



**Cláudia Sofia
Cordeiro Nunes**

Purificação da peroxidase da azeitona Negrinha do Douro – Identificação e caracterização das principais isoenzimas.

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química dos Produtos Naturais e Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente:

Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais:

Doutora Marlene Maria Tourais de Barros
Professora Auxiliar da Universidade Católica, Pólo de Viseu

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Aos meus Pais

Agradecimentos

O meu agradecimento ao Doutor Jorge Saraiva, orientador deste trabalho, pelo seu apoio constante através de sugestões e esclarecimentos, e também pelo incentivo que me transmitiu ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Manuel António Coimbra, o meu reconhecimento pelo seu interesse e apoio, assim como pelas críticas construtivas imprescindíveis na elaboração deste trabalho.

À Alexandra Nunes o meu agradecimento especial pela sua paciência e disponibilidade para me transmitir o seu conhecimento em proteínas e principalmente pela amizade.

Ao António Barros gostaria de agradecer a ajuda e amizade que me dispensou na elaboração final da tese.

Aos meus amigos, o meu agradecimento pela presença constante e incentivo, o que constituiu um auxílio fundamental para a elaboração deste trabalho. O meu muito obrigada a todos.

Gostaria de agradecer a todos os colegas de laboratório, que de uma forma ou de outra, me ajudaram na execução deste trabalho.

Para a minha família todas as palavras são poucas para expressar a minha gratidão. Muito obrigada pelo encorajamento, a compreensão e a confiança que sempre demonstraram.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia agradeço o apoio financeiro que me foi concedido.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização da peroxidase da azeitona Negrinha do Douro. A primeira parte deste trabalho consistiu na optimização de um método de extracção e purificação da enzima. Na segunda parte fez-se uma caracterização parcial das diversas isoenzimas purificadas. Neste estudo foram utilizadas azeitonas em dois estados de amadurecimento, identificados pela cor, pretas e verdes.

O procedimento de purificação utilizado para isolar as isoperoxidasas presentes na polpa da azeitona consistiu na precipitação selectiva com sulfato de amónio, seguida de cromatografia de troca catiónica e cromatografia de troca aniónica.

Na polpa de azeitona preta foram detectadas e purificadas oito isoenzimas, sendo quatro catiónicas e quatro aniónicas. Na azeitona verde foram isoladas nove isoperoxidasas, sendo quatro catiónicas e cinco aniónicas. A electroforese por SDS-PAGE e a focagem isoelectrica apresentaram apenas uma banda de proteína para todas as isoenzimas, facto que confirma a sua homogeneidade.

As isoenzimas catiónicas da azeitona preta apresentaram pesos moleculares entre 60 e 70 kDa, enquanto que as aniónicas tinham cerca de 20 kDa. Na azeitona verde, três isoenzimas catiónicas apresentaram pesos moleculares de 20 kDa e a restante isoenzima catiónica apresentou um valor idêntico ao determinado para as isoenzimas catiónicas da azeitona preta, cerca de 70 kDa. A análise por SDS-PAGE com β -mercaptoetanol revelou que cada isoenzima era constituída por uma única cadeia polipeptídica.

As isoenzimas aniónicas A1 e A2 da azeitona preta tinham um ponto isoelectrico de 6,9, enquanto que as A3 e A4 tinham pontos isoelectricos de 4,4 e 4,6 respectivamente.

O efeito do pH e temperatura, as constantes cinéticas (K_M e velocidade máxima) para o peróxido de hidrogénio e o fenol e o conteúdo em glúcidos foram analisados para a isoperoxidase A4 da azeitona preta. O pH e a temperatura óptima de actividade de peroxidase foi 7,0 e 35 °C, respectivamente. A análise de açúcares da isoenzima A4 revelou que a fracção glicosídica representa 28% da massa de enzima, sendo constituída maioritariamente por arabinose (64% mol), contendo também glucose, ramnose e galactose.

O extracto enzimático da azeitona preta, obtido por precipitação com sulfato de amónio apresentou uma estabilidade térmica reduzida. Um tratamento de 15 minutos a 35 °C ou 40 °C provoca a inactivação completa da peroxidase.

Abstract

The purpose of this work was the isolation and the characterisation of the "Negrinha do Douro" olive peroxidase. The first part was devoted to the optimisation of the methodologies of extraction and purification. In the second part a partial characterization of several purified isoenzymes was done. This study used olives in two stages of ripening, that were identified by colour as black and green.

The purification procedure used for isolation of olive pulp isoperoxidases comprises ammonium sulphate selective precipitation, followed by cationic exchange chromatography and anionic exchange chromatography.

In black olive pulp eight isoenzymes, four cationic and four anionic were detected and purified. In green olive nine isoperoxidases, four of which were cationic and five anionic were isolated. The SDS-PAGE and the isoelectric focusing showed only one protein band for all isoenzymes, which was related to their homogeneity.

The cationic isoenzymes from black olive had molecular masses between 60 and 70 kDa, while the anionic ones had molecular weights around 20 kDa. In green olive, three cationic isoenzymes showed molecular masses of 20 kDa and the other isoenzyme showed an identical value of that obtained for cationic isoenzymes from black olive, around 70 kDa. SDS-PAGE with β -mercaptoethanol showed that every isoenzyme were composed by a single polypeptide chain.

The anionic isoenzymes A1 and A2 from black olive had a isoelectric point of 6,9, while the isoenzymes A3 and A4 had isoelectric points of 4.4 and 4.6, respectively.

The effect of pH and temperature, kinetic constants (K_M and maximum velocity) for H_2O_2 and phenol, and the carbohydrate contents were analysed only for the anionic isoperoxidase A4 from black olive. The optimum peroxidase activity, and temperature was observed for pH 7.0 and 35 °C, respectively. Sugar analysis of isoenzyme A4 showed that the glycosidic fraction was 28% of enzyme weight and was composed mainly for arabinose (64% mol); glucose, rhamnose and galactose were also detected.

The enzymatic extract from black olive, extracted with ammonium sulphate precipitation, showed low thermal stability. A treatment for 15 minutes at 35 °C or 40 °C caused complete peroxidase inactivation.

Índice

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

1 – A Azeitona	13
1.1 – Introdução	13
1.2 – Descrição Botânica	14
1.3 – Anatomia e Características Gerais	15
1.4 – Propriedades Físicas	16
1.4.1 – Tamanho	16
1.4.2 – Textura	17
1.4.3 – Cor	17
1.5 – Composição Química.....	17
1.5.1 – Epiderme	18
1.5.2 – Mesocarpo.....	18
1.5.2.1 – Lípidos	19
1.5.2.2 – Açúcares	20
1.5.2.3 – Compostos Fenólicos	21
1.5.2.4 – Proteínas	22
1.5.2.5 – Ácidos Orgânicos.....	25
1.5.2.6 – Pigmentos	26
1.5.2.7 – Compostos Flavonóides	26
1.5.2.8 – Vitaminas e Minerais	27
2 – A Peroxidase de Plantas	27
2.1 – Introdução	27
2.2 – Tipos de Peroxidases	28
2.3 – Bioquímica da Peroxidase	30
2.3.1 – Reacções Catalisadas	30
2.3.2 – Condições Óptimas de Actividade Enzimática.....	31
2.3.3 – Estabilidade Térmica	33
2.3.4 – Função da Parte Glicosídica	36
2.3.5 – Determinação da Actividade Enzimática.....	37
2.4 – Efeito da Peroxidase na Natureza	37
2.5 – Aplicações da Peroxidase na Indústria	38
2.6 – Peroxidase em Frutos e Vegetais	39

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS 43

1 – Material Biológico.....	43
2 – Preparação do Material Biológico.....	43
3 – Extracção da Peroxidase.....	44
4 – Purificação da Peroxidase.....	44
4.1 - Precipitação	44

4.2 – Métodos Cromatográficos.....	45
4.2.1 – Cromatografia de Exclusão Molecular.....	45
4.2.2 – Cromatografia de Troca Iónica.....	46
5 – Determinação da Actividade da Peroxidase.....	48
6 – Quantificação de Proteína.....	48
7 – Electroforese em Gel de Poliacrilamida.....	50
7.1 - SDS-PAGE.....	50
7.2 – Focagem Isoeléctrica (IEF).....	52
7.4 – Revelação.....	53
8 – Caracterização Cinética.....	54
9 – Análise de Açúcares.....	54
10 – Estabilidade Térmica.....	56
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1 – Purificação.....	57
1.1 – Introdução.....	57
1.2 – Extracção da Peroxidase.....	58
1.3 – Precipitação da Peroxidase.....	60
1.4 – Fraccionamento por Cromatografia de Exclusão Molecular.....	60
1.5 – Fraccionamento por Cromatografias de Troca Iónica.....	62
1.6 – Resumo da Purificação da Peroxidase da Azeitona Preta.....	65
1.7 – Protocolo de Purificação da Peroxidase da Azeitona.....	67
1.8 –Purificação da Peroxidase da Azeitona Verde.....	68
2 – Caracterização.....	71
2.1 - Introdução.....	71
2.2 – Massa Molecular e Subunidades.....	72
2.3 – Ponto Isoeléctrico.....	75
2.4 – Efeito do pH.....	77
2.5 – Efeito da Temperatura.....	78
2.6 – Caracterização Cinética.....	79
2.7 – Análise da Fracção Glicosídica.....	82
2.8 – Estabilidade Térmica.....	83
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES.....	87
BIBLIOGRAFIA.....	91

Índice de Figuras

Figura 1 – Um ramo de oliveira com folhas e frutos.....	14
Figura 2 – Esquema da azeitona.	15
Figura 3 – Estrutura química da oleuropeína.....	22
Figura 4 – Estrutura da ferriprotoporfirina IX.	29
Figura 5 – Perfil de eluição da dextrana azul e do dicromato de potássio em Sephacryl S-300.....	46
Figura 6 – Curva de calibração para a quantificação de proteína pelo método do BCA.	49
Figura 7 – Curva de calibração para a determinação da massa molecular por SDS-PAGE.....	51
Figura 8 – Curva de calibração para a determinação do ponto isoelectrico por focagem isoelectrica.	52
Figura 9 – Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-300.....	61
Figura 10 – Cromatografia de troca catiónica em CM-Sepharose da azeitona preta.	64
Figura 11 – Cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sepharcel da azeitona preta.....	64
Figura 12 – Cromatografia de troca catiónica em CM-Sepharose da azeitona verde.....	68
Figura 13 – Cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sepharcel da azeitona verde.....	69
Figura 14 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas catiónicas da azeitona preta.	72
Figura 15 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas aniónicas da azeitona preta.....	73
Figura 16 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas catiónicas da azeitona verde.....	74
Figura 17 – Focagem isoelectrica das isoperoxidasas aniónicas da azeitona preta.....	76
Figura 18 – Efeito do pH na actividade de peroxidase da isoenzima A4 a 25 °C.....	77
Figura 19 – Efeito da temperatura na actividade de peroxidase da isoenzima A4 a pH 7,0.	78
Figura 20 – Curva de Michaelis-Menten do fenol para a isoenzima A4.	79
Figura 21 – Curva de Michaelis-Menten do peróxido de hidrogénio para a isoenzima A4.....	80
Figura 22 – Curva de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de fenol.	80
Figura 23 – Curva de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio.	81
Figura 24 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da isoperoxidase A4.	82
Figura 25 – Composição em açúcares (? mol) da isoperoxidase A4.	83

Índice de Tabelas

Tabela I – Composição da polpa de azeitona fresca (Adaptação de Fernández Diéz <i>et al.</i> , 1985).	19
Tabela II – Temperatura e pH ótimos para peroxidases de frutos e vegetais.	32
Tabela III – Valores de destruição térmica da peroxidase em diversos frutos e vegetais.....	35
Tabela IV – Características de algumas isoenzimas purificadas de diferentes frutos e vegetais.	40
Tabela V – Efeito do tampão de extracção (tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 7,0) na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C durante 30 minutos).	59
Tabela VI – Efeito do pH do tampão de extracção na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C com tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v) durante 30 minutos).....	59
Tabela VII – Efeito do tempo de extracção na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C com tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 contendo NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v)).....	59
Tabela VIII – Resultados de passos do processo de purificação da peroxidase.	62
Tabela IX – Resultados da purificação da peroxidase da polpa da azeitona preta.....	66
Tabela X – Resultados da purificação da peroxidase da polpa da azeitona verde.....	70
Tabela XI – Percentagem de actividade inicial da peroxidase a diferentes tempos e temperaturas.	84

Abreviaturas

A1, A2, A3, A4 e A5 – Isoperoxidasas aniónicas da polpa da azeitona separadas por cromatografia de troca aniónica.

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)

APS - Persulfato de amónio.

BCA - Ácido bicinconínico.

C1, C2, C3 e C4 – Isoperoxidasas catiónicas da polpa da azeitona separadas por cromatografia de troca catiónica.

CM - Carboximetilo.

DEAE – Dietilaminoetilo.

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético.

IEF – Focagem isoelétrica.

K_M - Constante de Michaelis-Menten.

PVPP - polivinilpirrolidona.

rpm - Rotações por minuto.

RZ - Razão entre a absorvância a 402 e 280 nm.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio.

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina.

Tris – 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

Capítulo I – Introdução Teórica e Revisão Bibliográfica

1 – A Azeitona

1.1 – Introdução

O cultivo e o processamento de azeitonas de mesa foram e continuam a ser uma tradição, bem como uma indústria muito importante em Portugal, Espanha, Itália, Grécia e outros países do Mediterrâneo.

Em geral, a composição da polpa da azeitona e, em particular, o conteúdo em gordura é variável e dependente de muitos factores como o clima, solo, sistema de cultura, poda, fertilizantes e métodos de colheita. Por esta razão a cultura de oliveiras pode ser classificada em três categorias de acordo com o tipo de fruto que produzem e o seu principal objectivo: azeitonas de mesa, azeitonas para a extracção de azeite ou azeitonas com ambas as finalidades.

As azeitonas de mesa são definidas pela “Unified Qualitative Standard Applying to Table Olives in International Trade” como: os frutos são de variedades específicas da oliveira, colhidos com um grau de amadurecimento correcto e com uma qualidade que produza após o processamento um bom produto e assegure uma boa preservação. Este processamento pode incluir a adição de vários produtos ou especiarias de boa qualidade (International Olive Oil Council, 1980).

A classificação das azeitonas de mesa é feita com base no estado de amadurecimento do fruto e na cor do produto final. Assim, quatro tipos fundamentais foram estabelecidos: azeitonas verdes, cerejadas, pretas naturais e pretas oxidadas. Os três primeiros tipos referem-se à cor do fruto utilizado e que se mantém inalterada durante o processamento e o último resulta de azeitonas verdes ou na mudança de cor que escurecem devido à oxidação em meio alcalino (Fernández *et al.*, 1997).

Os principais parâmetros de qualidade sensorial da azeitona de mesa são a cor e a textura. Assim o estudo da estrutura física e química das paredes celulares e das enzimas

responsáveis pela modificação da textura da polpa do fruto e pela alteração da cor durante o amadurecimento e processamento é uma base fundamental para compreender e melhorar a qualidade do produto final.

1.2 – Descrição Botânica

A oliveira pertence à família das Oleaceae, género *Olea* e à espécie *Olea europaea*, L. Esta é uma árvore pequena de folha persistente, com um crescimento lento e um elevado tempo de vida.

Esta árvore tem uma folhagem compacta com folhas lanceoladas de 0,5 a 1,0 cm de largura e 4 a 5 cm de comprimento. A superfície da folha tem uma cor verde intensa enquanto que a face inferior é verde esbranquiçada (Figura 1). As inflorescências aparecem na parte axilar de cada folha e têm cerca de 20 pequenas flores esverdeadas, mas apenas algumas dessas flores (1 a 10%) dão origem a frutos (Fernández *et al.*, 1997).



Figura 1 – Um ramo de oliveira com folhas e frutos.

Normalmente apenas um fruto é obtido por inflorescência, devendo-se esta elevada taxa de abortos das flores principalmente à acção de microorganismos ou condições adversas do meio ambiente.

1.3 – Anatomia e Características Gerais

A azeitona é denominada drupa, que significa fruto de mesocarpo carnudo e endocarpo duro, formando o caroço. O fruto é composto pela epiderme ou epicarpo, polpa ou mesocarpo e caroço ou endocarpo que é constituído por uma concha que contém uma ou raramente duas sementes (Figura 2) (Winton e Winton, 1982).

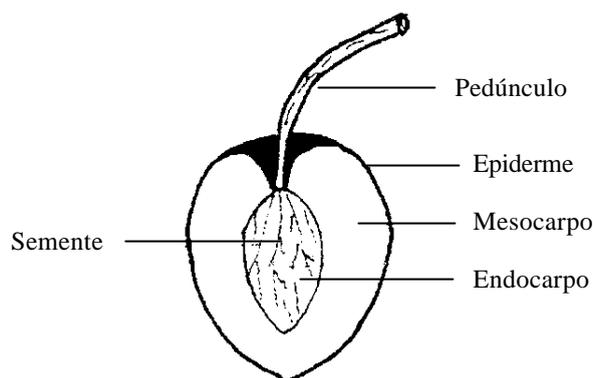


Figura 2 – Esquema da azeitona.

As azeitonas diferem das outras drupas na sua composição química, pois têm uma percentagem reduzida de açúcares (2 a 5%) e um elevado conteúdo em gordura (20 a 30%) e no seu característico sabor amargo devido à presença de um glucósido, a oleuropeína (Fernández *et al.*, 1997).

O mesocarpo é constituído por células que não estão muito compactadas deixando espaços intercelulares livres, uma vez que estão rodeadas por paredes celulares rígidas compostas principalmente por polissacarídeos pécticos, glucuronoxilanas, celulose e lenhina (Coimbra *et al.*, 1994).

O epicarpo da azeitona é composto por células muito empacotadas sem espaços intercelulares, sendo esta continuidade interrompida apenas por pequenos poros por onde o fruto transpira e os agentes patogénicos podem entrar provocando infecções (Fernández *et al.*, 1997).

A azeitona é um fruto que pode ter uma forma que vai de redondo a oval, com 2 a 3 cm de comprimento e 1 a 2 cm de diâmetro. Pode pesar entre 0,5 a 20 g, sendo a gama de peso mais comum de 3 a 10 g. A polpa representa 70 a 90% do peso total do fruto e o

endocarpo representa o restante, sendo que a semente pesa menos de 10% do peso do caroço. Contudo, todas estas características variam com a variedade da oliveira e o grau de maturidade do fruto (Fernández *et al.*, 1997).

1.4 – Propriedades Físicas

As propriedades físicas mais importantes na azeitona de mesa durante o amadurecimento e processamento são o tamanho, a textura e a cor dos frutos. Tanto as características físicas como a composição química da azeitona variam com certos factores, em que se destacam a variedade e o grau de crescimento e maturação do fruto. Por esta razão, os dados obtidos podem ser discordantes se estes parâmetros não forem controlados (Fernández Diéz *et al.*, 1985).

O crescimento da azeitona, tal como a maior parte das drupas, segue uma curva sigmoideal dupla com três etapas. Na primeira etapa existe uma rápida multiplicação das células, originando um crescimento rápido do fruto com o endocarpo a atingir o seu volume final. A segunda etapa é caracterizada pela completa lenhificação do endocarpo. Na terceira fase existe um aumento do tamanho das células do fruto (Fernández *et al.*, 1997).

1.4.1 – Tamanho

O tamanho do fruto é uma característica importante nas azeitonas de mesa. Normalmente, o fruto atinge o seu tamanho máximo quando existe a mudança da cor superficial de avermelhado para púrpura escura ou mesmo preta, dependendo da variedade (Seymour *et al.*, 1993).

O peso específico das azeitonas (peso/volume) é cerca de 1, que diminui ligeiramente durante o crescimento do fruto até atingir um mínimo, para depois aumentar até ao fim da maturação. O período em que o peso específico diminui coincide com a altura da mudança de cor do fruto de verde para avermelhado. (Fernández *et al.*, 1997).

1.4.2 – Textura

A textura é uma das mais importantes características organolépticas dos frutos, sendo a estrutura e composição das paredes celulares maioritariamente responsáveis pela qualidade da textura dos frutos. No caso das azeitonas a textura da polpa é muito variável e depende também do conteúdo em gordura, grau de maturação, da variedade da planta, tipo de cultura, solo, clima e outros factores que influenciam a composição química dos frutos (Fernández *et al.*, 1997).

No amadurecimento da azeitona existe um progressivo amolecimento da polpa do fruto. As principais alterações estruturais na polpa da azeitona coincidem com a mudança de cor do fruto, onde a firmeza diminui 50% na passagem de azeitonas verdes até à mudança de cor, sendo que a partir desta fase e até ao completo amadurecimento do fruto verificam-se poucas alterações na firmeza. Estas modificações na textura resultam da actividade de enzimas que degradam a parede celular, tendo estas a sua actividade máxima na mudança de cor das azeitonas (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995).

1.4.3 – Cor

A cor da superfície do fruto altera-se progressivamente ao longo do seu amadurecimento, podendo passar pelas cores verde, amarelado, rosa, púrpura e preta. A cor ideal varia consoante o tipo de azeitonas de mesa pretendida. Normalmente, as azeitonas no cimo da árvore amadurecem e tornam-se rosas mais rapidamente em relação às que se situam no interior da árvore (Fernández *et al.*, 1997).

1.5 – Composição Química

Uma vez que a composição do caroço se mantém praticamente inalterada durante o processamento, apenas vão ser descritas as características principais da pele (epicarpo) e da polpa (mesocarpo) das azeitonas.

