

Avaliação da termoestabilidade e da regeneração da atividade da peroxidase extraída de laranja (*Citrus* spp.)

Fernanda Berbicz e Edmar Clemente*

Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Author for correspondence.

RESUMO, Peroxidase (EC 1.11.1.7) solúvel e iônicamente ligada foram extraídas dos cultivares de laranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Citrus aurantium* (Rutaceae). Para a preparação dos extratos, as laranjas foram lavadas com água destilada e cortadas em pequenos pedaços e, em seguida, foram homogeneizadas em liquidificador com solução tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 6,0. Posteriormente, os extratos foram submetidos ao tratamento térmico nas temperaturas de 70°C, 75°C e 80°C, e a atividade da peroxidase foi determinada em períodos de 1 a 10 min. As frações contendo peroxidase solúvel foram as que apresentaram maior resistência ao tratamento térmico independente da cultivar. As frações contendo peroxidase iônica apesar de serem um pouco mais sensíveis aos tratamentos térmicos de forma idêntica as peroxidase solúveis não foram totalmente inativadas com os tratamentos utilizados. Uma regeneração de até 15% da atividade inicial foi observada na fração contendo peroxidase solúvel. Não se observou regeneração da atividade da peroxidase ligada iônicamente, demonstrando que a regeneração pode estar relacionada à presença de diferentes isoenzimas nas frações solúveis e iônicas que apresentam diferentes termoestabilidade.

Palavras-chaves: peroxidase, termoestabilidade, regeneração, laranja.

ABSTRACT. Estimation of thermostability and regeneration of peroxidase activity in orange extracts (*Citrus* spp.). Soluble and ionic-bound Peroxidase (EC 1.11.1.7) was extracted from orange cultivars *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus aurantium* (Rutaceae). Oranges were washed with distilled water and cut into small pieces for extract preparation; they were then homogenized with sodium phosphate buffer 100mM and pH 6.0, by a liquidizer. Afterwards, the extract underwent heat treatment at 70°C, 75°C and 80°C, and the peroxidase activity measured at 1 to 10 minutes. Whereas fractions with soluble peroxidase in both cultivars were more heat stable, those with ionic-bound peroxidase were less heat-stable. Total inactivation was not achieved with the heat treatments used. A regeneration of 15% of the initial activity was observed for fractions with soluble peroxidase. No regeneration was observed in the ionic-bound peroxidase fraction. This seems to show that regeneration may be linked to different isoenzymes with different heat stability.

Key words: peroxidase, thermostability, regeneration, orange.

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) está relacionada com mudanças ontogênicas ligadas ao estresse por deficiência de água, injúria pelo frio, interações patogênicas, hiperoxigenicidade é características em varias frutas e hortaliças. A respeito das regras fisiológicas, tem sido estabelecido que a peroxidase contribui com mudanças no "flavour", textura, cor, acelerando a deterioração, diminuindo, assim, as qualidades nutricionais em frutos e vegetais processados (Moulding *et al.*, 1987). A peroxidase é uma enzima altamente estável ao tratamento térmico (Burnette, 1977; Clemente, 1996). Sob certas condições de tratamento térmico,

sabe-se que a peroxidase pode ter sua atividade regenerada, podendo com isto causar perda de sabor ou desenvolver sabores desagradáveis através de reações oxidativas (Whitaker, 1985; Clemente e Pastore, 1998).

As regenerações da peroxidase, após a inativação pelo tratamento térmico, têm sido registradas por alguns trabalhos com uvas (Sciancalepore e Alvitì, 1985), maçã (Moulding *et al.*, 1987), kiwi (Prestamo, 1989), manga (Khan e Robinson, 1993), abacaxi (Mello e Clemente, 1996).

O processo utilizando alta temperatura em um curto espaço de tempo (HTST), comumente usado

no processamento de frutas e vegetais é pouco efetivo para a inativação da peroxidase (Khan e Robinson, 1993; Clemente, 1996).

