carambola (*Averrhoa carambola* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.33, n.2, p.199-201, 1985.
- 120 WINTERHALTER, P.; LUTZ, A.; HERDERICH, M. and SCHREIER, P. Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) - Attractive Source for Carotenoid-Derived Flavor Compounds. **ACS-Symposium Series**, Washington - DC, n.596, p. 114-126, 1995.
- 121 WU, J. S.-B.; SHEU, M.-J. and FANG, T.-T. Oriental Fruit Juices: Carambola, Japanese Apricot (Mei), Lychee. In: NAGY, S. CHEN, C. S. and SHAW, P. E. **Fruit Juice Processing Technology**. Anburndale, 1993. p.595-619.
- 122 ZAPATA, J. M.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R. and ROS BARCELÓ, A. Oxidation of Natural Hydroxibenzoic Acids by Grapevine Peroxidases: Kinetic Characteristics and Substrate Specificity. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.43, n.2, p.134-138, 1992.
- 123 ZHENG, X. H.; NISHIOKA, M.; KAWAMURA, A. UKEDA, H. SAWAMURA, M. and KUSUNOSE, H. Cluster Analysis by Measurement of Peroxidase and Esterase from *Citrus* Flavedo. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.60, n.3, p.390-395, 1996.
- 124 ZHENG, X. H.; OOTANI, Y. and SAWAMURA, M. Isozymic Analysis of Peroxidase and Esterase in *Citrus* Flavedo. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.57, n.10, p.1800-1802, 1993.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O trabalho visou estabelecer a ocorrência de atividade de peroxidase em quatro estados de maturação da carambola (verde, verde-matura, amarela-madura e sobremadura), isolá-la, purificá-la e caracterizá-la bioquimicamente.

Objetivos Específicos

- Verificar a atividade da peroxidase da casca, da polpa e do talo central com o gineceu de carambola.
- Estabelecer as condições ótimas de pH, molaridade e aditivos na extração da peroxidase de carambola.
- Estabelecer as condições ótimas de pH e temperatura para a reação da peroxidase de carambola.
- Isolar e purificar peroxidase do fruto da caramboleira.
- Caracterizar bioquimicamente a peroxidase purificada de carambola: pH ótimo e de estabilidade, temperatura ótima e inativação térmica, ativadores e inibidores da atividade da peroxidase, k_m e V_{max} frente a diferentes substratos.

CAPÍTULO 2

Peroxidase of carambola (*Averrhoa carambola*, L.) in four stages of maturation: Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.¹

¹ Este artigo foi escrito para o periódico: Food Chemistry.

Peroxidase of carambola (*Averrhoa carambola*, L.) in four stages of maturation:
Extraction, histochemical location, and some biochemical properties.

H. J. Holschuh¹ & G. M. Pastore^{2,1}

¹Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

²Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

ABSTRACT

The peroxidase activity of four maturation stages of Carambola (*Averrhoa carambola*, L.) and its histochemical location was studied. The results showed that peroxidase activity was localised near the vascular vessels. Increased solubility of peroxidase activity was found in overripe carambolas. The best extraction medium was 0.2 M potassium phosphate buffer at pH 8.0 and the best reaction medium was 0.1 M citrate phosphate buffer at pH 5.5 at 50 °C of reaction temperature. The internal stem with the gynoceium at all stages of maturation demonstrated the highest peroxidase activity per gram of fruit part, followed by the peel. The pulp only demonstrated appreciable activity in the overripe fruit. Green fruits yielded more activity per gram than other stages of maturity.

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, E.C.1.11.1.7, donor : H₂O₂ oxydoreductases) are a group of isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. In food science and technology these enzymes are associated with unpleasant organoleptic and colour changes, as well as in quality deterioration (Burnette, 1971; Vámos-Vigyázó, 1981; Robinson, 1991).

¹To whom correspondence should be addressed.

Carambola is one of the two species of the small genero *Averrhoa* whitch produces edible fruits and belongs to the family of Oxalidaceae. It's originated from the Indo - Malayan Region, where carambola has been cultivated for milleniums. No wild carambola cultivars are known. A french agronomist named Paul Germain introduced carambola from "Ille de France" to Pernambuco, Brazil in 1817 (Corrêa, 1926).

Browning of carambola was reported in the whole and sliced fruits of nine cultivars in Florida, associated with polyphenoloxidase (Weller et alii, 1997). Peroxidase activity in carambola was reported by Baldini et alii (1982), producing only one band in disk-electrophoresis. No reports were found about the location of peroxidase in the fruit, neither about its biochemical characterization.

For this reason we investigated the histochemical location of peroxidase in carambola, its extraction and activity in parts of the fruit, and some biochemical characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Carambolas of a tart local cultivar were harvested from an identified tree from a small farm in "Hortolândia" near Campinas, São Paulo State, Brazil, in the green, mature green, mature and overripe maturation stages. The fruits were transported to the laboratory and washed. For the histochemical location and determination of the extraction conditions, the fruits were stored at 4 to 5 °C and analysed in the fresh form. For the peroxidase evaluation in the peel, pulp and internal stem with adjacent gynoecium, the parts were separated with a sharp stainless steel knife, deep frozen in solid carbon-dioxide and stored at -19 °C in a freezer until examined.

Histochemical localization

Three to four mm thick slices from the middle of green, mature and overripe carambolas (Figure 1) were submitted to staining in a reaction system of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0 containing 50 mM guaiacol and 5 mM hydrogen peroxide. The

evolution of the reaction was photographed at intervals of 5 minutes for half an hour. The stained slices were rinsed in distilled water and photographed again.

Peroxidase extraction conditions

Whole carambolas were ground in a domestic blender for three minutes in the presence of cold (4°C) 0.2 M buffers in the pH range from 3.0 to 10.0. The extracts were submitted to centrifugation at 11,000 *g* for 15 minutes at 4°C. The supernatants were taken as peroxidase sources, and the activity determination performed immediately.

Peroxidase activity from carambola parts

Deep frozen carambola parts were extracted separately under the above conditions with 0.2M potassium phosphate buffer, pH 8.0, and the peroxidase activity determined in the supernatant.

Biochemical characteristics

The **optimum reaction pH** was determined in acetate, citrate phosphate, phosphate, and tris-HCl buffers, within their buffer capacities, in the pH ranging from 3.0 to 9.5 with 0.5 intervals and the **optimum reaction temperature** was determined at the optimum pH (citrate-phosphate buffer, pH 5.5) in a temperature range from 10 to 80 °C with 10°C intervals.

Peroxidase activity determination

The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction mixture contained 0.1 ml of enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer and buffer to complete 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, series DU-70. The activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve, between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The results were given as delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the

quantity of enzyme which causes an increase in 0.001 absorbancy units per minute and per ml of enzyme source at 470 nm with guaiacol as H^+ donor or at 485 nm with p-phenylenediamine. The specific activity was expressed in U per g of carambola or its parts.

RESULTS AND DISCUSSION

Histochemical location

The direct dying of the transversal sections of the carambola fruits visualized the localization of the peroxidase close to the vascular tissues and its connections to the gynoecium and seeds and in the skin in all maturation states analysed. No differences were found between the green and ripe fruits with respect to the localization (Figures 2 to 4). This finding was in accordance to that reported by Abeles & Biles (1990) for lignifying peach endocarp, by Miesle et alii (1991) for Highbush Blueberries, and by López-Serrano & Ros Barceló (1995) for strawberries. Calderon et alii (1993) localized greater peroxidase activity in the skin of grapes, as did Bernal et alii (1994) for Capsicum fruits. Rós Barceló et alii (1994) reported hypodermic localization of peroxidase activity for the grape varieties Thompson and Flame. Overripe carambolas developed a darker stain in the dye solution than mature green fruits (Figure 5) suggesting a greater solubility of the peroxidase activity in this maturation state. The "blank" solution with no hydrogen peroxide showed no alteration (Figure 6). Miesle et alii (1991) showed a similar connection between solubility and maturation state in Highbush Blueberries.

Peroxidase extraction conditions

The optimum extraction buffer was found to be 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 8.0 (Figure 7). Other buffer systems resulted in lower peroxidase activity per gram of frozen carambola parts. No study of the optimum extraction conditions has been published in recent papers, but most authors adopted buffers with pH values greater than pH 6.0 (Baldini et alii (1982) in carambola and Moulding et alii (1987) in apple).

Peroxidase activity in the parts of carambola

The activity of the peroxidase extracted from the previously separated and frozen carambola parts using the optimum extraction buffer was highest in the internal stem with the adjacent gynoecium of green carambolas (54,481 U/g) and lowest in the pulp of green and mature fruits (only 371 and 360 U/g, respectively) (Table 1). Green fruits yielded more POD activity per gram of carambola from the sum of parts (Table 1). Moulding et alii (1987) reported the peroxidase activity of the pulp of apples as being 75,7% of that of the peel (1.11 ± 0.07 and $0.84 \pm 0.03 A_{460}(\text{min/ml})$, respectively).

Biochemical characteristics

The best reaction buffer was found to be citrate-phosphate buffer pH 5.5. A pH between 5.0 to 6.0 gave results of above 80% of the best result (Figure 8). The reaction temperature of 50 °C resulted in the highest specific activity; temperatures between 40 and 50 °C resulted in activities higher than 80% of the major activity at 50 °C (Figure 9).

ACKNOWLEDGEMENTS

H. J. Holschuh holds a fellowship from CAPES - PICDT of the Brazilian Ministry of Education.

REFERENCES

- ABELES, F. B. and BILES, C. L. (1991) Characterisation of Peroxidase in Lignifying Peach Fruit Endocarp. Plant Physiology, **95** (1) :269-273,.
- BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. (1982) Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Coletânea do ITAL, **12** :283-291.
- BERNAL, M. A.; CÁCERES, F. M. de and ROS BARCELÓ, A. (1994) Histochemical Localization of Peroxidase in *Capsicum* Fruits. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, **27** (2) :197-198.
- BURNETTE, F. S. (1977) Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science, **42** (1) :1-6.
- CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; MUÑOZ, R., and ROS BARCELÓ, A. (1993) Localization of Peroxidase in Grapes using Nitrocellulose Blotting of Freezing/Thawing Fruits. HortScience, **28** (1) : 38-40.
- CORRÊA, M. Pio (1926) Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Ministério da Agricultura, IBDF : Rio de Janeiro, reimpresso 1989. p.33.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, **49** (4) : 407-410.
- LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. (1995) Peroxidase in Unripe and processing-ripe strawberries. Food Chemistry, **52** (2) :157-160.
- MIESLE, T. J. (1991) Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, **116** (5) :827-830.

- MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1987) Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, **22** (4) : 391-397.
- ROS BARCELÓ, A.; ZAPATA, J. M. and CALDERÓN, A. A. (1994) Tissue-specific expression of peroxidase activity in seedless grapes (*Vitis vinifera* cv. Thompson and Flame). Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, **34** (1) : 110-116.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. (1981) Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **15** : 49-127.
- WELLER, A.; SIMS, C. A.; MATHEWS, R. F.; BATES, R. P. and BRECHT, J. K. Browning Susceptibility and Changes in Composition During Storage of Carambola Slices. Journal of Food Science, Chicago, v.62, n.2, p.256-260, 1997.

APPENDIX

Table 1: Influence of the parts of the fruit and maturation on the specific peroxidase activity per mass of carambola or its parts

	Maturation	Green	Green- mature	Mature	Overripe	Sum of maturation stages
	Statistics					
Peel	mean	14848.0	9184.0	7835.0	10080.0	10544.0 b
	sd ¹	6675.9	3670.2	2569.9	3938.0	5059.7
Pulp	mean	371.0	880.0	360.0	2914.0	1218.0 a
	sd	395.5	574.9	664.5	920.5	1285.0
Internal stem	mean	54481.0	46295.0	24656.0	30884.0	38546.0 c
+ gynoecium	sd	15015.0	18371.0	12227.0	18505.0	19556.5
Sum of	mean	23340.0 B	18789 AB	10950.0 A	14460 AB	16769.0
parts	sd	25245.2	22759.0	12463.6	16058.3	19693.3

¹sd = standard deviation

Different lowercase letters in "Sum of maturation stages" column means a significant statistical difference in Tukey's test ($p=0.05$).

Different uppercase letters in "Sum of parts" row means a significant statistical difference in Tukey's test ($p=0.05$).

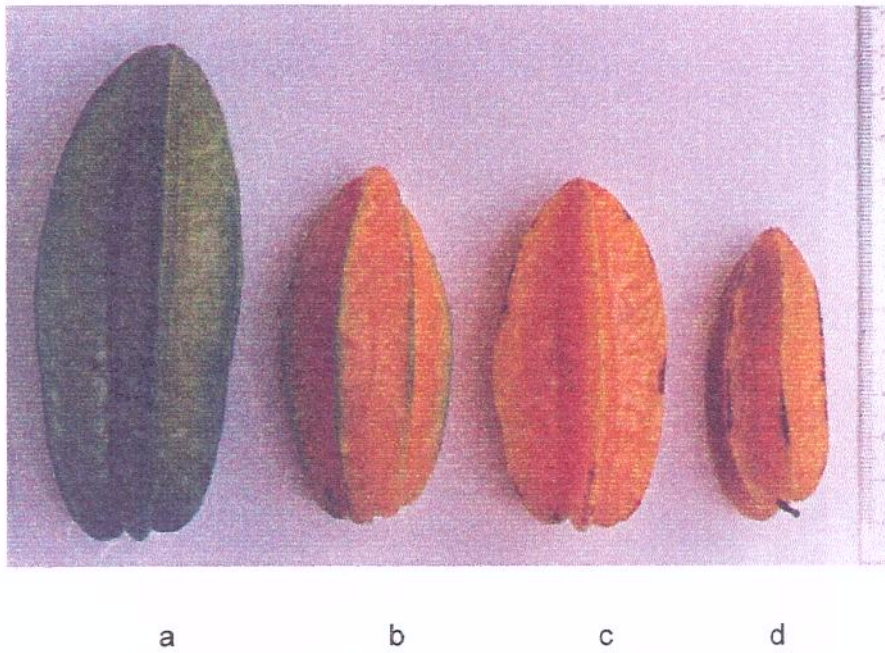


Figure 1: Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): a) green mature, b) ripe, c) full ripe and d) overripe fruits. No green fruits were available.



Figure 2: Histochemical localization of peroxidase activity in green carambola slices

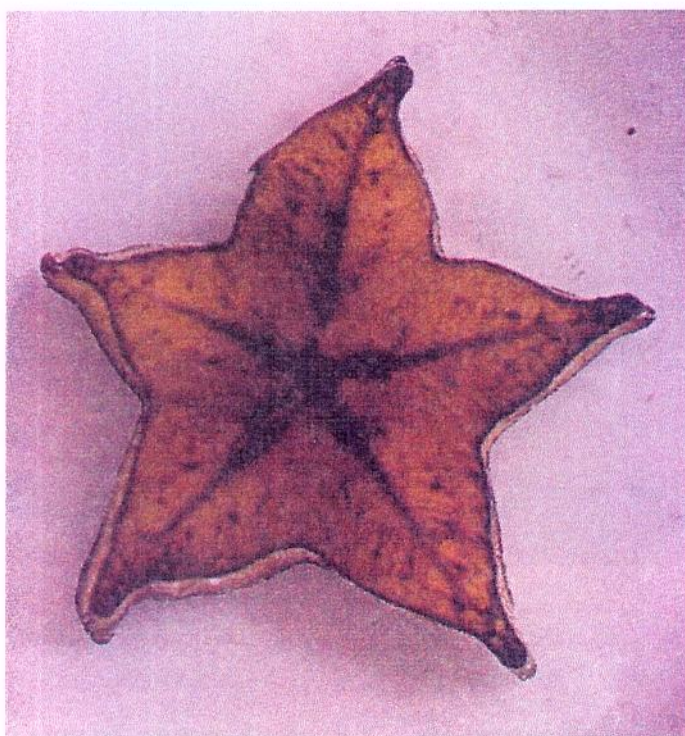


Figure 3: Histochemical localization of peroxidase activity in mature-green carambola

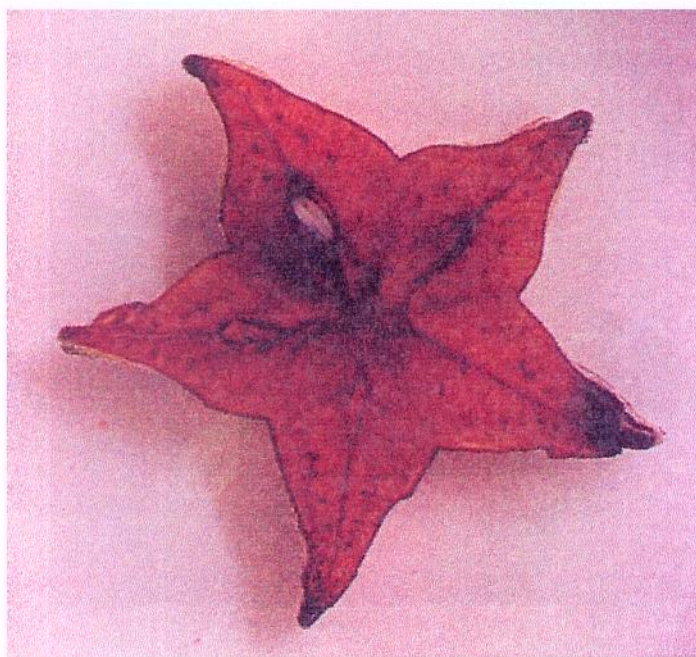


Figure 4: Histochemical localization of peroxidase activity in overripe carambola



Figure 5: Comparative peroxidase staining with guaiacol and hydrogen peroxide on the right; without hydrogen peroxide on the left. Green-mature carambola slices are on bottom and overripe slices on the top. Staining by the reaction solution on top-right was due to greater enzyme solubility in the overripe fruit.



Figure 6: Control slices of mature green carambola (right) and overripe fruit (left).

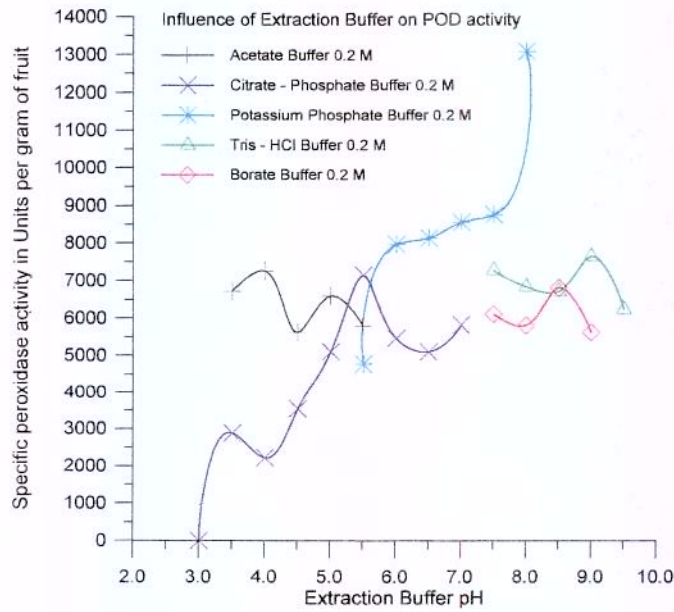


Figure 7: Influence of extraction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.

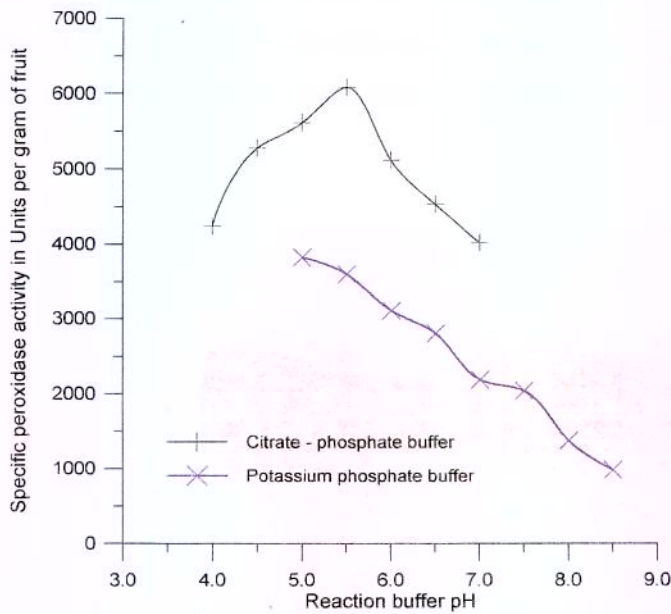


Figure 8: Influence of reaction buffer and pH on specific peroxidase activity per mass of carambola.

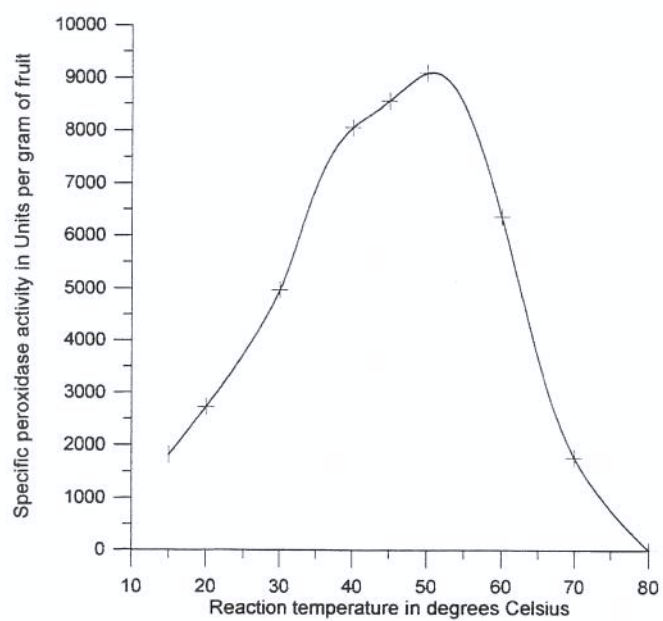


Figure 9: Influence of reaction temperature on specific peroxidase activity per mass of carambola.

CAPÍTULO 3

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.):

Influência de aditivos na extração da enzima.¹

¹ Este artigo foi publicado na íntegra nos Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob o número 580, em forma de CD-ROM, SBCTA, Regional Rio de Janeiro, 15 a 17 de julho de 1998.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA EXTRAÇÃO DA ENZIMA.

HOLSCHUH, H. J.¹ e PASTORE, G. M.²

RESUMO

A peroxidase (POD) de carambolas inteiras foi extraída com água destilada (H₂O) ou tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0, contendo ou não cloreto de cálcio (CaCl₂), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), ácido L-ascórbico e ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) como aditivos, isoladamente ou em combinação. A melhor combinação encontrada na extração seqüenciada foi H₂O contendo PEG e EDTA na extração da enzima livre e tampão fosfato contendo CaCl₂ na extração da enzima ionicamente ligada. O extrato total obtido com tampão fosfato contendo PEG, EDTA, CaCl₂ e Triton X-100 resultou em atividade de POD 1,29 vezes maior que a soma das atividades de POD obtidas na extração seqüenciada (POD livre + POD ionicamente ligada).

