

Termoestabilidade da peroxidase extraída da folha de repolho

Marlei Scariot Roling, Vagner Marques Moura e Edmar Clemente*

Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. Extratos da enzima peroxidase solúvel e ionicamente ligada foram obtidos da folha do repolho (*Brassica oleracea* L., var. capitata). Para essa extração usou-se solução-tampão fosfato 100 mM, pH 6,0. Perante o tratamento térmico nas temperaturas de 65, 70, 75°C, observou-se um comportamento não linear. O extrato solúvel de peroxidase apresentou-se particularmente mais estável no tratamento térmico que a peroxidase ionicamente ligada. O estudo da regeneração foi realizado a 70°C. A peroxidase ionicamente ligada permaneceu estável, demonstrando não haver renaturação, enquanto que o extrato solúvel perdeu atividade.

Palavras chave: peroxidase, *Brassica oleracea* L. var. capitata, inativação.

ABSTRACT. Thermostability of peroxidase from cabbage leaves. Extracts of soluble and ion-bound peroxidase enzyme were obtained from the cabbage leaf (*Brassica oleracea*, L. var. capitata). Phosphate buffer solution 100 mM, pH 6.0 was used. A non-linear behavior was detected at 65, 70, 75°C. The soluble peroxidase extract was much more stable than the ion-bound one. When regeneration analysis was undertaken at 70°C, the ion-bound peroxidase continued stable and showed no renaturation, whereas the soluble extract became inactivated.

Key words: peroxidase, *Brassica oleracea* L. var. capitata, inactivation.

A peroxidase é encontrada em muitas plantas; sendo que mais de 20 isoperoxidasas têm sido detectadas em extrato obtido de uma mesma planta (Akamine e Theodore, 1979; Chan, 1981; Haard, 1977). A peroxidase encontrada nas plantas superiores é uma glicoproteína que se difere na composição de seus aminoácidos e carboidratos, contendo como grupamento prostético a ferriprotoporfirina III (McLellan e Robinson, 1981).

Estudos têm mostrado que a peroxidase pode ocorrer em uma variedade de vegetais na forma solúvel e ligada (Gkinis e Fennema, 1978; McLellan e Robinson, 1981). As enzimas ligadas estão associadas à parede celular e também, possivelmente, às organelas, como por exemplo, mitocôndrias e ribossomos (Meudt e Stecher, 1972; Darimont e Baxter, 1973).

As propriedades e as funções fisiológicas da peroxidase em vegetais têm sido objeto de estudos por parte de vários autores (Haard, 1977; Vámos-Vigyázó, 1981). A respeito das funções fisiológicas já se estabeleceu que a peroxidase contribui para a modificação, de forma deteriorativa, no sabor,

textura, cor e propriedades nutricionais de vegetais processados (McLellan e Robinson, 1984). Tem sido reportado que a peroxidase apresenta um processo bifásico de inativação pelo calor (desnaturação) (McLellan e Robinson, 1981; Duden *et al.*, 1975; Clemente, 1995; Clemente e Robinson, 1995). Durante o tratamento térmico a perda da atividade está associada com a origem da enzima, com a concentração da enzima, com o pH e métodos de ensaio. Sob certas condições de tratamento térmico, a peroxidase não é totalmente inativada e, além disso ocorre a perda do sabor e o desenvolvimento de sabores desagradáveis em alimentos (Clemente, 1995).

No presente trabalho investigou-se a termoestabilidade do extrato bruto de peroxidase solúvel e ionicamente ligada à parede celular, considerando-se ainda como parte da fração solúvel qualquer peroxidase originária dos ribossomos ou mitocôndrias.

Material e métodos

O repolho (*Brassica oleracea* L., var. *capitata*) foi obtido diretamente de produtor da região de Maringá, Noroeste do Paraná. Os produtos químicos utilizados foram: fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, cloreto de sódio, guaiacol, peróxido de hidrogênio, tris(hidroximetil)aminometano, ácido clorídrico, ácido acético, todos de grau analítico. Os equipamentos utilizados foram: pHmetro, banho-maria termostaticado, liqüidificador, centrífuga K70D, espectrofotômetro dse UV/VIS 918 GBC.