Os sucos de laranja produzidos comercialmente incluem o albedo e flavedo que contribuem muito para o aumento da atividade da peroxidase, uma vez que os teores de peroxidase são altos nestas partes quando comparados com os teores do mesocarpo (Clemente, 1993).

No presente trabalho, foi investigada a estabilidade da peroxidase frente ao tratamento térmico e sua regeneração, após o tratamento térmico no suco de laranja, *Citrus* spp (Rutaceae), obtido a partir do fruto integral.

Material e métodos

Laranjas frescas e maduras foram obtidas diretamente de produtores da região Norte do Estado do Paraná. Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico obtidos da BDH Chemicals Ltd.

Preparação dos extratos.

Os extratos de peroxidase solúvel e peroxidase ligada ionicamente foram preparados a partir dos cultivares *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Citrus aurantium*. As laranjas foram lavadas com água corrente e posteriormente com água destilada. Em seguida, foram cortadas em pequenos pedaços. Pesaram-se 200 g que foram então homogeneizadas em solução tampão fosfato de sódio (100mM, pH 6,0), por 90 segundos, utilizando um liquidificador. Em seguida, esta mistura foi filtrada utilizando tecido de algodão. O filtrado foi recebido em béquer em banho de gelo. Na etapa seguinte, o filtrado foi centrifugado a 30.000 x g por 20 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi estocado a -18°C e designado de peroxidase solúvel da laranja (PSL1) para o extrato da cultivar *Citrus sinensis* e PSL2 para a cultivar *Citrus aurantium*. O resíduo da centrifugação foi ressuspenso em 100 mL de solução 1 M de NaCl em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,0, procedendo-se, em seguida, à centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Os sobrenadantes foram designados peroxidase iônica de laranja PIL1 e PIL2, respectivamente, e estocados a -18°C.

Tratamento térmico

Amostras de 15 mL dos extratos obtidos dos dois cultivares passaram por diálise em tampão fosfato de sódio (10mM, pH 6,0) por um período de 12 h sob refrigeração. Em seguida, alíquotas de 2 mL foram colocadas em tubo capilares (150 mm de

comprimento e diâmetro interno de 2 mm) utilizando uma micropipeta (Sigma) para encher os tubos, que foram selados e colocados em banho-maria previamente equilibrado nas diferentes temperaturas, 70°C, 75°C e 80°C, por um período que variou de 1 a 10 min. A cada minuto os tubos foram retirados e colocados em banho de gelo. A atividade da amostra de cada fração que não passou pelo tratamento térmico foi usada como controle (100% de atividade de peroxidase) para calcular a atividade de peroxidase que permaneceu após o tratamento térmico das amostras. Análises foram feitas em triplicatas.

Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com o método descrito por Clemente (1996), utilizando-se um espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U-200) a 460 nm. Para a reação misturaram-se 0,2 mL do extrato enzimático concentrado com 2,7 mL de solução de água oxigenada 0,1% em tampão fosfato de sódio (100 mM pH 6,0), e finalmente, 0,1 mL de solução de o-dianisidina 1% em etanol. Uma unidade de atividade de POD foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto/g de amostra.

Regeneração da atividade após parcial inativação

Para se observar a possível regeneração da atividade da peroxidase, alíquotas de 10 mL tratadas nas temperaturas de 70°C, 75°C e 80°C por um período suficiente para uma inativação parcial (tempo de 90 segundos), as amostras eram deixadas em banho de gelo. Posteriormente, elas foram deixadas a temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade de peroxidase sendo as primeiras a cada 10 min nos primeiros 60 min e depois de 30 em 30 min até completar 240 min.