Palavras chave: Peroxidase, Carambola, Extração com aditivos

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB. atualmente doutorando na FEA-UNICAMP.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

1 - INTRODUÇÃO

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxidoreductase) são uma família de isoenzimas amplamente distribuída no reino vegetal.

Na conservação de alimentos, a POD é tradicionalmente associada a alterações indesejadas de cor, sabor e odor (7). Escurecimentos em carambolas inteiras ou fatiadas foram observados em nove cultivares na Flórida. Correlação positiva foi relatada entre a degradação do ácido L-ascórbico, atividade polifenoloxidase (PPO) e teor em fenóis totais (8). No Brasil, carambolas do tipo ácido tiveram suas propriedades bioquímicas avaliadas, entre as quais a POD (2). A maior atividade de POD foi encontrada no talo central da fruta, seguido pela casca e pela polpa. A atividade diminuiu durante o amadurecimento da carambola em talo e na casca, aumentando novamente no estado sobre-maduro; a polpa demonstrou maior atividade no estado sobre-maduro da fruta (3).

Aditivos químicos para auxiliar a extração de POD de frutas foram usados por diversos autores: Peroxidase ionicamente ligada foi extraída pela adição de $CaCl_2$, o qual ainda precipita pectinas (1). Triton X-100 foi usado para solubilizar POD ligada à parede celular (5), sequestradores de fenóis (PVP, PEG) com a finalidade de proteger a enzima contra inativação por fenóis ou seus produtos de oxidação (5,4). Ácido L-ascórbico foi adicionado como antioxidante e EDTA como quelante (4).

No presente trabalho investigou-se a influência desses aditivos na atividade da POD, extraída de carambolas inteiras.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Carambolas sobre-maduras foram obtidas de produtor da Região de Campinas, colhidas pela manhã, lavadas e guardadas até a extração no mesmo ou no dia seguinte ao da colheita, sob refrigeração. Todos os reagentes usados no ensaio foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Extração da POD usando aditivos

A extração da POD com ou sem aditivos realizou-se por etapas e em extrações seqüenciadas.

Etapa 1: Na extração, usando os aditivos isoladamente, as carambolas foram homogeneizadas em H₂O gelada (4°C) na proporção de 1:3 (p/v), com o auxílio de liquidificador doméstico em velocidade máxima durante três minutos. O homogenato foi dividido em alíquotas e os aditivos da primeira extração, adicionados. Seguiu-se nova homogeneização por agitação em banho de gelo durante 15 minutos e centrifugação a 12000g durante 15 minutos a 0°C. Os precipitados obtidos na 1ª extração com tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 usando aditivos foram ressuspensos em tampão sem aditivos e aqueles obtidos com tampão sem aditivos foram ressuspensos no mesmo tampão com aditivos, em volume igual ao da 1ª extração. Foram testados os aditivos na concentração final CaCl₂ 0,2M, PVP 2%, PEG 2%, ácido L-ascórbico 0,01M e EDTA 0,01M. Aquelas etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas.

Etapa 2: Nessa etapa os aditivos mais eficientes da etapa anterior foram usados isoladamente e em combinação. Os procedimentos de extração foram idênticos aos da etapa anterior. PEG e EDTA foram adicionados à água destilada. Cloreto de cálcio e tampão fosfato só foram usados na segunda extração, em seqüência, por resultarem em extrato de enzima ionicamente ligada, todos nas concentrações acima indicadas.

Etapa 3: A extração seqüenciada e exaustiva com aditivos foi realizada com base nos procedimentos apresentados por MOULDING et alii (6).

Extração Seqüenciada

Enzima Livre: O meio de extração foi composto de água destilada contendo PEG e EDTA nas concentrações finais 2 % e 0,01 M, respectivamente. A extração foi repetida por mais duas vezes, ressuspendendo-se o precipitado no meio extrativo e recentrifugando a mistura. O terceiro precipitado foi considerado isento de POD livre.

Enzima Ionicamente Ligada: O último precipitado da extração de POD livre foi ressuspendido em tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,2M, homogeneizado e centrifugado como citado anteriormente. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e o terceiro precipitado dessa extração considerado livre de POD ionicamente ligada.

Enzima Solúvel por Triton X-100: O precipitado da última centrifugação da POD ionicamente ligada foi ressuspensionado no tampão da etapa anterior, contendo 0,1 % de Triton X-100, homogeneizado e centrifugado como descrito anteriormente. O procedimento foi repetido, também nessa extração, por mais duas vezes.

Extrato Total: As carambolas foram trituradas em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 contendo todos os aditivos usados na extração sequenciada, nas concentrações indicadas. Os procedimentos de extração também foram idênticos.

Todos os sobrenadantes foram guardados em banho de gelo e ensaiados quanto à sua atividade de POD.

2.2.2 - Determinação da atividade POD

A determinação da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN e ROBINSON (4) na forma relatada por HOLSCHUH e PASTORE (3). Os resultados apresentados em forma de gráfico representam média de três repetições com os valores tornados relativos ao extrato aquoso ou ao de maior atividade, conforme o caso.

Todos os ensaios foram realizados em pelo menos três repetições.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividades mais altas de POD foram obtidas com os aditivos isolados, nas combinações: **8)** extração com solução aquosa de 0,2 M CaCl_2 , seguida de extração com tampão fosfato 0,2M, pH 8,0; **10)** solução aquosa de 2 % PEG seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **5)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PEG; **9)** solução aquosa de 2 % PVP seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **12)** solução aquosa de 0,01 M EDTA seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0; **4)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PVP e **3)** água seguida de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 , todos com mais de 1,5 vezes acima da atividade do extrato aquoso (água seguida de água) (Figura 1). Os números em negrito se referem aos números das colunas do gráfico. Na etapa seguinte, além do tampão fosfato 0,2 M pH 8,0, foi usada extração com os aditivos 0,2 M CaCl_2 , 2 % PEG e 0,01 M EDTA combinados.

A melhor **combinação de aditivos** foi solução aquosa contendo 2% PEG e 0,01 M EDTA (primeira extração), seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 (segunda extração), obtendo com essa combinação atividades de POD maiores que os extratos com os respectivos aditivos isoladamente. A atividade de POD extraída da carambola com a melhor combinação de aditivos foi 1,95 vezes maior que a extraída com água destilada (Figura 2). ABELES e BILES (1) relataram que a adição de 0,25 M CaCl_2 ao meio de extração aumentou a atividade de POD extraída de endocarpo de pêssego 2,6 vezes e a extraída de mesocarpo, 1,7 vezes. KHAN e ROBINSON (4) extraíram POD ionicamente ligada com CaCl_2 0,4 M e NaCl 0,8 M; no entanto, só relataram que esses sais foram mais eficientes que MgCl_2 , não indicando resultados precisos. Os demais autores referenciados em material e métodos se limitaram a informar o uso e a concentração dos aditivos.

Comparando-se a Extração Seqüenciada com a Extração Total, a primeira recuperou apenas 77,58% da atividade obtida no Extrato Total. Na extração total com aditivos combinados 0,2 M CaCl_2 , 2% PEG e 0,01 M EDTA foi obtido 94% da enzima POD na 1ª extração, enquanto que na extração da enzima livre e da enzima ionicamente ligada foram obtidos respectivamente 90,7% e 79,67%. Triton X-100 não extraiu nenhuma atividade de POD após a terceira extração iônica (Figura 3). Na extração seqüenciada, a POD solúvel extraída correspondia ao dobro da POD ionicamente ligada (Figura 3). MOULDING et alii (6) usaram extração seqüenciada e exaustiva na extração de POD solúvel e ionicamente ligada de casca e polpa de maçã: a polpa continha 28 vezes mais POD solúvel que a POD ionicamente ligada, e a casca, 6,5 vezes.

4 - CONCLUSÕES

4.1 - A maior atividade de **Peroxidase Livre** foi extraída com solução aquosa de PEG a 2% e EDTA 0,01M.

4.2 - A maior atividade de **Peroxidase Ionicamente Ligada** foi extraída com tampão fosfato de potássio 0,2M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2M.

- 4.3 - A extração com Triton X-100 em tampão fosfato após a extração exaustiva da **Peroxidase Livre**, seguida da extração exaustiva da **Peroxidase Ionicamente Ligada**, não resultou em atividade de POD adicional.
- 4.4 - O **Extrato Total** rendeu 1,29 vezes mais atividade de POD que a soma de todos os extratos de POD livre e POD ionicamente ligada.
- 4.5 - Na **Extrato Total** com todos os aditivos combinados 0,2 M CaCl_2 , 2% PEG e 0,01 M EDTA em tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 foi obtido 94% da peroxidase; na extração da **Peroxidase Livre** com solução aquosa contendo 2% PEG e 0,01 M EDTA foi obtido 90,7% de rendimento enquanto que na extração da **Peroxidase Ionicamente Ligada** foi obtido 79,7%.

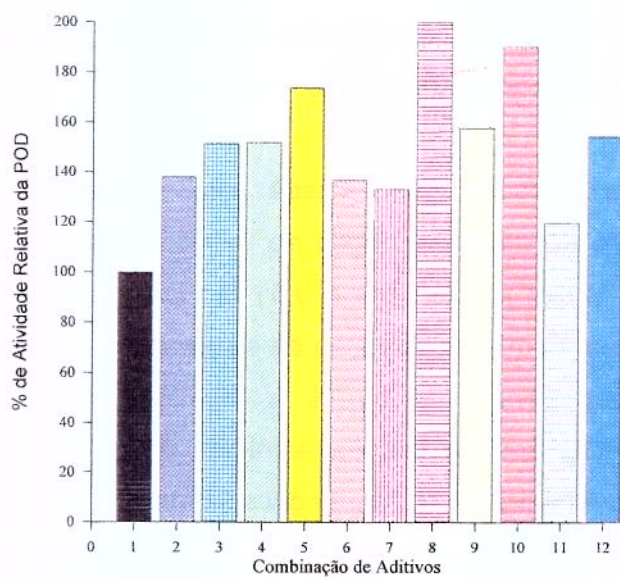


Figura 1: Atividade POD de extratos obtidos com e sem aditivos isolados:

- 1 - Extração com água seguida de extração com água;
- 2 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 3 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 ;
- 4 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2 % PVP;
- 5 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 2% PEG;
- 6 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,01 M ácido L-ascórbico;
- 7 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,01 M EDTA;
- 8 - Extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 9 - Extração com solução aquosa de 2% PVP seguida de extração com tampão fosfato 0,2M pH 8,0;
- 10 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 11 - Extração com solução aquosa de ácido L-ascórbico 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 12 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0.

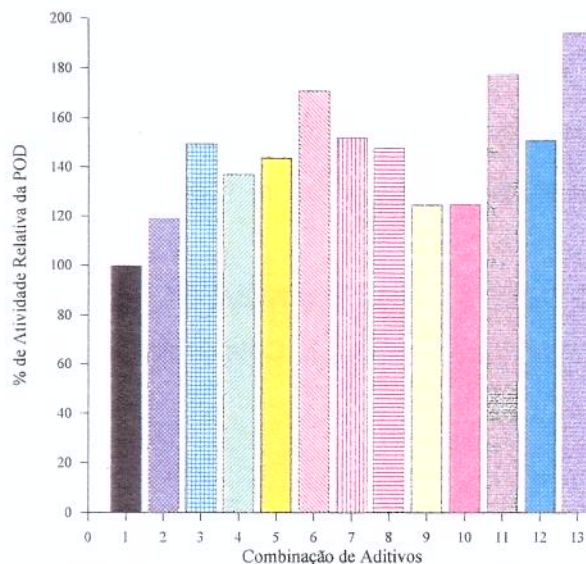


Figura 2: Atividade de POD de extratos obtidos com aditivos combinados:

- 1 - Extração com água seguida de extração com água;
- 2 - Extração com água seguida de extração com tampão fosfato 0,2M pH 8,0;
- 3 - Extração com água seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 4 - Extração com água seguida de extração com tampão contendo CaCl_2 0,2 M;
- 5 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 6 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 7 - Extração com solução aquosa de 2% PEG seguida de extração com tampão contendo 0,2 M CaCl_2 ;
- 8 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 9 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 10 - Extração com solução aquosa de EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2 M;
- 11 - Extração com solução aquosa de 2 % PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0;
- 12 - Extração com solução aquosa de 2% PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com solução aquosa de CaCl_2 0,2 M;
- 13 - Extração com solução aquosa de 2% PEG e EDTA 0,01 M seguida de extração com tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo CaCl_2 0,2 M.

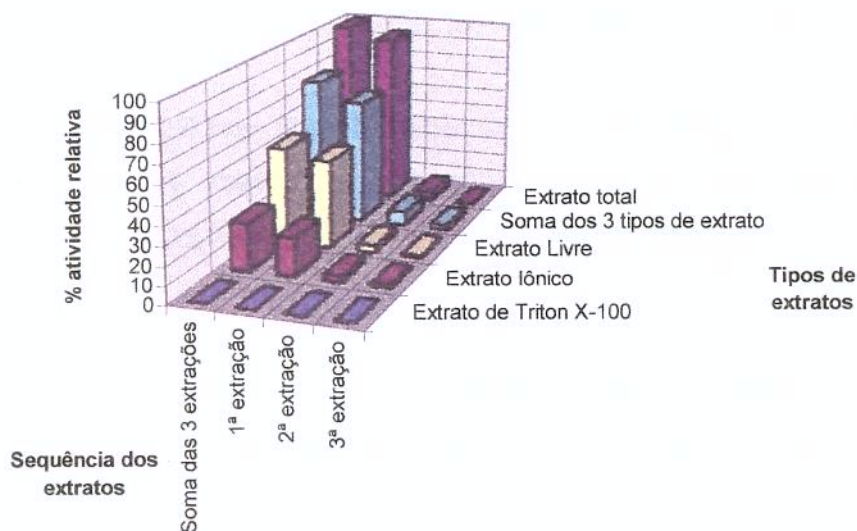


Figura 3: Extração de POD Livre, Ionicamente Ligada e Extrato Total

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ABELES, F. B. and BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v. 95, n. 1, p. 269-273, 1991.
- (2) BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação bioquímica da carambola (*Averrhoa carambola*, L.), **Coletânea do ITAL**, v. 12, p. 283-291, 1982.
- (3) HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.), extração e determinação de atividade em partes da fruta, provenientes de quatro estados de maturação. II **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - Book of Abstracts**, abstract 236, p.93, 1997
- (4) KHAN, A. A. & ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 53-59, 1993.
- (5) MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 690-692, 734, 1992.
- (6) MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**, v.22, n. 4, p.391-397, 1987.
- (7) VÁMOS-VIGYAZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC - Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.
- (8) WELLER, R. P.; BATES, C. A.; SIMS, C. A. and MATTHEWS, R. F. Evaluation of browning susceptibility in whole and sliced carambola. **IFT - Annual Meeting 1996, Book of Abstracts**, p. 99, 1996.

CAPÍTULO 4

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Caracterização parcial do extrato cetônico.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA.

1. The first step is to identify the problem or question that needs to be answered.

2. The second step is to gather relevant information and data.

3. The third step is to analyze the information and data to identify patterns and trends.

4. The fourth step is to develop a solution or answer based on the analysis.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO CETÔNICO.

Heinz Johann HOLSCHUH¹ e Gláucia Maria PASTORE²

RESUMO

Estudou-se a obtenção da peroxidase (POD) de carambola usando-se acetona, etanol na concentração final de 66 % e sulfato de amônio a 90% da saturação. Verificou-se que a precipitação das enzimas com acetona e sulfato de amônio preservaram mais a atividade peroxidásica do que etanol. O pó cetônico foi escolhido e caracterizado parcialmente por envolver menor número de operações na sua obtenção que o precipitado de sulfato de amônio. Temperatura e pH ótimos foram determinados na faixa de 0,5 e 80°C e entre pH 3,0 e 8,0. A atividade foi determinada em sistema de H₂O₂:Guaiacol. A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima a 50° C, sendo que na faixa de 40° a 55° C a atividade relativa foi superior a 80 %. A enzima mostrou pH ótimo de atividade na faixa de 5,5 a 6,0 em tampão fosfato 25 mM, pH 6,0. O pó cetônico perdeu cerca de 50% da sua atividade durante um ano de armazenagem a -19 °C.

Palavras chave: peroxidase, características, carambola, *Averrhoa carambola*.

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

SUMMARY

Partial purification of carambola peroxidase was carried out using acetone and ethanol in final concentrations of 66% and ammonium sulphate at 90% of saturation as precipitation agents, always at low temperatures in a ice bath. The precipitate was separated from the liquid portion by centrifugation and then dried in a refrigerated room at low humidity in the cases of the acetone and the ethanol precipitates. Ammonium sulphate precipitate were dialysed against distilled water and then freeze dried. The acetone powders and ammonium sulphate precipitates retained much more peroxidase activity than the ethanol powder. Acetone powders were chosen for characterization, because their obtention involved lesser operation steps than that of the ammonium sulphate precipitate. The optimum reaction temperature was examined in the range from 0.5 to 80 °C, and optimum pH in the range from pH 3.0 to 8.0. The best reaction temperature was 50 °C, but temperatures between 40 and 55 °C showed more than 80% of maximum activity. The optimum reaction pH of the acetone powder was situated between pH 5.5 and 6.0 in 25 mM phosphate buffer. The acetone powder losted nearly 50 % of its activity during storage at -19° C, over nearly one year.

Keywords: Peroxidase, characteristics, carambola, star fruit, *Averrhoa carambola*.

1 - INTRODUÇÃO

Um melhor aproveitamento de frutas tropicais e subtropicais ao natural ou processadas pressupõe o estudo de enzimas como as peroxidases para determinação do pH e temperatura ótimos de reação e estabilidade em estado semi-purificado ou purificado. Peroxidases de flavedo de laranja (CATALÁ y CHAMARRO [2]), de maçã (MOULDING *et alii* [13] [14], RICHARD and NICOLAS [16]), de tomate (LÓPEZ-SERRANO & ROS BARCELÓ [10]), de mamão (SILVA, [17]), de manga (MARIN and CANO [11], KHAN and ROBINSON [6] [7]), de uva (MORALES *et alii* [12]) e de morango (CIVELLO *et alii* [3] e LÓPEZ-SERRANO & ROS BARCELÓ [8]), entre outras, têm sido descritas na literatura. Frutas de menor expressão comercial como a carambola (*Averrhoa carambola*, L.) foram menos ou não estudadas. Acerca da peroxidase de

carambola foram encontrados apenas dados relativos ao sobrenadante (suco centrifugado a baixas temperaturas) (BALDINI, DRAETTA, NOMURA [1]). Este trabalho teve como objetivo uma semi-purificação da peroxidase de carambola e a determinação de algumas das suas características bioquímicas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Carambolas de maturação aparente verde, verde-matura, amarela-madura e sobremadura foram colhidas em chácara de produtor da Região de Campinas - Estado de São Paulo, de cultivar ácida, sempre pela manhã. As frutas sadias e íntegras foram higienizadas com sabão neutro e água potável, imersas em solução de hipoclorito de sódio por 15 minutos e enxaguadas com água destilada. As frutas foram guardadas até o dia seguinte ao da colheita em geladeira a 5°C, quando a POD foi extraída de acordo com HOLSCHUH e PASTORE [5].

Todos os reagentes empregados nesse estudo foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Estudo de precipitação da peroxidase

Peroxidase de carambola foi extraída usando tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 contendo 0,2 M CaCl_2 , 2 % PEG e 0,01 M EDTA (HOLSCHUH e PASTORE [5]). O sobrenadante obtido após centrifugação a 11.000 g a 0° C durante 15 minutos foi submetido à precipitação com acetona resfriada a -20°C na proporção 1:2 de sobrenadante : acetona usando metodologia de MARIN & CANO [11]; etanol resfriado a -20° C na mesma proporção e sulfato de amônio até 90% de saturação (MOULDING *et alii* [14]).

2.2.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD

Na ocasião das ressuspensões do precipitado cetônico para as diversas caracterizações e para purificação, a atividade POD e o teor em proteínas foram determinados, de acordo com as metodologias abaixo citadas.

2.2.3 - Determinação da atividade da POD

A medida da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN & ROBINSON [7]. A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,5 ml de solução de guaiacol a 1% em tampão de análise, 0,4 ml de solução de H_2O_2 0,1 M em tampão de análise e tampão de análise (tampão-pH ótimo), completando um total de 3,2 ml. O aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante cinco minutos à temperatura ótima de atividade peroxidásica do sobrenadante (50° C), contra um branco no qual o H_2O_2 foi substituído por tampão, em espectrofotômetro Beckman UV / VIS, série DU-70. A atividade da POD foi calculada usando os dados relativos à porção linear da curva entre 0,1 e 0,7 unidades de absorbância. As leituras foram feitas em triplicata.

Uma Unidade (U) foi definida como quantidade de enzima que causa aumento de absorbância em 0,001 unidades por minuto a 470 nm, tendo guaiacol como doador de H^+ . A atividade específica da peroxidase foi expressa em unidades por mg de proteína ($U \times mg^{-1}$ proteína).

2.2.4 - Influência do pH do meio reativo na atividade da POD

Nesse estudo, soluções de 0,5% do pó cetônico foram feitas com os tampões citrato-fosfato e fosfato 25 mM na faixa de pH 3,0 a 8,0, dentro da capacidade tamponante, com intervalo de 0,5 unidades de pH. A atividade da POD foi medida usando o guaiacol e a água oxigenada diluídas nos respectivos tampões. O tampão em que foi verificada atividade ótima foi utilizado nos estudos subseqüentes.

2.2.5 - Influência da temperatura na atividade da POD

A peroxidase foi analisada na faixa de 0,5 a 80°C, com intervalos 10°C, estreitado para 5°C na zona de atividade ótima, usando-se tampão fosfato 0,1 M pH 6,0.

2.2.6 - Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi estimado através do método de LOWRY et alii [9], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Semi-purificação da peroxidase de carambola

3.1.1 - Estudos de precipitação da peroxidase de carambola

Tabela 1: Influência do agente precipitante na atividade POD recuperada em relação ao sobrenadante.

Data	17/12/97	13/01/98	13/01/98	13/01/98	13/01/98	média
Maturação	verde	verde	verde- maduro	maduro bordas verdes	maduro todo amarelo	
Sobrenadante*	100	100	100	100	100	100
Acetona	28,67	33,19	48,17	59,88	65,06	46,99
Etanol	10,98	12,64	10,97	20,19	37,46	18,45
(NH ₄) ₂ SO ₄ -H ₂ O	27,78	43,95	52,04	61,33	63,51	49,72
(NH ₄) ₂ SO ₄ -KPi**	23,21	46,19	43,95	55,54	37,08	41,19

* A atividade peroxidásica dos sobrenadantes foi adotada como 100% de atividade relativa, inclusive na média das determinações

** KPi = tampão fosfato 25 mM, pH 6,0.

Os ensaios de precipitação da peroxidase visaram determinar entre os agentes precipitantes qual o mais adequado em termos de rendimento, de concentração e de praticidade de conservação da enzima semi-purificada.