As soluções-tampão foram preparadas de acordo com as tabelas bioquímicas da BDH. A solução-tampão fosfato de sódio foi preparada a partir de soluções-estoque de 200 mM de fosfato monobásico de sódio e 200 mM de fosfato dibásico de sódio. O tampão preparado para a utilização foi de 100 mM, com o pH 6,0, à temperatura ambiente. Tampão acetato de 100 mM, pH 5,6, foi preparado a partir de soluções-estoque de 200 mM de acetato de sódio e 200 mM de ácido acético. Tampão tris/HCl 20 mM foi preparado a partir da solução-estoque de 200 mM de tris(hidroximetil)aminometano e solução de 100 mM de ácido clorídrico. Para a solução 1,0 mol de cloreto de sódio foram dissolvidos 58,44g de cloreto de sódio em tampão tris/HCl (pH 7,5). A solução de guaiacol 0,5% (p/v) foi preparada pela mistura de 0,5 ml de guaiacol com 99,5 ml de água destilada. A solução peróxido de hidrogênio foi preparada pela mistura de 0,1 ml 30%(p/v) de peróxido de hidrogênio com 99,9 ml, em tampão de acetato de sódio 100 mM.

Extrato solúvel de peroxidase: as folhas de repolho foram picadas usando-se um multiprocessador de alimentos, 30 g de repolho, devidamente picado. O material foi homogeneizado por um minuto, com 300 ml de solução-tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, por um minuto. A suspensão obtida foi filtrada em tecido de algodão, e o filtrado foi centrifugado a 10.000 rpm, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -18°C. Este sobrenadante foi designado como peroxidase solúvel de repolho (PSR). Extrato iônico de peroxidase. O resíduo resultante da primeira centrifugação foi ressuspensão duas vezes em tampão fosfato para garantir que toda a peroxidase solúvel tinha sido extraída, e posteriormente este resíduo foi ressuspensão com solução 1,0 mol de cloreto de sódio em tampão tris/HCl. A centrifugação foi realizada a 10.000 rpm, por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi estocado a -18°C, e foi designado peroxidase ionicamente ligada de repolho (PIR).

Tratamento térmico dos extratos da peroxidase.

Para verificar o efeito da temperatura na atividade enzimática da peroxidase nos extratos iônicos e solúveis, foram colocados 0,5 ml de cada extrato (em triplicata), em tubos de ensaio (5 cm de altura x 0,5 cm de diâmetro interno); posteriormente esses tubos foram transferidos para banho-maria termostaticado, o banho foi regulado para as temperaturas de tratamento de 65, 70 e 75°C; o intervalo de aquecimento para cada temperatura variou de 0 a 600 s. Após o tratamento térmico, em cada temperatura e tempo determinados, os tubos eram retirados do banho-maria e mergulhados em banho de gelo, para posterior determinação da atividade ótica.

A determinação da atividade da peroxidase nos extratos baseou-se no método descrito por McLellan e Robinson (1984). Foram misturados 1,4 ml de solução 0,1% (v/v) de peróxido de hidrogênio em 100 mmol tampão acetato de sódio pH 5,6 e 0,2 ml de extrato de peroxidase e a estes foram acrescentados 1,4 ml de solução aquosa de guaiacol 0,5% (v/v). Em seguida fez-se a leitura da absorbância a 420 nm, a 25°C.

Regeneração enzimática. Alíquotas de 30 ml de amostra dos dois extratos foram aquecidas a 70°C por um minuto. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em banho de gelo; posteriormente, foram retiradas do banho de gelo e deixadas à temperatura ambiente. Alíquotas de 0,2 ml eram retiradas em intervalos de tempo de 10, 20, 30 e 40 min na primeira, e de 30 min na segunda e terceira horas respectivamente, e colocadas em tubos de ensaio, que eram imediatamente mergulhados em banho de gelo. A seguir mediu-se a atividade enzimática da peroxidase nestas alíquotas de acordo com o método descrito por McLellan e Robinson (1984).