No início do crescimento existe uma acumulação de glúcidos na polpa. No amadurecimento o conteúdo em açúcares solúveis diminui e ocorre o aumento do conteúdo em gordura. Assim, durante o amadurecimento das azeitonas além das alterações físicas, principalmente na cor e textura dos frutos, existem também modificações na sua composição química (Seymour *et al.*, 1993).

1.5.1 – Epiderme

A epiderme contribui com 1,5-3,0% do peso total do fruto e a sua principal função é proteger o fruto contra infecções microbianas. A pele é impregnada com cutina, uma substância impermeável à água (Fernández *et al.*, 1997).

Na pele da azeitona foram isolados os seguintes compostos: alcanos (3 a 7% do extracto total), ésteres saturados e insaturados (3 a 5%), aldeídos (3 a 5%), metil fenil ésteres (2 a 3%), triacilgliceróis (17 a 25%), álcoois (10 a 18%), triterpenos (0 a 14%) e ácidos gordos (9 a 10%). Todos estes compostos estão presentes nas azeitonas verdes e nas maduras, com excepção dos triterpenos que apenas foram detectados na primeira fase do amadurecimento (Bianchi *et al.*, 1992).

O epicarpo deve também ser rico em fenóis, pois a superfície das azeitonas torna-se castanha após uma curta exposição ao ar e escurece quando as azeitonas são arejadas após um tratamento alcalino (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2 – Mesocarpo

Os principais constituintes da polpa ou mesocarpo são a água, os lípidos e os açúcares, como é visível na tabela I que apresenta a proporção dos diferentes constituintes da polpa fresca da azeitona. Durante o amadurecimento das azeitonas existe uma alteração significativa no conteúdo dos principais constituintes da polpa. A polpa das azeitonas representa 70 a 90% do seu peso seco (Fernández Díez *et al.*, 1985).

Tabela I – Composição da polpa de azeitona fresca (Adaptação de Fernández Diéz *et al.*, 1985).

Componente	Proporção (%)
Humidade	60 – 70
Lípidos	10 – 25
Açúcares redutores	3 – 6
Açúcares não redutores	? 0,3
Manitol	0,5 – 1,0
Fibra	1 – 4
Proteína	1 – 2
Cinzas	< 1,0
Ácidos orgânicos e sais	0,5 – 1,0
Compostos fenólicos	2 – 3
Substâncias pécticas	? 0,6
Outros compostos	3 – 7

O conteúdo em humidade tem uma função importante no processamento das azeitonas de mesa, uma vez que todos os métodos necessitam que ocorram uma série de trocas entre a polpa da azeitona e o meio envolvente (soluções de hidróxido de sódio e salmoura) (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.1 – Lípidos

O conteúdo em gorduras não é homogéneo numa variedade de oliveira. Este varia com a posição do fruto na árvore. Normalmente azeitonas da parte superior são maiores e têm um maior conteúdo em gordura do que os da parte inferior e interior da árvore (Fernández *et al.*, 1997).

Devido ao grau de saturação moderado dos ácidos gordos, o conteúdo em gordura tem uma contribuição significativa para o facto das azeitonas de mesa serem consideradas um produto de elevado valor biológico e nutricional.

O aparecimento das gorduras ocorre a seguir à lenhificação do caroço da azeitona e atinge a sua maior percentagem durante a segunda fase de crescimento. As gotas de óleo dentro das células aumentam de tamanho progressivamente ao longo da maturação. A biossíntese dos lípidos pode atingir os 30 a 50 mg de óleo por semana durante o período de actividade biossintética máxima (Fernández *et al.*, 1997).

Durante o amadurecimento das azeitonas existe uma relação inversa entre o conteúdo em lípidos e o conteúdo em água. Contudo, a diminuição do conteúdo em água é menor do que o aumento da quantidade de lípidos, devido ao aumento do tamanho do fruto.

A composição dos lípidos também se altera durante o amadurecimento. No princípio da biossíntese dos lípidos, os ácidos mais abundantes são o palmítico, o linoleico e linolénico. Com o amadurecimento as suas proporções diminuem gradualmente, enquanto que as de ácido oleico e esteárico aumentam (Fernández *et al.*, 1997).

Os lípidos da polpa da azeitona são constituídos principalmente por triglicéridos, mas também existem diglicéridos e ácidos gordos livres, assim como outras substâncias solúveis em lípidos, tais como esteróis e ácidos triterpénicos. A percentagem de triglicéridos, em relação ao conteúdo total de lípidos, aumenta rapidamente até 95%, enquanto que a dos diglicéridos diminui dos iniciais 10% até menos de 0,5%, no fim do amadurecimento (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.2 – Açúcares

Em geral, os açúcares redutores são os mais abundantes representando cerca de 90 a 95% dos açúcares da polpa, com pequenas variações consoante o grau de amadurecimento do fruto. Os açúcares presentes na polpa são por ordem decrescente de importância, a glucose, frutose, sacarose, xilose e ramnose. O amadurecimento das azeitonas provoca a diminuição no conteúdo em açúcares, principalmente da frutose. Existe também a diminuição da quantidade de glucose, enquanto que a concentração de sacarose se mantém praticamente constante (Fernández *et al.*, 1997).

Para além dos açúcares redutores, os polissacarídeos também representam uma parte significativa dos açúcares presentes na polpa de azeitona. Estes polissacarídeos são constituídos por polissacarídeos pécticos, glucuronoxilanas e celulose, em menores quantidades estão também presentes xiloglucanas, mananas e glicoproteínas (Coimbra *et al.*, 1994).

A perda de firmeza das azeitonas durante o amadurecimento ocorre principalmente devido à modificação dos polissacarídeos da parede celular, causada pela presença de enzimas. Segundo Mafra *et al.* (2001) durante a última fase do amadurecimento existe uma

degradação e/ou solubilização dos polissacarídeos constituintes das paredes celulares da polpa da azeitona, isto é dos polissacarídeos pécticos, celulose, glucuronoxilanas e xiloglucanas.

As substâncias pécticas têm uma função importante na textura dos frutos, uma vez que os compostos pécticos insolúveis localizados na lamela média unem as células, estando o amolecimento dos tecidos também relacionado com a degradação dessas substâncias. O amadurecimento provoca a diminuição da quantidade de pectinas insolúveis e um gradual aumento das pectinas solúveis em água, sendo um factor importante na perda de firmeza do fruto. O grau de esterificação das pectinas também se altera com a maturação dos frutos, sendo de 86% nos frutos verdes e diminuindo com o amadurecimento das azeitonas, contribuindo também para o amolecimento dos frutos (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.3 – Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são responsáveis por muitas características importantes na azeitona, como a sensação de amargo, o escurecimento quando a azeitona é danificada e a inibição dos microorganismos durante a fermentação. A percentagem destes compostos pode variar de 1 a 3% do peso da polpa fresca.

Estes compostos são essenciais para o escurecimento que ocorre durante o processamento das azeitonas. Estes também inibem a celulase e outras enzimas presentes na polpa da azeitona, retardam o crescimento de microorganismos e têm um efeito antioxidante no azeite.

O composto fenólico mais estudado é a oleuropeína (Figura 3), uma vez que é responsável pelo sabor amargo da azeitona. A dimetiloleuropeína é um composto fenólico similar à oleuropeína, contudo apenas foi detectado nos frutos maduros e em concentrações inferiores às da oleuropeína. Recentemente outros compostos fenólicos derivados da oleuropeína foram determinados na polpa da azeitona principalmente nos frutos verdes. Outros compostos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico, entre os quais o ácido cafeico, são também muito importantes na polpa da azeitona (Fernández *et al.*, 1997).

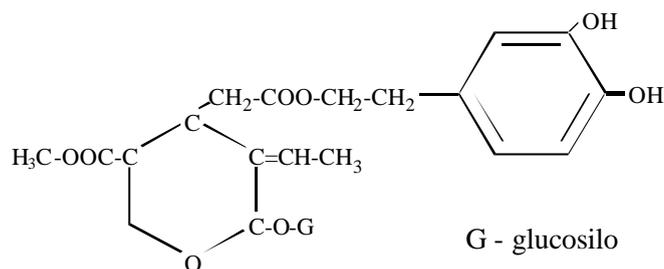


Figura 3 – Estrutura química da oleuropeína.

O conteúdo em compostos fenólicos diminui com o amadurecimento dos frutos, desde 7% da matéria seca, até 0,5% em azeitonas de variedades espanholas completamente maduras. A razão entre a dimetiloleuropeína e a oleuropeína é aparentemente característica de cada variedade, podendo este ser um parâmetro de diferenciação (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.4 – Proteínas

O conteúdo em proteínas (1 a 3%) da polpa de azeitona é relativamente reduzido. Praticamente não existem alterações no seu conteúdo proteico durante o crescimento e amadurecimento do fruto. O azoto não proteico ou livre representa 0,2 a 1,0% da quantidade total de azoto.

Os principais aminoácidos livres presentes na azeitona são a arginina, a alanina, o ácido aspártico, o ácido glutâmico e a glicina, representando cerca de 60% dos aminoácidos. A quantidade de aminoácidos nas proteínas da azeitona varia com a variedade da oliveira e com o grau de amadurecimento do fruto. A hidrólise das proteínas demonstra que todos os aminoácidos essenciais estão presentes na polpa de azeitona (Fernández *et al.*, 1997).

As enzimas têm um papel fundamental no amadurecimento das azeitonas, sendo por exemplo responsáveis pelas modificações que ocorrem nos polissacarídeos provocando alterações na textura da polpa dos frutos. Em seguida refere-se brevemente alguns estudos realizados para enzimas presentes na polpa de azeitona:

Celulase

A celulase da azeitona é constituída por um sistema multienzimático composto por: endoglucanases, celobio-hidrolases, exoglucanases e β -glucosidases, capazes de provocar a hidrólise completa da celulose da parede celular da azeitona (Moreno *et al.*, 1989).

Esta enzima actua nos polissacarídeos da parede celular, nas células do epicarpo e mesocarpo da azeitona, responsáveis pelo suporte da estrutura do fruto, como a celulose e as hemiceluloses, provocando alterações na sua textura. A celulase actua sobre a celulose insolúvel, hidrolizando-a parcialmente e convertendo-a em açúcares solúveis, rompendo assim o esqueleto que dá consistência ao fruto. Esta enzima é então muito importante no processo de amadurecimento e perda de firmeza das azeitonas (Moreno e Mosquera, 1981).

Moreno e Fernández-Bolaños (1985) verificaram que enquanto a actividade celulolítica aumenta a percentagem de celulose diminui, confirmando o facto de que durante o amadurecimento existe a hidrólise enzimática da celulose.

Na variedade Hojiblanca, a actividade enzimática da celulase é praticamente desprezável nos frutos verdes, começando a aparecer durante o amadurecimento até à mudança de cor da azeitona e aumentando rapidamente em frutos completamente maduros. Após a colheita dos frutos a actividade da celulase aumenta drasticamente durante a armazenagem, sendo mais evidente em frutos com um grau de maturação elevado (Moreno *et al.*, 1988).

Clorofilase

A presença da clorofilase nas azeitonas provoca a perda drástica de clorofilas durante a extracção do azeite. Contudo, a acção desta enzima no fruto fresco e a alteração da sua actividade durante o crescimento e amadurecimento ainda não foi elucidada (Fernández *et al.*, 1997).

Galactosidases

A actividade de β e α -galactosidases aumenta desde as azeitonas verdes até à completa maturação (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995). A β -galactosidase parece ser uma enzima muito importante no processo de amolecimento do fruto, uma vez que esta enzima

degrada e solubiliza as pectinas que são um dos principais componentes da parede celular da azeitona.

Pectina metilesterase

A actividade de pectina metilesterase apenas aparece na mudança de cor da azeitona e aumenta rapidamente até à completa maturação dos frutos (Fernández *et al.*,1997).

A actividade desta enzima tem uma função importante na medida em que a pectina na polpa da azeitona está acessível à sua acção, originando também a perda de firmeza do fruto durante o amadurecimento (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995).

Os tipos de enzimas pécticas e as alterações que estas podem causar nas substâncias pécticas durante o amadurecimento do fruto são importantes, pois determinam a altura da colheita e processamento do fruto (Moreno e Mosquera, 1981).

Peroxidase

A actividade da peroxidase na polpa da azeitona, assim como o seu efeito no crescimento e amadurecimento dos frutos tem sido pouco estudado. Segundo Sciancalepore (1985), a polpa das azeitonas tem uma actividade significativa de peroxidase, mas não foi determinada qualquer relação entre este facto e o processo de maturação das azeitonas.

Polifenoloxidase

A polifenoloxidase é uma das enzimas mais estudadas na azeitona. Esta enzima é responsável pela alteração de cor do fruto de verde para castanho quando este é danificado mecanicamente. Durante o crescimento das azeitonas a actividade de polifenoloxidase diminui gradualmente enquanto que a quantidade de *o*-difenois (produto da reacção de oxidação dos fenóis catalisada pela polifenoloxidase) presentes aumenta consideravelmente (Goupy *et al.*,1991).

Existe uma elevada correlação entre o grau de escurecimento das azeitonas e a actividade de polifenoloxidase, segundo estudos realizados por Sciancalepore e Longone (1984) e Sciancalepore (1985)

Durante a fase final do amadurecimento das azeitonas, quando ocorre o escurecimento do fruto, esta enzima aparece predominantemente na fracção solúvel. Esta alteração coincide com o aparecimento das antocianinas, facto que pode ser explicado pela ruptura das membranas dos cloroplastos, onde provavelmente a enzima está ligada nos frutos verdes, facilitando a sua libertação, ficando assim solúvel (Ben-Shalom *et al.*, 1977).

Poligalacturonase

A actividade da poligalacturonase apenas é detectada na fase final do amadurecimento, não existindo qualquer actividade em azeitonas verdes ou na mudança de cor dos frutos (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995).

Outras enzimas

A presença de várias glicosidases foi também detectada durante o crescimento e amadurecimento de azeitonas. Dentro deste grupo, as glicosidases mais activas são a β -glucosaminidase e β -manosidase, seguidas das β -arabinosidase e β -xilosidase, por ordem decrescente de actividade (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995). A maioria destas enzimas apresenta um máximo de actividade na altura da mudança de cor do fruto, estando associadas à perda da textura dos frutos, pois actuam sobre os polissacarídeos da parede celular das azeitonas.

1.5.2.5 – Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos e os seus sais estão presentes na polpa das azeitonas, em concentrações entre 0,5 e 1,0%. Os ácidos encontrados na polpa do fruto são o oxálico, o málico e o cítrico, com concentrações de 0,02 - 0,41%, 0,01 - 0,17% e 0,01 - 0,24%, respectivamente (Fernández *et al.*, 1997).

O conteúdo em ácidos orgânicos totais aumenta de 0,182 a 0,266% durante o amadurecimento. No período até ao completo amadurecimento das azeitonas existe um aumento progressivo do ácido cítrico, enquanto que o ácido málico diminui. A razão malato/citrato está inversamente relacionada com a formação de lípidos, sendo o conteúdo máximo de lípidos atingido quando a razão é cerca de 1. Valores inferiores indicam frutos

muito maduros enquanto que superiores indicam frutos ainda imaturos (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.6 – Pigmentos

As alterações de cor durante o amadurecimento das azeitonas são devidas à formação das antocianinas, sendo a cor final uma mistura de cinco antocianinas (duas cianidinas e três triósidos).

Normalmente a formação de antocianinas começa quando os frutos atingem a fase da mudança de cor. O conteúdo final de antocianinas pode atingir os 0,5 g/100 g de polpa fresca, expressa em cianidina, em praticamente todas as variedades de azeitonas (Fernández *et al.*, 1997).

A biossíntese das antocianinas nas azeitonas está relacionada com a luz, pois os frutos mantidos no escuro durante o crescimento produzem apenas 10% da quantidade encontrada em frutos similares expostos à luz. Isto significa que a luz, tem uma função muito importante na maturação das azeitonas (Fernández *et al.*, 1997).

A presença de clorofilas e carotenóides foi também determinada nas azeitonas da variedade Hojiblanca e Manzanilla. Os principais pigmentos são as clorofilas, predominando a clorofila *a* seguida da clorofila *b*. Os carotenóides estão presentes em menores quantidades pela seguinte ordem de importância: luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina (Fernández *et al.*, 1997). Durante o amadurecimento das azeitonas ocorre uma diminuição gradual e uniforme das concentrações das clorofilas e carotenóides. Em princípio a degradação da clorofila durante o amadurecimento pode estar relacionada com a biossíntese de outros compostos, como as antocianinas (Seymour *et al.*, 1993).

1.5.2.7 – Compostos Flavonóides

Os flavonóides estão presentes desde as primeiras fases da formação dos frutos e aumentam progressivamente ao longo da maturação. A composição em flavonóis e flavonas varia com as diferentes espécies de azeitona, podendo ser utilizada para a caracterização bioquímica das variedades das azeitonas (Fernández *et al.*, 1997).

1.5.2.8 – Vitaminas e Minerais

Na polpa da azeitona fresca a percentagem de cinzas varia entre 0,6 e 1%. Os elementos mais importantes são o potássio, o cálcio, o fósforo, o sódio, o magnésio e o enxofre. Outros elementos estão também presentes mas em quantidades reduzidas: ferro, zinco, cobre e manganês.

Em relação ao conteúdo em vitaminas da polpa da azeitona não existem muitos estudos, tendo sido apenas determinada a presença de carotenos, tiamina e riboflavina (Fernández *et al.*, 1997).

2 – A Peroxidase de Plantas

2.1 – Introdução

A peroxidase é ubíqua no reino vegetal, aparecendo também em animais e microorganismos. Esta enzima é uma oxido-redutase (E.C.1.11.1.7) que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio na presença de um composto dador de hidrogénio ou a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos.

Esta enzima pertence à família das proteínas com ferriprotoporfirina como grupo prostético. As funções principais destas enzimas hémicas estão relacionadas com a activação do oxigénio para a incorporação no substrato (actividade oxidativa) ou a utilização do peróxido na oxidação do substrato (actividade peroxidativa) (Wong, 1995).

A função da peroxidase nas plantas é um dos tópicos menos elucidados da enzima mas, tomando em conta alguns factores que induzem a sua biossíntese foi concluído que o *stress* fisiológico, ferimentos ou infecções provocam alterações nas isoenzimas da peroxidase. O amadurecimento e senescência dos frutos também provocam alterações nas isoenzimas e na actividade da peroxidase.

A peroxidase é considerada a enzima termicamente mais estável nas plantas, sendo a enzima mais estudada do ponto de vista da sua estabilidade térmica. Este interesse advém

da sua utilização como indicador do impacto de processos térmicos aplicados a frutos e vegetais. A inactivação da peroxidase indica que todas as outras enzimas foram também inactivadas (Whitaker, 1994).

Extractos de peroxidase de muitos frutos e vegetais demonstraram que a enzima era constituída por um variado número de isoenzimas. Aparentemente as isoperoxidasas catalisam diferentes reacções oxidativas nos alimentos e estão associadas a diferentes funções fisiológicas nos organismos em geral (Moulding *et al.*, 1988).

A expressão de diferentes isoenzimas da peroxidase é específica de organismos particulares, tecidos ou tipos de células. A actividade total das isoenzimas nas folhas pode ser muito diferente da do caule ou das flores de algumas plantas. As raízes, as sementes e as células da epiderme de todos os tecidos sujeitos a *stress* ou ataque patogénico são normalmente uma boa fonte de peroxidase (Gijzen, 1997).

Por todas as razões referidas anteriormente, o estudo da peroxidase é importante, pois pode contribuir para uma melhor compreensão do comportamento desta enzima em frutos e vegetais. O conhecimento da presença e formação da peroxidase durante o ciclo de vida das plantas, assim como a cinética e as propriedades moleculares das isoenzimas, podem ajudar a conhecer exactamente a função fisiológica da peroxidase nos frutos e vegetais. Este conhecimento pode ser importante para produzir frutos e vegetais frescos, congelados, secos, enlatados ou liofilizados de elevada qualidade, uma vez que a peroxidase está relacionada com a qualidade do alimento, em particular no sabor de frutos e vegetais naturais ou processados (Vámos-Vigýázó, 1981).

A oxidação de compostos fenólicos catalisada pela peroxidase está associada com a deterioração no sabor, cor, textura e qualidades nutricionais de alimentos processados e dos seus produtos (Morales *et al.*, 1993).

2.2 – Tipos de Peroxidasas

As peroxidasas podem ser classificadas em dois grupos principais: as ferropoteínas e as flavoproteínas. As enzimas pertencentes ao primeiro grupo podem ainda ser subdivididas em dois grupos: as peroxidasas ferriprotoporfirinas e as verdoperoxidasas.

O grupo das ferriprotoporfirinas inclui as peroxidases de plantas superiores, animais e microorganismos. Estas peroxidases contêm ferriprotoporfirina IX (Figura 4) como grupo prostético e devido a este cofactor, quando purificadas, apresentam cor castanha. Devido ao grupo prostético estas peroxidases têm uma absorção máxima não só a 275 nm, devido aos resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina, mas também a 403, 497 e 641,5 nm. O valor RZ (*Reinheitszahl*) é a razão entre a absorção a 403 e 280 nm, sendo este valor utilizado para expressar a pureza de uma preparação de peroxidase. Contudo, o índice RZ tem algumas desvantagens, tal como ser diferente para peroxidases provenientes de diversas fontes devido ao diferente conteúdo em aminoácidos aromáticos e açúcares (por exemplo, as múltiplas formas moleculares da peroxidase do rábano bravo têm valores de RZ que variam entre 2,50 e 4,19) e refere-se à pureza como proteína, não tendo em conta a actividade como enzima (Whitaker, 1994).

