

## Estudo da termoestabilidade de peroxidases extraídas da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*)

Keli Cristina Alvim e Edmar Clemente\*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil.

\*Author for correspondence.

**RESUMO.** Extratos de peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada foram preparados a partir da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*), sendo submetidos a tratamento térmico nas temperaturas de 60°C, 65°C e 70°C, por um período de 0 a 10 minutos, para estudo do comportamento da atividade enzimática da peroxidase. Isoenzimas aniônicas e catiônicas, da fração solúvel da casca, foram separadas utilizando cromatografia de troca iônica (DEAE - Sepharose), sendo essa separação confirmada por eletroforese. Foram encontradas duas isoenzimas aniônicas e duas isoenzimas catiônicas na fração solúvel da casca. O estudo da atividade enzimática mostrou ser não-linear em relação ao aumento da temperatura.

**Palavras-chave:** *Citrus deliciosa*, estabilidade térmica, peroxidase.

**ABSTRACT. Thermostability studies of peroxidase extracts from tangerine (*Citrus deliciosa*) pulp and peel.** Extracts of the soluble and ionic-bound peroxidases were prepared from tangerine (*Citrus deliciosa*) pulp and peel and submitted to heat treatments at 60°C, 65°C and 70°C during a period of 0 to 10 minutes for the study of the peroxidase enzymatic activity. Ion exchange chromatography (DEAE-Sepharose) was carried out in the soluble fraction of the peel to isolate cationic and anionic iso-enzymes. Separation was confirmed by electrophoresis. Two anionic and two cationic iso-enzymes were found in the soluble fraction of peel. Enzyme activity showed itself to be non-linear with increase of temperature.

**Key words:** *Citrus deliciosa*, heat stability, peroxidase.

Peroxidases são oxiredutases capazes de catalisar um grande número de reações de oxidação em plantas, usando também outras peroxidases ou, em alguns casos, oxigênio e hidrogênio como acceptor (McLellan e Robinson, 1984). As peroxidases ocorrem na maioria das plantas superiores e estão intimamente relacionadas com a perda de sabor e odor nos alimentos estocados, bem como com o desenvolvimento de sabores indesejáveis (Clemente e Robinson, 1995).

A peroxidase (E.C. 1.11.1.7) tem um aumento em sua solubilidade durante o período de maturação da fruta e, conseqüentemente, um aumento na atividade no pós-climatério. Por essa razão, tem sido considerada uma das principais enzimas responsáveis pela qualidade e deterioração em muitas frutas (Mello e Clemente, 1996). Muitos trabalhos têm sido realizados sobre a atividade enzimática da peroxidase em frutas e vegetais industrializados, com o objetivo de atingir a inativação dessa enzima, sem perda das qualidades nutricionais e do "flavor" do alimento.

A perda da atividade da peroxidase durante o tratamento térmico está associada com a origem da enzima, pH, concentração enzimática e métodos de ensaio. Sabe-se que, sob certas condições de tratamento térmico, a peroxidase não é totalmente inativada e, além disso, pode ter uma renaturação, o que contribui para a perda do sabor e o desenvolvimento de sabores desagradáveis em alimentos (Lu e Whitaker, 1974; Clemente, 1995). Estudos da inativação da peroxidase em extratos de plantas têm mostrado, de maneira geral, ser não-linear com relação aos fatores tempo e temperatura, levando a acreditar que esse fato se deve à presença de isoperoxidases com diferentes graus de termoestabilidade.

De modo geral, é aceito que a peroxidase, ao contrário de outras enzimas que são inativadas pelo calor, permanece ativa. Por essa razão, a atividade da peroxidase, em muitas indústrias de alimentos, é usada como indicador de branqueamento (Halpin *et al.*, 1989).

No presente trabalho investigou-se a termoestabilidade do extrato bruto de peroxidase solúvel e ionicamente ligada à parede celular, e das isoperoxidasas aniônicas e catiônicas.

## Material e métodos

### Materiais

Mexericas (*Citrus deliciosa*) frescas e maduras foram obtidas em supermercado local.

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico, obtidos da Synth, Reagent e Ecibra.

### Métodos

#### 1. Preparação do extrato bruto de peroxidase da polpa e casca

Pesaram-se cerca de 800g de cada parte (polpa e casca), sendo estas homogêneas separadamente em liquidificador com 500ml de solução tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) gelada, por um minuto. As misturas foram filtradas, em tecido de algodão, e os filtrados recebidos separadamente em bequer, em banho de gelo.