A maior taxa de recuperação obtida através da precipitação com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), seguido de diálise com água destilada (Millipore) foi apenas 3% maior que a obtida com acetona a 65% (**Tabela 1**). A forma física dos precipitados de acetona e de etanol gelados foi pó, enquanto os precipitados de sulfato de amônio tiveram que ser dialisados para a eliminação do sal, e por isso encontraram-se em forma dissolvida. A forma do pó seco foi mais facilmente manipulável e pode ser armazenado em recipiente hermeticamente fechado, sob congelamento. Carambolas totalmente maduras propiciaram maior concentração de atividade POD em precipitado de acetona, como no de sulfato de amônio dialisado contra H_2O (**Tabela 1**). O precipitado de acetona foi denominado de Pó Cetônico de Peroxidase de Carambola. A maioria dos autores consultados não indica o rendimento de POD obtida após a precipitação, limitando-se a informar a concentração de sulfato de amônio usada. KHAN e ROBINSON [6] indicaram 47% de rendimento de POD de manga 'Chaunsa' após precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação, concordando com os resultados obtidos com POD de carambola. Quanto à utilização de acetona ou etanol resfriados a -19°C para precipitar peroxidase já extraída, nenhuma publicação recente foi encontrada. Aqueles pesquisadores que usaram acetona, usaram-na para produzir pó cetônico da fruta, para posterior extração da enzima (MUJER, MENDOZA, RAMIREZ [15] e CIVELLO *et alii* [3]), sem indicar rendimentos.

3.2 - Influência do tempo de armazenamento na atividade POD

Flutuações grandes da atividade POD foram observadas durante o armazenamento do pó cetônico, em frasco fechado sob temperaturas de congelamento durante um ano (**Tabela 2**). Essas flutuações de atividade peroxidásica constatadas, entre +2,35 e -1,99 vezes em relação à atividade inicial, foram atribuídas à distribuição não homogênea da enzima no pó tendo em vista as diferenças no teor de proteína/ml entre as amostras ressuspensas, a diferenças de solubilidade entre as amostras

retiradas e à perda de atividade, quando comparadas as atividades específicas da primeira e da última amostra (Tabela 2).

Tabela 2: Estabilidade do precipitado cetônico de peroxidase de carambola, armazenado a -19°C

Data	Peso / Volume	Atividade POD U / ml	Atividade POD U / g	Proteína mg / ml	Atividade específica U / mg proteína	Variação da atividade
22/06/98	1 g / 5 ml	190.000	950.000	6,926	27.433	0
28/10/98	1 g / 5 ml	159.320	796.600	4,326	36.828	1.34
11/12/98	1 g / 15 ml	44.100	661.500	0,790	55.823	2.03
19/01/99	1 g / 10 ml	179.050	1.790.500	2,783	64.337	2.35
23/06/99	1 g / 13 ml	70.470	916.110	5,110	13.790	-1.99

3.3 - Caracterização parcial do extrato cetônico

3.3.1 - Influência do pH do meio reativo na atividade da POD

A peroxidase de carambola mostrou atividade máxima em tampão fosfato pH 5,5 e 6,0. Nestes valores de pH a atividade relativa de peroxidase foi cerca de 10% menor usando-se tampão citrato-fosfato. A presença de um ombro em pH 4,0 na curva de pH de atividade da peroxidase parece indicar a presença de isoenzimas. Na faixa de pH 4,0 a 7,0, a peroxidase apresentou atividade relativa superior a 50 % (**Figura 1**). A enzima ficou com mais de 50 % da sua atividade entre os pH 4,0 e 7,0. BALDINI, DRAETTA, NOMURA [1] não fizeram referência ao pH ótimo da reação da POD de carambola, no entanto adotaram tampão fosfato de potássio, pH 6,0 na determinação da

mesma. FILS, SAUVAGE, NICOLAS [4] verificaram que as isoperoxidasas de tomate apresentaram atividade ótima em pH 6,0 a 6,2, enquanto MARANGONI *et alii* [10] verificaram maior atividade em pH 5,0 a 5,2. CATALÁ e CHAMARRO [2] relataram um pH ótimo entre pH 4,0 e 6,2 para isoperoxidasas aniônicas e catiônicas de flavedo de laranja 'Valencia Late', dependendo do doador de H⁺. Com Guaiacol, as isoperoxidasas aniônicas apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e 5,5, enquanto as catiônicas em pH 4,5. Analisando as peroxidases solúvel e ionicamente ligada de maçã, MOULDING *et alii* [13] encontraram em maçã dois picos para peroxidase solúvel da polpa (pH 5,5 e 6,0), ionicamente ligada da polpa (5,2 e 5,6), solúvel da casca (5,4 e 5,6) e ionicamente ligada da casca (5,0 e 5,4). RICHARD e NICOLAS [16] relataram pH 5,8 como ótimo da POD de casca de maçã. Analisando peroxidase de mamão SILVA, LOURENÇO, NEVES [18] encontraram 6,8 como o pH ótimo. Para morango, CIVELLO *et alii* [3] observaram pH 6,0 como o ótimo no extrato bruto obtido a partir do pó cetônico da fruta.

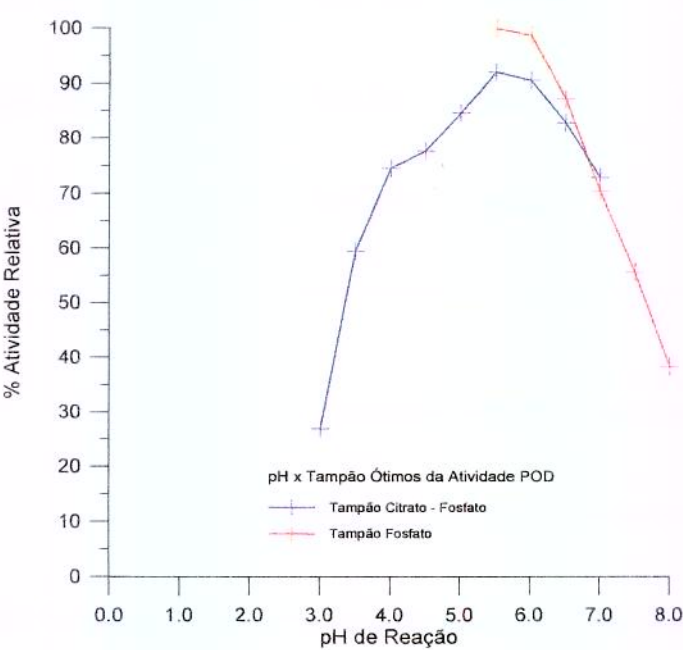


Figura 1: Influência do pH na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.

3.3.2 - Influência da temperatura na atividade da POD

A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima a 50° C (**Figura 2**). A presença de um pico de atividade na temperatura de 25° C parece indicar a existência de isoenzimas de peroxidase na carambola. SILVA [17] verificou que POD solúvel de mamão mostrou atividade ótima a 40° C enquanto a POD ionicamente ligada a 50° C. CIVELLO *et alii* [3] relataram 30 °C como a temperatura ótima da POD de morango, bem mais baixa que a encontrada para o pó cetônico de carambola. Nenhum dado foi encontrado na literatura sobre a temperatura ótima da POD de carambola.

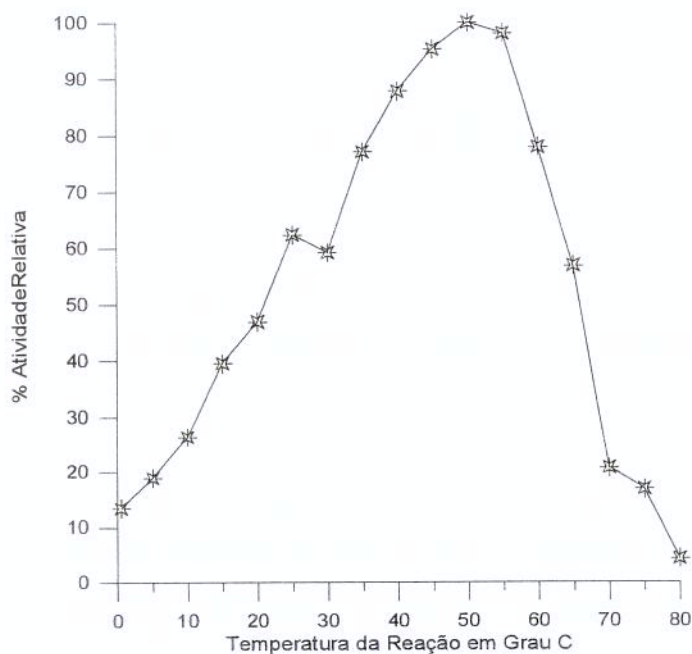


Figura 2: Influência da Temperatura na Atividade do Extrato Cetônico da Peroxidase de Carambola.

4 - CONCLUSÕES

- 1 - Maior rendimento de precipitado semi-purificado de peroxidase de carambola foi obtido com acetona e sulfato de amônio com diálise em água Milli-Q (18 Ω cm). O pó cetônico foi escolhido pelo número menor de operações até chegar à forma de pó seco.

- 2 - O pó cetônico perdeu cerca de 50% de atividade durante um ano de estocagem a -19° C.
- 3 - A temperatura ótima de atividade peroxidásica do pó cetônico de carambola foi 50 °C.
- 4 - A atividade peroxidásica do pó cetônico manteve-se acima dos 80% da atividade máxima entre 40 e 55 °C.
- 5 - A peroxidase de carambola apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,0.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. e NOMURA, E. H. Avaliação Bioquímica da Carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Coletânea do ITAL, Campinas - SP, v.12, p. 283-291, 1982.
- [2] CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valência, v.27, n.4, p.509-518, 1987.
- [3] CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- [4] FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. Sciences des Aliments, Paris, v.5, n.2, p.217-232, 1985.

- [5] HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Influência de Aditivos na Extração da Enzima. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15 a 17 de julho de 1998, Anais, Rio de Janeiro, 1998, CD-ROM.
- [6] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, Oxford, v.46, n.1, p.61-64, 1993.
- [7] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford, v.49, n.4, p.407-410, 1994.
- [8] LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. Purification and characterisation of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. Food Chemistry, Oxford, v.55, n.2, p.133-137, 1996.
- [9] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- [10] MARANGONI, A. G.; BROWN, E. D.; STANLEY, D. W. and YADA, R. Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. Journal of Food Science, Chicago, v.54, n.5, p.1269-1271, 1989.
- [11] MARIN, M. A. and CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. Journal of Food Science, Chicago, v.57, n.3, p.690-692, 734, 1992.
- [12] MORALES, M.; PEDREÑO, M. A.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. & CALDERÓN, A. A. Purification and kinetic characterisation of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignification in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. Food Chemistry, Oxford, v.48, n. 4, p. 391-394, 1993.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- [13] MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- [14] MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.23, n.4, p. 343-351, 1988.
- [15] MUJER, C. V.; MENDOZA, E. M. T. and RAMIREZ, D. A. Coconut Peroxidase Isoenzymes: Isolation, Partial Purification and Physicochemical Properties. Phytochemistry, Oxford, v.22, n.6, p.1335-1340, 1983.
- [16] RICHARD, F. and NICOLAS, J. Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. Sciences des Aliments, Paris, v.9, n.2, p.335-350, 1989.
- [17] SILVA, E. Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Tese de Doutorado, São Paulo : Universidade de São Paulo, 1987. 127 pp.
- [18] SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, v.29, n.4, p.1051-1056, 1990.

CAPÍTULO 5

Peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Estabilidade térmica e ao pH do extrato cetônico.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA.

PEROXIDASE DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola*, L.): ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH DO EXTRATO CETÔNICO.

Heinz Johann HOLSCHUH¹ e Gláucia Maria PASTORE²

RESUMO

O pó cetônico de peroxidase (POD) de carambola foi redissolvido em solução tampão com valores de pH 3,0 a 9,0 e submetido a tratamento térmico a 0, 25, 40, 50 e 60 °C durante 24 horas. A atividade de POD residual foi medida no início dos tratamentos e após 3, 6, 12 e 24 horas. Nos tratamentos térmicos adicionais de 75°C e ebulição, a atividade residual foi determinada a 0 e após 5, 15, 30 e 60 minutos. A atividade foi determinada em sistema de H₂O₂ : Guaiacol e o aumento da absorbância monitorado durante 5 minutos. A 0°C, a POD de carambola foi estável em todos os valores de pH durante 24 horas, exceto em pH 3,0, no qual a enzima perdeu atividade, atingindo 70% de sua atividade inicial após 24 horas. Na temperatura ótima de reação, 50°C, foi observada inativação em dois estágios nos pH 3,0 a 6,0, enquanto uma ativação inicial da enzima pôde ser observada nos pH 8,0 e 9,0 (Tris-HCl 25 mM). POD cetônica de carambola foi totalmente instável em pH 3,0 em todas as temperaturas ensaiadas durante 24 horas. Após 3 horas de tratamento, 80% das combinações de pH - temperatura mantiveram mais de 90% da atividade inicial. Após 24 horas apenas 40% das combinações mantiveram a mesma condição. A maior estabilidade foi determinada em pH 8,0 entre 0 e 40 °C e a 40 °C entre pH 5,0 e 9,0, com mais de 80% da atividade inicial após 24 horas de tratamento. Inativação da enzima foi alcançada a 75 °C em pH 3,0 após 5 minutos e em pH 7,0 após 15 minutos. Foi verificada a inativação da peroxidase em quase todos os valores de pH após 5 minutos de tratamento térmico em temperatura de ebulição; apenas em pH 6,0 foi verificada atividade residual em torno de 4%.

Palavras chave: Peroxidase, carambola, *Averrhoa carambola*, estabilidade térmica e ao pH.

¹ Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

² Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

SUMMARY

Aliquots of acetone extract were redissolved in buffers from pH 3.0 to 9.0 at intervals of 1.0 pH units. These enzyme dilutions were submitted to heat treatments at 0, 25, 40, 50 and 60 °C for 0, 3, 6, 12 and 24 hours. Peroxidase activity was measured in a H_2O_2 : Guaiacol system and the results expressed in percent of the initial activity. Additional heat treatments were done at 75 °C and at the boiling point. In these cases, residual activities were determined at 0, 5, 15, 30 and 60 minutes. At zero degrees Celsius, peroxidase was stable for 24 hours, except at pH 3.0, a condition under which the enzyme retained only 70% of its initial activity. At the optimal reaction temperature (50°C) the peroxidase was inactivated in a two step reaction at pH 3.0 to 6.0, while at pH 8.0 and 9.0 an initial activation could be observed. The cetonc powder of peroxidase was totally instable at pH 3.0 at all temperatures after 24 hours of treatment. After 3 hours 80% of all the treatment combinations retained 90% or more of the initial activity whereas after 24 hours only 40% of the combinations maintained this condition. The greatest stability conditions were at pH 8.0 between 0 and 40 °C and at pH 5.0 to 9.0 at 40 °C, retaining more than 80% of the initial activity after 24 hours. Enzyme inactivation was obtained at 75 °C at pH 3.0 after 5 minutes of treatment and at pH 7.0, after 15 minutes. At boiling temperatures, the peroxidase of carambola was inactivated after 5 minutes at most pH solutions. At pH 6.0 about 4% of the residual activity was still found.

Keywords: Peroxidase, carambola, star fruit, *Averrhoa carambola*, thermal and pH stability.

1 - INTRODUÇÃO

Peroxidases (POD, E.C.1.11.1.7, doador : H_2O_2 oxidoreductase) são conhecidas pela sua alta termorresistência e por isso são usadas como parâmetro da eficiência de tratamentos térmicos de frutas e hortaliças, nos quais são tradicionalmente relacionadas a reações de escurecimento e a alterações organoléticas negativas (BURNETTE [2]; VÁMOZ-VIGYÁZÓ [21]). Esse aspecto e a utilidade da POD em ELISA

(Enzyme-linked immuno-sorbent assays), onde a peroxidase tem aplicação em análises de microrganismos patogênicos (CHEN e CHANG [5]), de toxinas (CHU e FAN [6]) de higiene (CHANG e HUANG [4]), de autenticidade de alimentos (ANGUITA *et alii* [1]) e mais ainda em análises clínicas, determinam a necessidade de se conhecer a estabilidade da enzima em diferentes condições de pH e temperatura. A ação conjugada da glucose oxidase, que degrada glucose para gluconolactona e H_2O_2 , e a peroxidase, que usa o peróxido de hidrogênio, vêm sendo aplicada em análise de alimentos (McCLEAR e GLENNIE-HOLMES [15] e CASELLA *et alii* [3]). Esse trabalho teve como objetivo o estudo da estabilidade térmica e ao pH, bem como da inativação térmica da POD de carambola (*Averrhoa carambola*, L.) em pó cetônico semipurificado.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Usou-se o pó cetônico da peroxidase de carambola obtido por precipitação de proteínas, contidas no sobrenadante, com acetona em temperatura baixa (0 °C). O precipitado foi separado por centrifugação a 11.000 g a 4 °C durante 10 minutos, secado em ambiente gelado e de baixa umidade, triturado em almofariz e armazenado em temperaturas de congelamento (-19 °C).

Todos os reagentes empregados nesse estudo foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Temperatura x pH de estabilidade

O pó cetônico foi dissolvido na concentração de 0,5 g/100 ml, em soluções tampão com valores de pH de 3,0 a 9,0, com intervalo de 1 unidade de pH, todos 25 mM, e incubado em temperaturas de 0, 25, 40, 50 e 60 °C durante 0, 3, 6, 12 e 24 h, e sua atividade residual determinada.

2.2.2. - Inativação térmica

Nos ensaios de inativação térmica, o pó cetônico foi dissolvido na mesma concentração, nas mesmas soluções-tampão do ensaio anterior e submetido a temperaturas de 75 °C e de ebulição, durante 0, 5, 15, 30 e 60 minutos, e suas atividades residuais determinadas.

2.2.3 - Determinação da atividade da POD

A determinação da atividade da POD dos extratos de carambola baseou-se no método de KHAN & ROBINSON [11]. A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,5 ml de solução de guaiacol a 1% em tampão de análise, 0,4 ml de solução de H₂O₂ 0,1 M em tampão de análise e tampão de análise para completar um total de 3,2 ml. O aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante cinco minutos, contra um branco no qual o H₂O₂ foi substituído por tampão, em espectrofotômetro Beckman UV / VIS, série DU-70. A atividade da POD foi calculada usando os dados relativos à porção linear da curva entre 0,1 e 0,7 unidades de absorbância. As leituras foram feitas em triplicata.

Uma Unidade (U) foi definida como quantidade de enzima que causa um aumento de absorbância de 0,001 unidades por minuto e ml de solução enzimática a 470 nm, tendo guaiacol como doador de H⁺. A atividade específica da peroxidase foi expressa em unidades por mg de proteína (U x mg⁻¹ proteína).

2.2.4 - Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi estimado através do método de LOWRY *et alii* [14], usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Influência da temperatura e do pH na estabilidade da POD de carambola

3.1.1 - Estabilidade térmica da POD de carambola

Em tampão citrato - fosfato 25 mM, pH 3,0, a POD reteve 72,44% da sua atividade inicial após 24 horas a 0 °C, 65% a 25 °C, 24% a 40 °C e apenas 16% a 50 °C e 11% a 60 °C. Nas temperaturas mais altas (40 a 60 °C), uma perda de atividade em duas fases pôde ser observada: bem acentuada nas primeiras 3 horas e menos acentuada nas horas seguintes (**Figura1**).

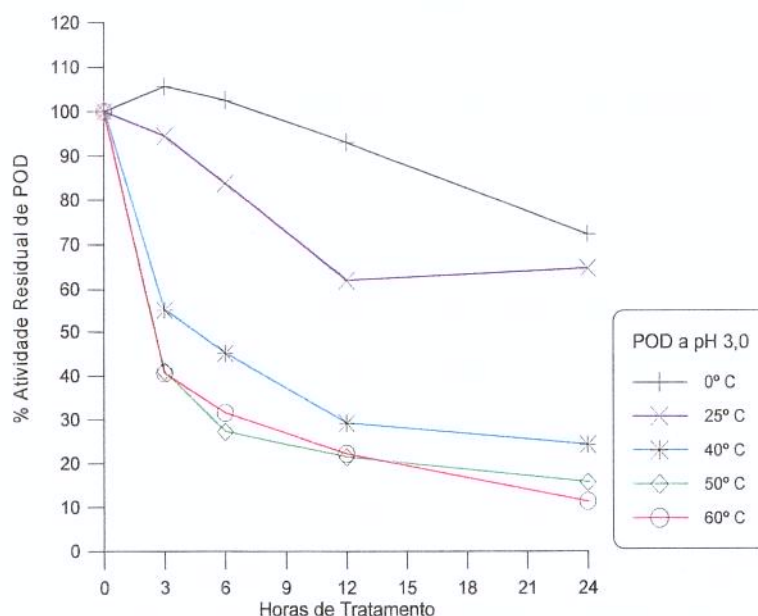


Figura1: Estabilidade térmica da POD em tampão citrato - fosfato 25 mM, pH 3,0.

Em tampão fosfato de potássio pH 6,0, a peroxidase cetônica de carambola mostrou-se estável durante 24 horas em todas as temperaturas até 40 °C, mantendo mais de 80% de sua atividade inicial. A 50 °C, a atividade residual ainda foi de 78% e a 60 °C foi 59% (**Figura 2**).

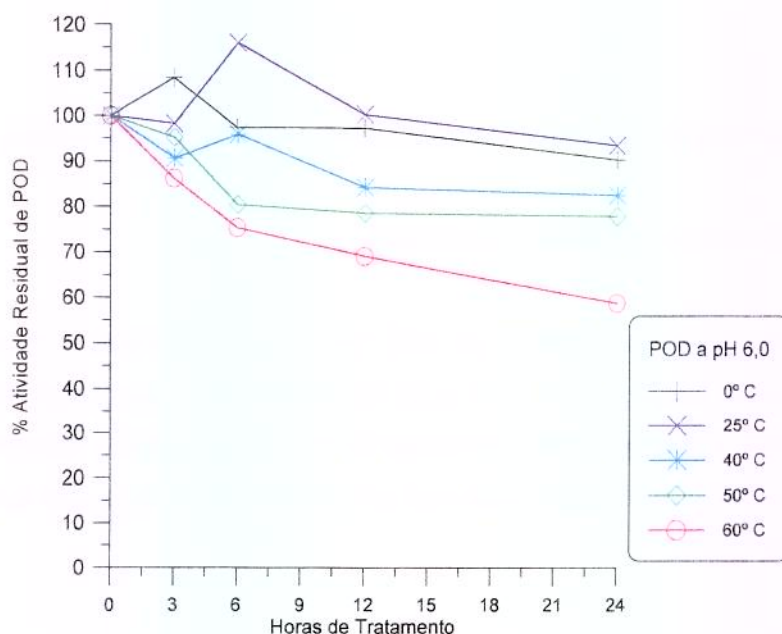


Figura 2: Estabilidade térmica da POD em tampão fosfato 25 mM, pH 6,0.

Uma diminuição acentuada da atividade da POD pôde ser observada nas temperaturas de 50 e 60 °C após 12 horas de tratamento em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 9,0. Nas demais temperaturas e tempos de tratamento, a enzima mostrou-se estável nesse pH (**Figura 3**).