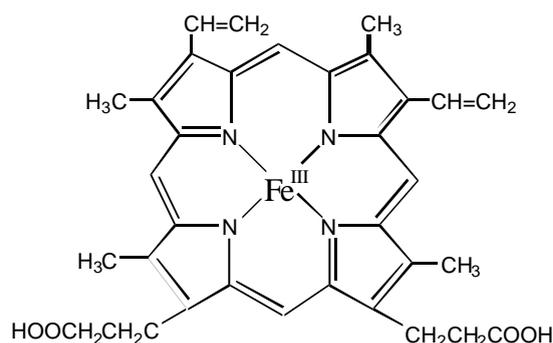


Figura 4 – Estrutura da ferriprotoporfirina IX.

O grupo prostético das verdoperoxidases é também constituído por um núcleo porfirínico contendo um ião ferro III, contudo este é diferente do ferriprotoporfirina IX. Estas enzimas estão presentes em animais e no leite (lactoperoxidase) e quando purificadas têm uma cor verde devido à sua absorvância máxima na zona entre 570 e 690 nm (Whitaker, 1994).

As peroxidases flavoproteínas foram purificadas em microorganismos, em diversos *streptococci* e em tecidos animais e têm como grupo prostético o dinucleótido de adenina e flavina (FAD) (Burnette, 1977).

2.3 – Bioquímica da Peroxidase

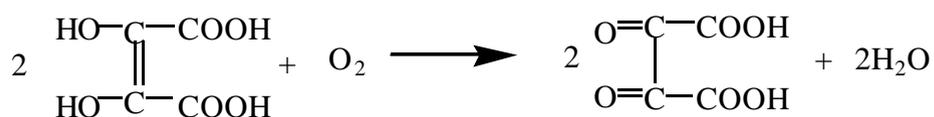
2.3.1 – Reacções Catalisadas

A peroxidase catalisa quatro tipos de reacções: peroxidativa, oxidativa, catalática e hidroxilação. As equações gerais das reacções são as seguintes (Whitaker, 1994):

✍ *Peroxidativa*



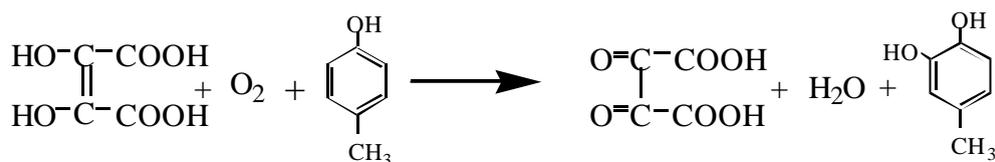
✍ *Oxidativa*



✍ *Catalática*



✍ *Hidroxilação*



A reacção peroxidativa é geralmente considerada a mais importante, podendo diversos compostos actuar como dadores de hidrogénio, incluindo fenóis (*p*-cresol, guaiacol, resorcinol) e aminas aromáticas (anilina, benzidina, *o*-dianisidina) entre outros, sendo estes compostos usados como substratos (Burnette, 1977).

A reacção oxidativa da peroxidase pode ocorrer na ausência do peróxido de hidrogénio. Contudo, requer a presença de oxigénio e cofactores (manganês e fenol). Os

substratos que podem ser transformados neste tipo de reacção são o ácido di-hidroxi-fumárico, o ácido ascórbico e a hidroquinona (Whitaker, 1994).

Diferentes isoenzimas de diversas fontes têm diferentes razões de actividade peroxidativa/oxidativa, as duas actividades têm diferentes respostas em relação aos inibidores, o que sugere que locais activos separados são responsáveis pelas duas acções catalíticas (Vámos-Vigýazó, 1981).

Na ausência de um substrato dador de hidrogénio, a peroxidase funciona como a catalase, decompondo cataliticamente o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, numa reacção pelo menos 1000 vezes mais lenta do que as reacções peroxidativa e oxidativa (Wong, 1995).

A reacção de hidroxilação produz derivados do catecol a partir de derivados do fenol e oxigénio, necessitando de um dador de hidrogénio, em particular o ácido di-hidroxi-fumárico. A peroxidase hidroxila uma variedade de compostos aromáticos, incluindo a tirosina, a fenilalanina, o *p*-cresol e os ácidos benzóicos e salicílico (Whitaker, 1994).

2.3.2 – Condições Óptimas de Actividade Enzimática

O pH óptimo de actividade da peroxidase varia com a fonte de enzima, a composição em isoenzimas e o dador de hidrogénio e tampão usado na determinação de actividade. A gama de pH óptimo observada em algumas fontes de peroxidase pode ser devida à presença de várias isoenzimas com diferentes óptimos de pH. Também podem existir diferenças no pH óptimo em fracções de peroxidase solúvel ou ligadas às paredes celulares (Halpin *et al.*, 1989).

A perda de actividade da peroxidase para valores ácidos é devido à alteração da proteína do estado nativo para um estado desnaturado reversível, provavelmente devido a uma alteração estrutural da enzima (destruição da estrutura de α -hélice). A passagem da proteína do estado desnaturado reversível para o estado irreversível é influenciada pelo pH, sendo esta a razão pela qual a estabilidade térmica da peroxidase pode ser reduzida num meio ácido, pH 2,5 a 4,5 (Vámos-Vigýazó, 1981).

A temperatura óptima para a peroxidase de plantas, tal como ocorre para o pH, varia consoante a fonte de onde é extraída a enzima. A temperatura e pH óptimos de

actividade para algumas peroxidases purificadas de diferentes frutos e vegetais são apresentados na tabela II.

Tabela II – Temperatura e pH óptimos para peroxidases de frutos e vegetais.

<i>Fonte</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Observações</i>	<i>Referência</i>
Batata	55	5,0 – 5,4	- Extracto homogeneizado - Tampão acetato	Vámos-Vigýázó (1981)
Couve-flor	40	6,5	- Isoenzima principal - Tampão citrato – fosfato e guaiacol	Lee <i>et al.</i> (1984)
Melão	-	5,5	- Isoenzima aniónica - Tampão citrato – fosfato e guaiacol	Rodríguez-Lopez <i>et al.</i> (2000b)
Morango	30	6,0	- Extracto purificado por exclusão molecular - Tampão fosfato e guaiacol	Civello <i>et al.</i> (1995)
Nabo	40	5,5	- Isoenzima catiónica - Tampão fosfato e ABTS	Duarte-Vázquez <i>et al.</i> (2000)
	45	5,0	- Isoenzima aniónica - Tampão fosfato e ABTS	
	55	5,0	- Isoenzima aniónica - Tampão fosfato e ABTS	
Papaia	-	6,0	- Isoenzima principal - Tampão fosfato e <i>o</i> -dianisidina	Silva <i>et al.</i> (1990)
Rábano bravo	-	5,8	- Isoenzimas aniónicas - Tampão citrato – fosfato e <i>o</i> -dianisidina	Kay <i>et al.</i> (1967)
	-	5,0	- Isoenzimas catiónicas - Tampão citrato – fosfato e <i>o</i> -dianisidina	
Soja	-	5,5	- Isoenzima principal - Tampão citrato – fosfato e guaiacol	Sessa e Anderson (1981)

Tabela II - Temperatura e pH óptimos para peroxidases de frutos e vegetais (Continuação).

<i>Fonte</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>Observações</i>	<i>Referência</i>
Tomate	-	5,0-5,3	- Isoenzima aniónica - Tampão citrato – fosfato e guaiacol	Marangoni <i>et al.</i> (1989); Heidrich <i>et al.</i> (1983)
Uva	-	5,4	- Isoenzima principal - Tampão citrato – fosfato	Vámos-Vigýázó (1981)
	-	4,0 – 5,0	- Isoenzima principal - Tampão borato	
	-	5,0 – 6,0	- Isoenzima principal - Tampão acetato	

2.3.3 – Estabilidade Térmica

O processo de inactivação das enzimas é teoricamente considerado um processo cinético de decaimento de primeira ordem. Contudo, este modelo não se aplica à destruição da actividade enzimática em vários casos e da peroxidase, em particular. A inactivação térmica da peroxidase a temperaturas inferiores a 80-90 °C é um processo bifásico e as duas fases têm cinéticas de primeira ordem com constantes diferentes.

Vámos-Vigýázó (1981) sugeriu a presença de isoenzimas estáveis e lábeis termicamente como responsáveis por este comportamento bifásico. As isoperoxidases menos resistentes à temperatura formam facilmente agregados expondo o grupo hémico, sendo incapazes de catalisar a clivagem do peróxido. As isoperoxidases mais estáveis termicamente não agregam na mesma extensão mantendo uma actividade residual.

Outra hipótese para as curvas de inactivação bifásicas encontradas em diversos vegetais foi atribuída por alguns autores à formação, durante o tratamento térmico, de um novo composto de elevada termoestabilidade proveniente da enzima desnaturada e grupos de peroxidase que permanecem activos (Vámos-Vigýázó, 1981). Esta segunda hipótese obteve forte suporte experimental, em experiências em que se verificou uma mudança gradual de cinética bifásica para primeira ordem, em função da diminuição da força iónica do tampão até água pura (Saraiva *et al.*, 1996).

Os processos que estão envolvidos na desnaturação térmica da peroxidase são: a dissociação do grupo prostético da holoenzima, a modificação conformacional da apoenzima e a modificação ou degradação do grupo prostético. A reversibilidade do processo de inactivação é dependente do pH. No caso do rabão Japonês a pH 5 a reacção é reversível, sendo irreversível a pH inferior a 5 ou superior a 9. A irreversibilidade a pH ácido é devida às modificações irreversíveis na apoenzima e a pH alcalino devido à modificação do grupo prostético (Vámos-Vigýazó, 1981).

Os factores que afectam a inactivação térmica da peroxidase podem ser subdivididos em dois grupos, os relacionados com a fonte de enzima e os resultantes de parâmetros externos ao tratamento térmico.

O género, espécie e variedade têm uma influência muito significativa na estabilidade térmica da peroxidase, por exemplo a peroxidase da batata e da couve-flor é inactivada completa e irreversivelmente com um tratamento a 95 °C durante 10 minutos, enquanto que a de couve (*Brassica oleracea* var *Gongyloides*) mantém cerca de 0,3% de actividade após um tratamento de 120 °C durante 10 minutos. Em três variedades de couve, uma demonstrou um aumento da actividade após 10 minutos a 55 °C, enquanto que nas outras duas variedades a actividade diminui ligeiramente nas mesmas condições. Foi ainda demonstrado que níveis elevados de actividade estão relacionados com o aumento da resistência térmica. O ambiente, isto é as substâncias celulares, afecta também a estabilidade da peroxidase, pois pode ter um efeito protector da enzima, mas também pode em alguns casos reduzir a sua estabilidade térmica (Vámos-Vigýazó, 1981).

Segundo experiências realizadas em diferentes espécies de plantas, para além de todos os factores referidos anteriormente, foi estabelecido que os iões cálcio e cobre e alguns aminoácidos influenciam a actividade da enzima e a sua sensibilidade à temperatura. Na maior parte dos casos, o enriquecimento dos tecidos com iões cálcio e cobre e certos aminoácidos provocam um aumento na estabilidade da molécula de enzima (Bakardjieva *et al.*, 1999).

Os principais factores externos que influenciam a inactivação térmica, a determinado pH, são o tempo e a temperatura do tratamento térmico. A determinada temperatura, um aquecimento longo resulta numa completa destruição da peroxidase, enquanto procedimentos com temperaturas elevadas durante curtos períodos de tempo, embora provoquem uma inactivação, dão muitas vezes origem a processos de regeneração

da actividade. Este processo de regeneração é característico da peroxidase e como quase todas as características da peroxidase, a reactivação também depende das espécies e da variedade das plantas. Outros factores que afectam a reactivação são o tempo e a temperatura do tratamento térmico, as condições (pH e temperatura) durante o armazenamento da enzima inactivada e o método de determinação da actividade. Contudo, de todos estes factores, o que assume maior importância é a duração do tratamento térmico. Quanto mais longo é o tratamento (a uma dada temperatura) menor é a reactivação observada. Se o tratamento térmico for suficientemente longo consegue-se evitar a reactivação da actividade enzimática (Burnette, 1977).

Aparentemente, a resistência térmica da peroxidase também depende do substrato dador de hidrogénio, que é utilizado na determinação da actividade da enzima. Este facto poderá estar relacionado com a existência de diferentes isoenzimas com especificidades diferentes para o substrato dador de hidrogénio (Vámos-Vigýázó, 1981).

A tabela III apresenta dados que permitem ter uma ideia da diferente estabilidade térmica da peroxidase proveniente de diversas fontes.

Tabela III. – Valores de destruição térmica da peroxidase em diversos frutos e vegetais.

<i>Fonte</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Actividade residual (%)</i>	<i>Referência</i>
Batata	10	90	20	Boucoiran <i>et al.</i> (2000)
Cogumelos	1,0	100	0	Vámos-Vigýázó (1981)
Couve-flor	15	50	2	Lee <i>et al.</i> (1984)
Ervilhas	1,5	25	50	Halpin <i>et al.</i> (1989)
Feijão	20	90	10	Yemenicioglu <i>et al.</i> (1998)
Feijão verde	3,0	121	0	Vámos-Vigýázó (1981)
	2,0	95	0,7 – 3,2	
Maçã	2,0	90	5	Moulding <i>et al.</i> (1988)
Manga	2,0	80	2	Khan e Robinson (1993b)
Morango	20	55	23	Civello <i>et al.</i> (1995)

Tabela III – Valores de destruição térmica da peroxidase em diversos frutos e vegetais (Continuação).

<i>Fonte</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Actividade residual (%)</i>	<i>Referência</i>
Nabo	10	55 - 60	50	Agostini <i>et al.</i> (1997)
Pêra	4,5	87	0	Vámos-Vigýazó (1981)
Pêssego	0,41	87	0	Vámos-Vigýazó (1981)
Pimenta	15	60	25	Pomar <i>et al.</i> (1997)
	5	80	10	
Soja	72	70	3	Sessa e Anderson (1981)
	15	80	0	
Uva	10	80	10	Robinson <i>et al.</i> (1989)

A temperaturas reduzidas (-18 °C ou -20 °C) a actividade enzimática não é destruída ou é destruída reversivelmente, muito lentamente, facto que pode ter consequências negativas na qualidade de produtos alimentares congelados (Vámos-Vigýazó, 1981).

2.3.4 – Função da Parte Glicosídica

As peroxidases das plantas são glicoproteínas, caracterizadas pela presença de uma cadeia de oligossacarídeos ligada à proteína, sendo esta importante na actividade e estabilidade térmica da enzima (Cella e Carbonera, 1997).

A presença e configuração dos glúcidos são importantes no estudo das propriedades funcionais e biológicas das glicoproteínas. As principais funções da parte glicosídica da peroxidase são: a manutenção da conformação e solubilidade da proteína, estabilização do polipeptídeo contra a proteólise, mediação da actividade biológica e distribuição intracelular (McManus e Ashford, 1997; Sun *et al.*, 1997).

Apesar de ser conhecida a importância da parte glicosídica na acção da peroxidase de plantas, a sua função em concreto ainda não está completamente elucidada.

2.3.5 – Determinação da Actividade Enzimática

A actividade da peroxidase é determinada por métodos espectrofotométricos baseados na formação de compostos corados a partir do substrato dador de hidrogénio durante a reacção com o peróxido de hidrogénio.

Como foi referido anteriormente, a peroxidase necessita de dois tipos de substrato: o peróxido e o dador de hidrogénio. O peróxido mais utilizado é o peróxido de hidrogénio, sendo a enzima inactivada por elevadas concentrações deste substrato. Ao contrário do que ocorre com o peróxido, a peroxidase tem uma reduzida especificidade em relação ao substrato dador, sendo este facto explicado pelas diferentes especificidades das diferentes isoenzimas (Burnette, 1977).

2.4 – Efeito da Peroxidase na Natureza

Nas plantas, a peroxidase está localizada na célula na forma solúvel, no citoplasma, e insolúvel, ligada às paredes celulares ou a alguns organelos (como as mitocôndrias). As funções da peroxidase nas plantas variam consoante a sua localização nas células.

A peroxidase solúvel está envolvida no balanço hormonal, biossíntese de etileno, integridade da membrana e controlo da respiração, isto é, está relacionada com o controlo metabólico do amadurecimento dos frutos podendo ser usada como um índice do amadurecimento e senescência.

A peroxidase insolúvel está relacionada com a regulação do crescimento das plantas, uma vez que tem uma função na formação e no controlo das propriedades mecânicas da parede celular, pois pensa-se que participa na deposição de lenhina no tecido vascular (Ingham *et al.*, 1998). Pode também ter um efeito degradativo nos frutos e vegetais, uma vez que pode contribuir para o processo de acastanhamento e amolecimento dos frutos (Whitaker, 1994).

A actividade da peroxidase está também relacionada positivamente com a resistência das plantas a um ataque patogénico. O efeito preciso das peroxidases na reacção de defesa das plantas em resposta a um ataque patogénico ainda não está completamente esclarecido. Contudo, *in vitro*, há indicação que a peroxidase na presença de um dador de hidrogénio e de um peróxido produz produtos tóxicos (por exemplo, fenóis oxidados) que são letais para os microorganismos mas, *in vivo*, este facto ainda não foi comprovado. O aumento da actividade da peroxidase na célula infectada pode inibir a multiplicação de vírus e o seu alastramento a outras partes da planta, pois como as peroxidases estão envolvidas na biossíntese de lenhina existe a lenhificação dos tecidos infectados criando uma barreira aos microorganismos (Esnault e Chibbar, 1997).

2.5 – Aplicações da Peroxidase na Indústria

O interesse no estudo da peroxidase tem aumentado ao longo dos tempos, não só para conhecer a sua função fisiológica, mas devido à sua possível aplicação industrial ou analítica. As enzimas têm uma função importante na indústria, embora a peroxidase não seja uma enzima muito utilizada. No entanto é uma das enzimas utilizadas na indústria de lacticínios como um método rápido de determinar a presença de antibióticos no leite. Utilizando carboxipeptidases, D-aminoácido oxidase e peroxidase ocorre uma reacção cromática quantitativa que é inibida na presença de alguns antibióticos (Tucker e Woods, 1995).

A estabilidade térmica e a tendência para a regeneração da enzima, especialmente em vegetais pouco ácidos, induzem a necessidade de aplicação de um branqueamento ou pasteurização, condições que podem deteriorar a qualidade dos frutos, nomeadamente a cor, a consistência e o sabor, assim como perdas de valor nutritivo. Por outro lado, a presença de enzimas activas está demonstrada estar relacionada com a perda de sabor e descoloração. Este é um problema grave em indústrias alimentares, sendo esta provavelmente a razão pela qual a estabilidade térmica é a característica mais estudada desta enzima (Vámos-Vigyázó, 1981).

As enzimas são cada vez mais utilizadas para o tratamento de resíduos produzidos pela indústria, pois além de actuarem em poluentes específicos, este é um método mais

rápido e simples de realizar do que os métodos convencionais. Peroxidases provenientes de diversas fontes têm sido usadas para o tratamento de águas residuais contendo contaminantes, uma vez que após ser activada pelo peróxido de hidrogénio a peroxidase pode catalisar uma grande variedade de compostos aromáticos tóxicos, como por exemplo fenóis, bifenóis, anilinas, benzidinas e aminas aromáticas (Karam e Nicell, 1997).

O uso da peroxidase a nível biotecnológico tem tido desenvolvimentos recentes, tais como a utilização desta enzima na preparação de moléculas orgânicas quirais necessárias para a síntese enzimática de um grande número de compostos (Colonna *et al.*, 1999).

2.6 – Peroxidase em Frutos e Vegetais

Segundo estudos realizados em diversos frutos e vegetais, aparentemente os frutos apresentam uma actividade de peroxidase inferior do que a maioria dos vegetais e, destes, o rábano bravo é o que tem a maior actividade (Vámos-Vigýázó, 1981).

Diversos estudos revelam que a actividade de peroxidase nas plantas está associada com a ocorrência de um número significativo de isoperoxidasas, tendo estas um papel primordial nas funções e propriedades da peroxidase nos frutos e vegetais (Robinson *et al.*, 1989). Os pontos isoeléctricos das isoenzimas de peroxidase provenientes de diversas plantas variam de 3,5 a 9,5 aproximadamente, indicando a existência de isoperoxidasas aniónicas e catiónicas. Normalmente, as isoperoxidasas mais básicas estão associadas às paredes celulares (McLellan e Robinson, 1983). Estas isoperoxidasas diferem em algumas propriedades, como a sua sensibilidade ao calor e o pH óptimo, assim como outras características físicas e catalíticas (Khan e Robinson, 1993a).

Na tabela IV é apresentado um resumo dos processos de purificação da peroxidase e de algumas características das isoenzimas purificadas de alguns frutos e vegetais, descritas na bibliografia.

Tabela IV – Características de algumas isoenzimas purificadas de diferentes frutos e vegetais.