Os filtrados foram centrifugados (15000rpm) por 20 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram estocados a -18°C, e esses extratos foram denominados, respectivamente, peroxidase solúvel da polpa (PSP) e peroxidase solúvel da casca (PSC). Os resíduos das centrifugações, de cada extrato, foram ressuspensos em solução tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) e centrifugados sob as mesmas condições, para extrair as peroxidases solúveis remanescentes. Após a segunda centrifugação os resíduos foram utilizados para extração da fração de peroxidase ionicamente ligada. Para isso, ressuspendeu-se o resíduo com solução 1M de NaCl em solução tampão Tris/HCl (20mM, pH 7,0), homogêneo por um minuto no liquidificador, e centrifugado a 15000rpm, por 20 minutos a 4°C. Obteve-se, assim, a fração peroxidase ionicamente ligada, sendo denominada peroxidase iônica da polpa (PIP), peroxidase iônica da casca (PIC), e sendo ambas estocadas a -18°C para análises posteriores.

**Tratamento térmico.** Os extratos contendo peroxidase foram aquecidos em tubos de ensaio em banho termostatizado, nas temperaturas de 60°C, 65°C e 70°C, por um período de 10 a 600 segundos, em intervalos de 10 segundos no primeiro minuto e, após, em intervalos de 30 segundos até completar dez minutos. Ao final de cada tempo, as amostras foram colocadas em um banho de gelo para posterior determinação da atividade enzimática, em triplicata.

#### 2. Determinação da atividade enzimática (o-dianisidina)

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-VIS

(Hitachi U-2000 -  $\lambda = 460\text{nm}$ ) para análise da atividade enzimática nos extratos. Para a reação misturaram-se 2,7ml de solução de água oxigenada (0,1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% p/v em solução-tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,0); em seguida adicionaram-se 0,2ml do extrato, e finalmente 0,1ml de solução de o-diani-sidina 1% (p/v) em metanol. A mudança da absorbância foi anotada por um período de 1 minuto, a 25°C.

#### 3. Preparação dos extratos para cromatografia em gel

**Concentração do extrato.** O extrato solúvel da casca, obtido da centrifugação, foi concentrado usando-se o concentrador Millipore minitan II, com uma membrana de exclusão de 10,00 KDa.

**Diálise do extrato bruto.** Para remover os compostos com baixo peso molecular e estabilizar o extrato no pH, para posterior aplicação na coluna cromatográfica, o extrato foi dialisado em solução-tampão fosfato (10mM, pH 7,0) por 12 horas, a 7°C.

**Cromatografia em gel (DEAE - Sepharose).** Para a cromatografia em gel, utilizou-se uma coluna (d.i. 16mm x 40cm), empacotada com gel (DEAE-Sepharose) e equilibrada com solução-tampão fosfato 100mM (pH 7,0) previamente filtrado em membrana de 22 $\mu\text{m}$  e desgaseificado. Aplicaram-se 5ml do extrato dialisado na coluna mantendo um fluxo de 30ml/h. As frações foram coletadas a cada 10 minutos e, a cada fração coletada, alíquotas eram retiradas para teste com o-dianisidina para verificar a presença da peroxidase. As frações que apresentavam atividade enzimática foram guardadas, para posterior determinação da concentração de proteína e da atividade enzimática.

A fração aniônica foi eluída da coluna, utilizando-se solução 1M de cloreto de sódio em tampão fosfato pH 7,0.

#### 4. Determinação de proteína

Para a determinação da proteína foi utilizado o método descrito por Bradford (1976).

**Eletroforese.** Para identificar a composição das isoenzimas no extrato bruto e nas frações obtidas da cromatografia, as frações foram concentradas utilizando-se concentrador Biomax - 10k.

Os extratos concentrados foram absorvidos em papel de filtro Whatman n<sup>o</sup>3 (5x6mm) e inseridos verticalmente em gel de amido a 10%, preparado com solução-tampão tris/ácido cítrico e solução-tampão ácido bórico/hidróxido de lítio, na proporção de 9:1. Nas cubas foi usada solução tampão ácido bórico/hidróxido de lítio (pH 8,3). Após a migração das proteínas, com 2,5V/cm de gel, durante 16 horas, o gel foi incubado a 37°C, ao abrigo da luz. Para a coloração do gel foram utilizados 50ml de solução-

tampão fosfato pH 6,0, 10ml de metanol e 2,5ml de o-dianisidina 1% (p/v), deixando-se por um período de 5 minutos, adicionando-se 8ml de solução de peróxido de hidrogênio, ficando então em repouso até visualização das bandas.