CIVELLO *et alii* [7] relataram que peroxidase de morango reteve atividade residual de 20 % após 5 minutos a 60 °C, 10 % após 10 minutos e cerca de 5 % após 20 minutos de incubação do extrato enzimático em tampão fosfato de sódio 0,08 M, pH 6,0, atividade residual essa muito menor que a da POD cetônica de carambola.

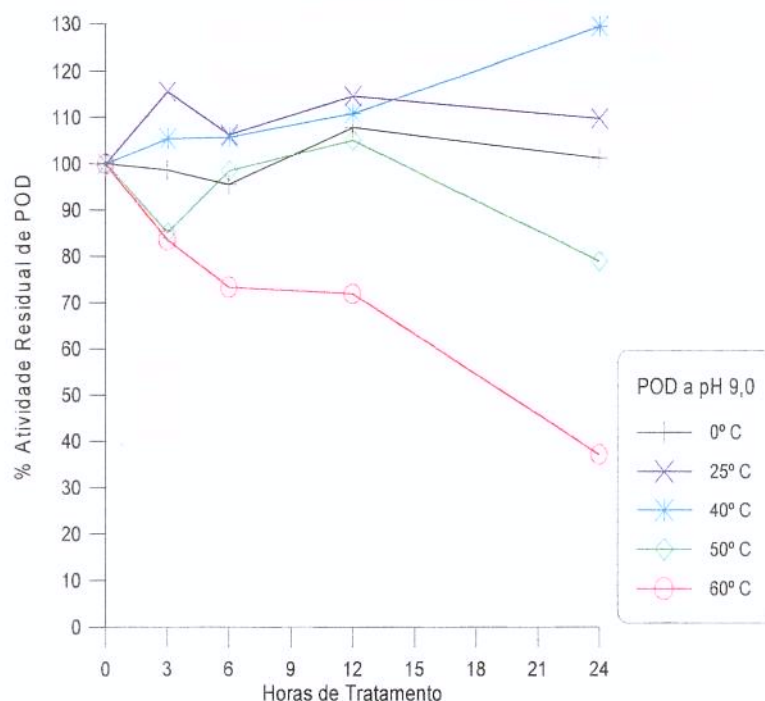


Figura 3: Estabilidade térmica da POD em tampão Tris - HCl 25 mM, pH 9,0.

3.1.2 - pH de estabilidade da POD de carambola

A 0°C a atividade da POD manteve-se estável durante 12 horas em todos os valores de pH com atividade residual acima dos 80 % da inicial. A exceção foi pH 3,0, no qual a atividade da POD decresceu após 6 horas até o final do ensaio, a 24 horas (Figura 4).

Comparando a atividade residual da POD submetida a 25 °C durante 24 horas, foi observada estabilidade nos valores de pH 6,0 e 7,0, ambos com tampão fosfato de potássio, e em tampão Tris - HCl pH 8,0 e 9,0, com atividades residuais perto da atividade inicial. Em pH 4,0, a inativação ocorreu em duas ou mais fases: a mais severa nas primeiras três horas, enquanto em pH 5,0 a fase severa de inativação iniciou após 6 horas de tratamento. Nos demais valores de pH, inativação em fases não foi observada (Figura 5).

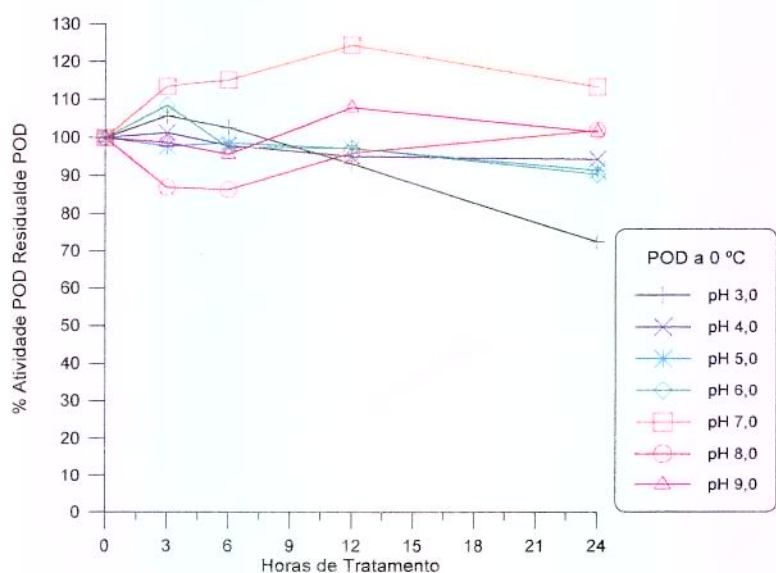


Figura 4: pH de Estabilidade da POD de carambola a 0°C.

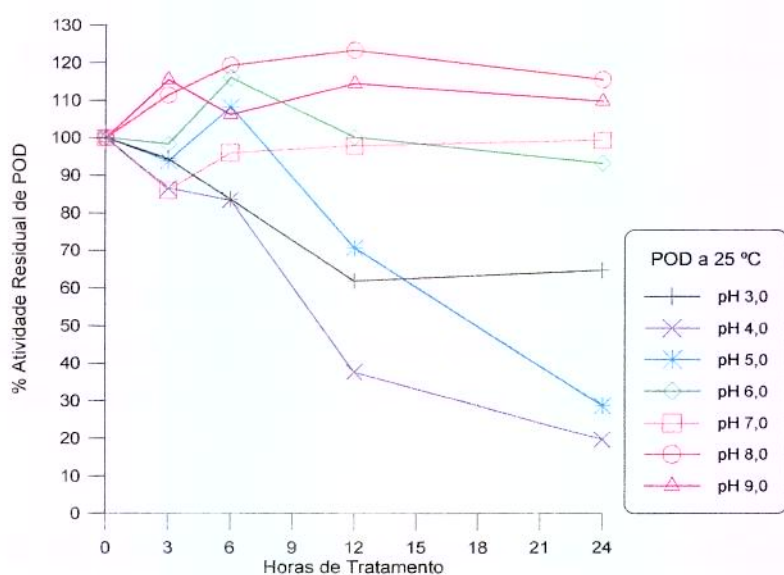


Figura 5: pH de Estabilidade da POD de carambola a 25°C.

A atividade da POD de carambola mostrou-se estável durante 24 horas a 50 °C apenas em tampão tris-HCl pH 8,0, e em pH 9,0 do mesmo tampão até 12 horas, bem como em pH 7,0 de tampão fosfato de potássio até 12 horas. Nos demais valores de

pH, a inativação da POD em duas ou mais fases foi observada após 3 horas de tratamento. A atividade residual mais baixa após 24 horas foi em pH 3,0 com 16 %, enquanto em pH 4,0 a atividade ainda foi de 46 %. Em pH 5,0 e 6,0, a atividade peroxidásica comportou-se de forma quase idêntica; foi estável durante 3 horas, teve a inativação acelerada até 6 horas de tratamento, permanecendo no patamar de cerca de 80% de atividade residual até 24 horas (**Figura 6**).

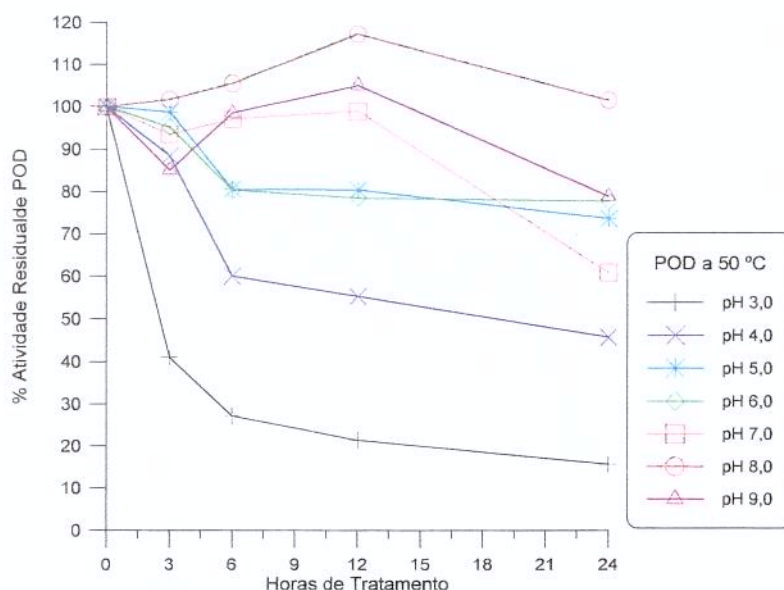


Figura 6: pH de Estabilidade da POD de carambola a 50°C

CIVELLO *et alii* [7] relataram boa estabilidade da POD de morango entre os pH 4,0 e 11, quando incubada durante 30 minutos a 20 °C. LOURENÇO e NEVES [12] incubaram POD solúvel de pêssago em pH 3 a 8 durante duas horas a 30 °C, não encontrando perda de atividade. A instabilidade da POD em pH abaixo de 4,0 pode ser atribuída à perda do grupo heme (BURNETTE [3]). Os resultados relatados por esses autores estão de acordo com os obtidos para carambola, no que tange à estabilidade em pH 3,0 e até 3 horas de tratamento.

3.1.3 - Efeito do tempo de tratamento, pH e temperatura na estabilidade enzimática da POD de carambola.

Após 3 horas de tratamento, a POD de carambola demonstrou atividade residual mais baixa em pH 3,0 nas temperaturas de 50 e 60 °C, com cerca de 40% da atividade inicial, seguido de 40 °C com 55% de atividade residual, aproximadamente. A 60 °C a atividade residual foi abaixo de 80% também nos valores de pH 4,0 e 5,0. Nas demais combinações de tratamentos, a peroxidase de carambola mostrou-se estável nessas três horas (**Figura 7**).

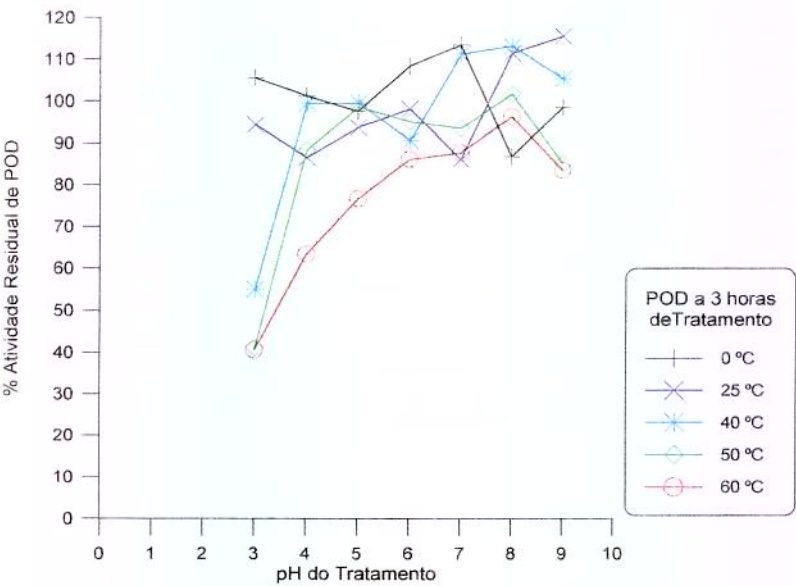


Figura 7: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.

Analisando a **Figura 8**, o tratamento a pH 3,0 resultou em atividade residual entre 40 e 60% nas temperaturas de 40 a 60 °C, e menos de 80 % nos tratamentos a pH 4,0 e 5,0 na temperatura de 60 °C. Nas demais combinações de temperatura x pH a POD de carambola foi estável, com pequena tendência de diminuição da atividade com o aumento da temperatura.

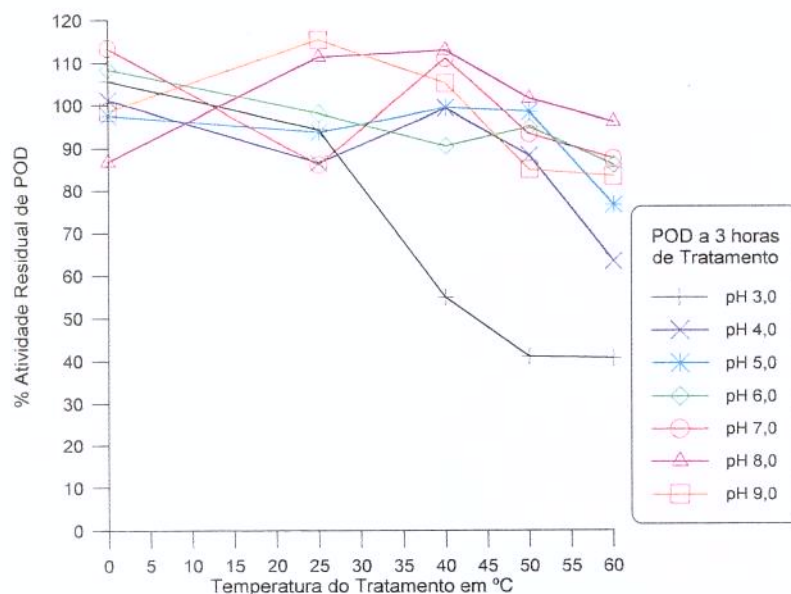


Figura 8: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.

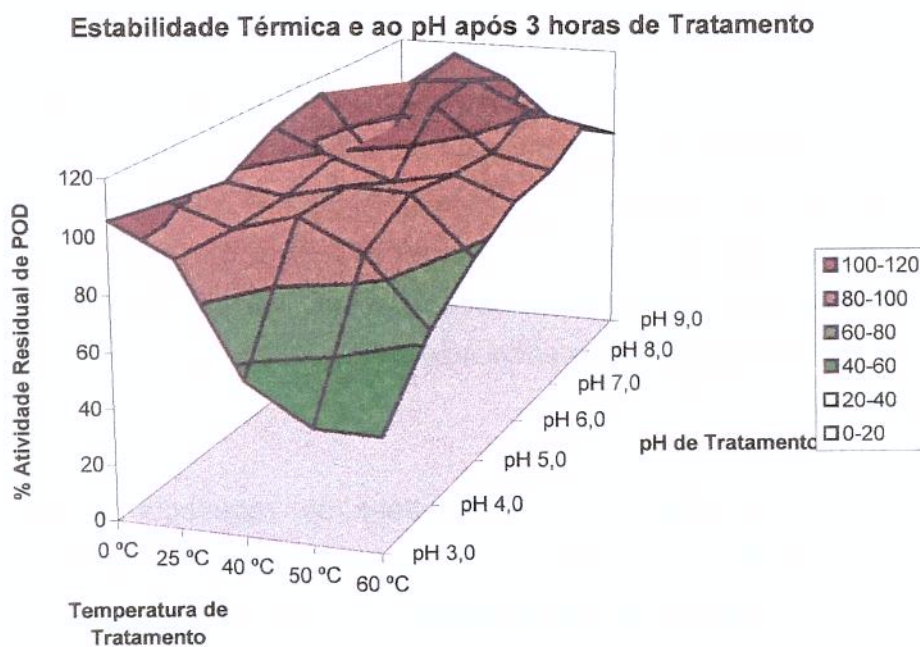


Figura 9a: Atividade residual da POD após 3 horas de tratamento: gráfico 3-D. As áreas em tons marrons constituem atividades residuais acima de 80 % da inicial e as verdes entre 40 e 80%.

Estabilidade Térmica e ao pH após 3 horas de Tratamento

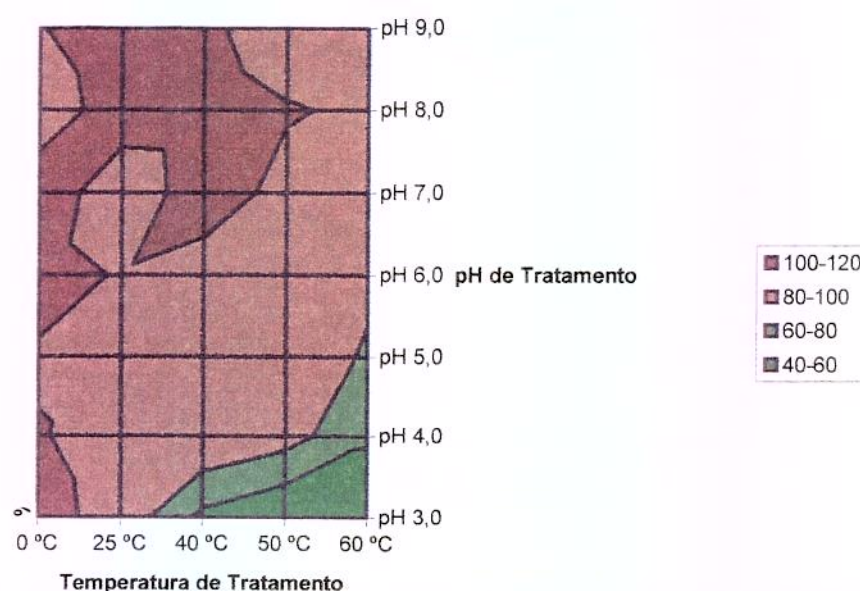


Figura 9b: Atividade de POD residual após 3 horas de tratamento: gráfico de superfície. As áreas em marrom significam atividade residual acima de 80% e as verdes de 40 a 60%.

Os gráficos 3-D e de superfície evidenciam a influência conjunta de pH e temperatura na estabilidade da peroxidase de carambola. O gráfico 3-D ilustra bem a amplitude entre a atividade residual menor após tratamento de 3 horas em pH 3,0 a 60°C, e a maior em pH 9,0 a 25° C ou pH 7,0 e 8,0 a 40° C (Figura 9a). A área abrangida com atividade residual acima de 80 %, de tonalidades marrons, encobre quase 90 % do gráfico de superfície, representando os tratamentos nos quais a enzima mostrou-se estável após 3 horas (Figura 9b).

A **Figura 10** ilustra que a peroxidase de carambola mostrou-se mais termossensível em pH ácido após 24 horas de tratamento. A atividade residual após esse tempo a 40°, 50° e 60° C em pH 3,0 foi respectivamente 25%, 15% e 12%.

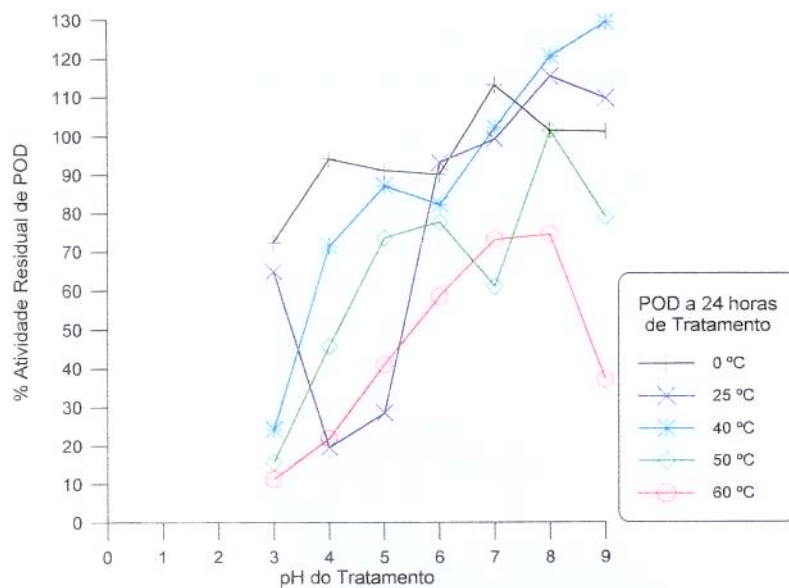


Figura 10: Atividade residual da POD após 24 horas de tratamento em diferentes valores de pH e temperatura.

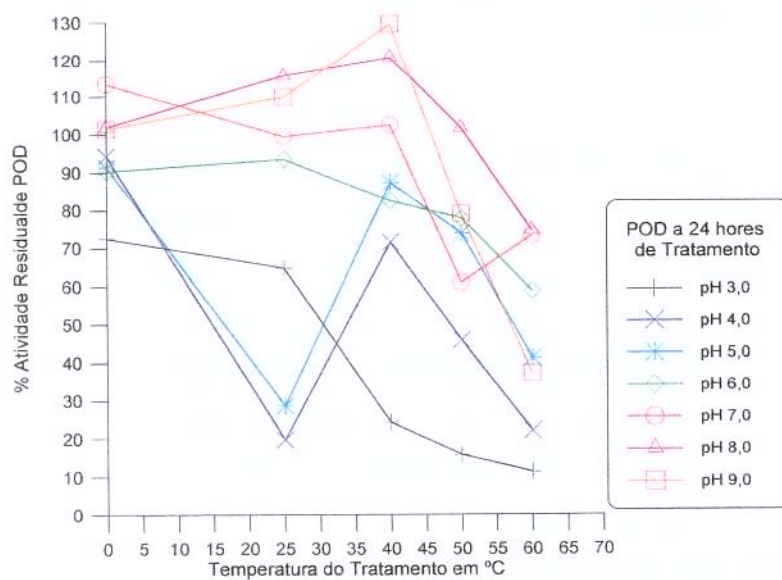


Figura 11: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH.

A Figura 11 ilustra uma tendência geral de diminuição da atividade da POD cetônica de carambola com o aumento da temperatura após 24 horas de tratamento. A queda da atividade a 25 °C em pH 4,0 e 5,0 ficou evidenciada. A enzima pode ser considerada estável em temperaturas até 40 °C em pH 6,0 a 9,0 (**Figura 11**).

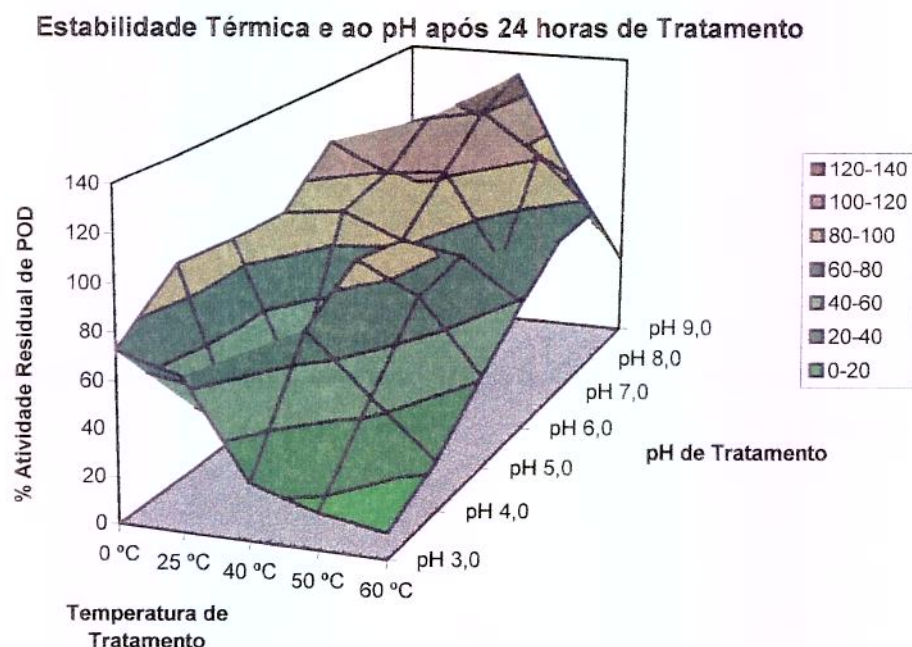


Figura 12a: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico 3-D. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.