<i>Fonte</i>	<i>Nº de Isoenzimas</i>	<i>Técnicas de Purificação</i>	<i>Ponto Isoelétrico</i>	<i>Massa Molecular (kDa)</i>	<i>Referência</i>
Couve de Bruxelas	4	Cromatografia de troca iónica	9,8; 9,0; 3,9; 3,0	-	McLellan e Robinson (1987)
	17	Focagem isoelétrica	-	-	
Couve-flor	3	Cromatografia hidrofóbica	-	-	Lee <i>et al.</i> (1984)
Ervilha	3	Cromatografia de troca iónica	?9,0; 7,0	-	Halpin <i>et al.</i> (1989)
Maçã	3	Cromatografia de troca iónica	8,9; 4,7; 4,4 – 4,5	-	Moulding <i>et al.</i> (1988)
Manga	6	Cromatografia de troca iónica	9,6; 8,9	22; 27; 40	Khan e Robinson (1993a)
Melão	4	Focagem isoelétrica	8,6; 8,4; 5,4; 3,7	-	Rodríguez-Lopez <i>et al.</i> (2000b)
Morango	2	Cromatografia de troca iónica	10,0; 9,5	65,5; 58,1	Civello <i>et al.</i> (1995)
Nabo	2	Focagem isoelétrica	3,6	42	Agostini <i>et al.</i> (1999)
	3	HPLC – troca iónica	8,5; 3,0; 3,0	39 - 43	Duarte-Vázquez <i>et al.</i> (2000)
Papaia	5 (solúvel)	Cromatografia de troca iónica	-	41	Silva <i>et al.</i> (1990)
	3 (ligada)	Cromatografia de troca iónica	-	54	
Pepino	3	Electroforese em gel de poliacrilamida	-	-	Miller <i>et al.</i> (1990)
Pimenta	2	Cromatografia de troca iónica e afinidade	3,8	50	Pomar <i>et al.</i> (1997)
Rábano bravo	7	Cromatografia de troca iónica	-	-	Shannon <i>et al.</i> (1966)

Tabela IV– Características de algumas isoenzimas purificadas de diferentes frutos e vegetais (Continuação).

<i>Fonte</i>	<i>Nº de Isoenzimas</i>	<i>Técnicas de Purificação</i>	<i>Ponto Isoelétrico</i>	<i>Massa Molecular (kDa)</i>	<i>Referência</i>
Rabanete	6	Cromatografia de troca iónica	9,0; 8,6; 4,0; 4,0; 3,5; 3,0	45; 44; 43; 43; 31; 50	Lee e Kim (1994)
Soja	3	Cromatografia de troca iónica, afinidade e hidrofóbica	-	37	Sessa e Anderson (1981)
Soja (planta)	15 - 20	Focagem isoelétrica	-	-	Chen e Mabrouk (2000)
Tabaco	1	Cromatografia de troca iónica	3,5	36	Gazaryan e Lagrimini (1996)
Tomate	1	FPLC – troca iónica	3,5	-	Marangoni <i>et al.</i> (1989)
	1	Cromatografia de troca iónica	-	46	Kokkinakis e Brooks (1979); Rodríguez-López <i>et al.</i> (2000a)
	8	Focagem isoelétrica	2 - 4	43	Heidrich <i>et al.</i> (1983)
Uva	6	Focagem isoelétrica	9,4–9,8; 7,7–8,2; 3,5–3,9	-	Robinson <i>et al.</i> (1989)

Capítulo II – Materiais e Métodos

1 – Material Biológico

As azeitonas (*Olea europaea* L. cv. Negrinha do Douro) utilizadas neste estudo foram fornecidas em fresco, pela empresa Maçarico Lda., em dois estados de amadurecimento, identificadas pela cor: pretas (colheita de 1999) e verdes (colheita de 2001).

As azeitonas, após chegarem ao laboratório, foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 – Preparação do Material Biológico

As azeitonas foram descaroçadas e convertidas em “pó de acetona” segundo o método utilizado por Moreno e Fernández-Bolaños (1985). Este método foi realizado com o objectivo de romper a parede celular, facilitar a saída das enzimas e retirar a gordura e algumas impurezas, tendo também a vantagem do “pó de acetona” obtido ser estável durante muito tempo, mantendo as enzimas inalteradas.

A 100 g de azeitonas descaroçadas e trituradas foi adicionado 1 L de acetona arrefecida previamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta mistura foi homogeneizada durante 2 minutos num Ultraturrax (Janke & Kunkel – T25) a 13500 rpm. O homogeneizado foi filtrado sob vácuo com filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C). O resíduo foi lavado com acetona fria, aproximadamente 250 mL, até o filtrado ser incolor (normalmente três lavagens). Em cada lavagem a mistura foi homogeneizada usando o Ultraturrax.

O pó obtido foi seco à temperatura ambiente durante 30 minutos, com agitação ocasional para evitar a formação de aglomerados. Depois de seco, o pó foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo as enzimas estáveis durante mais de um ano. A extracção enzimática foi realizada a partir deste “pó de acetona”.

3 – Extracção da Peroxidase

A extracção da peroxidase foi baseada no método descrito por Yemenicioglu *et al.* (1998) para a extracção da enzima solúvel e ligada às paredes celulares. O tampão de extracção usado incluía cloreto de sódio, de modo a possuir a força iónica necessária para libertar a enzima ligada ionicamente às paredes celulares (Price e Stevens, 1989). A polivinilpirrolidona (PVPP) adicionada ao tampão de extracção tem como função absorver os compostos fenólicos libertados, evitando a inactivação das enzimas (Gacesa e Hubble, 1990). A remoção dos compostos fenólicos é também importante para a redução da cor do extracto enzimático.

A 20 g de “pó de acetona” foram adicionados 250 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 contendo NaCl 1 M e polivinilpirrolidona 1% (m/v). A suspensão foi agitada durante 30 minutos a 4 °C. Ao fim desse tempo a mistura foi centrifugada (centrifuga Sigma 3K30) a 20000 g durante 20 minutos a 4 °C. Ao resíduo obtido foram adicionados 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 e a mistura foi novamente agitada e centrifugada a 20000 g durante 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos na primeira e segunda extracção foram misturados e correspondem ao extracto enzimático contendo a peroxidase solúvel e ligada ionicamente à parede celular.

4 – Purificação da Peroxidase

4.1 - Precipitação

A precipitação da peroxidase foi realizada baseada no método utilizado por Sessa e Anderson (1981). A precipitação selectiva foi usada para eliminar uma parte das proteínas contaminantes, pois o valor de força iónica que provoca a precipitação varia para diferentes proteínas.

A todo o extracto enzimático obtido foi adicionado sulfato de amónio lentamente e com agitação até 30% de saturação, deixando-se decorrer a precipitação durante 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi removido por centrifugação a 20000 g durante 20

minutos a 4 °C. Ao sobrenadante com actividade de peroxidase foi adicionado mais sulfato de amónio até 90% de saturação, tendo a precipitação ocorrido durante aproximadamente 3 horas a 4 °C, com agitação suave. O precipitado foi recolhido por centrifugação, como referido anteriormente, e dissolvido no mínimo volume possível de tampão fosfato 0,05 M a pH 7,0. Os sais presentes no extracto enzimático foram retirados usando uma coluna de dessalinização (Sephadex G-25), utilizando água destilada como eluente. O extracto dessalinizado foi concentrado por liofilização.

4.2 – Métodos Cromatográficos

4.2.1 – Cromatografia de Exclusão Molecular

O procedimento adoptado para a cromatografia de exclusão molecular teve como base o procedimento descrito por Civello *et al.* (1995). Nesta cromatografia foi escolhida como fase estacionária o gel Sephacryl S-300 (Pharmacia), pois fracciona proteínas com pesos moleculares entre 10 e 1500 kDa e, segundo a bibliografia, a peroxidase de origem vegetal tem um peso molecular que varia entre 30 e 54 kDa (Vámos-Vigyázó, 1981). Como fase móvel foi utilizado um tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 6,0 e usou-se uma coluna (Pharmacia XK 16/40) com 30 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro.

O gel de Sephacryl empacotado na coluna foi equilibrado com tampão fosfato referido no parágrafo anterior, a um fluxo de 15 mL/h. Todo o resíduo obtido na precipitação com sulfato de amónio (2 mL) foi aplicado na coluna e eluído com o mesmo tampão fosfato e ao mesmo fluxo de 15 mL/h, tendo sido recolhidas fracções de 1,45 mL num colector de fracções RediFrac (Pharmacia).

A determinação do volume morto e do volume de eluição total foi realizada eluindo uma solução contendo dextrana azul e dicromato de potássio com um fluxo de 15 mL/h. A dextrana azul tem uma massa molecular elevada (2000 kDa), podendo o seu volume de eluição ser considerado o volume morto da coluna. O dicromato de potássio como tem uma massa reduzida é eluído no volume total de eluição da coluna. A eluição foi seguida por leitura das absorvâncias a 625 nm (dextrana azul) e 500 nm (dicromato de potássio) em todas as fracções de 1,45 mL recolhidas (Figura 5).

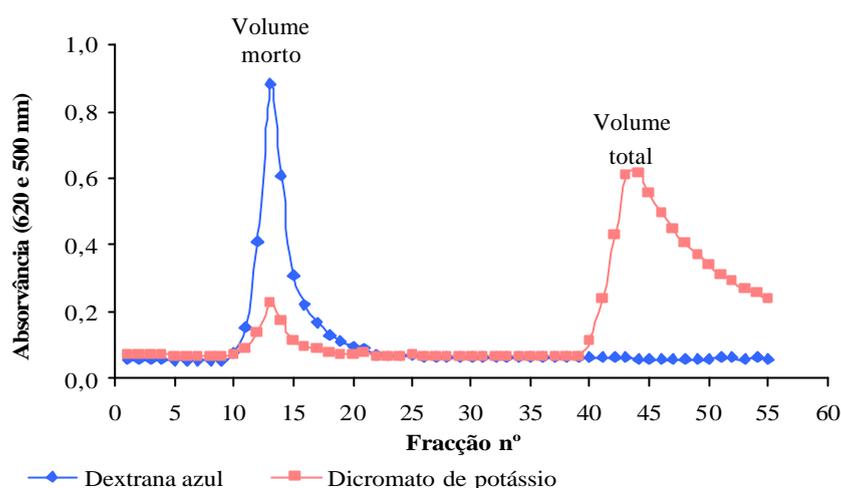


Figura 5 – Perfil de eluição da dextrana azul e do dicromato de potássio em Sephacryl S-300.

Os caudais foram mantidos constantes com a ajuda de uma bomba peristáltica (Gilson – Minipuls 3). Todas as soluções introduzidas na coluna foram previamente filtradas e degaseificadas sob vácuo, com agitação durante 30 minutos. A cromatografia foi realizada a 4 °C.

A eluição foi seguida por determinação da actividade da peroxidase (procedimento descrito no ponto 5 deste capítulo), pela presença de proteínas por leitura da absorvância a 280 nm (resíduos de aminoácidos aromáticos da tirosina, triptofano e fenilalanina) e 210 nm (ligação peptídica da proteína). As fracções que apresentavam actividade foram recolhidas, congeladas em azoto líquido e conservadas a -20 °C para posterior utilização.

4.2.2 – Cromatografia de Troca Iónica

Na purificação da peroxidase optou-se por utilizar duas cromatografias de troca iónica, uma catiónica e outra aniónica, pois pretendia-se separar todas as isoenzimas presentes na amostra (isoenzimas catiónicas e aniónicas). Assim, a fracção que foi excluída (não necessitou de sal para ser eluída) na troca catiónica foi aplicada na coluna de troca aniónica. Este procedimento foi realizado com base no descrito por Khan e Robinson (1993b).

Na cromatografia de troca catiónica foi escolhido um gel CM-Sepharose (Pharmacia), dado que o carboximetilo é um trocador catiónico fraco, ou seja, pode ser usado para valores de pH entre 6 e 10. O eluente usado foi o tampão fosfato 0,05 M e pH 7 com um gradiente linear de concentração de NaCl de 0 a 1,3 M, verificou-se que esta concentração de NaCl era suficiente para eluir todas as proteínas mesmo as mais adsorvidas à coluna. O extracto obtido na cromatografia de exclusão molecular ou na precipitação com sulfato de amónio foi aplicada na coluna (~ 10 mL) com um fluxo de 15 mL/h, fazendo-se primeiro a eluição com 30 mL de tampão de equilíbrio e depois com 50 mL de tampão com o gradiente linear de NaCl, utilizando o mesmo fluxo.

Para a cromatografia de troca aniónica foi seleccionada como fase estacionária uma resina DEAE-Sephacel (Pharmacia), que é um trocador aniónico fraco permitindo a separação numa gama de pH de 2 a 9. Como fase móvel foi escolhido o tampão Tris/HCl 0,01 M e pH 7 com um gradiente linear de concentração de NaCl entre 0 e 1,0 M, uma vez que a força iónica do gradiente permitia uma boa separação e era suficiente para eluir completamente todas as proteínas da resina. A fracção com actividade de peroxidase proveniente da troca catiónica (fracção eluída sem o gradiente de sal) foi colocada na coluna (~ 5 mL), a um fluxo de 20 mL/h. A eluição foi realizada ao mesmo fluxo com 50 mL do tampão de eluição e posteriormente com 50 mL de tampão com gradiente linear de sal.

Em ambas as cromatografias utilizaram-se colunas (Pharmacia XK 16/20) com 10 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. As fracções recolhidas tinham volumes de 2,0 mL (RediFrac, Pharmacia), tendo os caudais sido mantidos com uma bomba peristáltica (Gilson – Minipuls 3). Todas as soluções introduzidas nas colunas foram previamente filtradas e degaseificadas sob vácuo, com agitação durante 30 minutos. As cromatografias foram realizadas a 4 °C.

A todas as fracções obtidas foi determinada a actividade da peroxidase (procedimento descrito no ponto 5 deste capítulo) e a presença de proteínas pela determinação da absorvância a 280 e 210 nm. As fracções que apresentavam actividade foram recolhidas, congeladas em azoto líquido e conservadas a -20 °C para posterior utilização.

5 – Determinação da Actividade da Peroxidase

A actividade enzimática da peroxidase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Worthington (1978). Este método consiste na formação de compostos corados devido à oxidação do substrato por acção da enzima, sendo a alteração de cor seguida espectrofotometricamente.

A solução de substrato utilizada para a determinação da actividade da peroxidase era constituída por peróxido de hidrogénio 0,975 mM, fenol 83,1 mM e 4-aminoantipirina 1,15 mM em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. A solução de substrato, preparada no próprio dia, foi equilibrada a 25 °C. A 1,450 mL de substrato foram adicionados 50 µL de extracto enzimático. O aumento da absorvância foi determinado a 510 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-160A) durante 60 segundos, a 25 °C. Como medida de actividade usou-se a velocidade inicial, tendo sido determinada pelo declive da porção linear da curva que relaciona a absorvância e o tempo.

Com o intuito de facilitar a comparação de valores de actividade de diferentes passos de purificação, definiu-se uma unidade de actividade de peroxidase como sendo equivalente a uma variação de 0,001 unidades de absorvância a 510 nm por minuto, nas condições acima descritas.

A determinação de actividade enzimática a pH diferente de 7,0 foi realizada com tampão citrato 0,1 M para pH 4,0 e 5,0, tampão fosfato 0,1 M para pH entre 6,0 e 8,0 e tampão Tris/HCl 0,1 M para pH 9,0. Todas as outras condições mantiveram-se constantes com excepção do tempo de análise que foi alterado de 60 para 300 segundos.

6 – Quantificação de Proteína

Na determinação da quantidade de proteína nos extractos enzimáticos foi utilizado o método do ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Este método tem a vantagem de ser mais tolerante à presença de compostos que normalmente interferem noutros métodos de determinação de proteína. O BCA é mais tolerante a vários detergentes (usados para solubilizar proteínas) e agentes desnaturantes.

O método consiste na reacção, em meio alcalino, do ião cúprico com as ligações peptídicas da proteína formando um complexo, sendo reduzido a ião cuproso. O ião reduzido combina-se com duas moléculas de BCA, dando origem a um produto de cor púrpura intensa com um máximo de absorvância a 562 nm.

A solução A era constituída por BCA- Na_2 1% (m/v), carbonato de sódio 2% (m/v), tartarato de sódio 0,16% (m/v), hidróxido de sódio 0,4% (m/v) e bicarbonato de sódio 0,85% (m/v), com pH de 11,25, acertado com hidróxido de sódio 50% (m/v) ou bicarbonato de sódio sólido. A solução B consistia numa solução de sulfato de cobre pentahidratado 4% (m/v). A solução C foi preparada no momento da utilização e era constituída pelos reagentes A e B, numa proporção 100:2. A 50 μL de amostra foi adicionado 1 mL de reagente C e em seguida a mistura foi agitada e deixada a reagir durante 30 minutos a 60 $^\circ\text{C}$. A temperatura de incubação foi alterada de 30 para 60 $^\circ\text{C}$, pois aumenta a sensibilidade do método segundo Harris e Angal (1989). Após 30 minutos para arrefecer e estabilizar a mistura, a absorvância foi medida a 562 nm contra o branco, que continha 50 μL de tampão.

A quantidade de proteína foi determinada através de uma curva de calibração, em que foi utilizada como proteína padrão a albumina do soro bovino (Figura 6), tendo sido todos os ensaios realizados em triplicado.

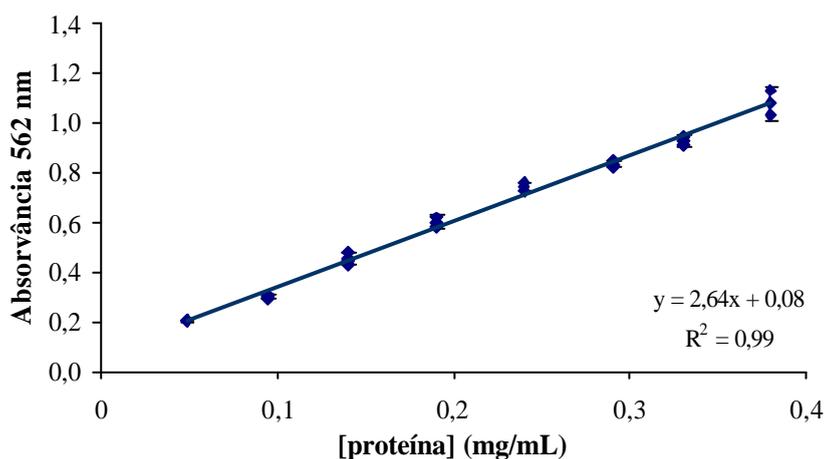


Figura 6 – Curva de calibração para a quantificação de proteína pelo método do BCA.

7 – Electroforese em Gel de Poliacrilamida

Neste método a separação de proteínas é dependente de uma ou da combinação de três propriedades principais: carga total, hidrofobicidade relativa e forma e tamanho das moléculas. Esta separação ocorre melhor num meio de suporte para impedir os efeitos de transferência e difusão que ocorrem durante a electroforese, para facilitar a imobilização das proteínas separadas, sendo normalmente usada a poliacrilamida (Harris e Angal, 1989).

Dois tipos de electroforese em gel foram utilizados: electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e focagem isoeléctrica.

7.1 - SDS-PAGE

A separação electroforética das isoenzimas purificadas foi realizada em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (Shewry *et al.*, 1995), num sistema Mini Protean II (BioRad) ou num sistema Phast System (Pharmacia). Esta técnica foi utilizada na determinação da massa molecular e subunidades de todas as isoenzimas purificadas nas cromatografias iónicas.

Na electroforese em sistema Mini Protean II, após vários ensaios preliminares determinou-se que a composição ideal do gel seria: acrilamida 15% e bis-acrilamida 0,4% em Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 e na presença de SDS 0,1% (m/v). O gel concentrador era constituído por acrilamida 4% e bis-acrilamida 0,4% em Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 e na presença de SDS 0,1% (m/v). A polimerização dos géis foi iniciada por adição de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 42,5 mM e catalisada por adição de persulfato de amónio (APS) 0,05% (m/v).

As amostras aplicadas no gel foram misturadas com igual volume de solução desnaturante constituída por Tris 62,5 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v) e deixadas em ebulição durante 5 minutos. No caso das amostras reduzidas foi adicionado β -mercaptoetanol 5% (v/v) à solução desnaturante, que reduz as pontes dissulfureto e separa as subunidades de proteína. As amostras aplicadas em todos os géis de electroforese em SDS-PAGE foram previamente dialisadas (membrana Snake Skin,

limite de exclusão de 3500 Da, Pierce) contra água e concentradas por corrente de azoto. A separação electroforética decorreu durante 45 minutos a 150 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução Tris 25 mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 0,1%.

Na separação electroforética em sistema Phast System foram usados géis de poliacrilamida PhastGel Homogeneous 20 (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante (“Separation Technique File N° 111”). Neste caso as amostras aplicadas no gel foram preparadas usando uma solução desnaturante Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, SDS 2,5% (m/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v).

Em ambos os sistemas a mobilidade electroforética das proteínas foi comparada com a mobilidade electroforética de proteínas de massa molecular conhecida, incluídos em todos os géis de electroforese. Os padrões utilizados foram os seguintes: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116,5 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina (66,2 kDa), ovalbumina do soro (45 kDa), anidrase carbónica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) (Bio-Rad). A curva de calibração utilizada para calcular as massas moleculares das isoenzimas é apresentada na figura 7.

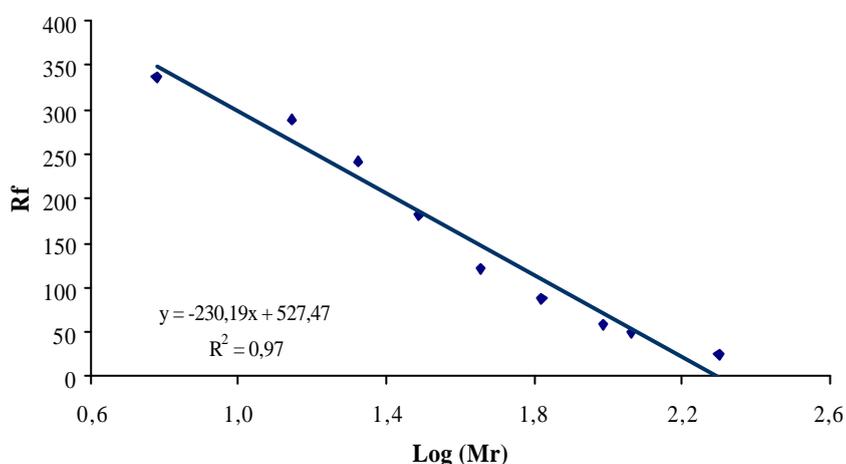


Figura 7 – Curva de calibração para a determinação da massa molecular por SDS-PAGE. (Rf = distância percorrida pela proteína)

7.2 – Focagem Isoelétrica (IEF)

A focagem isoelétrica é um método muito sensível na separação e determinação da pureza de uma solução de enzimas. Este método foi usado para determinar o ponto isoelétrico de todas as isoenzimas purificadas.