Após a coloração, os géis foram lavados e fixados com solução contendo água destilada, metanol e ácido acético (5:5:1).

**Resultados e discussão**

As atividades enzimáticas dos extratos brutos foram medidas antes do tratamento térmico. Os valores das atividades encontradas nas frações solúveis e iônicas da polpa e da casca estão dispostos na Tabela 1.

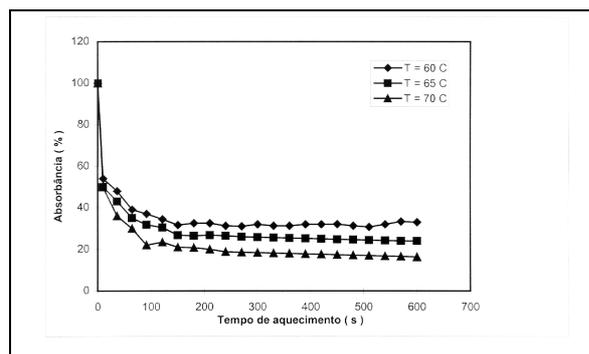
**Tabela 1.** Atividade resultado médio das atividades de peroxidase no extrato bruto de mexericá

| Amostra                           | $\Delta OD/min.mL \pm \delta (n=3)$ |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Peroxidase solúvel da polpa (PSP) | $0,289 \pm 2,919.10^{-2}$           |
| Peroxidase iônica da polpa (PIP)  | $0,114 \pm 0,919.10^{-2}$           |
| Peroxidase solúvel da casca (PSC) | $0,390 \pm 0,013.10^{-2}$           |
| Peroxidase iônica da casca (PIC)  | $0,286 \pm 1,979.10^{-2}$           |

n = número de repetições

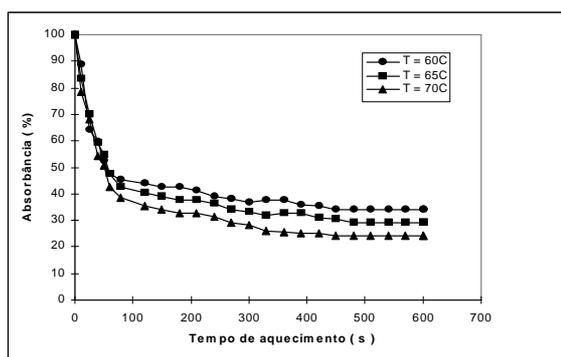
Dos resultados mostrados na Tabela 1, observa-se que a maior atividade da enzima está presente na casca, tanto para a forma solúvel como para a iônica, quando comparadas com os extratos obtidos da polpa.

A variação da atividade enzimática para a fração solúvel e para a fração iônica da polpa, em função do tratamento térmico, estão ilustradas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.



**Figura 1.** Efeito do tratamento térmico na atividade enzimática - fração solúvel da polpa (PSP)

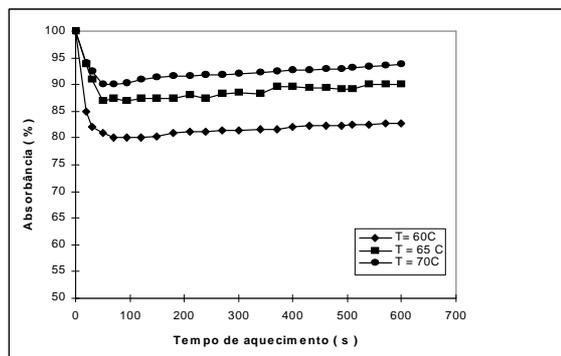
Analisando-se a variação da atividade enzimática, em relação ao tempo de aquecimento, observou-se que a atividade da peroxidase no extrato solúvel da polpa sofreu uma queda de 50% nos 100 primeiros segundos de aquecimento, em todas as temperaturas, permanecendo invariável após os 200 segundos e mostrando, nesse caso, uma queda de 60% da atividade ao final do aquecimento.



