

Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia averrhoa*) em diferentes estádios de maturação

Camila Laurenti e Edmar Clemente*

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: eclemente@uem.br

RESUMO. A peroxidase (EC. 1.11.1.7) solúvel e ionicamente ligada foi extraída da carambola em diferentes estádios de maturação da fruta. Os extratos foram preparados utilizando solução tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0 e determinada a atividade enzimática desses extratos. O grau de maturação não influenciou na atividade da peroxidase solúvel, no entanto foram observadas algumas modificações na atividade da peroxidase ligada ionicamente. Para o estudo da estabilidade térmica da peroxidase, os extratos brutos foram submetidos a temperaturas de 60, 65, 70, 75, 80 e 85°C e a atividade enzimática determinada em intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos. Foi observado que a enzima perdia sua atividade à medida que se aumentava o tempo e a temperatura. Na fase de purificação, o extrato concentrado da peroxidase solúvel foi dialisado usando solução tampão 10 mM de fosfato de sódio pH 7,0, em seguida a amostra foi aplicada em coluna cromatográfica (16 mm d.i x 70 cm) empacotada com Sephacryl HS100 com velocidade de fluxo de 30 mL/h. Os resultados da eletroforese mostraram a presença de uma isoenzima aniônica de peso molecular 64 kDa .

Palavras-chave: peroxidase, atividade enzimática, carambola, *Oxalidacia averrhoa*.

ABSTRACT. Peroxidase in unripe and ripe star fruit (*Oxalidacia Averrhoa*) in different stages of maturation. The soluble and ionically bound peroxidase (EC. 1.11.1.7) was extracted from the star fruit in different stages of maturation. The extracts were prepared using solution 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and the enzymatic activity of those extracts was measured. The maturation degree did not influence the soluble peroxidase activity; however, some changes were observed in the activity for the ionic bound peroxidase. For the study of peroxidase thermal stability, the crude extracts were submitted to temperatures of 60, 65, 70, 75, 80 and 85°C and the enzymatic activity was carried out at intervals of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 minutes. It was observed that the enzyme lost activity with increasing time and temperature. For purification, the concentrated extract of the soluble peroxidase was dialysed, using a solution of 10mM of the sodium phosphate buffer pH 7.0, after the sample was applied in a chromatographic column (16 mm i.d x 70 cm) packed with Sephacryl HS100 with flow rate of 30 mL/h. The electrophoresis results showed the presence of an anionic isoenzyme with 64kDa MW.

Key words: peroxidase, enzymatic activity, star fruit, *Oxalidacia averrhoa*.

Introdução

A perda de grande parte da produção de frutas e hortaliças pode ser atribuída à ação de enzimas durante a pós-colheita. As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas pertencentes ao grupo das oxiredutases, responsáveis pela deterioração oxidativa de muitos vegetais durante o armazenamento. A investigação desse grupo de enzimas tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que a continuidade da atividade enzimática pode ocasionar mudanças na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e até mesmo mudanças na textura (Clemente e Pastore, 1989).

O branqueamento é um tratamento térmico

geralmente aplicado em alimentos para inibir a ação das enzimas. A peroxidase (POD) é uma enzima resistente a elevadas temperaturas e sua inativação tem sido frequentemente usada como índice da efetividade do branqueamento. A perda da sua atividade enzimática num produto branqueado indica uma perda correspondente da atividade para outras enzimas de deterioração (Eskin, 1990).

A POD tem sido encontrada na forma solúvel e ionicamente ligada à parede das células (Clemente, 1998). Durante o período de maturação, há um aumento da atividade enzimática devido ao aumento da solubilidade da enzima com o grau de maturação. Este trabalho objetivou avaliar o comportamento da atividade enzimática da

peroxidase solúvel de carambola (PSC) e ionicamente ligada (PIC) em diferentes estádios de maturação da fruta e determinar propriedades de isoenzimas isoladas.

Material e métodos

Material

As carambolas, em diferentes graus de maturação (verde, 1/3 madura e madura) foram adquiridas em estabelecimentos da região de Maringá, Estado do Paraná.