Resultados e discussão

Os resultados média da atividade de peroxidase nos extratos PSL (peroxidase solúvel de laranja) e PIL (peroxidase iônica de laranja) obtidos dos cultivares estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Media da atividade de peroxidase nos extratos obtidos da laranja (n = 3)

Amostra	$\Delta OD_{460nm/min.mL} \pm \delta$	
	A	B
PSL1	14.71 ± 0.02	
PIL1	11.45 ± 0.01	
PSL2		12.03 ± 0.01
PIL2		10.42 ± 0.01

n – número de repetições, A-cultivar *Citrus Sinensis* (L.) Osbeck, B-cultivar *Citrus Aurantium*

As frações contendo peroxidase iônica em ambos cultivares apresentaram atividade 12 e 15% inferiores as frações que continham peroxidase solúvel. Outros estudos têm demonstrado que as frações contendo peroxidase iônicas apresentam uma atividade inferior à peroxidase solúvel (Khan e Robinson, 1993). Este fato pode talvez ser atribuído a uma composição de isoenzimas diferentes e/ou isoenzimas com estabilidades diferentes frente ao tratamento térmico. Nas Figuras 1 a 3, pode-se observar o comportamento da inativação tanto da fração solúvel como da iônica.

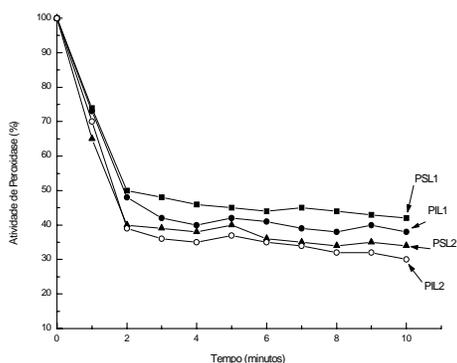


Figura 1. Inativação (70°C) da peroxidase solúvel e iônica obtidas dos cultivares *Citrus sinensis* (PSL1 e PIL1) e *Citrus Aurantium* (PSL2 e PIL2)

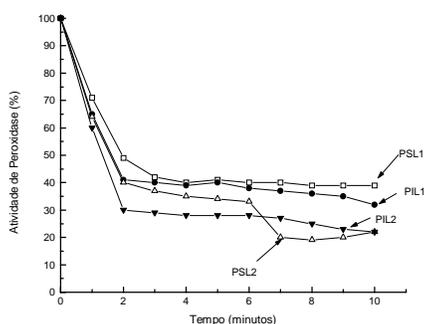


Figura 2. Inativação (75°C) da peroxidase solúvel e iônica obtidas dos cultivares *Citrus sinensis* (PSL1 e PIL1) e *Citrus aurantium* (PSL2 e PIL2)

A partir das Figuras 1 a 3, observa-se que no primeiro minuto do tratamento térmico há um decréscimo de 25% a 45% da atividade enzimática nos extratos de ambos cultivares, independente se a fração era de peroxidase solúvel ou iônica. A fração contendo peroxidase solúvel foi ligeiramente mais estável aos tratamentos térmicos, em comparação

com a fração contendo peroxidase iônica em ambos cultivares. No entanto, no tratamento térmico a 80°C, a partir de seis min, todas as frações apresentaram praticamente o mesmo comportamento, mantendo uma atividade entre 18 a 30% da atividade enzimática antes do início do tratamento. Este comportamento é semelhante ao observado por Clemente (1996) em seu trabalho com isoenzimas de laranja, onde a temperatura do tratamento foi de 70°C. Observou-se que a elevação de 10°C na temperatura não alterou o comportamento da atividade enzimática, mostrando estas temperaturas serem ineficientes para a inativação da peroxidase. Talvez, se ocorrer elevação da temperatura, possa ser possível inativar a peroxidase, porém, a pasteurização de sucos não é realizada em altas temperaturas, pois isto afetaria outras propriedades e qualidades dos sucos de frutas. Na Figura 4, pode-se observar que amostras, depois de serem aquecidas por um minuto, para que tivessem uma perda parcial de sua atividade enzimática inicial, foram deixadas à temperatura ambiente, podendo-se observar nas frações solúveis uma pequena regeneração da atividade em função do tempo.

