

EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS DE VEGETAIS

Laura Eduarda Lopes dos Reis¹ , Adalgisa Reis Mesquita¹

1. IF Sudeste de Minas Gerais - Campus Barbacena

lauralopes13@hotmail.com

1. Introdução

Enzimas são biomoléculas, em sua grande maioria proteínas, que catalisam, com grande eficiência, as reações biológicas. Elas aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, meio iônico, etc.. As reações catalisadas por enzimas há muito tempo vêm sendo usadas com diferentes propósitos como a determinação de atividades enzimáticas, inibidores entre outros [1].

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não proteico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente da sua própria estrutura proteica para exercer sua atividade, estas são denominadas apoenzimas, enquanto as coenzimas necessitam também de um ou mais componentes não proteicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas. Muitas enzimas dependem de ambos. Outras enzimas possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima [2].

Na classificação internacional sistemática, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases [3]. A peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) pertencem ao grupo das oxidoredutases e têm sido consideradas as principais enzimas responsáveis pela qualidade e deterioração de muitos frutos e hortaliças, catalisando reações oxidativas e de biodegradação [4].

Essas enzimas podem ser aplicadas em análises de grande interesse nas áreas alimentícia, ambiental, biológica, farmacêutica, industrial e também

utilizadas como matéria-prima para o desenvolvimento de biossensores. Um biossensor transforma sinal biológico em sinal elétrico, possibilitando a determinação da concentração de uma substância em uma amostra [5]. Vieira e Fatibello-Filho [1] desenvolveram um procedimento em FIA para a determinação de peróxido de hidrogênio em água oxigenada de uso farmacêutico e água da piscina usando extrato bruto de abobrinha como fonte da enzima peroxidase, obtendo bons resultados quanto à linearidade e ao limite de detecção para peróxido de hidrogênio.

A utilização de extratos vegetais apresenta vantagens com relação a outras fontes naturais como animais, algas e fungos por ser mais simples seu processo de obtenção. As aplicações geralmente são feitas utilizando enzimas já purificadas com custos altos, a variedade de vegetais, por tamanha biodiversidade existente no Brasil, possibilita diversas opções para a pesquisa no país, fazendo com que os custos caiam a patamares mínimos, um exemplo é a diferença do preço da peroxidase comercial e a extraída da abobrinha (*Cucurbita pepo*). Cinco mil unidades de peroxidase comercial custam US\$ 148,80 sem incluir taxas de importação e impostos, já um quilo de abobrinha que custa entre 30 e 50 centavos de dólar (R\$ 1,20 aproximadamente) geram cerca de $1,4 \times 10^{11}$ unidades de enzimas [5].

Palavras chave: enzima, peroxidase, polifenoloxidase

Categoria/Área: BIC/ Ciências Exatas e da Terra

2. Objetivos:

Obter as enzimas peroxidase e polifenoloxidase em extratos de diversos vegetais (repolho verde, repolho roxo, espinafre (folha) e espinafre (talo)) com potencial para substituição da enzima comercial em catálise de reações de compostos fenólicos.

3. Metodologia

3.1. Testes preliminares de presença de peroxidase

Os vegetais repolho roxo, repolho verde, espinafre (folha), espinafre (talo), banana (polpa), banana (casca), inhame e cenoura foram macerados e colocados na presença de guaiacol e peróxido de hidrogênio para identificar

qualitativamente a existência de peroxidase, através da mudança de cor da solução, característica da reação de formação do tetraguaiacol catalisada pela enzima, o esquema da reação é apresentado na figura 1.

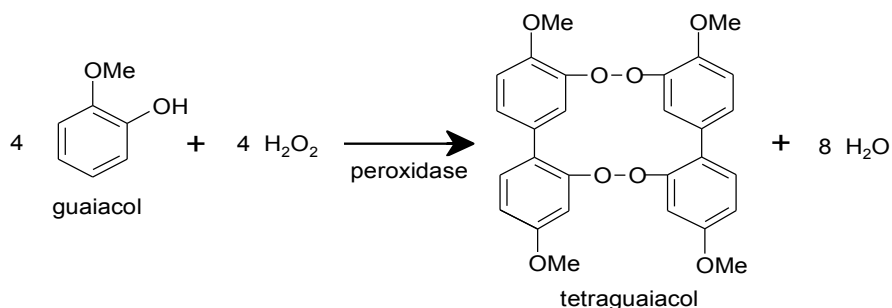


Figura 1 – Esquema da reação de conversão do guaiacol em tetraguaiacol (marrom).