A figura 12a mostra que a peroxidase de carambola foi instável após 24 horas em tratamentos de pH baixo (pH 3 e 4) em temperaturas acima de 25°C. Maior estabilidade após 24 horas foi verificada em tratamentos de pH 9,0 a 40° C. Analisando o gráfico de superfície da atividade residual após 24 horas de tratamento (**Figura 12b**), a área com atividade residual acima de 80%, cores bege e marrons, ocupa cerca de 40 % da área do gráfico, menos da metade da ocupada após 3 horas de tratamento (**Figura 9**). Embora a linha de 80% atravessasse o gráfico diagonalmente, maior estabilidade da POD cetônica de carambola verificou-se a 40 °C entre os pH 5,0 e 9,0 e a pH 8,0 entre 0 e quase 60 °C (**Figura 12b**).

Estabilidade Térmica e ao pH após 24 horas de Tratamento

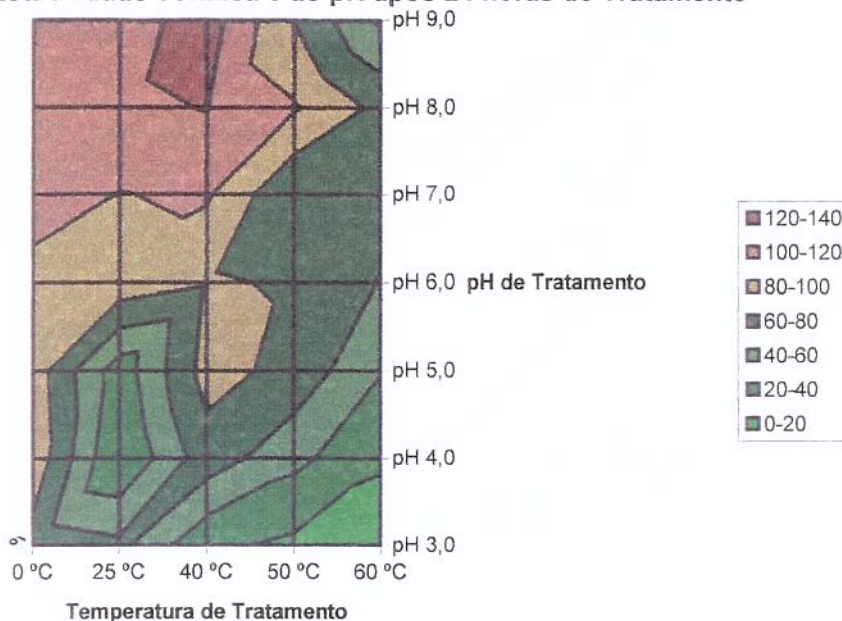


Figura 12b: Atividade residual de POD após 24 horas de tratamento: gráfico de superfície. As tonalidades bege e marrom indicam atividades residuais acima de 80 % e as verdes de 11 a 40 %.

3.1.4 - Inativação da POD cetônica de carambola por tratamento térmico e pH.

A Figura 13 ilustra a maior termossensibilidade da peroxidase da carambola em pH 3,0. A enzima foi totalmente inativada em pH 3,0 após 15 minutos de tratamento a 75° C. No estudo do efeito do pH na inativação térmica da peroxidase a 75°, verificou-se que a enzima foi mais estável em pH 6,0. A atividade residual após 60 minutos de tratamento térmico a 75° C em pH 6,0 foi aproximadamente 50 %. A peroxidase de carambola mostrou-se mais instável em pH 7,0 que em pH 6,0, 8,0 e 9,0 a 75° C, constituindo dois picos de atividade residual no estudo do efeito da influência do pH, o que pode ser um indício da presença de isoenzimas no pó cetônico.

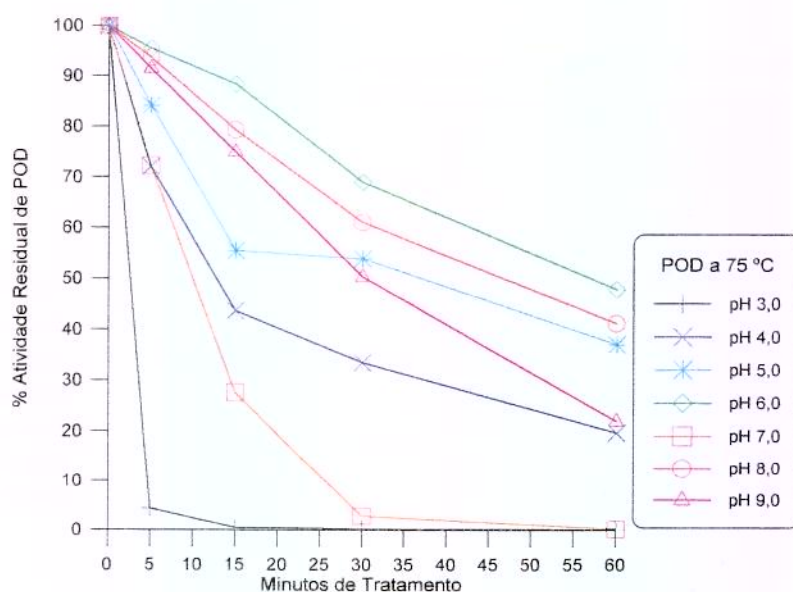


Figura 13: Inativação Térmica da POD de carambola a 75°C.

Em tratamento de ebulição a 96,8 °C, a POD cetônica de carambola ficou praticamente inativada nos primeiros 5 minutos em todos os valores de pH, exceto em pH 6,0, no qual tornou-se praticamente inativa após 15 minutos (**Figura 14**).

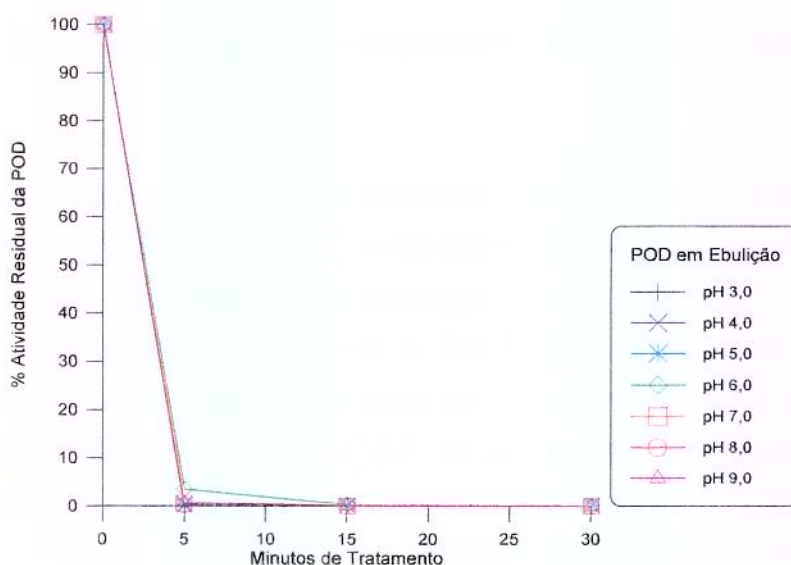


Figura 14: Inativação térmica da POD de carambola em temperatura de ebulição (96,8°C).

KHAN e ROBINSON [10] encontraram maior estabilidade térmica em POD ionicamente ligada de manga que em POD livre nos estágios iniciais do tratamento de calor a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. Foi verificado 10% de atividade residual após 2 minutos de tratamento a 75 °C da peroxidase solúvel e cerca de 15% de atividade residual de peroxidase ionicamente ligada. Peroxidase solúvel de mamão foi totalmente inativada a 80°C após 3 minutos e a 70 °C após 8 minutos, enquanto a ionicamente ligada foi inativada após 9 minutos a 80 °C e reteve atividade residual de 30% após 15 minutos a 70°C (LOURENÇO, NEVES, SILVA [13]). CLEMENTE [8] [9] relatou que POD bruta de laranja foi mais rapidamente inativada a 70 °C que suas isoperoxidasas. Após 10 minutos de tratamento da POD bruta, menos de 40% da atividade inicial permaneceram, enquanto nas isoenzimas purificadas essa atividade residual ainda foi de mais de 60%, no mesmo período. O autor não indicou o pH dos extratos enzimáticos. A POD de carambola por nós analisada quase não perdeu atividade no mesmo período, assumindo pH 6,0 para comparação. LOURENÇO e NEVES [12] trataram POD solúvel de pêssego a 60, 65, 70, 75 e 80 °C e vários tempos, relatando estabilidade a 60 °C e inativação considerável em temperaturas acima dos 70 °C, como já relatado para laranjas por McLELLAN e ROBINSON [16], por MOULDING *et alii* [18] [19] para maçã e para pera [17] e por ROBINSON, BRETHERICK, DONNELLY [20] para POD de uva "Ohane".

4 - CONCLUSÕES

- 4.1 - POD de carambola do pó cetônico foi mais estável em pH 6,0 em todas as temperaturas ensaiadas por 24 horas. Em pH 3,0 a enzima foi instável.
- 4.2 - A 0°C a peroxidase do pó cetônico de carambola mostrou-se estável em todos os valores de pH ensaiados; em pH 3,0 houve decréscimo da atividade para aproximadamente 70% da atividade inicial.
- 4.3 - A 50 °C, diminuição da atividade residual da POD de carambola pôde ser observada em dois estágios nos pH 3,0 a 6,0. Em pH 8,0 e 9,0, no entanto, uma ativação inicial pôde ser notada, nesta temperatura.

- 4.4 - Após 3 horas, cerca de 90% das combinações de tratamentos demonstraram atividade residual acima de 80%, indicando estabilidade da enzima nesses tratamentos.
- 4.5 - Após 24 horas de tratamento, apenas 40% das combinações de pH e temperatura demonstraram atividade residual acima de 80 %. A maior estabilidade após 24 horas de tratamento foi verificada em pH 8,0 entre 0° e quase 60 °C e a 40 °C entre pH 5,0 e 9,0.
- 4.6 - A Peroxidase semi-purificada de carambola foi inativada após 15 minutos de tratamento a 75 °C em pH 3,0 e após 30 minutos em pH 7,0. Nos demais pH a inativação foi mais lenta.
- 4.7 - A atividade residual menor em pH 7,0 que em pH 6,0, 8,0 e 9,0 em tratamento a 75°C, indica a possível existência de isoperoxidasas no pó cetônico de carambola.
- 4.8 - A peroxidase de carambola foi inativada após 5 minutos de tratamento em temperaturas de ebulição, em praticamente todos os valores de pH testados.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANGUITA, G.; MARTÍN, R.; GARCÍA, T.; MORALES, P.; HAZA, A. I.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, B. and HERNÁNDEZ, P. E. A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine β -Casein. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.60, n.1, p.64-66, 1997.
- [2] BURNETTE, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science, Chicago : IFT, v.42, n.1, p.1-6, 1977.

- [3] CASELLA, L.; GULLOTTI, M.; NARCHESINI, A. and PETRARULO, M. Rapid Enzymatic Method for Vitamin C Assay in Fruits and Vegetables Using Peroxidase. Journal of Food Science, Chicago : IFT, v.54, n.2, p.374-375, 378, 1989.
- [4] CHANG, T. C. and HUANG, S. H. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed Foods. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.57, n.3, p.184-189, 1994.
- [5] CHEN, C. H. and CHANG, T. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection, Ames : International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, v.58, n.8, p.873-878, 1995.
- [6] CHU, F. S. and FAN, T. S .L. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. Journal of the AOAC, Washington, DC : Association of Official Analytical Chemists, v.68, n.1, p.13-16, 1985.
- [7] CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC : American Chemical Society, v.43, n.10, p.2596-2601, 1995.
- [8] CLEMENTE, E. Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP : SBCTA, v.16, n.1, p.1-5, 1996.
- [9] CLEMENTE, E. Purification and Thermostability of Isoperoxidase from Oranges. Phytochemistry, Oxford : Pergamon Press, v.49, n.1, p.29-36, 1998.

- [10] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.47, n.1, p. 53-59, 1993.
- [11] KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.49, n.4, p.407-410, 1994.
- [12] LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas : SBCTA, v.17, n.1, p.42-48, 1997.
- [13] LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. and SILVA, M. A. da Heat Inactivation of Soluble and Bound Peroxidase from Papaya Fruit. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas : SBCTA, v.29, n.2, p.155-158, 1995.
- [14] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- [15] McCLEAR, B. V. and GLENNIE-HOLMES, M. Enzymatic Quantification of (1→3) (1→4)- β -D-Glucan in Barley and Malt. Journal of the Institut of Brewing, London, v.91, n.5, p.285-295, 1985.
- [16] McLELLAN, K. M. & ROBINSON, D. S. Heat Stability of Peroxidases from Orange. Food Chemistry, Oxford : Elsevier Applied Science Publishers, v.13, n.2, p.139-147, 1984.
- [17] MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.24, n.3, p.269-275, 1989.

- [18] MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.22, n.4, p.391-397, 1987.
- [19] MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.23, n.4, p. 343-351, 1988.
- [20] ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, v.24, n.6, p.613-618, 1989.
- [21] VÁMOZ-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Cleveland, v.15, p. 49-127, 1981.

CAPÍTULO 6

**Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*,
L.):**

Purification and characterization of an anionic isoenzyme.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Journal of Biochemistry, Westport : Food & Nutrition Press, Inc..

Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.):

Purification and characterization of an anionic isoenzyme.

HEINZ JOHANN HOLSCHUH

Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba,
Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

and

GLÁUCIA MARIA PASTORE

Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino
Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

Running Title: Purification of carambola peroxidase

Address: Gláucia Maria Pastore
Department of Food Science
College of Food Engineering
State University of Campinas - UNICAMP
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas - SP
13081-970
Brazil
E-mail: Glaupast @ FEA.UNICAMP.BR

ABSTRACT

Peroxidase from *Averrhoa carambola*, L. fruit was purified. Four peaks with activity were eluted by anion-exchange chromatography, and the strongest (A2) was purified by gel filtration chromatography, obtaining a purification degree of 106 with a yield of 14.5% in relation to the crude extract. The optimum reaction pH values were between 5.7 and 5.9 and the optimum reaction temperature was 50 °C. The apparent Michaelis-Menten constant (K_M) for guaiacol was 20.28×10^{-3} M and for hydrogen peroxide it was 12.75×10^{-3} M for this reaction system. The maximum reaction velocity (V_{max}) was estimated as 8,210 Units per millilitre (U/ml) for guaiacol and 11,635 U/ml for hydrogen peroxide. For p-phenylenediamine, K_M was 3.26×10^{-3} M and for hydrogen peroxide it was 1.85×10^{-3} M; V_{max} estimated was 15,937 U/ml and 19,702 U/ml, respectively. Native polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE) resulted in one band when stained with p-phenylenediamine and hydrogen peroxide, and SDS-PAGE demonstrated one well defined band after staining with silver salts.

Keywords: Peroxidase, carambola, *Averrhoa carambola*, L., purification

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, donor : hydrogen peroxide oxidoreductases) are isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. The investigation of this group of enzymes may be of interest, not only for its negative effects on colour (browning) and flavour, degradations of pigments and nutritional value, but also for its positive effects on the brown colour and reinforcement of texture caused by protein crosslinking (Matheis and Withaker 1984 and 1987). Isoperoxidases occur in discreet manner, soluble in protoplasm or linked to the cell walls (McLellan and Robinson 1983; Moulding et alii 1987 and 1989; Robinson et alii 1989; Khan and Robinson 1993). It is of general acceptance that isoenzymes differ with respect to charges in electric fields, catalytic properties, molecular size, thermal stability, regeneration properties, amino acid composition and carbohydrate content. In this work, carambola peroxidase was purified and an anionic isoenzyme characterized for its pH and temperature optima, and the kinetic parameters K_M and V_{max} of two H^+ donors (guaiacol and p-phenylenediamine), and hydrogen peroxide in the two reaction systems.

MATERIAL AND METHODS

Material

Semi-purified peroxidase, obtained from precipitation of the supernatant with a concentration of 65% of acetone, drying and grinding, stored under freezing temperatures (-19 °C) was the material investigated. All chemical reactants were from Merck or Sigma.

Methods

Peroxidase purification: Adequate quantities of acetone powder were dissolved in 0.025 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, identical to the equilibration buffer of the anionic exchange column. The solution was submitted to 40 °C for 30 minutes in a water bath to dissociate the pectin agglutinated to the enzyme (Silva 1987) and then centrifuged at 11,000 *g* at 4 °C for 15 minutes to clear the solution. Ten to fifteen millilitres were added to the DEAE Toyopearl 650-C (2.5 x 35 cm) column (Toiguchi et alii 1989). Fractions of 3.2 ml were collected at a rate of 24 ml per hour. The adsorbed proteins were eluted using a NaCl gradient between 0.14 and 0.40 M with intervals of 0.02 M. The protein concentration was measured at 280 nm in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, DU-70 serie. Peaks with POD activity were pooled, identified in order of elution (Khan & Robinson, 1993), dialysed against water (Millipore 18 MΩcm), concentrated by freeze drying and dissolved in a minimum of the above buffer for rechromatography on an identical column. Active fractions of the rechromatography column were pooled, dialysed and freeze dried as above. The pool of the strongest peak was dissolved in 0.025 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 and submitted to gel filtration chromatography (Toyopearl HW-55 F column, 1.5 x 65 cm) (Soda et alii 1991). The peak with POD activity was pooled and used for enzyme characterization. Native PAGE and SDS-PAGE of the purified anionic isoperoxidase were performed according to Davis (1964) and Laemmli (1970) respectively, for determination of the purity.

Molecular weight determination: Gel filtration chromatography of the strongest pool from the anion exchange chromatography was performed on a Sephadex G-100 column (1.5x65 cm), using blue dextran for the void volume determination and Cytochrome-C (12,400 Da), Carbonic anhydrase (29,000 Da) and Bovine Serum Albumin

- BSA (67,000 Da) as standards. The molecular weights of the peroxidase and of the two inactive protein peaks were calculated from a regression curve, where $\log_{10}$ of the molecular weights of standards were plotted against the ratio of the elution volumes of the standards and the void volume of the column.

Electrophoresis on polyacrylamide gels: Native PAGE was carried out according to Davis (1964) and SDS-PAGE according to Laemmli (1970). Enzyme-substrate staining of the native PAGE gels carried out using guaiacol : hydrogen peroxide (Gove and Hoyle 1975) or p-phenylenediamine : hydrogen peroxide (Marin and Cano 1992). SDS-PAGE gels were stained with silver salts (Morrissey 1981).

Optimum reaction pH: Purified anionic carambola isoperoxidase was submitted to reaction in buffer solutions from pH 3.0 to 9.0 with intervals of 0.5 units. In the optimum pH region between pH 5.5 and 6.5 the intervals were 0.1 pH units.

Optimum reaction temperature: The purified anionic isoperoxidase was submitted to reaction under the optimum pH conditions at 10, 25, 40, 45, 50, 55, 60 and 70° C.

The kinetic parameters K_M and V_{max} : These parameters were estimated using the Michaelis-Menten plot, calculating the values using linear regression for the systems guaiacol : hydrogen peroxide and p-phenylenediamine : hydrogen peroxide.

Peroxidase activity: The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction mixture contained 0.1 ml of

enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer and buffer to complete 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in Beckman UV/VIS spectrophotometer, DU-70 serie. Activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The results were given as the delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the quantity of enzyme which causes an increase in 0.001 absorbancy units per minute at 470 nm with guaiacol as H⁺ donor or at 485 nm with p-phenylenediamine. The specific peroxidase activity was expressed as units per mg of protein.

Protein determination: The protein content was estimated using the method of Lowry et alii (1951) and bovine serum albumin (BSA) as the standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of an anionic isoperoxidase from carambola.

The purification was carried out using the methodology described above. The chromatography scheme can be seen in Table 1. The anion exchange chromatography resulted in 4 (four) peaks: peak 1 (C) eluted with equilibration buffer, peak 2 (A1) and peak 3 (A2) with a 0.14 M salt (NaCl) gradient and peak 4 (A3) with a 0.3 NaCl gradient (Figure 1). Rechromatography after dialysing and freeze drying of the pools (Figure 2), resulted in a loss of specific activity by all peaks (Table 1). Both ion exchange chromatography steps caused a loss in yield: 28% in the first column and 43.5 % in the

second anionic exchange column. Peak A2 from the rechromatography column was submitted to gel filtration chromatography in a Toyopearl HW-55 F column (1.5 x 65 cm) and a single peak was obtained (Figure 3) with a purification factor of nearly 106 and yield of about 14.5 %, in relation to the total activity in the supernatant (Table 1). Native PAGE of the purified anionic isoperoxidase from carambola with p-phenylenediamine : hydrogen peroxide staining gave only one band (Figure 4a) and SDS-PAGE of the same isoperoxidase with silver salt staining gave one strong band and several very weak bands, which disappeared after the conclusion of the staining process (Figure 4b), indicating that the enzyme was not completely pure.

Molecular weight estimation

The Molecular weight was estimated using gel filtration chromatography in a Sephadex G-100 (65 x 1.5 cm) column. The anionic carambola isoperoxidase A2 eluted between the two peaks of protein, in the region near the elution of bovine serum albumin, one of the standards (Figure 5). The molecular weight of the anionic isoperoxidase A2 was estimated as 64.5 kDa by regression analysis and the results were in good accordance with those reported by Civello et alii (1995) for cationic isoperoxidases from strawberry (58.1 and 65.5 kDa). The molecular weights of the isoperoxidases of orange juice, as related by Clemente (1996) were much lower, being situated between 21.0 and 40.0 kDa.

Optimum reaction pH:

The optimum reaction pH of the anionic isoperoxidase A2 from carambola was situated between 5.7 and 5.9 for guaiacol as H⁺ donor. The activity was higher than 80% of

the maximum between pH 5.0 and 7.0 (Figure 7). In accordance with Catalá and Chamarro (1987), the pH optimum depends on the H^+ donor used: pH 4.5 to 5.5 for guaiacol, 5.0 to 5.5 for o-dianisidine for the two anionic and cationic isoperoxidases of orange flavedo, and pH 6.2 for benzidine and the anionic isoperoxidase. The pH optimum reported for apple peel (pH 5.8) by Richard and Nicolas (1989) was in good agreement with our findings for the anionic carambola isoperoxidase A2, while that related by Silva et alii (1990) for papaya peroxidase (pH 6.8) was much higher, from which we conclude that the optimum pH is dependant on the peroxidase source as well.

Optimum reaction temperature

The optimum reaction temperature was clearly at 50 °C (Figure 8). This finding was different from that related by Civello et alii (1995), who gave 30 °C as the optimum for the cationic isoperoxidase of strawberry.

