

Área: Ciência de Alimentos

EXTRAÇÃO DE PEROXIDASE DE RABANETE (*Raphanus sativus*)

Taiana Denardi de Souza*, Luciana Prietto, Priscila Tessmer Scaglioni, Eliana Badiale Furlong

Laboratório de Micotoxinas e Ciências de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

**E-mail: tdenardisouza@gmail.com*

RESUMO – A peroxidase (POD) é encontrada em tecidos de vegetais e catalisa a oxidação pelo peróxido de hidrogênio. Pode ser encontrada em pêssego, rabanete, abobrinha, nabo, etc. A atividade enzimática da POD pode ser avaliada por espectrofotometria pela formação do produto colorido, o tetraguaiacol. Neste trabalho foi estabelecido um método de extração de peroxidase utilizando como fonte o rabanete (*Raphanus sativus*), visando aplicá-la para avaliação de atividade antioxidante. A enzima POD foi extraída da polpa de rabanetes a partir de um planejamento experimental, variando o tempo de extração e o pH do tampão fosfato 20 mM (extrator). A medida da atividade enzimática dos extratos foi realizada a 30°C em tampão fosfato 0,2 M pH 6,5 utilizando o guaiacol 1% como substrato em presença de peróxido de hidrogênio 0,08%. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry. A maior atividade enzimática foi de 3,81 Uabs/mg proteína.min, correspondendo ao ensaio com tampão fosfato pH 5,5 e tempo de extração de 3 minutos. O pH não afeta de forma significativa a atividade da enzima, ficando demonstrado que a variável mais importante para extração de peroxidase de rabanete é o tempo de contato entre fonte e solução extratora.

Palavras-chave: enzima, pH, tempo de extração.

1 INTRODUÇÃO

A peroxidase (POD) é encontrada em tecidos de vegetais e está localizada nas células na forma parcialmente solúvel no citoplasma e parcialmente insolúvel quando ligada covalentemente e ionicamente à parede das células (TORALLES et al., 1981). Entre suas funções esta a de proteger as células contra os efeitos tóxicos de diversos peróxidos formados no metabolismo (FREITAS et al., 2008), catalisando, principalmente, a oxidação pelo peróxido de hidrogênio de alguns substratos como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis, entre outros. Esta enzima termoestável, cuja atividade pode ser regenerada após tratamento térmico, esta presente em pêssego, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo, aspargo entre outros (CAMPA et al., 1991). Em vista desta

estabilidade e tipo de ação pode ser útil para avaliar o mecanismo de antioxidante de compostos proveniente de fontes naturais.

A determinação da atividade enzimática da POD pode ser avaliada por espectrofotometria, e está baseada no desenvolvimento da cor em presença do substrato: guaiacol- água oxigenada. O complexo peroxidase-peróxido formado oxida o guaiacol (incolor), transformando-o em um produto final colorido o tetraguaiacol (OLIVEIRA et al., 2008).

Neste trabalho foi estabelecido um método de extração de peroxidase utilizando como fonte o rabanete (*Raphanus sativus*), visando aplicá-la em ensaios de avaliação de atividade antioxidante em produtos naturais, pois propicia a identificação do mecanismo de ação deles.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os rabanetes foram adquiridos no comércio local da cidade de Rio Grande-RS, mantidos em sacos plásticos sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o momento da extração da enzimática.

2.1 Preparo do extrato enzimático

A enzima POD foi extraída da polpa de rabanetes segundo Oliveira et al. (2007), com modificações. Foi elaborado um planejamento experimental, no qual variamos a extração com tampão fosfato 20mM em pH 5,5; 6,0; 6,5, com relação massa/solvente de 1:5, sob agitação em blender por 1, 2 e 3 minutos. O homogeneizado foi centrifugado e filtrado. O extrato bruto (sobrenadante) foi mantido a aproximadamente 4°C , para posterior utilização como fonte enzimática.

2.2 Avaliação da atividade enzimática

A medida da atividade enzimática dos extratos foi realizada a 30°C em pH 6,5 utilizando o guaiacol 1% como substrato em presença de peróxido de hidrogênio 0,08%. Também foram adicionados a reação: tampão fosfato 0,2M, água destilada e por fim, o extrato enzimático bruto. A atividade foi calculada a partir das absorvâncias medida a 470nm em 15 minutos de reação. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660nm (LOWRY et al., 1951). O conteúdo de proteínas foi determinado utilizando a equação da reta obtida através de uma curva padrão de albumina.