Determinação da atividade enzimática em diferentes pHs

Para determinar o melhor pH de extração da peroxidase, foram preparados extratos brutos de carambola (verde, 1/3 madura e madura) em diferentes pHs. As carambolas foram lavadas com água destilada e homogeneizadas, utilizando um liquidificador com soluções tampão 100 mM de fosfato de sódio nos seguintes valores de pH: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. As soluções resultantes foram filtradas utilizando um tecido de algodão e centrifugadas (30.000 rpm a 4°C por 20 minutos), separando-se os sobrenadantes contendo a peroxidase solúvel e desprezando-se os precipitados. A atividade enzimática dos sobrenadantes foi determinada de acordo com o método descrito por Clemente (1998). Uma alíquota de 0,2 mL da solução enzimática foi misturada a 2,7 mL de peróxido de hidrogênio 0,1% em tampão fosfato de sódio (100 mM e pH 7,0), e adicionou-se 0,1 mL de solução de o-dianisidina 1% em metanol. Para a leitura da absorbância foi utilizado um espectrofotômetro (UV mini-1240), com $\lambda=460$ nm, por um período de um minuto, na temperatura de 25°C. Uma unidade de atividade de POD foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto por mililitro.

Extração da peroxidase solúvel e da ionicamente ligada

Extratos de carambola verde, 1/3 madura e madura foram preparados homogeneizando-se porções de 30,0 g da fruta com 30,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0. Durante essa etapa, foi adicionado polivinilpirrolidone (PVPP) 5% e cloreto de cálcio para evitar a ação de fenóis e da pectina. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 30.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante contendo a peroxidase solúvel foi armazenado a -18°C. O resíduo foi tratado com solução 1,0 M de cloreto de sódio em tampão (fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0), para extração da peroxidase ionicamente ligada, e novamente centrifugado. Os extratos foram estocados a -18°C.

Concentração dos extratos com acetona e determinação da atividade enzimática

Os extratos da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de carambola, para os três estádios de maturação, foram tratados com acetona gelada na proporção de 1:2, para a precipitação das proteínas. Em seguida, os extratos foram centrifugados (30.000 rpm a 4°C durante 20 minutos). Os precipitados obtidos foram secos durante 12 horas em temperatura ambiente para total evaporação da acetona, e depois ressuspensos em solução tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0, em uma proporção necessária para uma concentração 10 vezes maior que o extrato bruto. Os extratos concentrados foram estocados a -18°C e descongelados de acordo com a necessidade de análise. A atividade enzimática foi determinada seguindo o método descrito por Clemente (1998).

Estabilidade térmica dos extratos

Os extratos brutos da peroxidase solúvel da carambola verde, 1/3 madura e madura foram submetidos ao tratamento térmico nas temperaturas de 60, 65, 70, 75, 80 e 85°C. A atividade enzimática foi medida em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8 e 10, de acordo com o método descrito por Clemente (1998).

Purificação da peroxidase de carambola

O extrato concentrado da POD solúvel de carambola (verde, 1/3 madura e madura), primeiramente passou por um processo de diálise em tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 7,0 durante 12 horas sob agitação a temperatura de 8°C. Após a diálise, a amostra foi filtrada em membrana éster celulose e um volume de 5,0 mL foi aplicado em coluna cromatográfica contendo Sephacryl HS 100 com velocidade de fluxo de 30 mL/h. As frações obtidas da cromatografia foram analisadas pelo método descrito por Bradford (1976) para a determinação do teor de proteínas e também determinada a atividade enzimática de acordo com método descrito por Clemente (1998).

Eletroforese

As frações obtidas da coluna Sephacryl HS100 que apresentavam atividade enzimática foram submetidas à eletroforese em gel de amido, o qual preparado homogeneizando 24 g de penetrose com solução tampão pH 7,0 elaborada com DL-histidina 0,05M e EDTA 0,0014 M diluída a 25%. Na cuba, foi utilizada solução tampão Tris 0,125 M com pH 7,0. Para a migração das proteínas, durante um período de 4 horas aplicou-se uma voltagem de 30 mA. Para a coloração do gel, foi utilizado 60 mL de solução (1:1) preparada com solução 1 M de acetato de sódio pH 4,7 e metanol, 50 mg de benzidina e 1,5 mL de

peróxido de hidrogênio.