Resultados e discussão

A atividade enzimática encontrada para os extratos crus de repolho está na tabela 1. No extrato contendo a fração solúvel, a atividade enzimática foi 20 vezes superior à atividade encontrada para a fração iônica.

Tabela 1. Atividade enzimática da peroxidase nos extratos crus de repolho. n=3

Extrato	$\Delta OD_{(420\text{ nm})/(\text{min.ml})}$	Sd ($\pm$)
P.S.R	3,34	0,04
P.I.R	0,16	0,01

ΔOD - mudança na atividade ótica; n - número de repetições; Sd - desvio padrão

Nas Figuras 1 e 2 estão representadas as atividades enzimáticas da peroxidase contida na fração solúvel e iônica, respectivamente, após o tratamento térmico nas temperaturas de 65, 70 e 75°C.

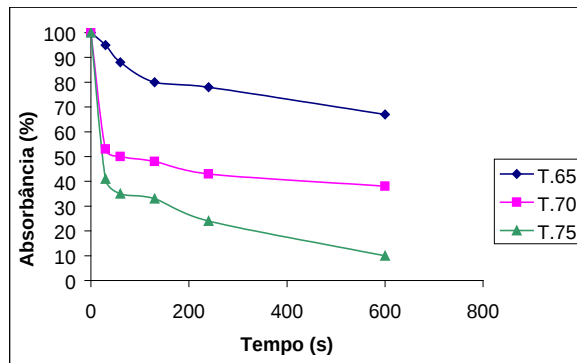


Figura 1. Atividade enzimática da peroxidase no extrato PSR (Peroxidase solúvel de repolho) após o tratamento térmico nas temperaturas de 65, 70, 75°C

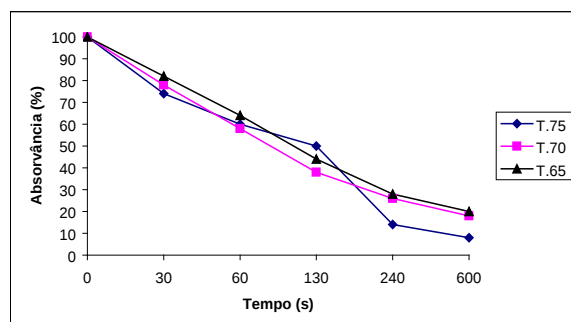


Figura 2. Atividade enzimática da peroxidase no extrato PIR (Peroxidase iônica solúvel de repolho) após o tratamento térmico nas temperaturas 65, 70, 75°C

Para cada fração, observou-se que o tratamento térmico resultou em uma curva de inativação não linear, o que indica um processo multifásico, sugerindo em cada fração a existência de um número diferente de isoenzimas. O fato de estar sendo utilizado um extrato bruto também pode ser um fator que contribuiu para essa não-linearidade. Esse resultado está em concordância com o reportado por McLellan e Robinson (1981,1984).

Com o aumento da temperatura, a atividade da peroxidase apresentou um decréscimo de aproximadamente 90%, em ambas as frações, quando submetidas ao tratamento de 75°C. Observou-se ainda que na amostra PIR os comportamentos da atividade enzimática nas temperaturas de 65 e 70°C foram bem semelhantes, talvez por apresentar conjunto de isoenzimas diferente da amostra PSR. Este fato foi também observado por Khan e Robinson, (1993) e Alvim e Clemente (1998). As temperaturas utilizadas no

experimento foram insuficientes para uma inativação total da enzima, porém considera-se satisfatório o resultado.