Esta técnica foi efectuada em sistema Phast System (Pharmacia) utilizando géis de poliacrilamida PhastGel 3-9. A separação das isoenzimas foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante (“Separation Technique File N° 100”). Todas as amostras aplicadas foram previamente dialisadas (membrana Snake Skin, limite de exclusão de 3500 Da, Pierce) contra a água e concentradas por corrente de azoto.

O ponto isoelétrico das proteínas separadas foi determinado por comparação com a mobilidade de proteínas de pontos isoelétricos conhecidos, separadas no mesmo gel. Os padrões utilizados continham: fitocianina, (pI 4,45; 4,65; 4,75), γ -lactoglobulina B (pI 5,1), anidrase carbónica bovina (pI 6,0), anidrase carbónica humana (pI 6,5), mioglobina (pI 6,8; 7,0), hemoglobina humana A (pI 7,1), hemoglobina humana C (pI 7,5), lecitina (pI 7,8; 8,0; 8,2) e citocromo c (pI 9,6) (Bio-Rad). Na figura 8 está representada a curva de calibração utilizada para calcular os pontos isoelétricos das isoenzimas purificadas.

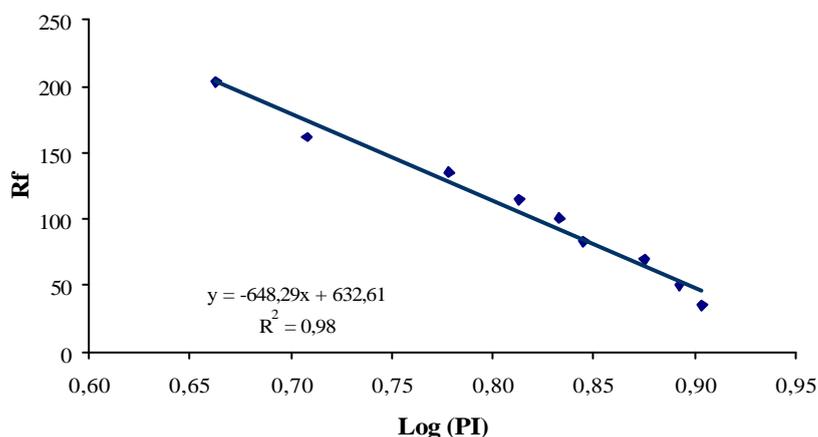


Figura 8 – Curva de calibração para a determinação do ponto isoelétrico por focagem isoelétrica. (Rf = distância percorrida pela proteína)

7.4 – Revelação

A revelação das proteínas separadas em electroforese em sistema Mini Protean II e em sistema Phast System foi efectuada utilizando dois métodos de coloração: a coloração com azul de Coomassie foi utilizada para quantidades de proteína de cerca 1 µg por banda e a coloração com nitrato de prata foi aplicada para revelação de quantidades de proteína de cerca 0,1 µg por banda (Shewry *et al.*, 1995).

A coloração dos géis com azul de Coomassie (R 250) foi efectuada com uma solução deste corante a 0,25% (m/v) em solução de metanol 25% (v/v) e ácido acético 5% (v/v). Após a separação electroforética os géis foram colocados num recipiente contendo a solução de coloração durante 30 minutos. A descoloração efectuou-se com uma solução de composição semelhante à descrita anteriormente, mas na ausência de corante.

A revelação com nitrato de prata foi realizada segundo o método descrito por Moreno *et al.* (1985). Os géis a revelar com nitrato de prata foram imersos numa solução de metanol 40% (v/v) e formaldeído 13,5% (v/v) durante 10 minutos, em seguida o gel foi lavado duas vezes com água destilada durante 5 minutos. O passo seguinte consistiu na colocação do gel numa solução de Na₂S₂O₃ 0,02% (m/v) durante 1 minuto, sendo posteriormente lavado duas vezes com água destilada durante 20 segundos. O gel foi então imerso numa solução de nitrato de prata 0,1% (m/v) durante 30 minutos na ausência de luz. A solução de revelação foi preparada antes da utilização e era constituída por carbonato de sódio 3% (m/v), formaldeído 0,05% (v/v) e Na₂S₂O₃ 0,000016% (m/v). Aos géis colocados nesta solução foram adicionados 12,5 mL de ácido cítrico 2,3 M quando apareceram as bandas, com o objectivo de parar a reacção de revelação. O gel foi deixado a agitar nesta mistura durante 10 minutos e em seguida foi colocado em água destilada na qual os géis ficaram armazenados até à sua secagem.

No caso das proteínas analisadas por focagem isoelectrica em Phast System, a coloração foi sempre efectuada com nitrato de prata, visto ser o método para o qual se obtiveram melhores resultados.

Os géis de SDS-PAGE, após terem sido digitalizados, foram secos entre membranas de celulose (Bio-Rad). As respectivas imagens foram convertidas numa matriz representativa dos diferentes níveis de cor (pseudo-imagem).

De modo a obter-se o perfil electroforético de cada amostra, as respectivas pseudo-imagens foram tratadas segundo um filtro proposto por Barros *et al.* (1997). Este tratamento, baseado na teoria da distribuição das probabilidades conjuntas, calcula uma distribuição (normal) mais provável para a informação contida na imagem do gel. O perfil electroforético de cada amostra é obtido tendo em conta o máximo dessa distribuição.

8 – Caracterização Cinética

Os parâmetros cinéticos do fenol e peróxido de hidrogénio, constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima, para reacção de oxidação catalisada pela peroxidase foram determinados para a isoenzima principal (A4) purificada da azeitona preta.

Os valores das constantes cinéticas e velocidade máxima foram calculados a partir das curvas de Lineweaver-Burk. Os valores de actividade foram obtidos utilizando o método de determinação de actividade de peroxidase descrito no ponto 5 deste capítulo, alterando apenas as concentrações de fenol ou peróxido de hidrogénio. As concentrações de fenol utilizadas no meio de reacção foram de 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 150 mM e as de peróxido de hidrogénio 0,08, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0 e 4,0 mM. Todos os valores de actividade foram determinados em duplicado para cada concentração de substrato.

9 – Análise de Açúcares

A determinação dos açúcares neutros foi realizada através da sua transformação em acetatos de alditol, sendo estes determinados por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia proposta por Blakeney *et al.* (1983) e Harris *et al.* (1988), tal como descrito por Coimbra *et al.* (1994). Estas determinações de açúcares foram realizadas para a isoenzima mais abundante da cromatografia de troca aniónica (A4), em duplicado.

A 1,5 mL de amostra foram adicionados 0,7 mL de água destilada e 200 µL de H₂SO₄ 72%. O tubo, depois de rolhado e agitado, foi incubado a 100 °C durante 2,5 horas. Ao hidrolisato, depois de arrefecido, foram adicionados 200 µL de 2-desoxiglucose (1 mg/mL) como padrão interno. Depois de bem agitado, foi retirado 1 mL da solução

anterior para um tubo lavado onde foram adicionados 0,2 mL de NH_3 a 25%, para a neutralização do ácido, e 0,1 mL de uma solução de NaBH_4 150 mg/mL em NH_3 3 M (esta solução preparada na hora), para a redução dos açúcares a alditóis. A solução foi agitada e incubada a 30 °C durante 1 hora. O tubo foi arrefecido em gelo e de seguida foram adicionados 100 μL de ácido acético glacial, em duas adições de 50 μL , com o objectivo de eliminar o excesso de NaBH_4 . A 0,3 mL da solução anterior foram adicionados 0,45 mL de 1-metilimidazole (catalisador da reacção) e 3 mL de anidrido acético, para a transformação dos alditóis em acetatos de alditol. A solução foi agitada e deixada a reagir a 30 °C durante 30 minutos. Ao fim dos 30 minutos a solução foi arrefecida em gelo. O anidrido acético em excesso foi eliminado pela adição de 4,5 mL de água destilada e os acetatos de alditol foram extraídos com 3 mL de diclorometano. A solução foi agitada vigorosamente e centrifugada (baixa rotação) durante cerca de 30 segundos para uma melhor separação das fases. A fase aquosa foi removida e à fase orgânica foram adicionados mais 3 mL de água destilada e 2 mL de diclorometano, tendo sido novamente agitada, centrifugada e separada a fase aquosa. A fase orgânica foi lavada duas vezes com 3 mL de água destilada para a remoção completa do 1-metilimidazole. A fase orgânica final foi transferida para um tubo lavado e o diclorometano foi evaporado sob atmosfera de azoto a 40 °C. Foi adicionado 1 mL de acetona para eliminar algum resíduo de água que ainda poderia existir e a acetona foi evaporada sob atmosfera de azoto a 40 °C, tendo este passo sido repetido duas vezes.

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 7 μL de acetona e analisados por cromatografia gasosa num cromatógrafo HP-5890. A coluna utilizada foi uma DB-1 (J&W) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme. O programa de temperaturas foi: início a 100 °C durante 1 minuto, subida de 2 °C/min até aos 220 °C, mantendo-se nesta temperatura durante 1 minuto. O injector e o detector estavam com temperaturas de 220 °C e 250 °C, respectivamente. O gás de arraste usado foi o hidrogénio a um fluxo de 39,5 mL/min.

Os tempos de retenção dos acetatos de alditol presentes na amostra foram comparados com padrões (uma mistura de açúcares neutros conhecidos) que foram transformados pelo procedimento descrito anteriormente e analisados por cromatografia de gás. Foram analisadas várias misturas com diferentes concentrações dos vários padrões para determinar a resposta do cromatógrafo. Assim, foi determinada uma relação linear entre a área do pico obtido e a concentração de açúcar padrão. Através dos factores de

resposta de cada uma foi então possível determinar a quantidade de cada açúcar presente na amostra. Os padrões utilizados foram: ramnose, fucose, xilose, arabinose, manose, galactose, glucose, glucosamina e galactosamina (Sigma). A amostra foi injectada duas vezes, assim como a sua réplica, sendo o valor final obtido uma média destes quatro valores.

10 – Estabilidade Térmica

O estudo do efeito do tratamento térmico da peroxidase da azeitona foi realizado no extracto enzimático parcialmente purificado (precipitação com sulfato de amónio), uma vez que as isoperoxidasas não foram purificadas em quantidade suficiente.

O extracto enzimático foi colocado num banho termostatizado a 35, 40, 50 e 60 °C. Alíquotas de 300 μ L foram retiradas ao fim de 5, 10 e 15 minutos de aquecimento e colocadas imediatamente em gelo. A actividade de peroxidase foi quantificada, segundo o método descrito anteriormente para a determinação da actividade de peroxidase (ponto 5), para todas as alíquotas obtidas e para o extracto enzimático antes do aquecimento.

A regeneração de actividade foi também estudada, sendo a actividade de peroxidase determinada após 24 horas de armazenamento a 4 °C das amostras obtidas para as diferentes temperaturas e tempos de aquecimento.

A quantificação da actividade de peroxidase foi realizada em triplicado para todas as amostras, tanto no estudo do efeito do tratamento térmico como na regeneração de actividade.

Capítulo III – Resultados e Discussão

1 – Purificação

1.1 – Introdução

Na purificação da peroxidase da polpa da azeitona foi necessário determinar o processo de purificação mais eficiente, uma vez que apenas estão descritos na bibliografia métodos de purificação para outros frutos e vegetais. Nesta primeira parte do trabalho, onde foram testadas as técnicas para a obtenção do melhor protocolo de purificação, foram apenas utilizadas azeitonas pretas. Nas azeitonas verdes apenas foi aplicado o procedimento de purificação da azeitona já otimizado.

A principal dificuldade encontrada durante a purificação da peroxidase da polpa da azeitona foi a reduzida actividade da enzima presente. Por esta razão reduziu-se ao mínimo a manipulação da amostra entre as várias técnicas de purificação para evitar mais perdas. Durante o procedimento os contaminantes principais foram os polifenóis, presentes em grande quantidade principalmente nas azeitonas pretas, sendo a sua eliminação muito difícil.

A pureza das isoperoxidasas obtidas, assim como o sucesso dos diferentes passos da purificação, foram avaliados pela determinação da actividade específica (actividade catalítica relacionada com o conteúdo de proteína), factor de purificação (comparação da actividade específica de um passo com a do extracto original) e o valor de RZ (razão entre as absorvâncias a 402 e 280nm). Para a avaliação da pureza das isoenzimas foi também utilizado o SDS-PAGE e a focagem isoelectrica.

1.2 – Extração da Peroxidase

O objectivo era extrair a maior quantidade de enzima, podendo esta ser extracelular e/ou intracelular, logo o primeiro passo foi a ruptura das células e membranas para a extração da enzima do tecido. Em tecidos vegetais um procedimento muito utilizado é a preparação do “pó de acetona”, sendo esta uma excelente maneira de romper as células das plantas (Whitaker, 1994). Foi testado outro método de extração em que a amostra não era convertida em “pó de acetona”, a enzima foi extraída homogeneizando directamente a polpa de azeitona com o tampão de extração, mas teve de ser abandonado, pois o extracto ficava com muitas impurezas e a gordura da polpa de azeitona não era facilmente eliminada.

A escolha do tampão utilizado para a extração depende da enzima, se é solúvel ou ligada às membranas e do tipo de tecido. Como o objectivo era retirar o máximo de peroxidase dos tecidos foi utilizado um tampão com concentração de sal com a força iónica necessária para retirar a enzima ligada ionicamente às paredes celulares.

O extracto obtido continha grandes quantidades de compostos fenólicos que poderiam ser oxidados enzimaticamente (polifenoloxidase), na presença de oxigénio, formando produtos que podem inactivar rapidamente um elevado número de enzimas. Assim, os compostos fenólicos devem ser eliminados nos passos iniciais da purificação, sendo para isso usada a polivinilpolipirrolidona (PVPP) que evita a inactivação das enzimas devido à adsorção dos compostos fenólicos libertados (Gacesa e Hubble, 1990). A remoção dos compostos fenólicos é também importante para a redução de cor do extracto enzimático, pois estes compostos têm a desvantagem de absorverem fortemente a 280 nm, absorvância usada para a monitorização de proteínas.

O tampão utilizado para a extração da peroxidase da polpa de azeitona foi seleccionado depois de terem sido testados vários tampões de extração. A tabela V apresenta os valores de actividade de peroxidase obtidos para os diferentes tampões usados. Também foram testados o pH do tampão utilizado e o tempo de extração (Tabelas VI e VII, respectivamente).

Tabela V – Efeito do tampão de extracção (tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 7,0) na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C durante 30 minutos).

<i>Composição do tampão de extracção</i>	<i>Actividade (U/g polpa de azeitona)</i>
Tampão com NaCl 1 M	0,68 ? 0,06
Tampão com NaCl 1 M e EDTA 1 mM	0,39 ? 0,03
Tampão com NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v)	1,99 ? 0,04

Tabela VI – Efeito do pH do tampão de extracção na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C com tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v) durante 30 minutos).

<i>pH do tampão de extracção</i>	<i>Actividade (U/g polpa de azeitona)</i>
6,0	0,84 ? 0,07
6,5	1,35 ? 0,01
7,0	2,11 ? 0,05
7,5	1,14 ? 0,09
8,0	1,02 ? 0,22

Tabela VII – Efeito do tempo de extracção na actividade de peroxidase nos extractos obtidos (extracção a 4 °C com tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 contendo NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v)).

<i>Tempo de extracção (min)</i>	<i>Actividade (U/g polpa de azeitona)</i>
10	0,54 ? 0,01
20	1,43 ? 0,01
30	2,29 ? 0,01
40	1,97 ? 0,08
50	2,02 ? 0,08
60	2,32 ? 0,11

A eficiência na extracção da peroxidase verificou-se ser maior para o tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 7,0 contendo NaCl 1 M e PVPP 1% (m/v), sendo este o tampão escolhido para a extracção. O tempo de extracção foi testado verificando-se que acima dos 30 minutos não existe uma melhoria significativa na extracção da peroxidase e como muito tempo de extracção implica maior risco de proteólise e perda de actividade da enzima, optou-se por extrair durante 30 minutos.

1.3 – Precipitação da Peroxidase

A precipitação é apenas usada nos primeiros passos da purificação para eliminar uma grande parte dos contaminantes e tem também a vantagem de concentrar, uma vez que nesta fase existia um volume apreciável de extracto.

Num processo de precipitação é necessário prestar atenção à concentração de sal que deve ser usado, pois proteínas com propriedades diferentes precipitam a diferentes forças iónicas. Verificou-se que a 30% de saturação a actividade de peroxidase mantinha-se constante no sobrenadante, podendo assim eliminar algumas proteínas contaminantes. Tentou-se aumentar a percentagem de saturação para 40%, mas a esta força iónica a peroxidase começava a precipitar.

Testou-se também a força iónica necessária para a completa precipitação da peroxidase, no menor tempo possível e com a melhor percentagem de recuperação enzimática. Uma saturação de 80% de sulfato de amónio não era suficiente, pois ao fim de 8 horas ainda existia actividade significativa de peroxidase no sobrenadante. Assim passou a ser utilizada uma saturação de 90%, pois ao fim de três horas a actividade de peroxidase era nula no sobrenadante, o que indica que praticamente toda a peroxidase havia precipitado.

1.4 – Fraccionamento por Cromatografia de Exclusão Molecular

O objectivo principal da cromatografia de exclusão molecular, que separa as proteínas com base no seu peso molecular, era retirar uma parte das impurezas do extracto

enzimático obtido após a precipitação. Esta técnica normalmente permite percentagens de recuperação de actividade enzimática perto dos 100% (Gacesa e Hubble, 1990). Assim o resíduo obtido na precipitação com sulfato de amónio (saturação de 90%) foi aplicado na coluna de cromatografia de exclusão molecular.

Na figura 9 é visível que a actividade de peroxidase dividiu-se por três grupos de picos. Uma estimativa das massas moleculares que correspondem a cada grupo foi realizada através da gama de fraccionamento da resina e dos volumes morto (V_0) e total de eluição (V_t) determinados como descrito no capítulo II. Verificou-se que o primeiro grupo corresponde a uma massa de 1300 kDa, o segundo a 800 kDa e o terceiro a uma gama de massas entre 25 e 60 kDa. O primeiro e o segundo grupos correspondem a massas moleculares muito elevadas o que parece indicar a presença de agregados proteicos, provavelmente devido à elevada concentração de amostra aplicada na coluna, ou de agregados proteína-polifenóis. O terceiro grupo corresponde à mistura das diferentes isoenzimas presentes na polpa de azeitona preta, uma vez que a gama de massas moleculares que abrange é similar às massas moleculares de peroxidases de diversos frutos e vegetais (Tabela IV).

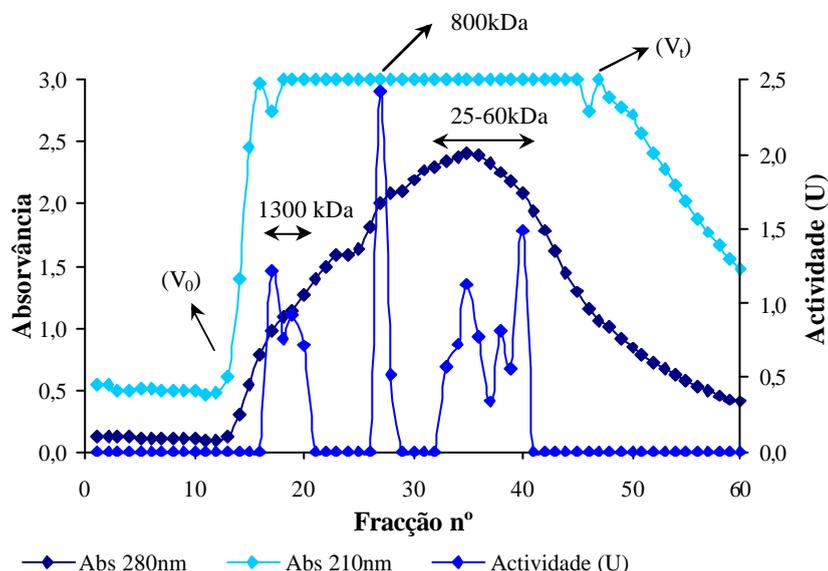


Figura 9 – Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-300.

Na tabela VIII são apresentados os valores de actividade específica, percentagem de recuperação de actividade e factor de purificação obtidos após a realização da

cromatografia de exclusão molecular. Pela análise destes valores verificou-se que o terceiro grupo de picos era aquele que possuía a maior percentagem de actividade de peroxidase, enquanto que os outros dois apresentaram actividades muito reduzidas. Apesar da terceira fracção apresentar a maior quantidade de peroxidase, a percentagem de recuperação é muito reduzida (cerca de 2%) e não existe uma melhoria no factor de purificação em relação ao passo anterior de purificação.

Tabela VIII – Resultados de passos do processo de purificação da peroxidase.