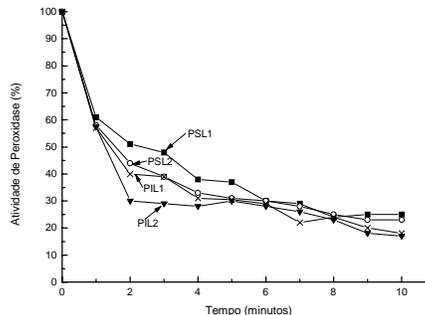


Figura 3. Inativação (80°C) da peroxidase solúvel e iônica obtidas dos cultivares *Citrus sinensis* (PSL1 e PIL1) e *Citrus aurantium* (PSL2 e PIL2)

Observa-se ainda uma regeneração de até 15% nos primeiros 60 min e se mantendo praticamente até ao final do tempo de 240 min. Este comportamento pode também estar relacionado com a composição de isoenzimas presentes na fração solúvel que pode ser responsável pela regeneração ocorrida. Independente do cultivar, observou-se comportamento semelhante, podendo este estar relacionado com a presença de isoenzimas com características e comportamento semelhantes frente ao tratamento térmico. As frações iônicas mantiveram praticamente uma atividade constante

ao longo de todo tempo de observação, o que está de acordo com o observado por Roling *et al.* (2000). Entre as frações solúvel e iônica, as frações (PSL1 e PSL2), além de apresentarem maior estabilidade térmica, também apresentaram regeneração. Para se obter maiores informações, mais estudos deverão ser realizados a fim de se adquirir maiores conhecimentos sobre este comportamento e composição de isoenzimas da peroxidase de frutas, bem como uma melhor compreensão da termoestabilidade, que é de muita importância para a indústria de sucos.

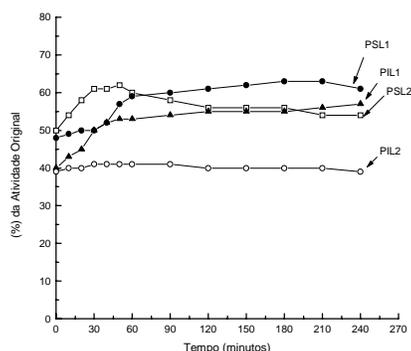


Figura 4. Regeneração da peroxidase nos extratos obtidos dos cultivares *Citrus sinensis* (PSL1 e PIL1) e *Citrus aurantium* (PSL2 e PIL2)

Referências

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: A review. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 42, p.1-6, 1977.

CLEMENTE, E. *The characterisation of isoperoxidase from orange*. 1993. Tese (Doutorado) - University of Leeds/Procter Department of Food Science, Leeds, England, 1993.

CLEMENTE, E. Isolamento, purificação e termoestabilidade da isoperoxidase do suco de laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.16, n. 1, p.1-5, 1996.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase: the importance for food technology. *Bol. SBCTA*, v. 32, n. 2, p.167-171, 1998.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S. The thermo stability of purified mango isoperoxidases. *Food Chem.*, Exeter, v. 47, p.53-59, 1993.

MELLO, E. T.; CLEMENTE, E. Thermo stability of crude extract of peroxidase from pineapple. *Revista Unimar*, Maringá, v. 18, n. 4, p. 757-763, 1996.

MOULDING, P. H. *et al.* Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase extracted from apples. *Int. J. Food Sci. Technol.*, Oxford, v. 22, p.391-397, 1987.

PRESTAMO, G. Peroxidase of kiwifruit. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 54, n. 3, p.760-762, 1989.

ROLING, M. S. *et al.* Termoestabilidade da peroxidase extraída da folha de repolho. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 22, n. 5, p.1157-1160, 2000.

SCIANCELEPORE, V.; ALVITI, F. S. Preliminary study on multiple forms of peroxidase from Malvasia grapes. *Lebensm-Wiss. Technol.*, London, v. 18, p.174-177, 1985.

WHITAKER, J. R. Mechanisms of oxidoreductases important in food component modification. In RICHARDSON, T.; FINDLEY, J.W. (Ed.). *Chemical changes in food during processing*, Westport: AVI Publishing, 1985, p.121-176.

Received on July 19, 2001.

Accepted on September 12, 2001.