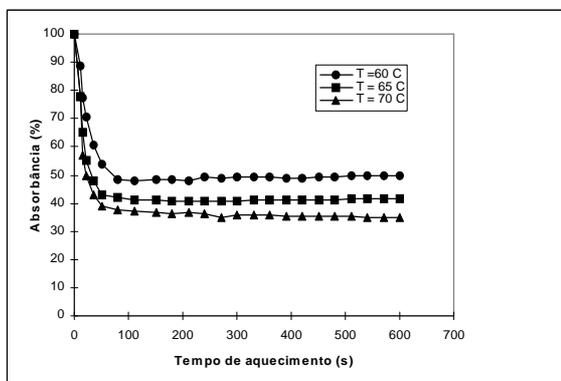
**Figura 2.** Efeito do tratamento térmico na atividade enzimática - fração iônica da polpa (PIP)

Observou-se um decréscimo quase contínuo de atividade das peroxidases ionicamente ligadas da polpa durante o tratamento térmico. Com o tratamento térmico realizado nas frações solúveis e iônicas da polpa, obteve-se uma inativação da peroxidase em torno de 60% ao final do tratamento.

A variação da atividade enzimática para as frações solúvel e iônica da casca, em função do tratamento térmico, está ilustrada, nas Figuras 3 e 4, respectivamente.



**Figura 3.** Efeito do tratamento térmico na atividade enzimática - fração solúvel da casca (PSC)

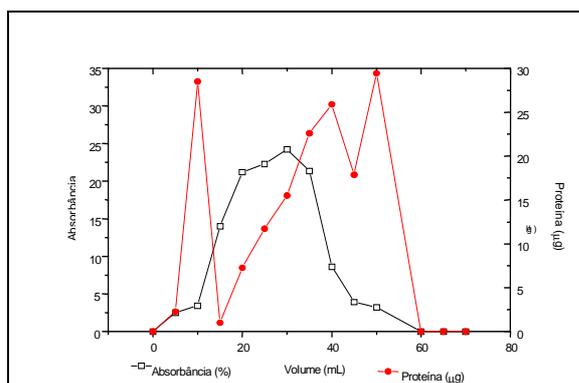


**Figura 4.** Efeito do tratamento térmico na atividade enzimática, fração iônica da casca (PIC)

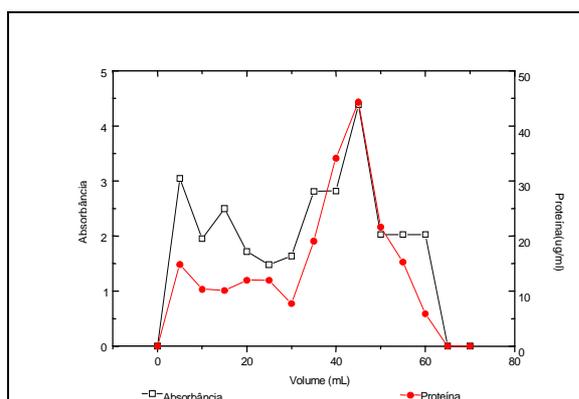
As frações solúveis e iônicas da casca mostraram ser mais resistentes ao tratamento térmico, quando

comparadas com os extratos da polpa. Esse resultado leva a crer que os extratos da casca apresentam isoenzimas mais termoestáveis em relação aos extratos da polpa.

Nas Figuras 5 e 6 são mostrados, a atividade enzimática e o teor de proteína das frações aniônicas e catiônicas do extrato solúvel da casca, resultante da cromatografia em DEAE - Sepharose.

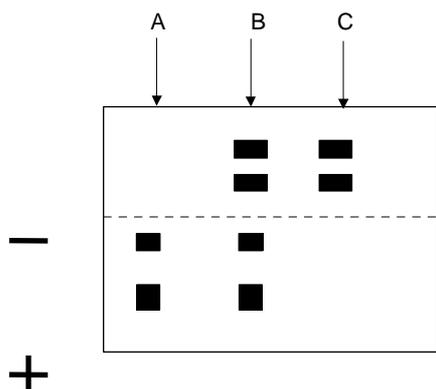


**Figura 5.** Atividade enzimática e concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da fração aniônica



**Figura 6.** Atividade enzimática e concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da fração catiônica

As frações aniônicas e catiônicas que apresentaram maior atividade enzimática (Figuras 5 e 6) foram agrupadas separadamente e analisadas por eletroforese. Os resultados encontrados são mostrados no esquema a seguir:



onde:

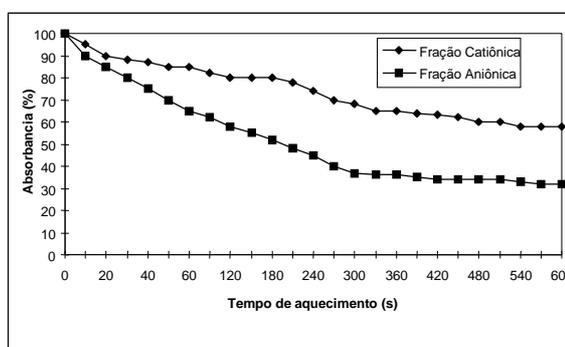
A - fração aniônica do extrato solúvel da casca

B - extrato solúvel da casca

C - fração catiônica do extrato solúvel da casca

Através da eletroforese, observamos que o extrato solúvel da casca possui duas isoenzimas aniônicas e duas catiônicas, com total separação entre as isoenzimas aniônica e catiônica.

Essas frações foram submetidas ao tratamento térmico a  $70^{\circ}\text{C}$  pelo mesmo período que os extratos brutos. Na Figura 7 pode-se observar que a fração contendo isoenzimas catiônicas, após o período de dez minutos, manteve uma atividade de 60% em relação à atividade anterior ao tratamento térmico, sendo, também, mais termoestável que a fração contendo isoenzimas aniônicas.



**Figura 7.** Efeito do tratamento térmico ( $70^{\circ}\text{C}$ ) nas frações catiônicas e aniônicas após separação cromatográfica

A cromatografia em gel mostrou ser eficiente na separação das isoenzimas aniônicas e catiônicas da fração solúvel da casca, o que foi comprovado por eletroforese, onde se observou que essa fração apresentava duas isoenzimas catiônicas e duas aniônicas. As isoenzimas catiônicas são mais resistentes ao tratamento térmico, sendo provavelmente as responsáveis pela estabilidade térmica da peroxidase no extrato bruto. Os tratamentos térmicos realizados nos extratos de mexerica demonstraram que a peroxidase perde um pouco de sua atividade original, porém ainda permanece com um grau de atividade, permitindo que a enzima continue agindo. Temperaturas mais altas talvez possam provocar uma inativação total da peroxidase, mas, por outro lado, a pasteurização industrial de sucos de frutas em temperaturas mais altas não é utilizada, devido à alteração do suco por perdas de compostos voláteis, essenciais para manter o sabor e o aroma do suco e, conseqüentemente, sua qualidade. Observamos uma maior atividade da enzima na casca e, como na maioria das indústrias o preparo do suco é feito por esmagamento, isso certamente elevará a concentração de peroxidases

nos sucos e seus concentrados. As temperaturas usuais de pasteurização são ineficientes para a inativação da peroxidase. Portanto, o “off-flavor” é, possivelmente, decorrente das reações de oxidação que ocorrem em razão da presença da peroxidase remanescente.

Mais estudos, no sentido de se obter mais informações sobre o comportamento da peroxidase em frutas cítricas, são de grande importância, pois no Brasil existe um grande número de variedades de frutas ainda não industrializadas.

### Agradecimento

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica.

### Referências bibliográficas

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.*, 72:248-254, 1976.

Clemente, E. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase from orange. *Rev. Unimar*, 17(3):401-408, 1995.

Clemente, E. Isolamento, purificação e termoestabilidade da isoperoxidase do suco de laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 16:1-5, 1996.

Clemente, E.; Robinson, D.S. The thermostability of purified oranges isoperoxidases. *Arq. Biol. Tecnol.*, 38(4):1109-1118, 1995.

Mello, T.E.; Clemente, E. Thermostability of crude extract of peroxidase from pineapple. *Rev. Unimar*, 18(4):757-763, 1996.

Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. Purification and characterization of peroxidase from green peas. *J. Food Sci.*, 54:644-649, 1989.

Lu, A.T.; Whitaker, J.R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, 39:1173-1178, 1974.

McLellan, K.M.; Robinson, D.S. Heat stability of peroxidase from orange. *Food Chem.*, 13:139-147, 1984.

*Received 05 December 1997.*

*Accepted 05 May 1998.*