	<i>Actividade Total (U)</i>	<i>Actividade Específica (U/mg)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Factor de Purificação</i>
Extracto Impuro	8800	10	100	1
Prec. (NH ₄) ₂ SO ₄	2900	20	33	2
Exclusão molecular				
Fracção 1	13	1	0,1	0,1
Fracção 2	32	3	0,3	0,3
Fracção 3	190	20	2	2

Os resultados apresentados na tabela VIII correspondem apenas um procedimento de purificação, mas este foi realizado mais duas vezes tendo-se obtido sempre os mesmos resultados.

A utilização desta técnica durante o procedimento de purificação foi excluída, pois verificou-se não existir vantagem na purificação da peroxidase, uma vez que a actividade de peroxidase era dividida por três fracções e não existia a purificação da peroxidase como se pode concluir pelos factores de purificação obtidos. A perda de actividade enzimática foi muito elevada mesmo na fracção mais abundante. Assim, optou-se por aplicar o resíduo obtido na precipitação com sulfato de amónio directamente na coluna de troca cationica, após ter sido dessalinizado e liofilizado.

1.5 – Fraccionamento por Cromatografias de Troca Iónica

Num processo de purificação uma das etapas de maior utilidade é frequentemente o uso de uma coluna de cromatografia de troca iónica, aumentando de maneira significativa a

actividade específica e permitindo uma elevada recuperação da actividade enzimática total, podendo ser utilizada nos últimos passos da purificação (Gacesa e Hubble, 1990).

Esta técnica permite também determinar o número de isoperoxidasas existentes no extracto, uma vez que a separação é baseada na carga da proteína. Consoante o tipo de resina de troca iónica usada, catiónica ou aniónica, as isoperoxidasas podem também ser classificadas em catiónicas e aniónicas consoante o seu ponto isoeléctrico seja básico ou ácido, respectivamente (Khan e Robinson 1993a).

Uma vez que não existia nenhum estudo sobre a peroxidase da polpa da azeitona e a bibliografia referia que extractos de peroxidase de muitos frutos e vegetais contêm um variado número de isoenzimas (Shannon *et al.*, 1966; Moulding *et al.*, 1988; McLellan e Robinson, 1987; Lee e Kim, 1994; Khan e Robinson, 1993b), resolveu-se aplicar o extracto enzimático obtido após a precipitação com sulfato de amónio numa coluna de troca catiónica e posteriormente numa de troca aniónica.

Na cromatografia de troca catiónica obtiveram-se cinco picos de actividade de peroxidase (Figura 10). O primeiro pico representa a maior parte da actividade enzimática, em comparação com os restantes quatro picos, correspondendo à fracção de peroxidase que não foi retida pela resina tendo sido eluída antes do gradiente de concentração de sal. Os outros quatro picos de actividade obtidos foram eluídos com o gradiente de concentração de sal, indicando que o extracto enzimático contém quatro isoperoxidasas catiónicas. A nomenclatura utilizada para as isoenzimas isoladas reflecte as suas posições quando separadas pela cromatografia, sendo as quatro isoenzimas catiónicas referidas daqui para a frente como C1, C2, C3 e C4.

Na figura 10 é visível que a absorvância a 280 nm de todas as fracções é muito reduzida não havendo diferenças significativas, enquanto que a 210 nm as absorvâncias são superiores. Apesar de ambas as absorvâncias estarem relacionadas com a quantidade de proteína presente, a 280 nm absorvem não só os resíduos aromáticos da proteína como também todos os compostos aromáticos presentes onde se inclui os polifenóis. Enquanto que a 210 nm absorve a ligação peptídica da proteína, tendo esta um menor risco de erro na quantificação de proteína. Verificou-se pelos valores de absorvância a 210nm, que a maior quantidade de proteínas eluídas não coincide com os picos de actividade demonstrando que uma quantidade significativa de proteínas contaminantes foram eliminadas.

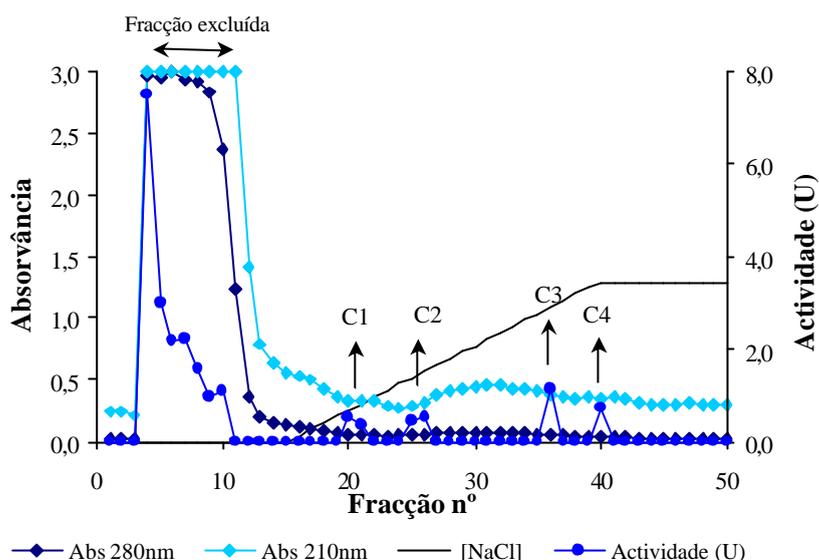


Figura 10 – Cromatografia de troca catiónica em CM-Sepharose da azeitona preta.

A fracção excluída na cromatografia de troca catiónica, fracção constituída provavelmente por proteínas com carga negativa, foi aplicada numa coluna de troca aniónica para serem separadas as isoperoxidases aniónicas. Os resultados obtidos na coluna de troca aniónica revelaram a presença de mais quatro isoperoxidases, pois foram eluídos quatro picos com actividade de peroxidase (Figura 11). A nomenclatura das isoenzimas aniónicas, tal como nas catiónicas, reflecte a ordem com que foram obtidas na cromatografia, passando a ser referidas como A1, A2, A3 e A4.

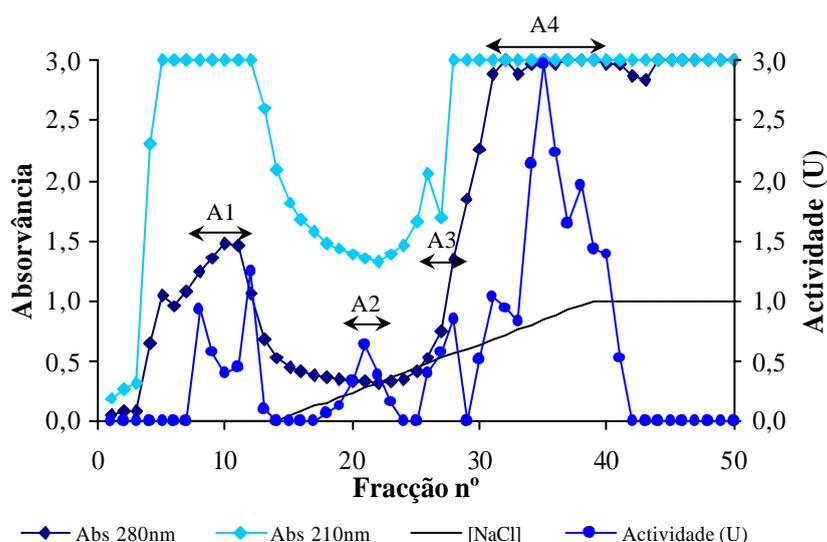


Figura 11 – Cromatografia de troca aniónica em DEAE-Sephacel da azeitona preta.

O primeiro pico foi eluído antes da aplicação do gradiente da concentração de sal, o que significa que a isoenzima deve ter um ponto isoelétrico próximo de 7, o pH a que foi realizada a cromatografia, pois não tem carga para ficar retida em nenhuma das resinas de troca iónica. As outras três isoenzimas foram eluídas todas muito próximas, o que indica que devem ter pontos isoelétricos relativamente próximos.

A primeira e a última isoenzimas eluídas da coluna de troca aniónica apresentam uma forte coloração, principalmente a última, provavelmente não só devido à cor da peroxidase purificada mas também devido à presença de polifenóis que apesar de todos os passos de purificação não se conseguiram eliminar totalmente, o que é visível no perfil de absorvância a 280 nm apresentado na figura 11. No entanto, estas duas isoenzimas eluídas da coluna de troca aniónica foram as fracções em que a quantidade de proteína era maior (Tabela IX), o que está de acordo com o perfil de absorvância a 210 nm.

1.6 – Resumo da Purificação da Peroxidase da Azeitona Preta

Na tabela IX são apresentados os valores obtidos na purificação da peroxidase da polpa de azeitona preta. O procedimento de purificação, depois de optimizado, foi realizado três vezes tendo sido obtidos, no geral, sempre os mesmos resultados. Contudo, os valores apresentados nesta tabela são referentes a apenas um procedimento de purificação, aquele a partir do qual foram obtidas as quantidades de isoenzimas suficientes para a sua caracterização posterior.

Na purificação da peroxidase da azeitona preta determinou-se que esta era constituída por oito isoenzimas. Estas isoperoxidasas têm factores de purificação acima de 100, excepto para as C1, A2 e A4 (Tabela IX). A pureza de todas isoenzimas foi confirmada por SDS-PAGE (Figuras 14 e 15) e algumas também por focagem isoelétrica, tendo em todos os casos sido detectada apenas uma banda de proteína nos géis.

As isoperoxidasas purificadas, após diálise e concentração por corrente de azoto para posterior caracterização, apresentavam uma cor acastanhada e esta é uma característica das peroxidases contendo o ião ferro e pertencentes ao grupo das ferriprotoporfirinas.

A actividade total de peroxidase, como é natural, diminui durante todo o processo de purificação, mas existe um aumento da actividade específica (Tabela IX).

Tabela IX – Resultados da purificação da peroxidase da polpa da azeitona preta.

	<i>Actividade</i>					
	<i>Actividade Total (U)</i>	<i>Proteína (mg)</i>	<i>Específica (U/mg)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Factor de Purificação</i>	<i>RZ</i>
Extr. Impuro	18 x 10 ³	27 x 10 ²	6,4	100	1,0	0,7
Prec. (NH ₄) ₂ SO ₄	10 x 10 ³	6,8 x 10 ²	15	57	2,3	0,5
Liofilização	2,1 x 10 ³	2,7 x 10 ²	7,7	12	1,2	0,6
Catiónica	2,0 x 10 ³	2,1 x 10 ²	10	11	1,5	0,5
(fracção excluída)						
Catiónica 1 (C1)	42	0,10	4,4 x 10 ²	0,2	69	0,4
Catiónica 2 (C2)	86	0,07	12 x 10 ²	0,5	194	0,4
Catiónica 3 (C3)	33	0,03	9,6 x 10 ²	0,2	151	0,6
Catiónica 4 (C4)	52	0,04	14 x 10 ²	0,3	220	0,8
Aniónica 1 (A1)	1,5 x 10 ³	1,9	7,7 x 10 ²	8,4	121	0,3
Aniónica 2 (A2)	2,7 x 10 ²	0,52	5,3 x 10 ²	1,6	83	0,4
Aniónica 3 (A3)	7,0 x 10 ²	0,72	9,7 x 10 ²	3,9	152	0,3
Aniónica 4 (A4)	10 x 10 ³	29	3,5 x 10 ²	57	54	0,6

Pela análise da tabela IX verifica-se que a liofilização foi o passo do procedimento de purificação onde se perdeu mais actividade enzimática. Contudo, outros métodos de concentração foram utilizados, como a ultrafiltração em membranas YM3 (limite de exclusão de 3 kDa da Millipore), mas a perda da actividade foi semelhante (cerca de 40%), assim optou-se por concentrar o extracto por liofilização.

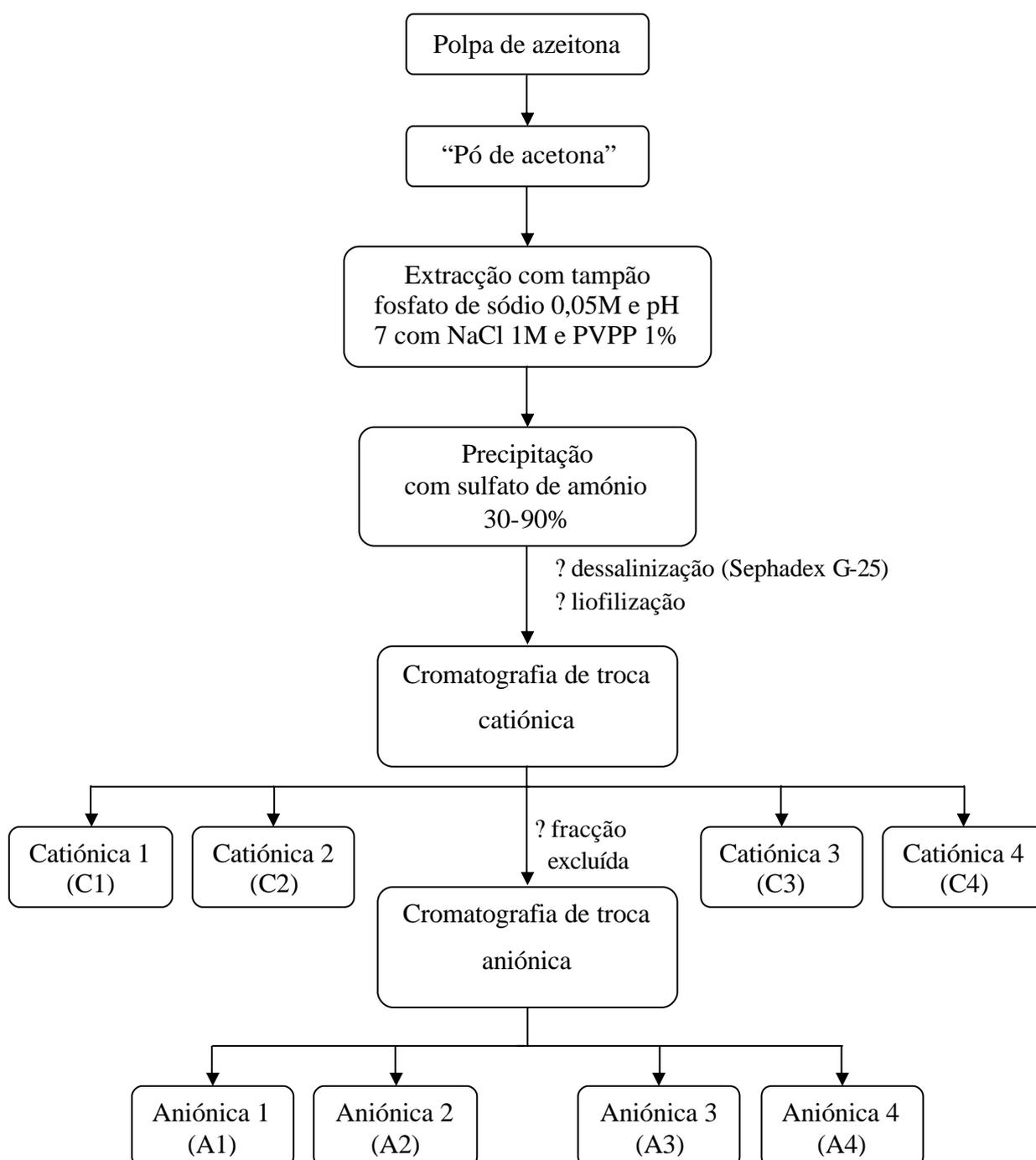
O valor RZ é a razão entre a absorção a 402 e 280 nm, sendo este valor utilizado para expressar a pureza de uma peroxidase. Este valor foi calculado para todas as isoenzimas purificadas e os valores obtidos em todas estavam abaixo de 1 (Tabela IX). Normalmente uma peroxidase pura, apresenta um RZ entre 2 e 4, mas este índice pode ser diferente para peroxidases provenientes de diversas fontes. Na bibliografia foram também referidos valores de RZ igualmente baixos, nomeadamente para isoperoxidasas purificadas no nabo (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000) e no tomate (Heidrich *et al.*, 1983).

Pela análise da tabela verifica-se que a peroxidase de azeitonas pretas é constituída predominantemente por isoperoxidasas aniónicas, uma vez que estas representam 98% da actividade total de todas as isoenzimas. A isoenzima A4 é a mais abundante, apresentando 79% da actividade total de todas as isoperoxidasas purificadas. A quantidade de proteína é também mais reduzida nas isoenzimas catiónicas em comparação com as catiónicas.

1.7 – Protocolo de Purificação da Peroxidase da Azeitona

O objectivo da primeira parte do trabalho era estabelecer um procedimento de purificação da peroxidase da polpa da azeitona. Após várias tentativas conseguiu-se estabelecer um protocolo em que se verificou uma adequada separação entre as diversas isoperoxidasas.

O protocolo de purificação pode ser esquematizado da seguinte forma:



1.8 –Purificação da Peroxidase da Azeitona Verde

As enzimas têm um papel fundamental no amadurecimento das azeitonas de mesa, provocando o amolecimento dos frutos e também a alteração da cor de verde para púrpura ou preto. As peroxidases, por exemplo, podem ser utilizadas como um índice do amadurecimento e senescência de alguns frutos. A actividade da peroxidase na polpa da azeitona e o seu perfil isoenzimático em relação com o seu crescimento e amadurecimento não foi ainda estudado.

Neste trabalho, achou-se então importante verificar as possíveis alterações que ocorrem na peroxidase com o amadurecimento da azeitona. Assim, depois de se ter estabelecido um procedimento de purificação da peroxidase da azeitona, este foi utilizado para isolar e purificar as isoperoxidasas da azeitona verde, da mesma variedade mas de uma colheita posterior à das azeitonas pretas.

Na cromatografia de troca catiónica foram obtidos os mesmos picos de actividade, isto é, o mesmo número de isoperoxidasas catiónicas do que as observadas para as azeitonas pretas (Figura 12). A principal diferença encontrada foi em relação às isoperoxidasas aniónicas, pois foi isolada mais uma isoenzima (Figura 13). Assim, nas azeitonas verdes foram purificadas quatro isoperoxidasas catiónicas e cinco aniónicas.

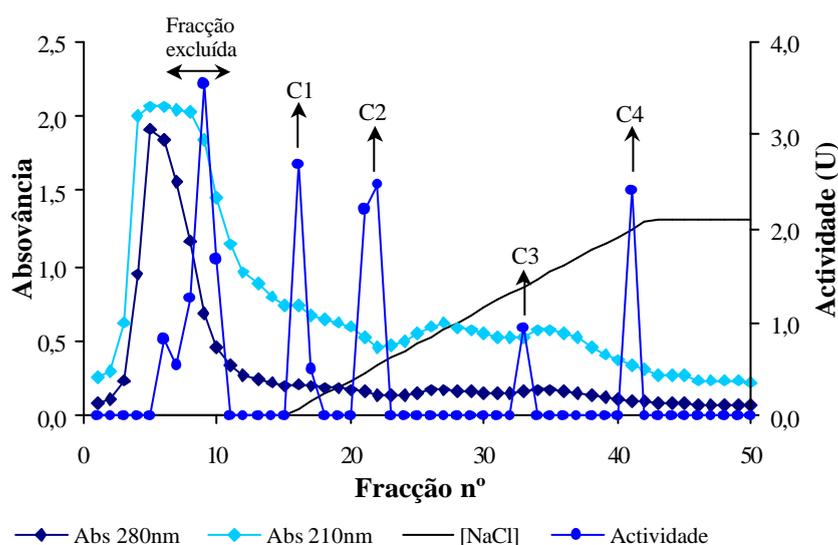


Figura 12 – Cromatografia de troca catiónica em CM-Sepharose da azeitona verde.

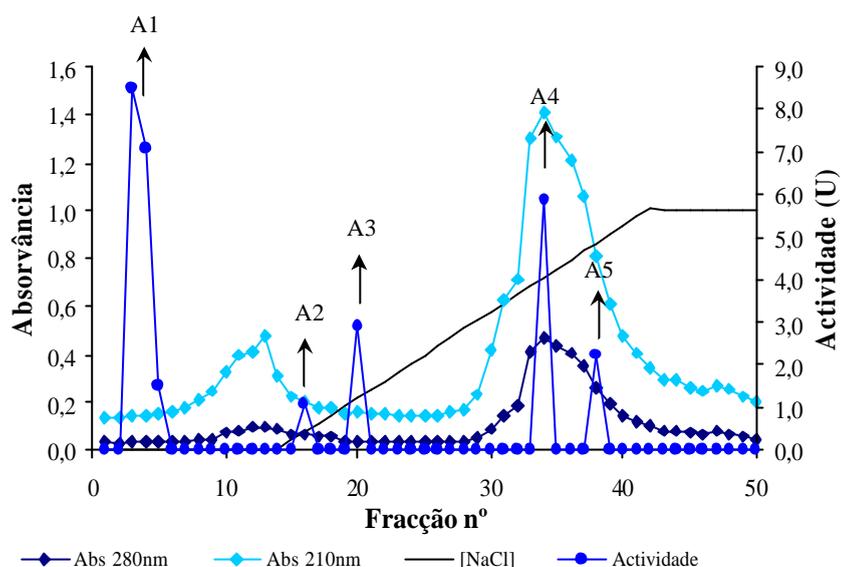


Figura 13 – Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel da azeitona verde.

A isoenzima A5 poderá ser apenas devida ao facto de na azeitona preta a isoenzima A4 corresponder a um grande número de fracções (29 a 41), como é visível na figura 11, onde poderá estar incluída também a isoenzima A5 separada no caso das azeitonas verdes. Esta melhor separação pode ocorrer devido à concentração do extracto enzimático nas azeitonas pretas ser elevada.