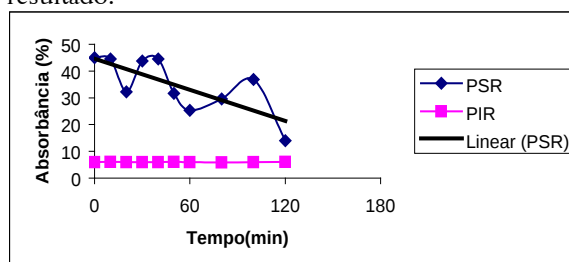


Figura 3. Regeneração das peroxidases nas frações (PSR) e (PIR), do extrato cru de repolho após tratamento térmico a 70°C

A regeneração da atividade da peroxidase pode ser observada na Figura 3. A fração solúvel apresentou atividade, a qual sofreu um decréscimo com o tempo, porém a fração iônica manteve-se constante e praticamente inativa desde o princípio.

Dos resultados observou-se que entre os extratos solúvel e iônico de peroxidase obtidos da folha de repolho, a fração PIR apresentou um comportamento menos estável com relação ao tratamento térmico.

No procedimento da regeneração, enquanto a fração solúvel PSR apresentou alguma atividade, a fração PIR permaneceu inalterada. Esse comportamento diferente entre as frações PSR e PIR talvez seja devido à presença de isoenzimas diferentes, o que também pode ser responsável pelo comportamento da atividade enzimática na regeneração.

Estudos para isolar as isoenzimas presentes e verificar o comportamento das mesmas em relação a tratamentos térmicos não só levarão a uma maior compreensão da ação da enzima como também serão de grande importância para a indústria de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CNPq pelas bolsas de IC - Pibic/UEM/CNPq.

Referências bibliográficas

- Alvim, K.L.; Clemente, E. Estudo da termoestabilidade de peroxidases extraídas da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*). *Acta Scientiarum*, 20(2):201-205, 1998.
- Akamine, E.K.; Theodore, G. Concentration of carbon dioxide and ethylene in the cavity of attached papaya fruit. *Horticult. Sci.*, 14(21):138-139, 1979.
- Chan, H.T.JR; Tam, S.Y.T.; Seo, S.T. Papaya polygalacturonase and its role in thermally injured ripening fruit. *J. Food Sci.*, 46:190-197, 1981.

- Clemente, E. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase from orange. *Rev. Unimar*, 17(3):401-408, 1995.
- Clemente, E.; Robinson, D.S. The thermostability of purified oranges isoperoxidases. *Arq. Biol. Tecnol.*, 38(4):1109-1118, 1995.
- Darimont, E.; Baxter, Ribosomal and mitochondrial peroxidase isoenzymes of the lentil (*Lens culinaris*) Root. *Planta*, 110:205-212, 1973.
- Duden, R., Fricker, A., Heintze, K., Paulus, K.; Zohm H. Der Einfluss Thermischer Behandlung Von Spinat im Temperaturbereich bis 100°C Auf Gehalt an Wesentlichen Inhaltsstoffen IV. Peroxydase. *Food Sci. Technol.*, 8:147-150, 1975.
- Gkinis, A. M.; Fennema, O.R. Changes in soluble and bound peroxidase during low - temperature storage of green beans. *J. Food Sci.*, 43:527-553, 1978.
- Haard, N.F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. *Am. Chem. Soc.*, 47:143-171, 1977.
- Heplar, P.K.; Rice, R.M.; Terranova, W.A. Cytochemical localization of peroxidase activity wound vessel members of *Coleus*. *Can. J. Bot.*, 50:977-983, 1972.
- Khan, A.A.; Robinson, D.S. The thermostability of purified mango isoperoxidases. *Food Chem.*, 47:53-59, 1993
- McLellan, K.M.; Robinson, D.S. Heat stability of peroxidase from orange . *Food Chem.*, 13:139-147, 1984.
- McLellan, K.M.; Robinson, D.S. The effect of heat on cabbage and brussels sprout peroxidase enzymes. *Food Chem.*, 7:257-266, 1981.
- Meudt, Q.J.; Stecher, K.J. The effect of heat on cabbage and brussels sprout peroxidase enzymes. *Plant Physiol.*, 50:157-266, 1972.
- Vámos-Vigyazó, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.*, 15:49-127, 1981.

Received on May 19, 2000.

Accepted on July 26, 2000.