Resultados e discussão

A determinação da atividade enzimática dos extratos brutos de carambola para a POD em diferentes valores de pH permitiu encontrar o pH ótimo de extração da enzima. A relação do pH com a atividade dos extratos é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade enzimática da POD em extratos da polpa de carambola preparados em diferentes de pH^a (OD_{460nm}.min⁻¹.ml⁻¹).

pH	A	B	C
5.5	0,66 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,64 ± 0,01
6.0	0,56 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,58 ± 0,02
6.5	0,73 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,74 ± 0,01
7.0	1,07 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,02
7.5	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,47 ± 0,01

A- Carambola verde; B- Carambola 1/3madura e C- Carambola madura; ^a (n=3) - n = número de repetições

De acordo com os resultados, o extrato preparado em pH 7,0 foi o que apresentou atividade enzimática superior aos demais, e por essa razão foi considerado o pH ótimo para a extração da peroxidase de carambola, independente do estágio de maturação do fruto. Após essa determinação, foram preparados extratos concentrados da peroxidase de carambola solúvel (PSC) e ionicamente ligada (PIC) em diferentes estádios de maturação da fruta. As atividades enzimáticas desses extratos podem ser observadas na Figura 1.

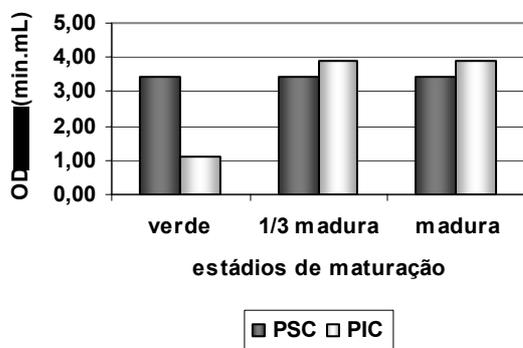


Figura 1. Atividade enzimática da POD nos extratos concentrados.

A atividade enzimática para a peroxidase na forma solúvel foi semelhante para a carambola verde, 1/3 madura e madura. A fração iônica apresentou uma atividade superior à fração solúvel (PSC). No entanto, foram observadas variações da atividade nos diferentes estádios de maturação. O que poderia indicar, de acordo com Robinson (1991), não só uma concentração superior dessas enzimas ionicamente ligadas à parede celular, como também a participação dessas enzimas na evolução dos estádios de maturação da fruta. Observação semelhante foi realizada por Clemente (1998) em seu estudo com peroxidase de laranja.

Para o estudo da estabilidade térmica da peroxidase, os extratos contendo a enzima na forma solúvel foram submetidos a temperaturas de 60, 65, 70, 75, 80 e 85°C. As Figuras 2, 3 e 4 ilustram a relação da atividade enzimática com a variação da temperatura em função do tempo para os três estádios de maturação da carambola. A atividade da peroxidase diminuiu com o tempo para cada temperatura, e independente do grau de maturação da fruta, observou-se uma perda de aproximadamente 85% da atividade da enzima após 10 minutos de tratamento térmico a uma temperatura de 85°C.

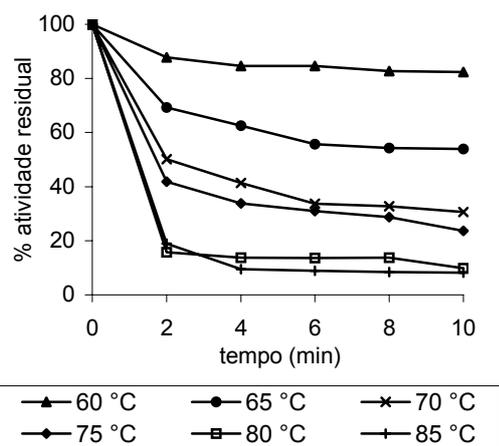


Figura 2. Efeito do tratamento térmico na POD de carambola verde.

Nas frações obtidas da cromatografia realizou-se a determinação do teor de proteínas e a atividade enzimática da POD. O perfil dessa etapa de purificação pode ser observado na Figura 5. De acordo com os resultados, a fração F₁₃ apresentou um pico de atividade para a peroxidase.

O resultado da eletroforese está ilustrado na Figura 6. A banda A corresponde à amostra de peroxidase antes da aplicação na coluna cromatográfica e as bandas F₁₂, F₁₃ e F₁₄ são referentes às frações 12,13 e 14 eluídas da coluna na cromatográfica, sendo possível observar a presença de uma isoenzima aniônica, com PM estimado em 64 kDa resultado esse semelhante ao reportado por Holschuh (2000) em seus experimentos com peroxidase de carambola, nos quais o PM da enzima foi estimado em 64,5 kDa.