Na tabela X apresentam-se os resultados obtidos na purificação das isoperoxidasas da polpa de azeitona verde. No geral, os graus de purificação e actividades específicas das isoperoxidasas purificadas são superiores em relação às da polpa de azeitona preta, enquanto que a recuperação da actividade enzimática foi inferior neste grau de amadurecimento (Tabela IX). Segundo um estudo realizado por Civello *et al.* (1995) no morango foram também obtidas actividades específicas superiores nos frutos verdes em comparação com os maduros.

Os valores de RZ obtidos para estas isoperoxidasas purificadas foram inferiores a 1,0 com excepção para a isoenzima A3 que é ligeiramente superior (Tabela X). Estes valores são idênticos aos das isoperoxidasas purificadas a partir da polpa de azeitona preta, apresentados na tabela IX.

Tabela X – Resultados da purificação da peroxidase da polpa da azeitona verde.

	<i>Actividade</i>					
	<i>Actividade Total (U)</i>	<i>Proteína (mg)</i>	<i>Específica (U/mg)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Factor de Purificação</i>	<i>RZ</i>
Extr. Impuro	140 x 10 ²	1,8 x 10 ³	7,4	100	1,0	0,7
Prec. (NH ₄) ₂ SO ₄	31 x 10 ²	50	60	23	8,5	0,5
Liofilização	50	0,06	4,2	0,4	28	0,7
Catiónica	12 x 10 ²	1,3	1,2 x 10 ²	0,9	17	0,4
(fracção excluída)						
Catiónica 1 (C1)	12 x 10 ²	0,23	5,2 x 10 ²	0,9	71	0,5
Catiónica 2 (C2)	19 x 10 ²	0,09	21 x 10 ²	1,4	280	0,7
Catiónica 3 (C3)	19	0,02	7,5 x 10 ²	0,1	102	0,7
Catiónica 4 (C4)	48	0,03	17 x 10 ²	0,4	238	0,9
Aniónica 1 (A1)	26 x 10 ²	0,01	330 x 10 ²	1,9	4507	0,4
Aniónica 2 (A2)	21	0,01	42 x 10 ²	0,2	572	0,6
Aniónica 3 (A3)	58	0,01	320 x 10 ²	0,4	4410	1,2
Aniónica 4 (A4)	12 x 10 ²	0,06	19 x 10 ²	0,9	258	0,3
Aniónica 5 (A5)	45	0,02	27 x 10 ²	0,3	373	0,3

Nas azeitonas verdes as isoperoxidasas aniónicas, apesar de serem em maior número, representam 57% da actividade total obtida para todas as isoenzimas, enquanto que para as azeitonas pretas a diferença na actividade total entre as isoperoxidasas aniónicas e catiónicas era muito significativa, uma vez que as aniónicas representavam quase a totalidade de actividade de peroxidase. Nestas azeitonas também não se verificou a predominância de uma isoperoxidase em relação às outras, como ocorreu nas pretas com a isoenzima A4.

2 – Caracterização

2.1 - Introdução

Após a realização do processo de purificação das oito isoenzimas da polpa da azeitona preta, procedeu-se à sua caracterização para um melhor conhecimento de cada uma, dado que noutras frutos foi determinada a existência de várias isoenzimas de peroxidase com propriedades diferentes.

O maior problema encontrado nesta parte do trabalho foi a pouca quantidade de enzima purificada. Por esta razão não foi possível determinar algumas características em todas as isoperoxidases das azeitonas pretas. A isoenzima A4 como é a mais abundante (Tabela IX), sendo não só a que tem maior actividade catalítica mas a que existia em maior quantidade, foi a usada para determinar todas as características: massa molecular, subunidades, ponto isoeléctrico, efeito da temperatura e do pH, características cinéticas e análise da parte glicosídica. A todas as outras isoenzimas as características estudadas foram a massa molecular, o número de subunidades e o ponto isoeléctrico.

Nas isoperoxidases da polpa de azeitona verde a actividade total de peroxidase obtida em todas as isoenzimas foi muito reduzida, assim como a quantidade de proteína. Por esta razão a única caracterização que foi possível realizar foi a determinação dos pesos moleculares e subunidades das isoperoxidases catiónicas, uma vez que estas isoenzimas tinham quantidades de proteína total, no geral, superiores em relação às aniónicas (Tabela X).

A peroxidase é referida como uma das enzimas mais estáveis presente em muitos frutos e vegetais. Devido a este facto achou-se importante estudar a estabilidade térmica na caracterização das isoperoxidases purificadas da polpa da azeitona. Contudo, isto revelou-se impraticável pois era necessário uma elevada quantidade de isoenzima purificada com uma boa actividade enzimática, que não se obteve mesmo aumentando a quantidade de polpa de azeitona usada na purificação. Assim, optou-se por estudar a estabilidade térmica do extracto enzimático parcialmente purificado (após a precipitação com sulfato de amónio), considerando-se este extracto representativo da mistura das isoperoxidases.

2.2 – Massa Molecular e Subunidades

A determinação da massa molecular das diferentes isoperoxidasas e o número de subunidades que as constituem foi efectuada por electroforese em SDS-PAGE. Os pesos moleculares foram calculados a partir das distâncias percorridas no gel em comparação com os padrões (Capítulo II, sub-capítulo 7.1). A determinação das subunidades foi realizada adicionando β -mercaptoetanol às amostras, pois este cliva as ligações por pontes dissulfureto, separando os diferentes peptídeos.

As isoenzimas catiónicas da azeitona preta apresentaram pesos moleculares de cerca de 66 (\pm 0,1) kDa para a C1, 69 (\pm 0,2) kDa para a C2, 64 (\pm 0,3) kDa para a C3 e 60 (\pm 0,5) kDa para a C4. O facto de se observar uma única banda de proteína com a mesma massa molecular para cada isoperoxidase, quer em meio redutor quer em meio não redutor, mostra que todas as isoenzimas são constituídas por apenas um peptídeo (Figura 14).

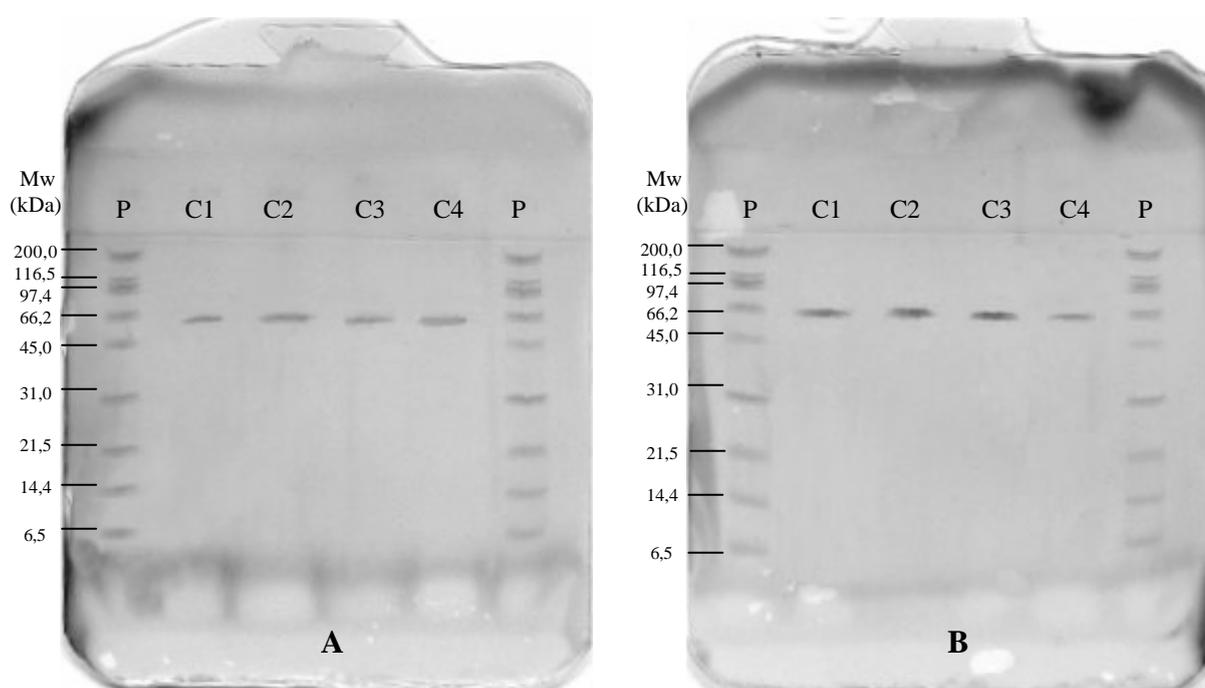


Figura 14 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas catiónicas da azeitona preta. **A** – não reduzidas; **B** – reduzidas com β -mercaptoetanol.

Os pesos moleculares obtidos para todas as isoperoxidasas aniônicas purificadas na azeitona preta foram inferiores em relação às catiônicas, pois têm valores na ordem dos 20 kDa, 18 (? 0,8) kDa para a A1, 20 (? 0,7) kDa para a A2, 20 (? 0,9) kDa para a A3 e 21 (? 0,4) kDa para a A4, sendo todas constituídas também por uma única cadeia de peptídeos, como é visível nos géis de SDS-PAGE da figura 15.

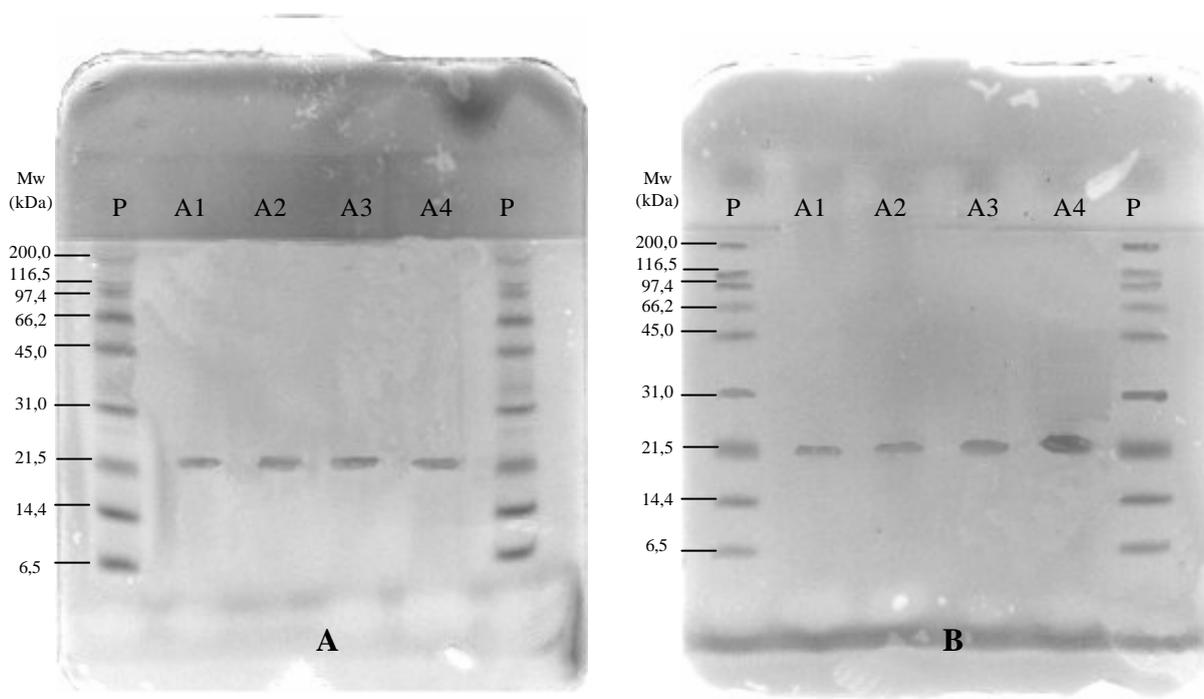


Figura 15 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas aniônicas da azeitona preta.
A – não reduzidas; **B** – reduzidas com β -mercaptoetanol.

Os pesos moleculares obtidos para todas as isoperoxidasas da azeitona preta confirmaram as estimativas realizadas através da cromatografia de exclusão molecular realizada para a otimização do protocolo de purificação (Sub-capítulo 1.4 deste capítulo), em que se verificou que o terceiro pico correspondia a uma mistura de isoperoxidasas com massas moleculares que variavam entre 25 e 60 kDa.

A ocorrência de apenas uma banda nos géis de SDS-PAGE para a isoenzima A4 da azeitona preta suporta a ideia de que nas azeitonas pretas não existe a isoenzima A5, confirmando que nas azeitonas verdes foi isolada mais uma isoenzima aniônica.

As massas moleculares determinadas são semelhantes aos valores descritos na bibliografia para diversos frutos e vegetais, em que as isoperoxidasas têm massas que

podem variar entre 20 e 66 kDa. Como exemplo, na manga as isoperoxidasas aniônicas têm peso molecular de cerca de 40 kDa e as catiónicas de 22 e 27 kDa (Khan e Robinson, 1993a), no morango são de 58,1 e 65,5 kDa para as isoenzimas catiónicas (Civello *et al.*,1995). Praticamente todas as isoperoxidasas purificadas demonstraram ser constituídas por apenas uma cadeia peptídica.

A figura 16 apresenta o gel de electroforese em SDS-PAGE, onde se pode verificar que apenas uma banda foi obtida para todas as isoenzimas catiónicas purificadas na polpa de azeitona verde. As massas moleculares calculadas revelaram que estas isoperoxidasas catiónicas têm uma massa de aproximadamente 18 (? 1,1) kDa, 18 (? 0,7) kDa e 17 (? 0,9) kDa para a C1, C2 e C3 respectivamente, enquanto que para a C4 foi obtido um valor de 70 (? 0,5) kDa.

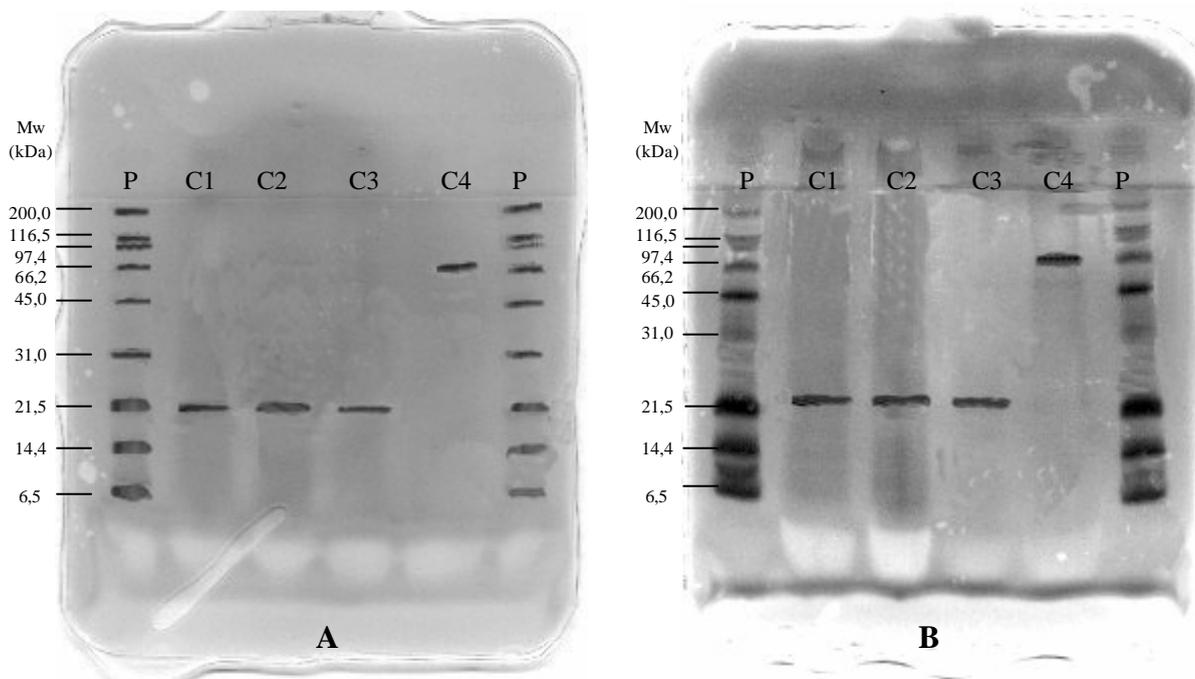


Figura 16 – Géis em SDS-PAGE das isoperoxidasas catiónicas da azeitona verde.
A – não reduzidas; **B** – reduzidas com β -mercaptoetanol.

As isoenzimas catiónicas demonstraram ser constituídas por apenas um peptídeo, pois apareceram as bandas com o mesmo peso molecular na electroforese após a redução com β -mercaptoetanol (Figura 16), tal como já se havia verificado para as isoenzimas da polpa de azeitona preta.

Em comparação com os pesos moleculares obtidos para as isoperoxidasas catiónicas das azeitonas pretas, que variam entre 60 e 70 kDa, os valores obtidos para as C1, C2 e C3 das azeitonas verdes são muito inferiores, embora semelhantes aos das aniónicas, enquanto que a C4 tem um valor idêntico.

Estas diferenças encontradas podem de facto estar relacionadas com o diferente estado de amadurecimento das azeitonas, uma vez que as isoperoxidasas aniónicas e catiónicas no mesmo fruto ou vegetal estão associadas com diferentes funções fisiológicas da peroxidase. As peroxidases básicas catalisam a biossíntese de algumas hormonas presentes nas plantas, nomeadamente o ácido indole-3-acético e o etileno, enquanto que as ácidas participam na última etapa da biossíntese da lenhina (Duarte-Vásquez *et al.*, 2000).

Contudo, as azeitonas utilizadas na purificação da peroxidase, além de estarem com graus de amadurecimento distintos, eram de colheitas de anos diferentes e apesar de serem da mesma variedade não existe a certeza de serem da mesma área geográfica, sendo que estes factores podem também influenciar o perfil e características das isoperoxidasas, como foi referido por Burnette (1977).

2.3 – Ponto Isoeléctrico

O ponto isoelectrico foi determinado para todas as isoperoxidasas purificadas por focagem isoelectrica utilizando géis de poliacrilamida PhastGel 3-9.

Na purificação das isoperoxidasas foram utilizadas duas colunas de cromatografia de troca iónica. Por esta razão, já existia uma estimativa para os pontos isoelectricos, de que as isoenzimas catiónicas teriam valores básicos (carga positiva a pH 7) e as aniónicas ácidos (carga negativa a pH 7), sendo mais básicos ou ácidos consoante foram mais retidos pelas resinas.

Para as isoenzimas catiónicas não foi possível realizar a focagem isoelectrica para obter os pontos isoelectricos porque, como já foi referido, a quantidade de proteína obtida na purificação era muito reduzida em comparação com as isoenzimas aniónicas, só tendo sido possível determinar a massa molecular e a presença de subunidades ligadas por pontes dissulfureto.

Os pontos isoelétricos obtidos para as isoperoxidasas aniônicas da azeitona preta foram 6,9 para as A1 e A2 e um valor próximo de 4,6 e 4,4 para as isoenzimas A3 e A4 respectivamente. Os valores foram calculados por comparação com proteínas padrão de pontos isoelétricos conhecidos. O gel de focagem isoelétrica com as bandas obtidas para as diferentes isoperoxidasas é apresentado na figura 17.

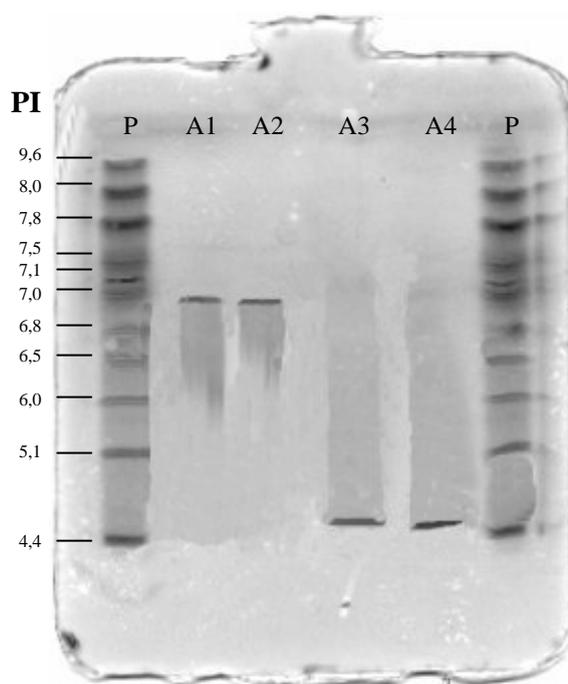


Figura 17 – Focagem isoelétrica das isoperoxidasas aniônicas da azeitona preta.

Estes pontos isoelétricos confirmam os valores estimados pela coluna de troca aniônica, pois a isoenzima A1, com um valor próximo de 7, foi eluída da coluna praticamente sem necessitar de sal e a A2 apesar de ter o mesmo ponto isoelétrico foi eluída separadamente, mas muito próximo, provavelmente porque tinha características físicas ligeiramente diferentes. Estas duas isoenzimas têm valores muito superiores em comparação com as A3 e A4, como já era previsto uma vez que estas precisaram de uma concentração de sal próximo de 1 M para serem excluídas da resina de troca iônica.

Vários autores referem a presença de peroxidases em diversos frutos e vegetais, constituídas por várias isoenzimas com diferentes valores de pontos isoelétricos (básicos, neutros e ácidos) (Halpin *et al.*, 1989; Lee e Kim, 1994).

2.4 – Efeito do pH

O efeito do pH na actividade da peroxidase foi estudado apenas para a isoenzima A4, pois era a que possuía maior actividade. A variação de actividade em função do pH foi estudada para valores de pH entre 4,0 e 9,0 sendo cada ensaio realizado pelo menos três vezes, utilizando o método de determinação de actividade descrito no capítulo II.