Kinetic parameters K_M and V_{max}

In the system guaiacol : hydrogen peroxide the K_M for guaiacol was estimated as 20.28×10^{-3} M and for hydrogen peroxide as 12.75×10^{-3} M. V_{max} was estimated as 8,210 U / ml and 11,635 U / ml, respectively for guaiacol and hydrogen peroxide in this system. Determining the two parameters in a system with p-phenylenediamine and hydrogen peroxide, K_M was estimated as 3.62×10^{-3} M for the first and 1.85×10^{-3} M for the second. V_{max} was estimated as 15,937 U / ml for p-phenylenediamine and 19,702 U / ml for hydrogen peroxide (Table 2). The relation V_{max} / K_M shows that p-phenylenediamine was the preferred substrate for anionic isoperoxidase A2 from carambola (Table 2). Silva

(1987) related a K_M of 3.07×10^{-3} M for soluble and 7.40×10^{-3} M for bound peroxidases of papaya, using guaiacol as substrate. For p-phenylenediamine the values reported were 10.0×10^{-3} M and 7.2×10^{-3} M, respectively. These data were very different from our findings for the anionic carambola isoperoxidase. Our findings for the ratio V_{max} / K_M for p-phenylenediamine were comparable to those related by Silva (1987) for o-dianisidine and the soluble peroxidase from papaya.

REFERENCES

- ANDREWS, P. (1965) The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. Biochemical Journal, 96 (), 595-605.
- CATALÁ, C. y CHAMARRO, J. (1987) Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valência, 27 (4), 509-518.
- CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. (1995) Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, American Chemical Society, 43 (10), 2596-2601.
- CLEMENTE, E. (1996) Isolamento, Purificação e Termoestabilidade da Isoperoxidase do Suco de Laranja. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP, SBCTA, 16 (1), 1-5.
- DAVIS, B. J. (1964/65) Disk Electrophoresis - II Method and Application to Human Serum Proteins. Annals of the New York Academy of Science, New York, , 121 (), 404-427.
- FILS, B.; SAUVAGE, F. X. and NICOLAS, J. (1985) Tomato Peroxidases: Purification and some Properties. Sciences des Aliments, Paris, 5 (2), 217-232.

- GOVE, J. P. and HOYLE, M. C. (1975) The Isozymic Similarity of Indolacetic Acid Oxidase to Peroxidase in Birch and Horseradish. Plant Physiology, Waltham / Bethesda, American Society of Plant Physiologists, 56 (4), 684-687.
- HOLSCHUH, H. J. e PASTORE, G. M. (1998) Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola*, L.): Influência de Aditivos na Extração da Enzima. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15 a 17 de julho de 1998, Anais, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nº 580, CD-ROM.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1993) Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, Oxford, 46 (1), 61-64.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, Oxford, 49 (4), 407-410.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, London, 227,(8), 680-685.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, 193, 265-275.
- McLELLAN, K. M. & ROBINSON, D. S. (1984) Heat Stability of Peroxidases from Orange. Food Chemistry, Oxford, 13, (2), 139-147.
- MARIN, M. A. and CANO, M. P. (1992) Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. Journal of Food Science, Chicago, IFT, 57 (3), 690-692, 734.
- MATHEIS, G. and WHITAKER, J. R. (1984) Modification of Proteins by Polyphenol Oxidase and Peroxidase and their Products. Journal of Food Biochemistry, Westport, Food & Nutrition Press, Inc., 8 (3), 137-162.

- MATHEIS, G. and WHITAKER, J. R. (1987) A Review: Enzymatic Cross-Linking of Proteins Applicable to Foods. Journal of Food Biochemistry, Westport Food & Nutrition Press, Inc., 11 (4), 309-327.
- MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1989) The occurrence of isoperoxidases in Conference pears. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 24 (3) 269-275.
- MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1987) Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 22(4), 391-397.
- MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M. and ROBINSON, D. S. (1988) Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 23 (4), 343-351.
- RICHARD, F. and NICOLAS, J. (1989) Purification of Apple Peel Peroxidase Studies of some Properties and Specificity in Relation to Phenolic Compounds. Sciences des Aliments, Paris, 9(2), 335-350,
- ROBINSON, D. S. ; BRETHERICK, M. R. and DONNELLY, J. K. (1989) The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grapes. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, 24 (6), 613-618.
- SILVA, E. da (1987) Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Doctor Thesis, 127 pp.: University of São Paulo, São Paulo.
- SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. (1990) Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, Pergamon Press, 29 (4), 1051-1056.

- SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. and OGURA, N. (1991) Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 55 (6), 1677-1678.
- TOIGUCHI, S.; HAYASHI, K.; ADACHI, Y.; MOTOKI, M. and HARAGUCHI, K. (1989) Purification and Characterization of Soybean Oxidase. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, Japanese Society of Food Science and Technology, Tokyo, 36 (7), 597-602.
- WHITAKER, J. R. (1963) Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. Analytical Chemistry, -/[35 (12), 1950-1953.

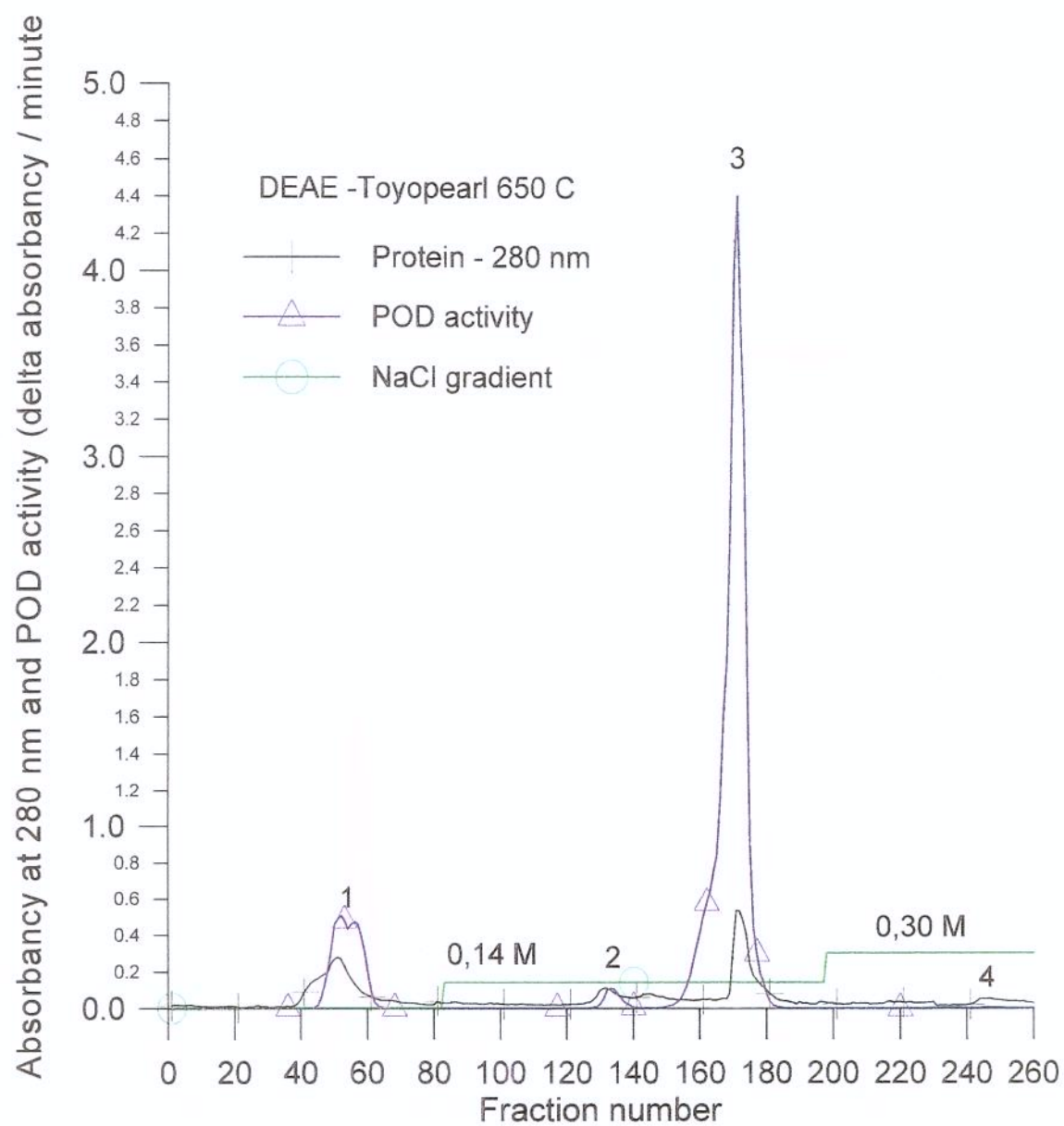


FIGURE 1: Purification of peroxidase from carambola on first DEAE Toyopearl 650 C column. Active POD peaks are numbered from 1 to 4.

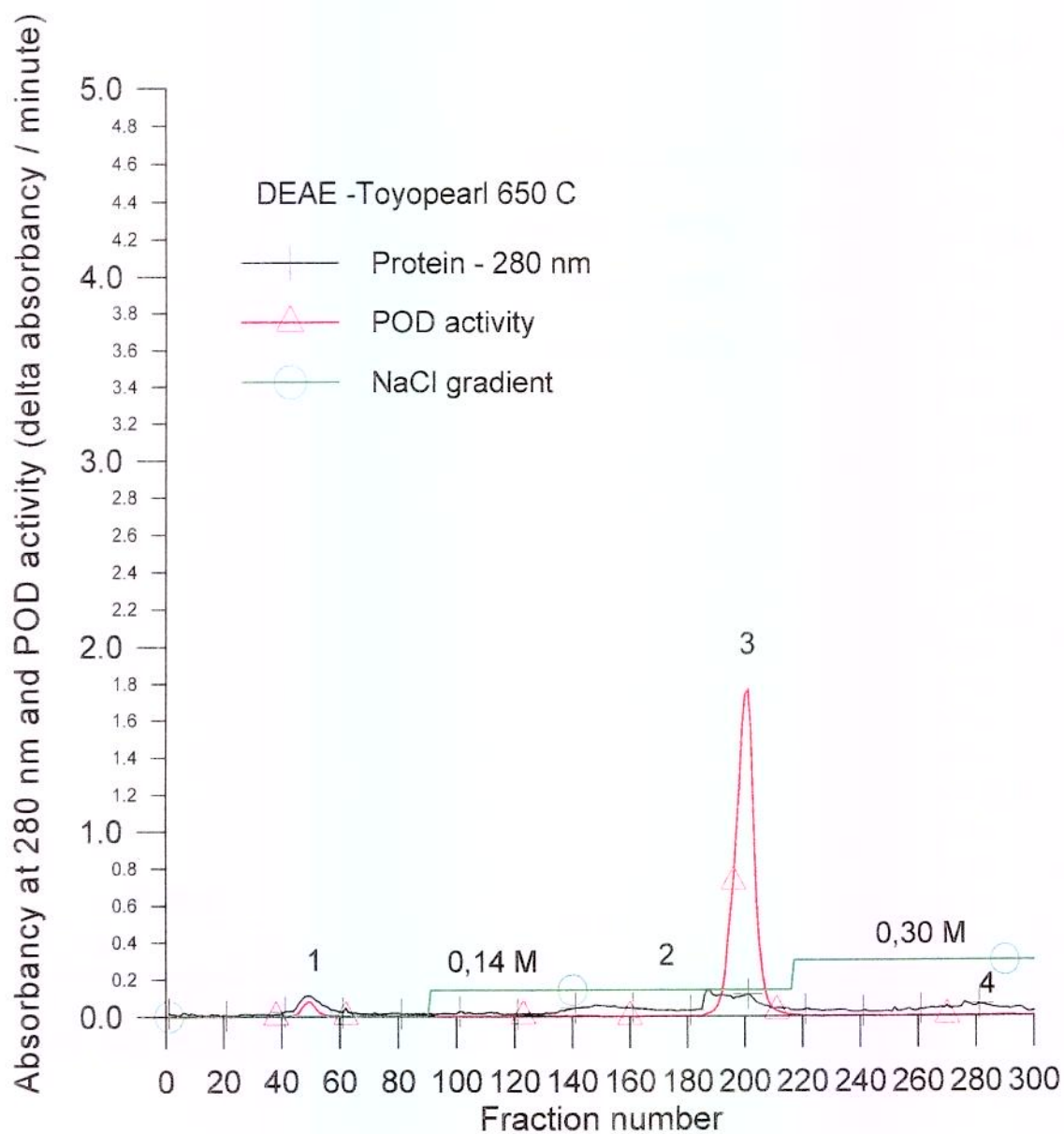


FIGURE 2: Purification of peroxidase from carambola on second DEAE Toyopearl 650 C column. Protein peaks are numbered from 1 to 4.

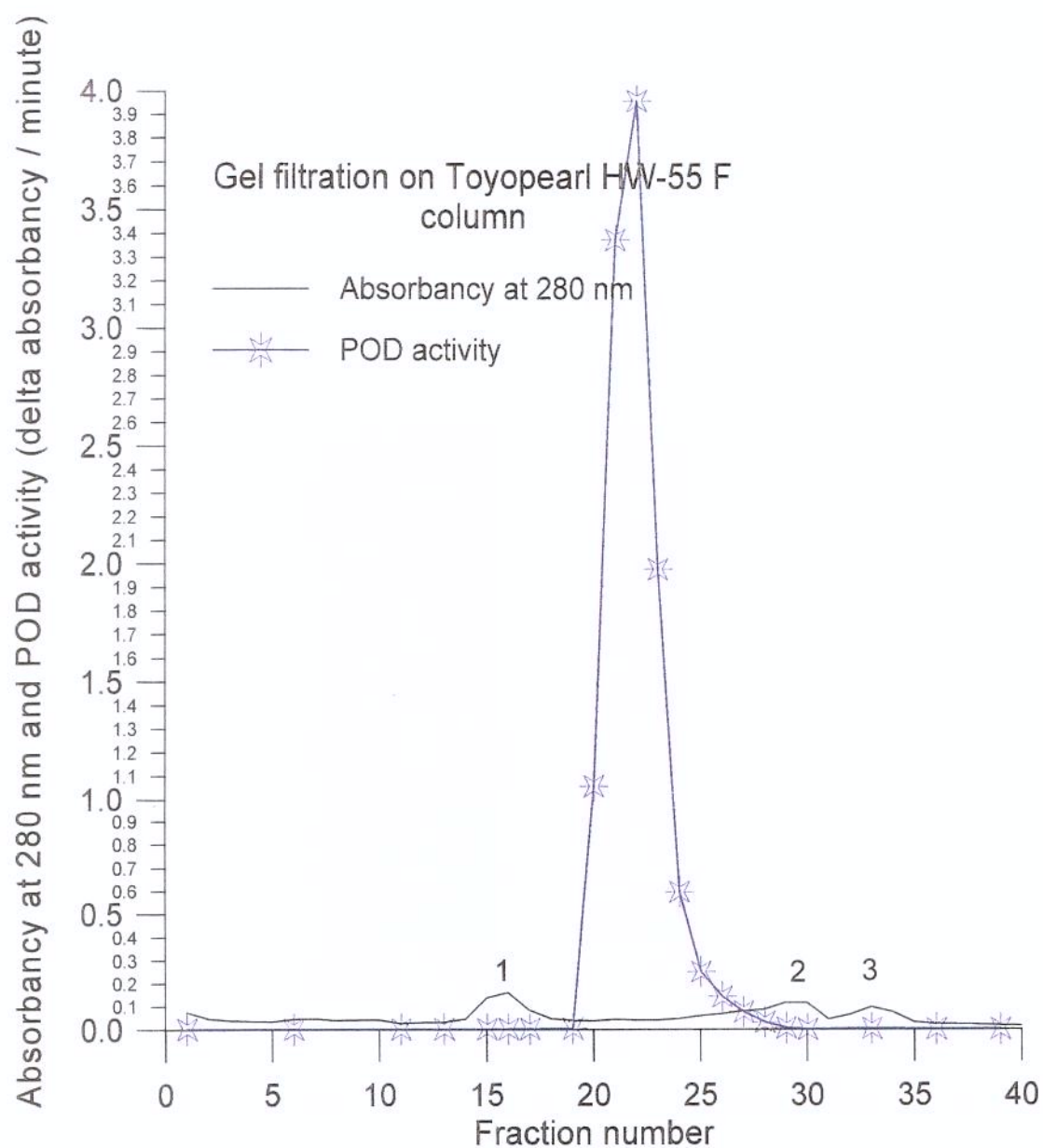


FIGURE 3: Purification of isoperoxidase A2 on Toyopearl HW-55 F gel filtration column.

Protein peaks are numbered from 1 to 3.

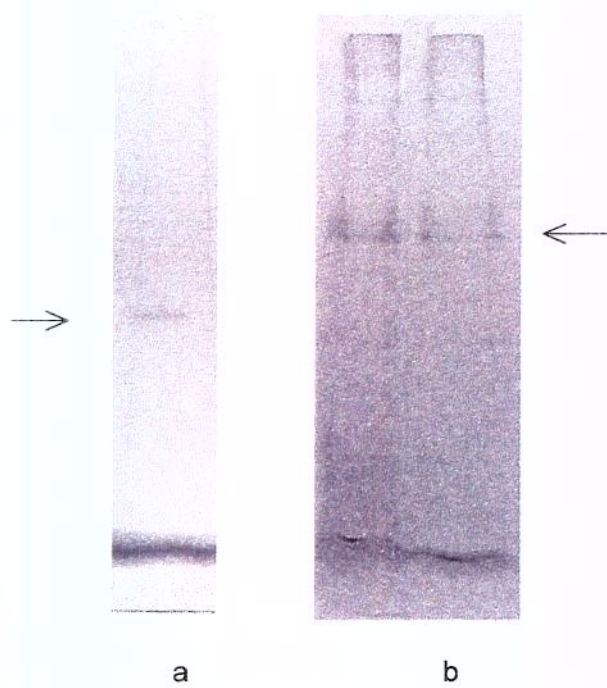


FIGURE 4: Native PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of the purified anionic isoperoxidase. The arrows indicate the POD-band in a and protein-band in b.

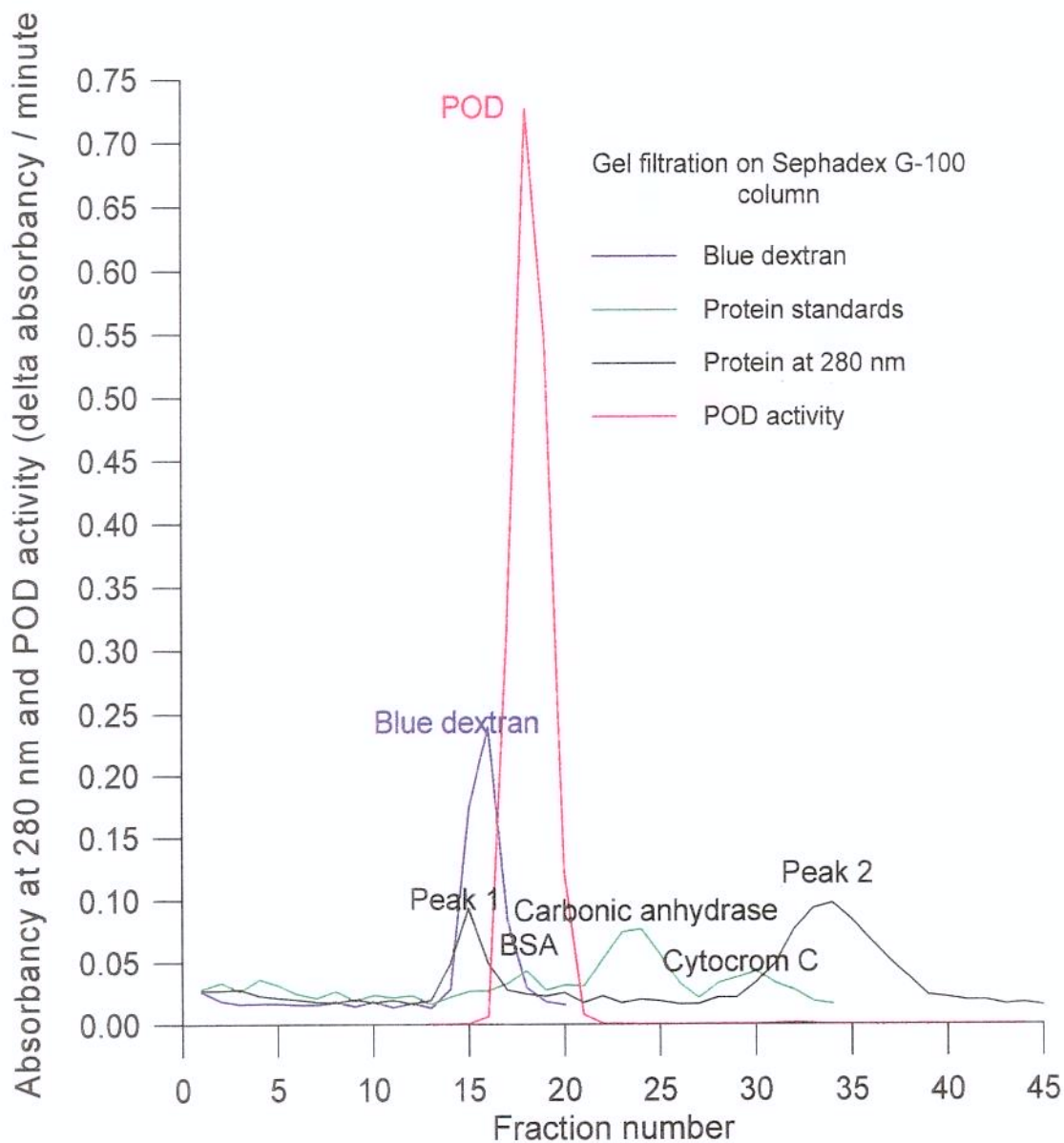


FIGURE 5: Outline of gel filtration chromatography on Sephadex G-100 for the molecular weight determination.