A atividade enzimática foi definida como Uabs/mg de proteína.min (OLIVEIRA et al., 2007). Sendo, uma unidade de atividade (Uabs/ mg de proteína) definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental tem como objetivo reduzir o número de experimentos a serem realizados, sem prejuízo da confiabilidade dos resultados. Os resultados obtidos no planejamento experimental, tratados através de Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software *Statistic 7.0* (Tabela 1) mostram os efeitos das variáveis nas atividades oxidativas dos extratos obtidos.

Tabela 1. Efeito das variáveis combinadas na atividade dos extratos enzimáticos.

Ensaio	Uabs/mg proteína.min (*CV%)
1 (pH 6,5+3min)	3,48 ^a (7,81)
2 (pH 6,5+1min)	1,97 ^c (9,46)
3 (pH 5,5+3min)	3,81 ^a (9,19)
4 (pH 5,5+1min)	2,86 ^b (5,84)
Ponto central (pH 6,0+2min)	2,85 ^b (4,20)

*Coeficiente de Variação;

**Letras iguais na coluna não diferem estaticamente ($p < 0,05$).

As melhores atividades específicas nos extratos foram verificadas naqueles obtidos com maior tempo de extração, ou seja, 3 minutos. Sendo este resultado previsto na literatura, pois esta enzima encontra-se no citoplasma das células requerendo rompimento da parede e membrana para ser liberada ao meio extrator (TORALLES et al., 1981).

O pH é um parâmetro importante para a atividade enzimática, Maciel, Gouvêa e Pastore (2007) avaliaram alguns fatores que influenciam a atividade da peroxidase extraída de folhas de *C. langsdorffii* e observaram que a peroxidase semi-purificada apresentou atividade ótima em pH entre 4,0 e 7,0. No entanto, neste trabalho não houve efeito significativo dele na atividade dos extratos. Isto demonstra que a extração desta matriz é mais dependente do tempo de extração do que o pH, sendo o método robusto para variação do pH do tampão fosfato. A Figura 1 apresenta a curva de contorno do modelo preditivo e significativo oriundo planejamento experimental.

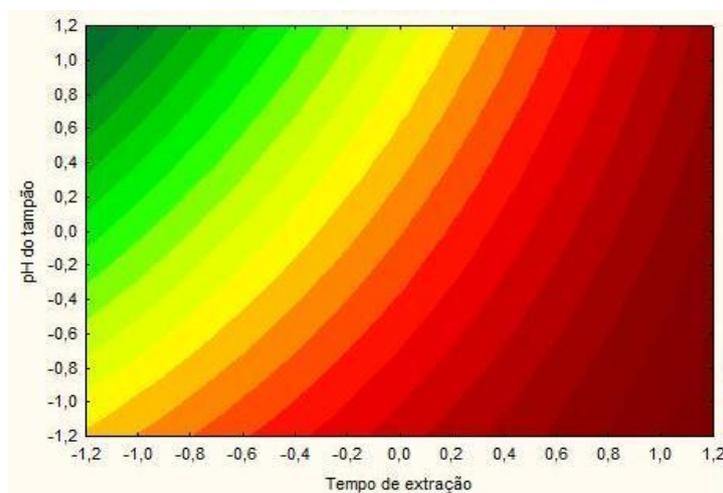


Figura 1. Curva de contorno para extração de peroxidase de rabanete na atividade enzimática.

A maior atividade enzimática foi de 3,81 Uabs/mg proteína.min, correspondendo ao ensaio 3, com tampão fosfato pH 5,5 e tempo de extração de 3 minutos. Diante desses resultados definimos esse ensaio como o melhor procedimento para extração da peroxidase. Além disso, a utilização de tampão pH 5,5 apresenta vantagem sobre os demais tampões utilizados no planejamento, em vista que, quanto menor o pH menor a possibilidade de contaminação por alguns micro-organismos durante a aplicação da enzima em intervalos prolongados.

4 CONCLUSÃO

O tempo de extração é a variável mais importante para extração de peroxidase de rabanete.

5 AGRADECIMENTOS

CNPq e Capes

6 REFERÊNCIAS

- CAMPA, A.; EVERSE, K.; GRISHAM, M.B.; EDS.; CRC, Press Biological Roles of Plant Peroxidases: Know and Potential Function. In Peroxidase in Chemistry and Biology, New York, 1991, vol. II, pp. 25.
- FREITAS, A. A. de; FRANCELINI, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L.; Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 172-177, 2008.

MACIEL, H.P.F.; GOVÊA, C.M.C.P.; PASTORE, G.M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27(2), 2007.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N.F. F.; PAULA, C. D.; VIANA, G. A. Active packaging use to inhibit enzymatic browning of apples. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p. 267-275, 2007.

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; HAAS, L. I. R.; FERRI, N. L.; DEL PINO F. A. B.; VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Food Science Nutrition**. v. 49, p. 127, 1981.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951..