3.2. Obtenção do extrato bruto

Lava-se o vegetal com água ultra purificada (GEHAKA: Master all), secar, descasca-se (se necessário) e pica-se 25 g do vegetal, liquidifica-se com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0 e 2,5 g de agente protetor (polivinilpirrolidona). Filtra-se a solução resultante em 4 camadas de tecido organza e centrifuga-se em 3000 rpm durante 20 minutos, caso necessário, repete-se o processo de centrifugação. Retira-se o sobrenadante e mantenha-o refrigerado.

Os vegetais utilizados foram: espinafre, repolho verde e repolho roxo.

3.3. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática é necessário medir a variação da absorbância em 436 nm do tetraguaiacol formado na reação enzimática da peroxidase (figura 1) [6]. Nesta etapa utiliza-se 2,8 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0, 0,1 mL de extrato enzimático, 0,05 mL de solução de guaiacol 0,018 mol.L⁻¹ e 0,05 mL de solução de peróxido de hidrogênio 0,027 mol.L⁻¹.

Uma unidade de atividade enzimática (unidade/mL) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto [6]. Para o cálculo da atividade enzimática emprega-se a equação:

$$U.mL^{-1} = \frac{\Delta A_{436}}{\min} \times 4 \times V_t \times FD \quad \text{Equação 1}$$

$$e \times V_s$$

Onde: U.mL⁻¹ = unidade de atividade da peroxidase por mL; A= absorbância; e= absortividade molar do tetraguaiacol nestas condições=25.5; V_t= volume final 3.0 mL; V_s= volume da amostra 0.1 mL [7].

A leitura foi realizada por análise contínua em espectrofotômetro UV-VIS (Hach: DR-5000).

4. Resultados e discussão

Todos os testes preliminares indicaram a presença da enzima peroxidase, como pode ser observado na figura 2, todas as soluções apresentaram escurecimento, indicativo de formação do tetraguaiacol catalisado por peroxidase. O espinafre, tanto folha quanto talo, apresentou mudança de coloração indicando a presença da enzima, porém os testes não foram fotografados.



Figura 2 – Teste qualitativo para identificação de peroxidase em extratos vegetais.

Foram preparados extratos enzimáticos de: espinafre (folha), espinafre (talo), repolho roxo e repolho verde. Os resultados da atividade enzimática dos respectivos vegetais estão representados da tabela 1.

Vegetal	Atividade Enzimática (U/mL)
Espinafre (folha)	0,112
Espinafre (talo)	0,144
Repolho roxo	1,951
Repolho verde	2,500

Os testes para a identificação da enzima polifenoloxidase não foram efetuados devido ao atraso na entrega do reagente catecol utilizado na reação de determinação de análise enzimática para polifenoloxidase.

5. Conclusão

A presença da peroxidase foi confirmada em todos os vegetais testados. A análise quantitativa indicou maior atividade enzimática no repolho verde, mas a quantidade apresentada pelos demais aponta possibilidade da utilização desses vegetais em reações catalítica.

Em prosseguimento ao projeto serão efetuadas análises quantitativas dos vegetais: banana, inhame e cenoura ainda não quantificados. Além disso, deverá ser realizada a quantificação da atividade enzimática da polifenoloxidase nos vegetais utilizados neste projeto.

6. Referências bibliográficas

1. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, Vol 25, No.3, 455-464, 2002.
2. LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**; Savier: São Paulo, 1986, p 154-233.
3. MOTTA, V. T. *Bioquímica Básica*. Autolab, 2006, pag. 72
4. CAMARGO, L.A.; Glicerol-3-fosfato oxidase em levedura de panificação. **Araraquara**, 2007.
5. ROCHA, V. A ciência vai à feira. **Univerciência** , p. 10-15, dez. 2003.
6. CLEMENTE, E.; LOPES, A. S. Minerais e enzimas oxidativas em brócolis (*Brassica oleracea L.Cv. Italica*) minimamente processado. **Maringá**, v.24, n.6, p. 1615-1618, 2002.
7. FATIBELLO-FILHO, O.; ZERAÍK, A.E.; SOUZA, F.S. Desenvolvimento de um spot teste para o monitoramento da atividade enzimática da peroxidase em um procedimento de purificação. **Quim. Nova**, Vol 31, No. 4, 731-734, 2008.

Apoio financeiro: IF Sudeste MG – Campus Barbacena.