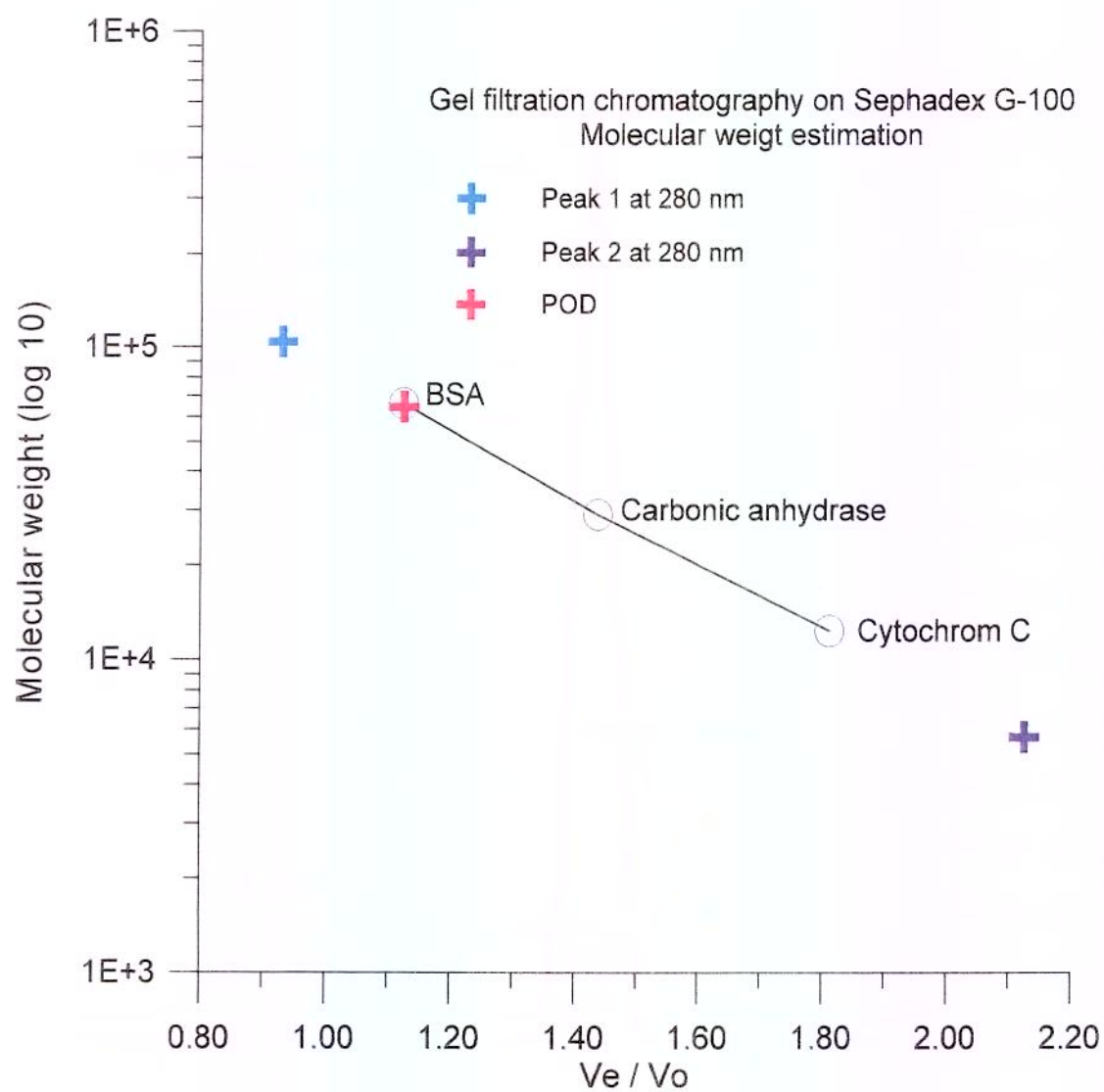


FIGURE 6: Molecular weight estimation of an anionic isoperoxidase from carambola

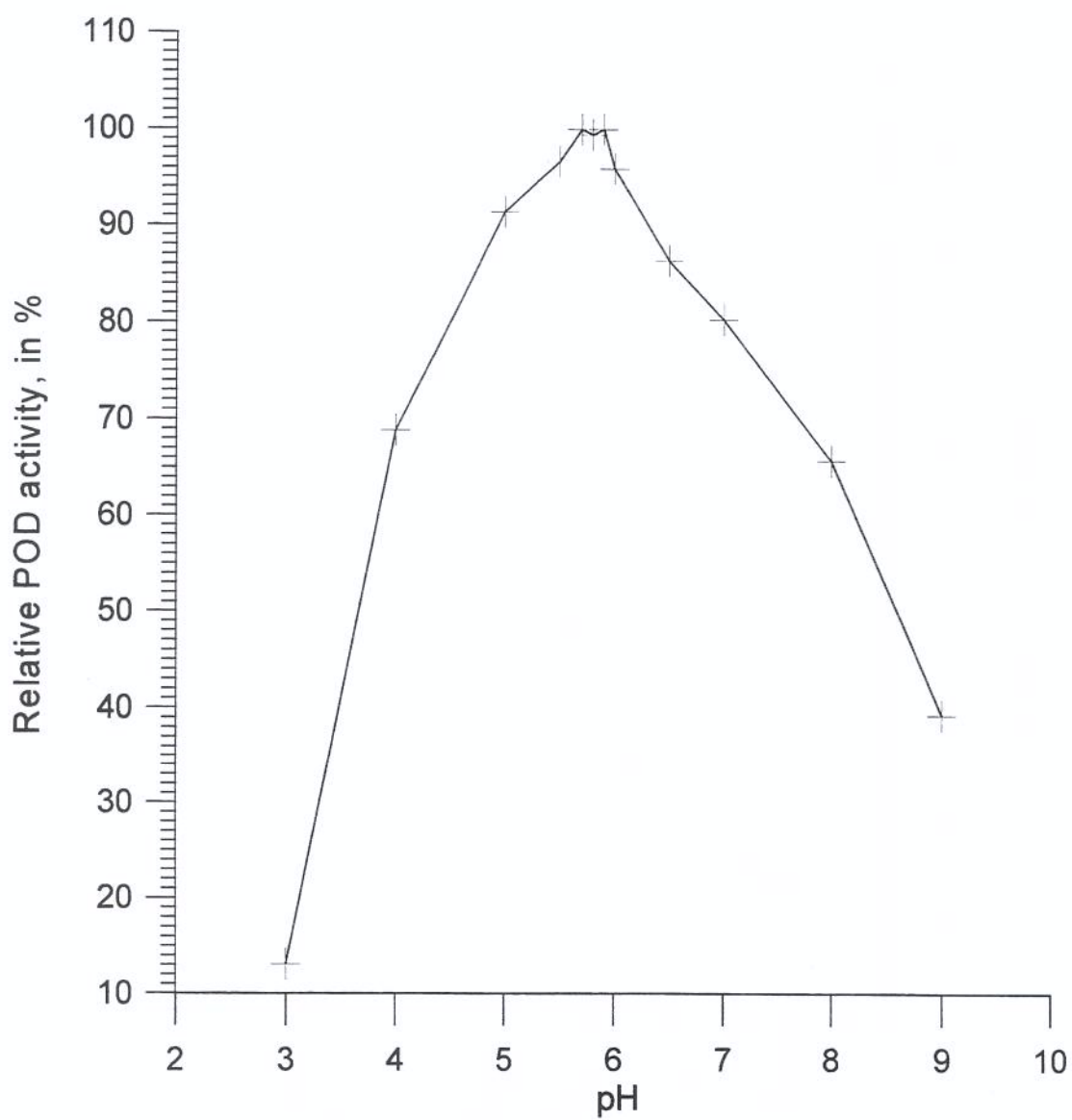


FIGURE 7: Optimum reaction pH of the anionic isoperoxidase A2 from carambola

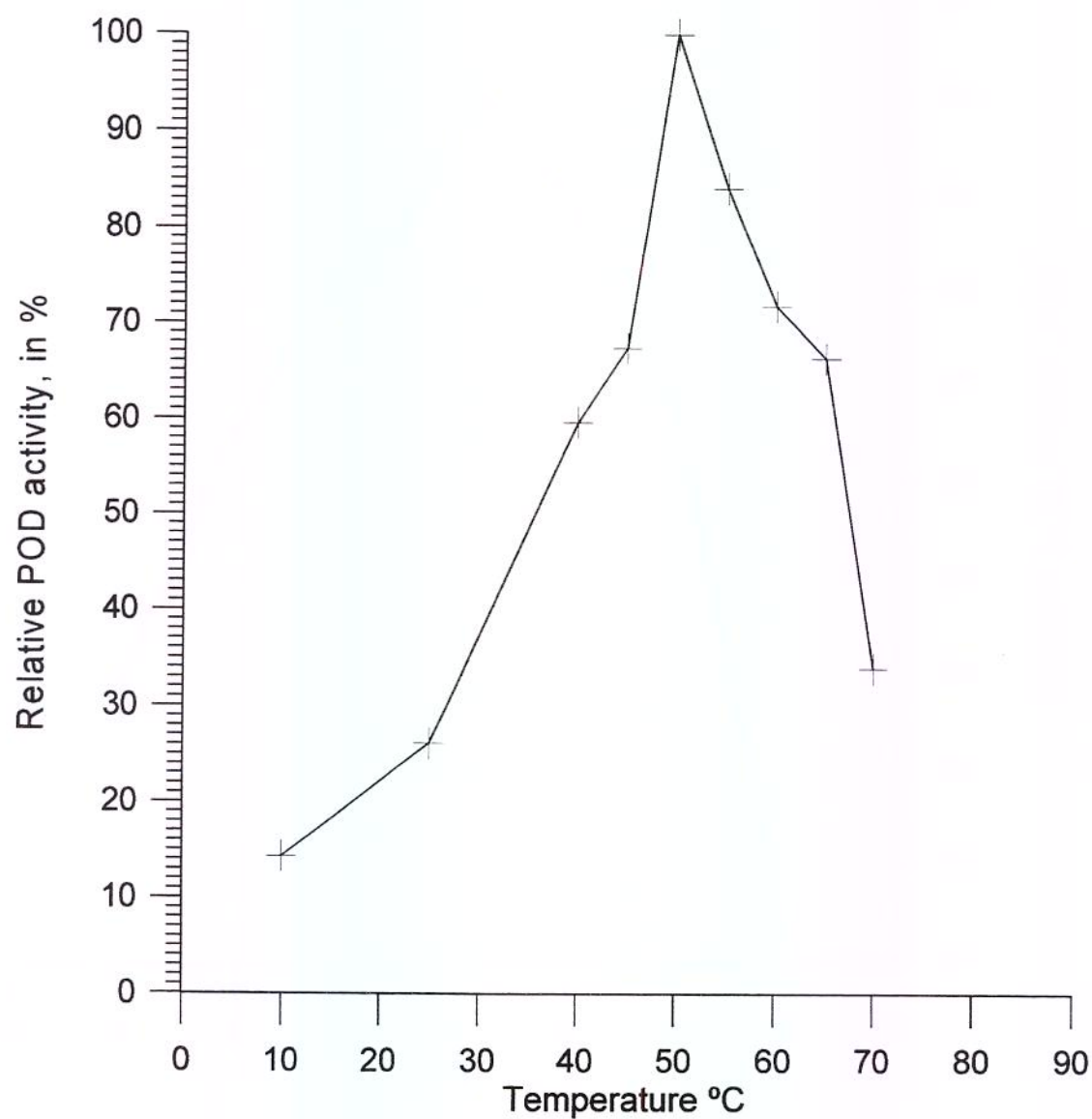


FIGURE 8: Optimum reaction temperature of the anionic isoperoxidase A2 from carambola

TABLE 1.
PURIFICATION STEPS AND YIELD OF CARAMBOLA PEROXIDASE.

Purification step	Quantity	POD activity U/ml	Total activity U x 10 ³	Protein mg/ml	Specific activity U/mgprotein	Yield (%)	Purification factor
Carambola	626.500g						
Supernatant	2,300 ml	10,640	24,472.00	2.034	5,207.01	100.00	1
Acetone powder	17.89g	1,291,290	23,099.80	1.068	132,827.86	94.32	25.51
Acetone powder add to Column 1	1g in 8.1 ml	141,900	20,562.59	1.068	132,827.86	94.32	25.51
Pool 1 freeze dried	4.0 ml	44,420	3,178.70	0.987	45,018.75	14.53	8.65
Pool 2 freeze dried	4.0 ml	16,660	1,192.19	0.309	54,073.35	5.47	10.38
Pool 3 freeze dried	4.0 ml	137,550	9,843.08	0.335	411,087.87	45.15	78.95
Pool 4 freeze dried	4.0 ml	3,565	255.11	0.102	34,916.75	1.17	6.71
Pools 1 to 4 applied to column 2	12.0 ml	7,530	14,469.07	0.422	17,860.53	66.37	3.43
Pool 1 freeze dried	6.5 ml	2,613	303.86	0.207	12,623.19	1.39	2.42
Pool 3 freeze dried	6.5 ml	40,250	4,680.47	0.126	320,206.84	21.47	61.50
Pool 3 applied to column 3	5.0 ml	40,250	3,600.36	0.126	320,206.84	22.86	61.50
Pool eluted	30.0 ml	6,610	3,547.59	0.012	555,833.33	14.50	106.26

Observation: The pool numbers were maintained throughout the purification scheme, so pools 2 and 4 eluted from column 2 without POD activity (Figure 2).

TABLE 2.

ESTIMATED K_M E V_{MAX} VALUES FOR THE SYSTEMS GUAIACOL : HYDROGEN PEROXIDE AND P-PHENYLENEDIAMINE : HYDROGEN PEROXIDE OF PURIFIED ANIONIC CARAMBOLA PEROXIDASE.

Substrate	K_M	V_{max}	V_{max} / K_M
Guaiacol	20.28 mM	8,210 U / ml	404.83 U/ml•mM
hydrogen peroxide	12.75 mM	11,635 U / ml	912.55 U/ml•mM
p-Phenylenediamine	3.62 mM	15,937 U / ml	4.402.49 U/ml•mM
hydrogen peroxide	1.85 mM	19,702 U / ml	10.649.73 U/ml•mM

CAPÍTULO 7

**Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*,
L.):**

Heat and pH stability and inhibition of an anionic isoperoxidase.¹

¹ Este artigo foi escrito para publicação no periódico Journal of Biochemistry, Westport : Food & Nutrition Press, Inc..

Peroxidase from carambola fruit (*Averrhoa carambola*, L.):

Heat and pH stability and inhibition of an anionic isoenzyme.

HEINZ JOHANN HOLSCHUH

Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba,
Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa - PB.

and

GLÁUCIA MARIA PASTORE

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp,
Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13081-970, Campinas - SP

Running Title: Heat stability, and inactivation of carambola peroxidase

Address: Gláucia Maria Pastore
Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Campinas - SP
CEP 13081-970
Brasil
E-mail: Glaupast@FEA.UNICAMP.BR

ABSTRACT

Thermal and pH stability of a purified anionic isoperoxidase from carambola fruit was determined using temperatures between 0 and 60°C, in buffer solutions between pH 3.0 and 9.0, with pH intervals of 1.0 for 24 hours. For 75°C and boiling temperatures, the treatment times were up to 60 minutes. Different potential inhibitors were added to the reaction mixture at different concentrations. In pH 3.0 buffer, the enzyme activity was inhibited at all time x temperature treatment combinations. Peroxidase was stable for 24 hours at 0°C at pH values from 4.0 to 9.0, and at 25°C from pH 6.0 to 9.0. Inactivation was obtained after 1 hour at pH 6.0 at 75 °C. Under boiling conditions inactivation was achieved at pH 6.0 to 9.0 after 5 minutes. Strong inhibitors of enzyme activity were 0.05mM CuSO₄ (92.7%), 0.1mM KCN (98.8%), 2-mercaptoethanol (99.9%), ferrulic acid (92.4%), sodium metabisulphide (100%) all in 5mM concentration and 10mM Fe₂(SO₄)₃ (98.9%). Strong enhancement of the activity was caused by 5mM CaCl₂ (22.9%).

INTRODUCTION

Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7, donor : hydrogen peroxide oxidoreductases) are isoenzymes widely distributed in the plant kingdom. These enzymes are known to be very heat resistant and so peroxidase is used in the food industry as an indicator for optimal heat treatments, enzyme inactivation with minimal organoleptic and nutritional quality modifications. On the other hand, if there is to preserve peroxidase activity for some application, thermal and pH stability will be of interest. No work on the heat and pH stability nor susceptibility to heat or chemical inactivation of the peroxidase from carambola fruit has been reported upto now. Our work examined these aspects for a purified anionic isoperoxidase from carambola.

MATERIAL AND METHODS

Material

Purified anionic isoperoxidase from carambola was obtained purifying the dry acetone precipitate from the supernatant, using anionic exchange chromatography on a DEAE Toyopearl G-250 column (2.5 x 35 cm) twice, followed by gel filtration chromatography on a Toyopearl HW-55 F column (1.5 x 65 cm). The pool of a 106 fold purified enzyme was used for characterization. All reagents were of analytical grade, from Merck or Sigma.

Methods

Heat x pH stability: Aliquots of 0.2 ml of purified anionic isoperoxidase from carambola fruit were diluted to 1.3 ml with buffer in the pH range from 3.0 to 9.0, with intervals of 1.0 pH units, and submitted to heat treatment for 0, 3, 6, 12, and 24 hours in Eppendorf tubes. Heat treatments were carried out at 0, 25, 40, 50, and 60 °C. For the temperatures of 75 ° and boiling (96.8 °C) treatment times were 0, 5, 15, 30, and 60 minutes. The peroxidase activity was determined in 0.2 M potassium phosphate buffer (reaction buffer), pH 6.0 at 50 °C, in a reaction medium of 1.3 ml of treated enzyme solution, 1.5 ml of 1% guaiacol in the reaction buffer and 0.4 ml of 0.1 M hydrogen peroxide solution in the reaction buffer, in a total of 3.2 ml. Increasing absorbancy was measured for 3 minutes at 470 nm in a Beckmann UV/VIS spectrophotometer, series DU-70, and the linear part of the curve used to calculate the peroxidase activity. One unit was defined as the amount of enzyme which caused an increase of 0.001 absorbancy units per minute.

Influence of ions on peroxidase activity

The influence of ions on the peroxidase activity was investigated, replacing 0.2 ml of reaction buffer by the same amount of different ion solutions in the salt form. The concentrations were those to reach 0.05 mM, 0.10 mM, 0.50 mM, 1.0 mM, 5.0 mM, and 10.0 mM, except for potassium cyanide, where a concentration of 0.25 mM was used instead of 10.0 mM in the reaction medium of 3.2 ml. All of them were diluted in the reaction buffer of 0.1 M potassium phosphate, pH 6.0. Peroxidase was determined as described in the pertinent section.

Influence of inhibitors on peroxidase activity

For supposed inhibitory substances, the same molar concentrations were used as for ions, using the same analytical procedures.

Determination of peroxidase activity

The determination of peroxidase activity was based on the method of Khan and Robinson (1994). The reaction was started with the addition of 0.1 ml of enzyme solution to the reaction mixture containing 1.5 ml of 1% guaiacol in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, and 0.1M hydrogen peroxide in the same buffer giving a total of 3.2 ml. Absorbancy was measured for three minutes in a Beckman UV/VIS spectrophotometer, series DU-70. The activity was calculated from the linear section of the absorbancy curve between 0.1 and 0.7 absorbancy units. The result was given as the delta absorbancy per minute. One peroxidase unit was defined as the quantity of enzyme which caused an increase in 0.001 absorbancy units per minute at 470 nm with guaiacol or at 485 nm with p-phenylenediamine as H^+ donors.

RESULTS AND DISCUSSION

Heat and pH stability

The anionic isoperoxidase from carambola fruit, submitted to heat treatment at 0 °C was stable for 24 hours in all pH solutions tested, except pH 3.0, in which the residual activity decreased rapidly to a level below 30% after 3 hours (Figure 1). At 25 °C, enzyme

activity was stable for 24 hours at pH 6.0 to 9.0, with residual activities higher than 80%. In the other pH solutions a gradual reduction of activity was observed with decreasing pH. In solutions at pH 3.0 the peroxidase activity was nearly zero after 3 hours (Figure 2). Only pH 7.0 demonstrated stability for peroxidase activity at 50 °C, for 24 hours. In solutions at pH 6.0, 8.0 and 9.0, about 30% residual activity was retained after 24 hours and all other pH values resulted in inactivation after 3 hours (Figure 3). At 75 °C anionic isoperoxidase from carambola was stable at pH 8.0 and 9.0, for 15 minutes and pH 6.0 retained 55% of the initial activity. Inactivation was achieved at pH 3.0 after 15 seconds, pH 4.0 and pH 5.0 after 5 minutes, and pH 6.0 after 1 hour (Figure 4). Anionic isoperoxidase from carambola was inactivated by treatment at boiling temperatures (96.8 °C) after 15 seconds at pH 3.0, 1 minute at pH 4.0 and 5.0 and after 5 minutes at all other pH values (Figure 5). Analysing the results from the pH point of view, at pH 3.0 the anionic isoperoxidase from carambola was unstable at all treatment temperatures (Figure 6). In pH 6.0 solutions, stability was found at 0 and 25 °C for 24 hours and at 40 °C for 12 hours (Figure 7), whereas at pH 9.0, stability occurred at 0, 25 and 40 °C for 24 hours. At 50 °C only 30% of the activity was retained after 24 hours and 60 °C nearly inactivated the peroxidase activity in 12 hours at this pH (Figure 8). The findings of Civello et alii (1995) of good stability for cationic peroxidase from strawberry fruit in the pH range from 4.0 to 11.0, for 30 minutes at 20 °C, are in good agreement with our findings at 25 °C for pH 4.0 to 9.0. Lourêngo and Neves (1997) reported that soluble peach peroxidase suffered no loss in activity at pH 3.0 to 8.0 for 2 hours at 30° C, like our isoperoxidase at pH 5.0 to 9.0. The instability of peroxidases at pH values below 4.0 may be due to the loss of the heme-group under these conditions (Burnette 1977), a possible reason for the loss of activity of the anionic isoperoxidase from carambola fruit at pH 3.0. Khan and Robinson (1993) reported greater heat stability for ionically bound peroxidase than for

soluble peroxidase from mango 'chaunsa' in the initial stages of heat treatments at 60, 65, 70, 75 and 80 °C, but after 2 minutes, only 10 and 15 % of the initial activity was found for soluble and bound peroxidase, respectively, both lower in activity than our findings for the anionic isoperoxidase of carambola, which was stable at 75 °C for 5 minutes at pH 6.0, still retaining 55 % of its initial activity after 15 minutes under the same conditions.

Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the activity of anionic isoperoxidase from carambola

The addition of Indole-3-acetic acid (IAA) to the reaction medium caused little inactivation: 7.3 % at a concentration of 5.0 mM (Table 1). The highest inactivation was obtained using 5 mM of ferrulic acid, retaining only 7.6 % residual activity, followed by caffeic acid (24.2 %) and p-coumaric acid with 51.9 % residual activity (Table 1). Prabha and Patwardhan (1986) reported an activation effect of 248 for p-coumaric acid, 700 for caffeic acid and 1500 for ferrulic acid on the peroxidase activity of mango pulp, contrary to our findings of inactivation of our anionic isoperoxidase from carambola with the same reagents. Silva (1987) reported that 0.16 μ M of ferrulic acid inhibited 96 % of the soluble and ionically bound peroxidase activity from papaya, showing a much higher efficiency than in our findings with the anionic isoperoxidase from carambola.

Influence of ions on the anionic isoperoxidase activity of carambola

Strong inactivation was caused by potassium cyanide (KCN): 0.1 mM resulted in 1.2 % of residual activity (Table 2), an indication of a heme group at the active site.