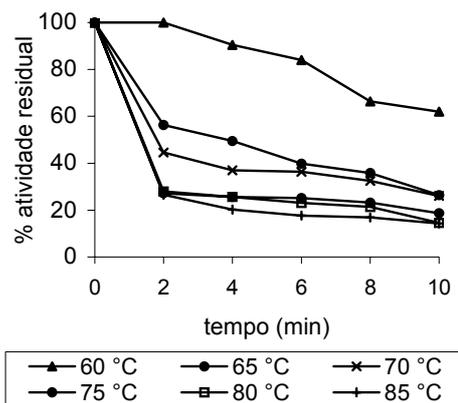


Figura 3. Efeito do tratamento térmico na POD de carambola 1/3 madura.

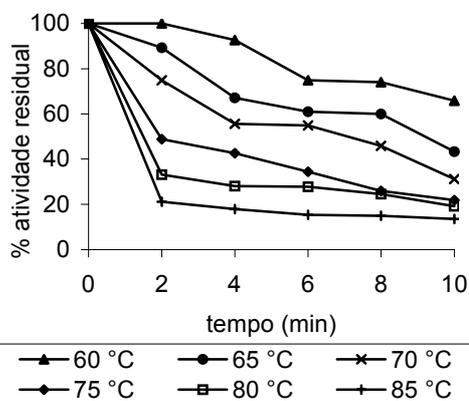


Figura 4. Efeito do tratamento térmico na POD de carambola madura.

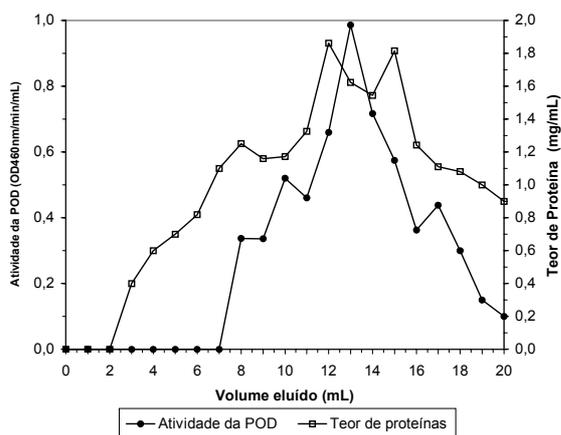


Figura 5. Determinação de proteínas e atividade enzimática da POD de carambola.



Figura 6. Eletroforese das frações (F₁₂ - F₁₃ - F₁₄) obtidas da coluna Sephacryl HS100.

Conclusão

Dentro dos pHs avaliados, o pH 7,0 foi considerado o melhor para a extração da peroxidase solúvel e ionicamente ligada da polpa de carambola.

Observou-se que o grau de maturação da fruta não influenciou na atividade da peroxidase solúvel de carambola (PSC), diferentemente do que foi observado para a peroxidase ionicamente ligada de carambola (PIC).

No monitoramento térmico dos extratos da peroxidase solúvel, foi observado que a enzima perdia sua atividade com o aumento do tempo e da temperatura.

Na primeira etapa de purificação da peroxidase através da cromatografia em Sephacryl HS100, foi possível isolar uma isoenzima aniônica observada pela eletroforese e estimar seu peso molecular (64 kDa).

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica Pibic/UEM.

Referências

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.72, p. 248-254, 1976.
- CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, Kidlington/Oxon, v.49, p.29-36, 1998.
- CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

ESKIN, N. A. M. *Biochemistry of foods*. 2 ed. Ottawa: Academic Press, 1990, p. 557.

HOLSCHUH, H. J.; PASTORE, G. M. Peroxidase de carambola: semi-purificação e caracterização parcial do extrato cetônico. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3, 1999, Campinas. *Anais...* Campinas: FEA-Unicamp, 1999. p. 61.

HOLSCHUH, H. J.; PASTORE, G. M. Peroxidase de carambola: estabilidade térmica e de pH do extrato cetônico. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3, 1999, Campinas. *Anais...* Campinas: FEA- UNICAMP, 1999. p.61-62.

HOLSCHUH, H. J. *Isolamento, purificação e*

caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (Averrhoa carambola, L.).2000. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciência de Alimentos, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LOPES, A. S. Minerais e enzimas oxidativas em brócolos (*Brassica oleracea L. Cv. Itálica*) minimamente processado. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.6, p. 1615-1618, 2002.

ROBINSON, D. S. *Peroxidase and catalases in foods*. Oxidatives enzymes in foods. London: Elsevier Science Publishers, 1991. p.1-47.

Received on September 02, 2004.

Accepted on March 09, 2005.