Copper sulphate inhibited the anionic isoperoxidase more than KCN: the same concentration causing negative results, explained by the clarification of the reaction mixture (Table 2). The addition of 10 mM potassium chloride (KCl) resulted in 94.6 % and the same amount of sodium chloride (NaCl), 87.9 % of residual activity. NaCl in 0.1 mM concentration resulted in 6.3 % activation (Table 2). Magnesium sulphate (MgSO_4) demonstrated an activation effect up to 1 mM (8.8%) and inactivation of 7.3 % in 10 mM concentration (Table 2), whereas manganese sulphate (MnSO_4) showed an activation effect of 6.4 % at a concentration of 5 mM and inactivation effect of 59.5 % at a concentration of 10 mM (Table 2). Light inactivation of 4.8 % was caused by Iron (III) sulphate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) up to 1 mM, and a heavy inactivation of 98.9 % by a concentration of 5 mM. The Fe^{+++} ion may be oxidized to Fe_2O_3 by hydrogen peroxide, clarifying the reaction solution by precipitation. Calcium chloride demonstrated an activation influence of 22.9 % at a concentration of 5 mM and an inhibition effect of 21.2 % at a concentration of 10 mM, whereas sodium sulphate demonstrated no influence on the activity (Table 2). Silva (1987) indicated 60% inhibition of soluble and 80% inhibition of bound peroxidase from papaya by 0.16 μM KCN, much stronger inhibition than our findings for the anionic isoperoxidase from carambola. The same author reported 60 % inhibition caused by 4.0 μM sodium sulphate and no inhibition by 1.0 μM of copper sulphate, manganese sulphate or calcium chloride, whereas Lourenço and Neves (1997) related 89.5 % of inhibition by ferrous sulphate, 12.4 % by calcium chloride, 8.5 % by manganese sulphate, 6.5 % by sodium chloride and 12.0 % by sodium sulphate, all at a concentration of 10 mM, for the peroxidase from peach, these results being very different from ours for the anionic isoperoxidase from carambola.

Sodium dodecyl sulphate (SDS) showed increasing inactivation with increasing concentration up to 25.5 % at a concentration of 5.0 mM (Table 3). Nearly total inhibition was caused by 2-mercaptoethanol at the same concentration, indicating the rupture of disulphide bonds and disorganization of the enzyme molecule. p-Mercuribenzoate is known to react with cysteiny groups, so the inactivation of 31.9 % by a concentration of 5 mM and 72.7 % by a concentration of 10 mM may signify that such groups participates in the stabilization of the enzyme. N-bromosuccinimide inhibited 69.9 % of the activity at a concentration of 5 mM. This reagent reacts with cysteiny, tyrosyl and histidyl groups, so the inactivation may be due to one or more of these groups being involved in the catalytic or binding site or in the stabilization of enzyme conformation. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is a well known chelating agent and caused 16.4 % inhibition at a concentration of 5 mM (Table 3). The antioxidants sodium metabisulfite and L-ascorbic acid, each at a concentration of 5 mM, inhibited 100 % and 65 % of the enzyme activity, respectively (Table 3). Silva et alii (1990), reported 51 % and 19 % inhibition for soluble and bound peroxidase from papaya in a 1 mM solution of o-chloromercuribenzoate, whereas Lourenço and Neves (1997), studying peach peroxidase, found inhibition of 6.5 % by p-chloromercuribenzoate in a 1 mM solution.

REFERENCES

- BURNETTE, F. S. (1977) Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: A Review. Journal of Food Science : Chicago, IFC, 42 (1), 1-6.
- CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R. and AÑÓN, M. C. (1995) Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of some Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, American Chemical Society, 43 (10), 2596-2601.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1993) Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. Chaunsa). Food Chemistry, 46 (1), 61-64.
- KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S. (1994) Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. Food Chemistry, 49 (4), 407-410.
- LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A. (1997) Peroxidase Solúvel de Pêssego: Purificação Parcial e Propriedades. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, SBCTA, 17 (1), 42-48.
- PRABHA, T. N. and PATWARDHAN, M. V. (1986) In Vitro Effect of Polyphenols on Some Enzyme Systems. Acta Alimentaria, Akadémiai Kiadó, Budapest, 15 (2), 129-135.
- SILVA, E. da (1987) Peroxidases de Mamão (*Carica papaya* L.). Doctor Thesis, 127 pp.: University of São Paulo, São Paulo.
- SILVA, E. da; LOURENÇO, E. J. and NEVES, V. A. (1990) Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. Phytochemistry, Oxford, Pergamon Press, 29 (4), 1051-1056.

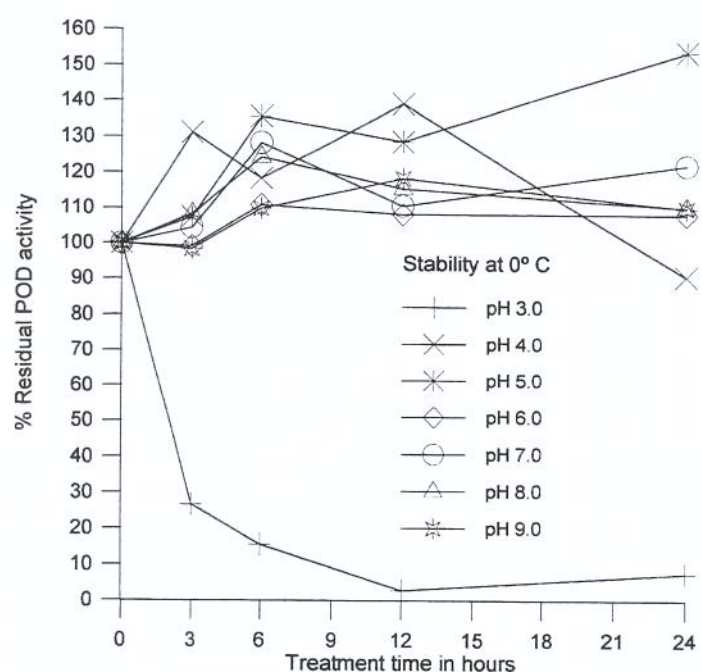


FIGURE 1: Peroxidase stability at 0 °C

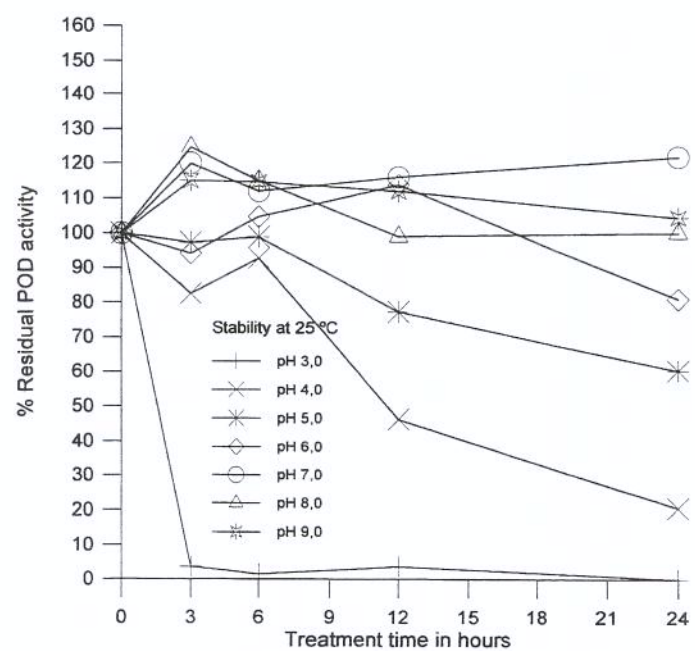


FIGURE 2: Peroxidase stability at 25 °C

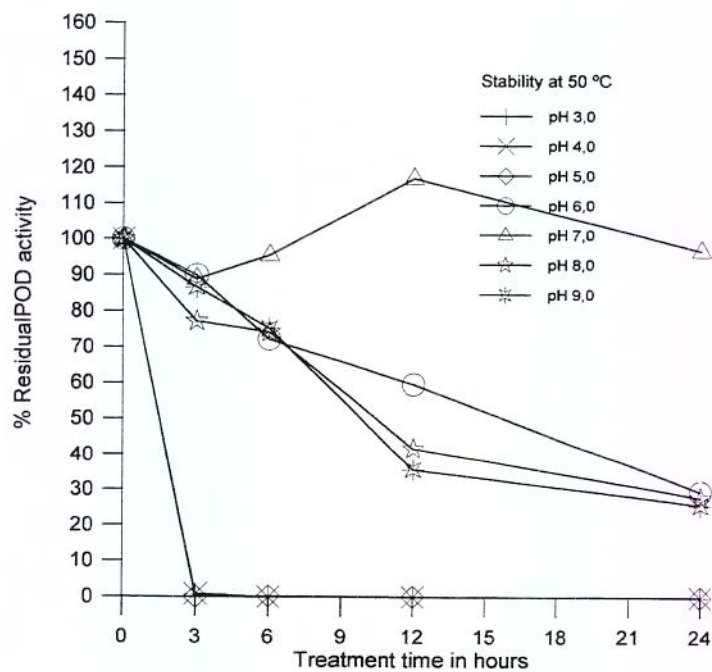


FIGURE 3: Peroxidase stability at 50 °C.

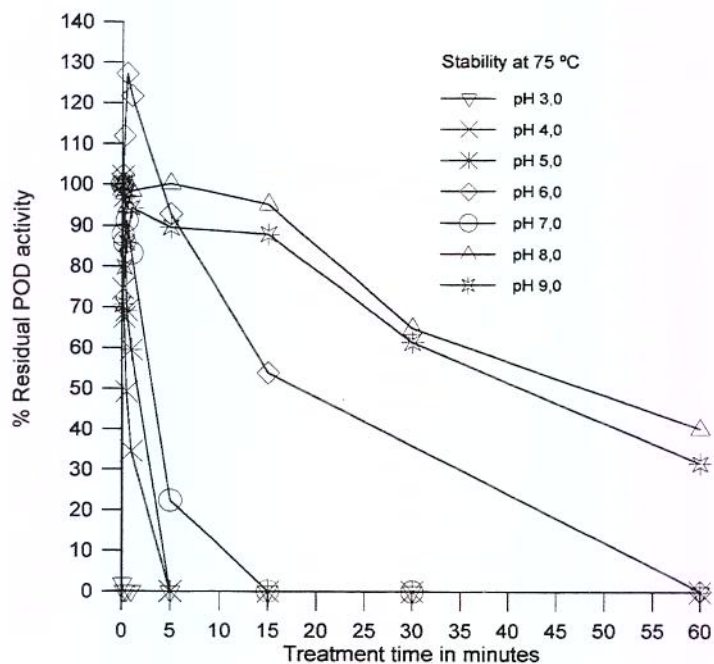


FIGURE 4: Peroxidase stability at 75 °C

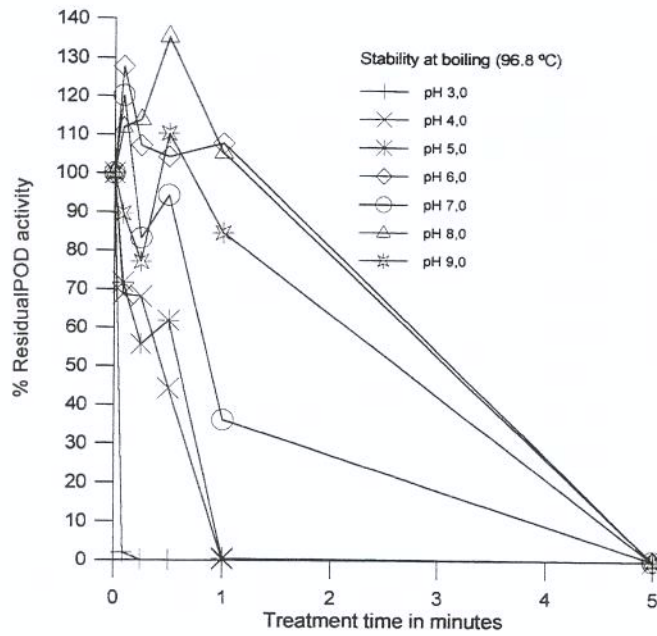


FIGURE 5: Peroxidase stability at boiling temperature (96.8 °C)

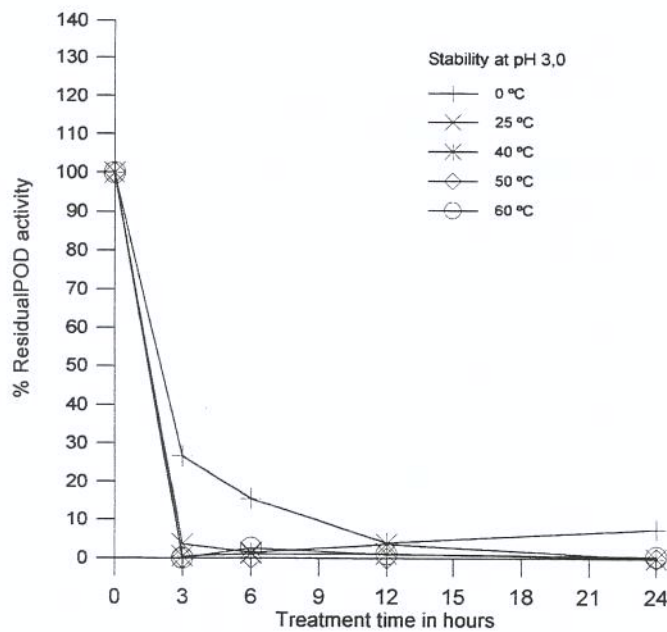


FIGURE 6: Peroxidase stability at pH 3.0

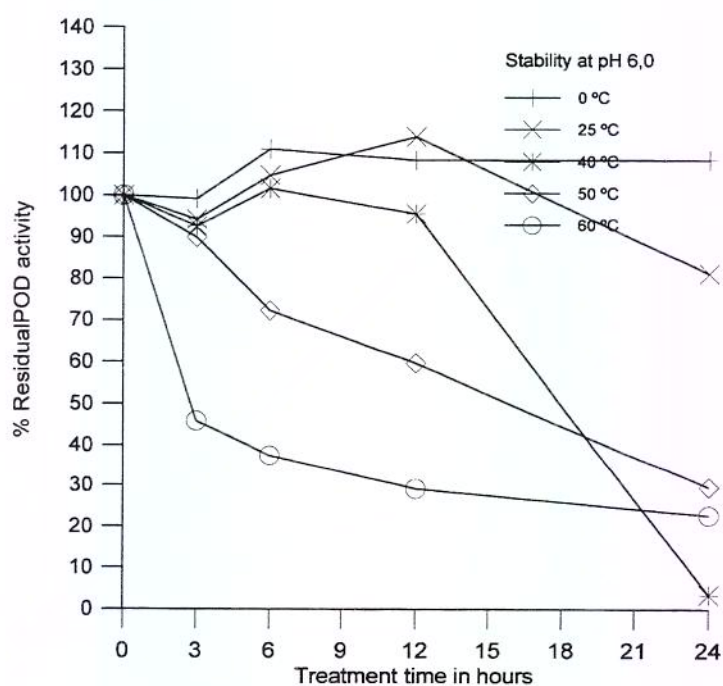


FIGURE 7: Peroxidase stability at pH 6.0.

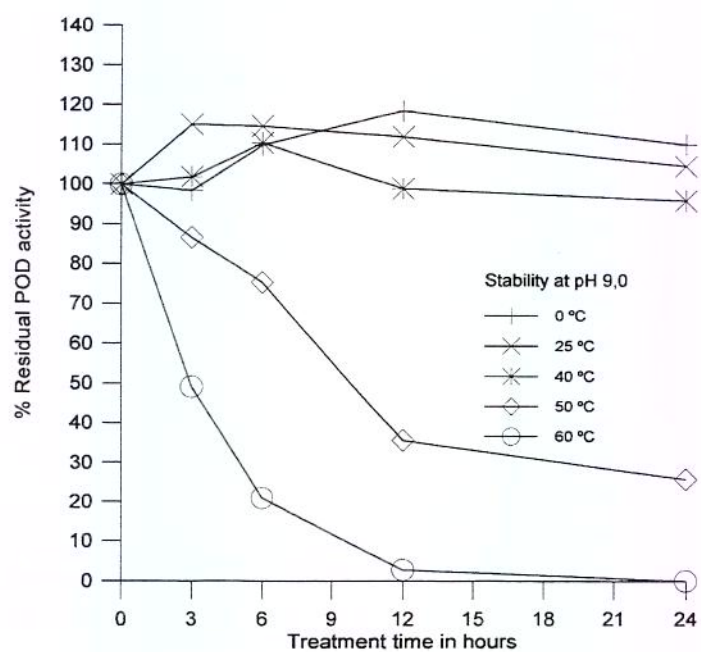


FIGURE 8: Peroxidase stability at pH 9.0

Table 1

Influence of hydroxycinnamic acids and IAA on the anionic carambola isoperoxidase, expressed in residual activity

Inhibitor	% Residual POD activity					
	Inhibitor concentration in mM					
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00
IAA	100	91.8	98.9	92.2	95.7	95.9
caffeic acid	100	70.5	50.8	21.8	23.2	24.2
p-coumaric acid	100	92.9	93.3	88.8	77.3	51.9
ferrulic acid	100	68.8	41.8	17.0	12.9	07.6

Table 2

Influence of ions on the anionic carambola isoperoxidase activity

Ion	% Residual POD activity						
	Ion concentration in mM						
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
Potassium cyanide	100	22.0	1.2	-	-	-	-
Potassium chloride	100	99.9	98.1	99.3	98.1	99.0	94.6
Sodium chloride	100	100.3	106.3	100.0	99.7	104.2	87.9
Copper sulphate	100	7.3	-5.3	-15.6	-0.6	-85.5	-
Magnesium sulphate	100	96.4	103.4	100.6	108.8	106.1	92.7
Manganese sulphate	100	97.9	91.9	103.5	99.1	106.4	40.5
Iron ^{III} sulphate	100	98.7	99.6	96.4	95.2	1.1	-4.5
Calcium chloride	100	101.0	107.4	99.4	100.2	122.9	78.8
Sodium sulphate	100	90.5	91.6	99.9	103.1	100.9	98.9

Table 3

Influence of inhibitors, antioxidants and chelating agents on the anionic carambola
isoperoxidase activity

Inhibitor	% Residual POD activity						
	Inhibitor concentration in mM						
	0.00	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
Sodium dodecyl							
sulphate (SDS)	100	97.8	101.6	84.8	80.9	74.5	-
4-chloromercuri-							
benzoate	100	101.5	100.1	96.4	95.7	68.1	27.3
2-mercaptoethanol	100	76.7	64.4	15.4	6.4	0.1	0.2
N-bromosuccinimide	100	100.6	99.6	95.3	91.7	30.1	-
Sodium							
metabisulfide	100	62.3	73.7	68.8	62.9	0.0	-
L-ascorbic acid	100	99.0	95.6	85.5	109.4	37.3	47.9
Ethylenediamine-							
tetraacetic acid	100	95.4	90.2	89.7	85.8	83.6	88.3

CONCLUSÕES GERAIS

- A localização histoquímica mostrou que a peroxidase de carambola está mais concentrada junto aos feixes vasculares, ao talo central e ao gineceu, portanto ligada a tecidos mais fibrosos. Em carambolas sobremaduras houve extravazamento do tetraguaiacol, produto da reação da peroxidase com guaiacol e peróxido de hidrogênio, para o meio reativo, indicando a presença de maior quantidade de peroxidase solúvel. A extração da peroxidase de partes da fruta confirmou esses resultados: o talo central com gineceu demonstrou a maior atividade, seguido pela casca; a polpa só teve atividade expressiva em carambolas sobremaduras.
- O melhor tampão para extração da peroxidase de carambola foi tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0.
- O melhor meio de reação da peroxidase bruta (sobrenadante) foi tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5 e a temperatura ótima foi 50 °C.
- A adição de 2% polietilenoglicol (PEG), 0,01 M ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e 0,2 M de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao tampão de extração (fosfato de potássio, 0,2 M, pH 8,0) trouxe o melhor rendimento de extração por grama de carambola.
- No estudo de precipitação da peroxidase, a adição de sulfato de amônio a 90% da saturação preservou 49,7 % da atividade inicial enquanto que a adição de 65 % de acetona preservou cerca de 46,9 %. O estado físico da enzima foi líquido no caso do sulfato de amônio e pó seco no caso da acetona, fato que nos levou a adotar a precipitação da peroxidase com acetona.
- A temperatura ótima de reação da peroxidase cetônica foi 50 °C, igual a do extrato bruto e o pH ótimo de reação foi na faixa de pH 5,5 a 6,0, em tampão fosfato de potássio 25 mM.
- A peroxidase do extrato cetônico mostrou maior estabilidade em pH 8,0 na faixa de temperatura entre 0 e 60 °C e na faixa de pH 5,0 a 9,0 na temperatura de 40 °C.
- A peroxidase do extrato cetônico de carambola foi inativado em pH 3,0 após 15 minutos de tratamento a 75° C e em pH 7,0 após 30 minutos. A enzima foi inativada após 5 minutos de tratamento térmico de ebulição, em todos os pH.

- A purificação da peroxidase de carambola resultou em 4 isoenzimas, identificadas como C, A1, A2 e A3, de acordo com sua ordem de eluição da coluna de troca aniônica (DEAE Toyopearl G-250, 35 x 2,5 cm). A isoenzima A2, a de maior reatividade, foi purificada com um fator de 106 e rendimento de 14.5 %, após duas passagens pela coluna acima e uma filtração em gel (Toyopearl HW-55 F, 65 x 1,5 cm). PAGE nativa da isoperoxidase A2, corada com p-fenilenediamina e peróxido de hidrogênio, resultou em uma única banda, mas SDS-PAGE, corado com sais de prata, resultou em uma banda forte e outras tênues, que desapareceram ao interromper a coloração com ácido cítrico. Concluímos que a isoperoxidase A2 de carambola não foi totalmente purificada.
- As condições ótimas de reação da isoperoxidase A2 de carambola foram pH 5,7 a pH 5,9 a 50 °C.
- A isoperoxidase A2 foi estável durante 24 horas a 0°C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25° C na faixa de pH 6,0 a 9,0.
- Inativação da isoperoxidase A2 foi verificada após 1 hora de tratamento a 75 °C em pH 6,0 em e após 5 minutos de tratamento em temperatura de ebulição na faixa de pH 6,0 a 9,0. Nos demais valores de pH, a inativação foi mais rápida em ambas as temperaturas.
- A isoperoxidase A2 de carambola mostrou maior afinidade em relação a p-fenilenediamina, se comparada com guaiacol. A eficiência da enzima ($V_{\max} / K_M$) foi 404,8 U/ml•mM e 4.402,5U/ml•mM para guaiacol e p-fenilenediamina, respectivamente. Dentro de cada sistema de reação, a eficiência maior foi para o peróxido de hidrogênio, seu substrato primário: 912,6 U/ml•mM com guaiacol e 10.649,7 U/ml•mM com p-fenilenediamina.
- Os compostos CuSO_4 (0,05 mM), KCN (0,1 mM), 2-mercaptoetanol (5 mM), ácido ferrúlico (5 mM), metabisulfito de sódio (5 mM) e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (10 mM) inibiram respectivamente 92,7 %, 98,8 %, 99,9 %, 92,4 %, 100 % e 98,9 % a isoperoxidase A2 de carambola.
- O cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração 5 mM ativou a peroxidase purificada cerca de 22,9 %.