A isoenzima A4 apresenta uma actividade de peroxidase máxima a pH 7, nas condições experimentais utilizadas, como é visível na figura 18 onde se apresenta a curva da actividade de peroxidase em função do pH. A actividade é muito reduzida, menor do que 20% da actividade máxima, a pH inferior a 5,0 e superior a pH 8,0. A pH 9,0 existe um ligeiro aumento da actividade, em comparação com o pH 8,0. Este facto pode dever-se ao tampão usado para a análise ser diferente, uma vez que o pH óptimo também depende do tampão usado na determinação enzimática (Halpin *et al.*, 1989).

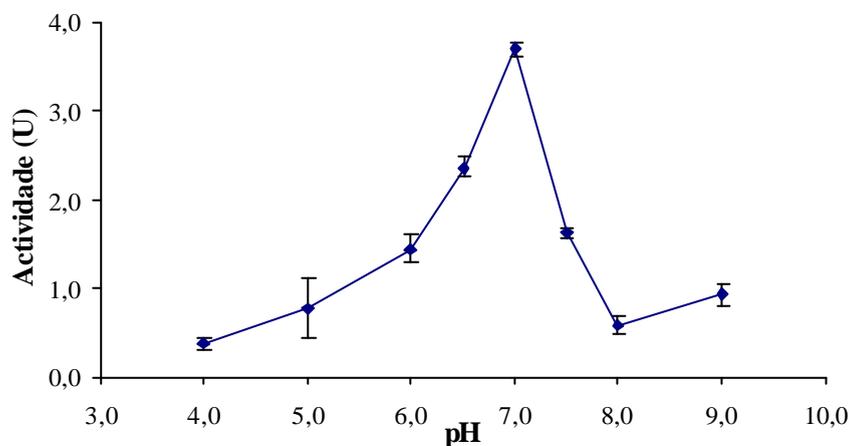


Figura 18 – Efeito do pH na actividade de peroxidase da isoenzima A4 a 25 °C.

O pH óptimo obtido é semelhante ao de outras isoperoxidasas caracterizadas para outros frutos e vegetais. Por exemplo, a couve-flor apresenta isoperoxidasas com um pH óptimo a 6,5 (Lee *et al.*, 1984); a actividade máxima para o morango (Civello *et al.*, 1995) e a papaia (Silva *et al.*, 1990) ocorre a pH 6,0; para a da ervilha é a 7,0 (Halpin *et al.*, 1989). Convém referir que a actividade máxima para determinado pH depende também do substrato dador de hidrogénio utilizado na determinação de actividade (Heidrich *et al.*,

1983) e em todos estes estudos foram utilizados substratos diferentes do fenol, substrato usado neste trabalho.

2.5 – Efeito da Temperatura

A variação da actividade de peroxidase em função da temperatura para a isoenzima A4 foi estudada para a gama de temperaturas de 15 a 60 °C, sendo cada ensaio realizado no mínimo três vezes. O método utilizado na determinação da actividade foi o descrito no capítulo II. O substrato usado na determinação da actividade de peroxidase (referido no capítulo II, sub-capítulo 5) foi incubado à temperatura pretendida durante pelo menos 30 minutos.

A actividade de peroxidase da isoenzima A4 é significativamente superior a 35 °C, nas condições experimentais acima referidas. Como é visível na figura 19, a uma temperatura superior a 50 °C a actividade é praticamente nula. A 25 °C, temperatura usada na determinação da actividade, os valores obtidos são reduzidos, sendo portanto esta isoenzima muito mais activa a temperaturas superiores, entre 30 e 35 °C.

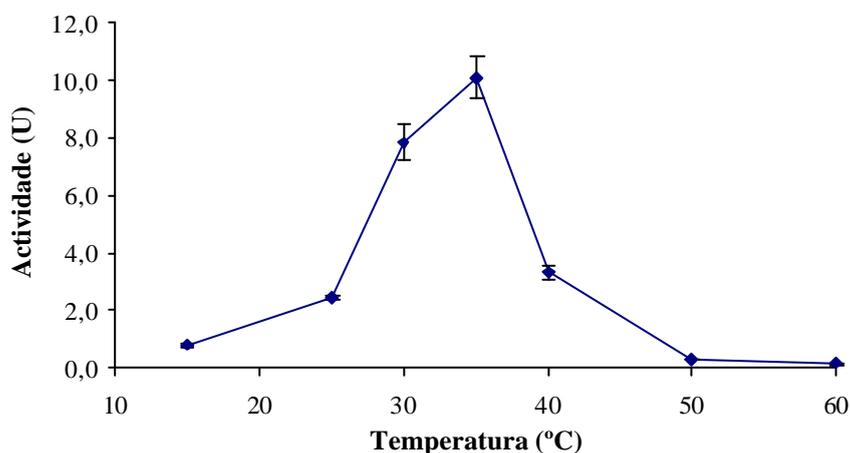


Figura 19 – Efeito da temperatura na actividade de peroxidase da isoenzima A4 a pH 7,0.

A temperatura óptima de cerca de 35 °C obtida para a isoenzima A4 é idêntica aos valores determinados para as isoperoxidasas de outros frutos e vegetais. Uma actividade máxima para uma temperatura de 40 °C foi descrita para uma isoenzima extraída da couve-

flor (Lee *et al.*, 1984) e do nabo (Duarte-Vásquez *et al.*, 2000) e uma temperatura óptima de 30 °C para a peroxidase do morango, segundo um estudo realizado por Civello *et al.* (1995).

2.6 – Caracterização Cinética

A caracterização cinética foi apenas realizada para a isoperoxidase A4, pois esta era a isoenzima purificada com actividade suficiente. Optou-se por determinar os parâmetros cinéticos, a constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima para as reacções de oxidação dos dois substratos utilizados na determinação de actividade de peroxidase, o fenol e o peróxido de hidrogénio.

A isoenzima A4 purificada obedece à cinética de Michaelis-Menten para concentrações de fenol entre 5 e 150 mM e para o peróxido de hidrogénio entre 0,08 e 4,0 mM. A concentração de saturação para o fenol é de cerca de 60 mM e do peróxido de hidrogénio é de cerca de 1 mM, como é visível nos gráficos das figuras 20 e 21, respectivamente.

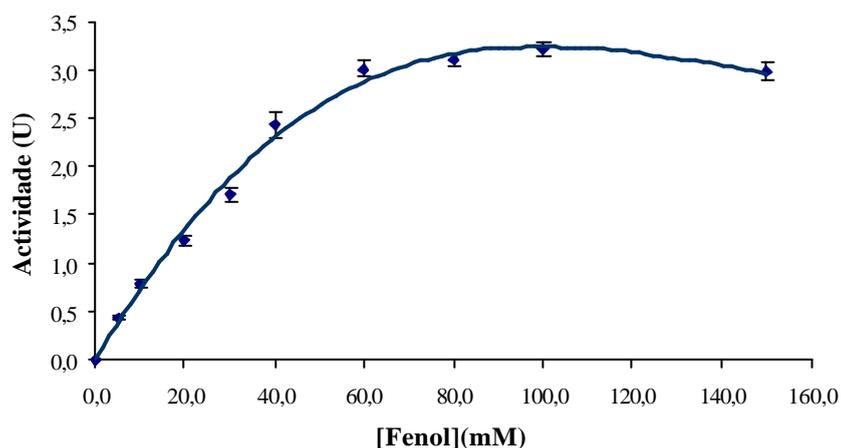


Figura 20 – Curva de Michaelis-Menten do fenol para a isoenzima A4.

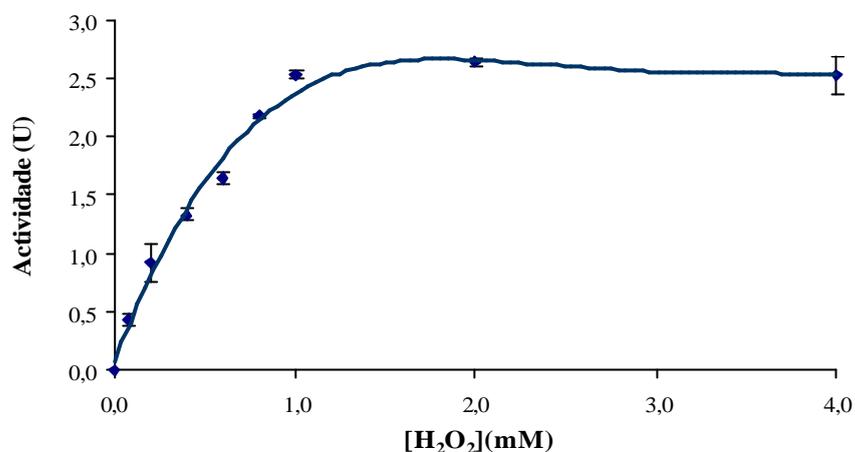


Figura 21 – Curva de Michaelis-Menten do peróxido de hidrogénio para a isoenzima A4.

O valor de K_M determinado para a isoperoxidase A4 da azeitona preta com o fenol foi de 46,43 mM e uma velocidade máxima de 4,4 U, a pH 7,0 e a 25 °C. Estes valores foram calculados a partir da curva de Lineweaver-Burk obtida entre o inverso da actividade e o inverso da concentração de fenol numa gama de concentrações entre 5 e 40 mM, apresentada na figura 22.

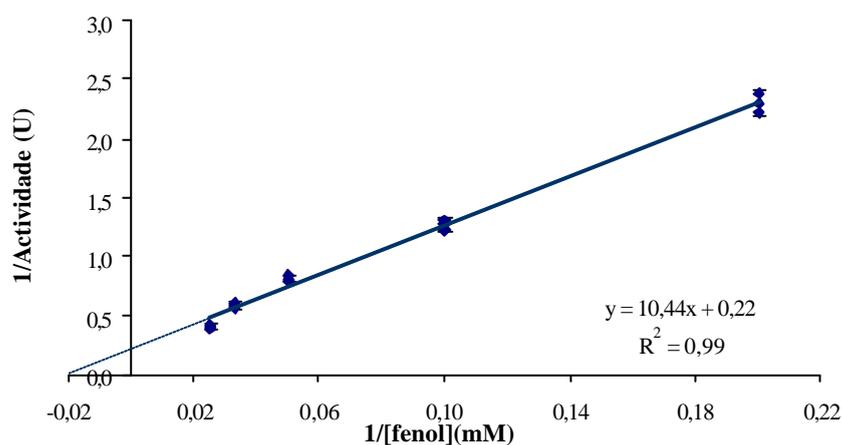


Figura 22 – Curva de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de fenol.

A isoenzima A4, para o peróxido de hidrogénio, tem um valor de K_M de 0,49 mM e uma velocidade máxima de 3,1 U, nas condições experimentais referidas anteriormente

(pH 7,0 e 25 °C). A curva de Lineweaver-Burk para concentrações de peróxido de hidrogénio entre 0,08 e 0,8 mM está representada na figura 23.

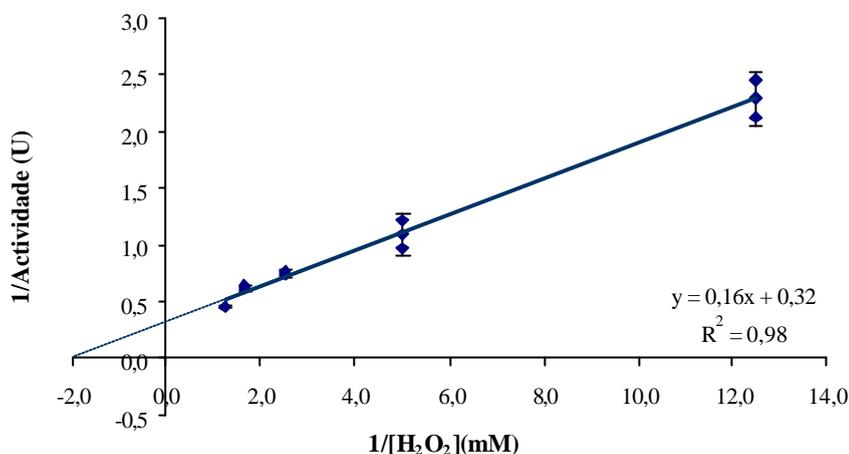


Figura 23 – Curva de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio.

Na bibliografia não foram encontrados estudos para os parâmetros cinéticos estudados, valores de K_M e velocidade máxima com o fenol, uma vez que apenas apareceram estudos para outros substratos como o ABTS (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2000b), o guaiacol (Sessa e Anderson, 1981; Heidrich *et al.*, 1983; Halpin *et al.*, 1989) e a *o*-dianisidina (Moulding *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 1990). Por esta razão não é possível comparar os resultados obtidos com os da bibliografia, pois o substrato dador de hidrogénio não é o mesmo sendo a reacção de oxidação diferente.

Pela análise destes resultados pode-se sugerir que esta isoperoxidase da azeitona possui uma grande tolerância para o fenol, quando comparado com valores referidos na bibliografia para outros substratos, como o ABTS, o guaiacol e a *o*-dianisidina.

O valor de K_M obtido para a isoperoxidase A4 com o peróxido de hidrogénio é semelhante aos descritos para a peroxidase de outros frutos e vegetais, apesar de serem utilizados outros substratos dadores de hidrogénio: soja 0,58 mM (Sessa e Anderson, 1981); o tomate 0,8 mM (Heidrich *et al.*, 1983); uva 0,21 mM (Morales *et al.*, 1993); melão 0,23 mM (Rodríguez-López *et al.*, 2000b).

2.7 – Análise da Fracção Glicosídica

A composição da fracção glicosídica da isoperoxidase A4 foi determinada através da transformação em acetatos de alditol e posterior determinação por cromatografia de gás, como foi descrito no capítulo II. Optou-se por efectuar este estudo uma vez que, segundo a bibliografia, a peroxidase é uma glicoproteína e a fracção glicosídica tem uma função importante na actividade e estabilidade térmica da peroxidase.

A figura 24 representa um cromatograma obtido para a amostra e os tempos de retenção de cada açúcar analisado e do padrão interno (Pi) utilizado para a quantificação dos açúcares.

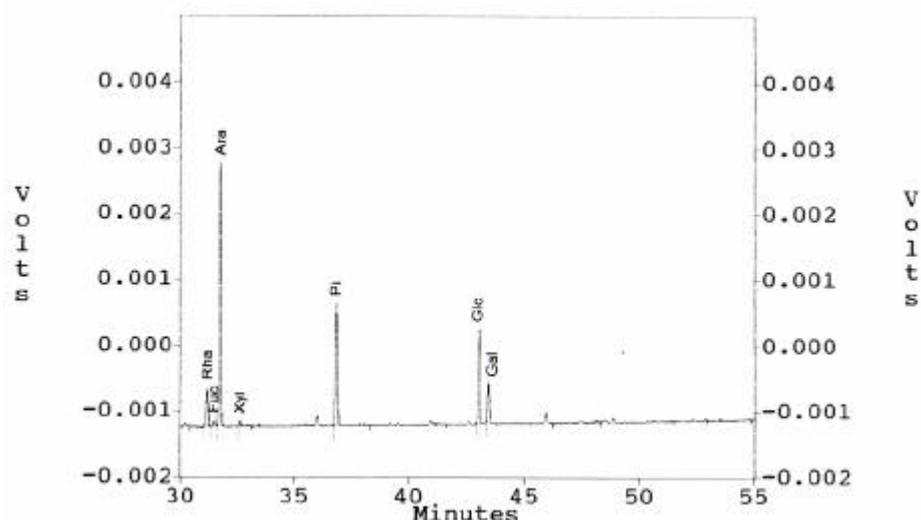


Figura 24 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da isoperoxidase A4.

A isoenzima analisada apresenta um conteúdo total em açúcares de 28% em relação à massa de enzima. Esta percentagem de açúcares para a isoperoxidase A4 da azeitona preta, apesar de mais elevada, é relativamente próxima dos valores encontrados na bibliografia para várias isoperoxidasas purificadas, que variam entre 5 e 20% (Lee e Kim, 1994).

Na figura 25 é apresentada a composição em açúcares da isoenzima A4. Esta análise revelou que a fracção glicosídica desta isoperoxidase era constituída principalmente por arabinose (64% mol) e quantidades significativas de glucose (16% mol), ramnose (9%

mol) e galactose (7% mol), sendo também detectadas quantidades vestigiais de fucose, xilose e manose (< 2% mol).

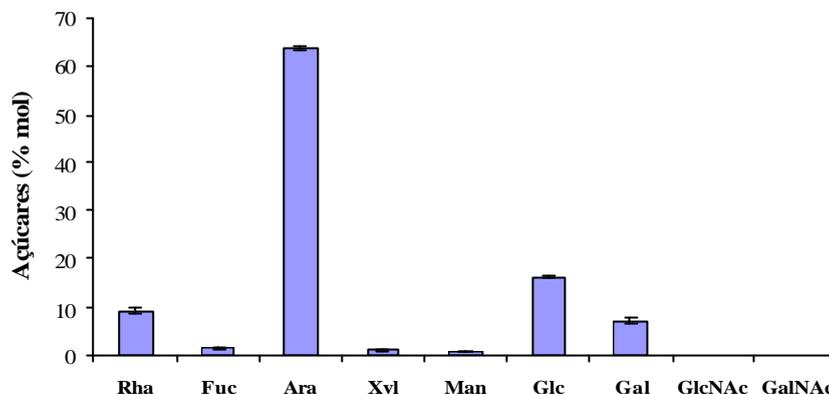


Figura 25 – Composição em açúcares (% mol) da isoperoxidase A4.

Todos os açúcares presentes nesta isoenzima purificada da azeitona preta já haviam sido detectados noutras isoenzimas purificadas, como no caso das isoenzimas do rábano bravo (Vámos-Vigýázó, 1981). Contudo, os açúcares quantificados nesta isoperoxidase não foram detectados nas mesmas proporções noutras isoenzimas estudadas, como por exemplo a isoperoxidase catiónica purificada a partir do amendoim em que os açúcares quantificados foram a manose com 29%, a xilose 15%, a galactose 9% e a fucose 7% (Sun *et al.*, 1997).

Nesta análise da fracção glicosídica da isoperoxidase não foram detectados açúcares aminados, enquanto noutros estudos foi sempre detectada a presença de hexosaminas (Vámos-Vigýázó, 1981). No caso da isoperoxidase do amendoim, a glucosamina (40% mol) está presente em quantidades superiores às dos açúcares quantificados nesta análise (Sun *et al.*, 1997).

2.8 – Estabilidade Térmica

O estudo da estabilidade térmica foi realizado no extracto enzimático parcialmente purificado, isto é, após a precipitação selectiva com sulfato de amónio (30 a 90% de saturação), considerando-se que este extracto é representativo da mistura de todas as

isoperoxidasas presentes na azeitona preta. A amostra foi colocada num banho de água termostaticado à temperatura pretendida e durante determinado tempo, sendo depois determinada a actividade de peroxidase como referido no capítulo II.

Na tabela XI são apresentados os valores de percentagem de actividade inicial obtidos para um aquecimento a 35 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C durante 5, 10 e 15 minutos. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a peroxidase da polpa de azeitona preta é termolábil. Isto porque um aquecimento a 60 °C ou 50 °C durante 5 minutos origina a perda total de actividade de peroxidase e para temperaturas inferiores (35 °C e 40 °C) um aquecimento de apenas 15 minutos também provocou a inactivação completa da peroxidase.

Num tratamento a 40 °C, durante 5 minutos, existe a perda de cerca de 60% de actividade, enquanto que um aquecimento de 10 minutos aumenta esta perda para 85%. A uma temperatura inferior aconteceu praticamente o mesmo, pois apenas 60% da actividade inicial de peroxidase foi determinada após 5 minutos a 35 °C e cerca de 35% com um aquecimento de 10 minutos. Estes resultados confirmam a termolabilidade desta peroxidase, pois um aquecimento a estas temperaturas consideradas baixas durante apenas 5 minutos provoca a perda de praticamente metade da actividade de peroxidase.

Tabela XI – Percentagem de actividade inicial da peroxidase a diferentes tempos e temperaturas.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>
35	59,0 ? 2,3	36,2 ? 3,1	0
40	40,6 ? 2,7	15,7 ? 1,8	0
50	0	0	0
60	0	0	0

Em qualquer um dos casos não ocorreu a regeneração da actividade, isto é depois do tratamento térmico do extracto enzimático não existia actividade de peroxidase, ao fim de 24 horas a 4 °C, para todas as temperaturas estudadas.

Na bibliografia foram descritas isoperoxidasas com elevada estabilidade térmica nas couves de bruxelas (McLellan e Robinson, 1987), nas maçãs (Moulding *et al.*, 1988), na manga (Khan e Robinson, 1993b) e na soja (Sessa e Anderson, 1981), entre outros frutos e vegetais. No entanto, algumas isoenzimas foram descritas como termolábeis, como

a catiónica da maçã (Moulding *et al.*, 1988), do morango (Civello *et al.*, 1995), do nabo (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000) e da couve-flor (Lee *et al.*, 1984) e uma isoenzima neutra da ervilha (Halpin *et al.*, 1989).

Na bibliografia apenas é feita referência a isoperoxidasas com uma estabilidade térmica tão reduzida, mas nunca a nenhum extracto de peroxidase apenas parcialmente purificado. Contudo, está descrito por Halpin *et al.*, (1989) que as isoenzimas ácidas e neutras normalmente apresentam uma estabilidade térmica reduzida e, no caso da peroxidase da azeitona preta, estas são as mais abundantes, como já foi referido na primeira parte deste capítulo.

Capítulo IV – Conclusões

O primeiro objectivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento de purificação da peroxidase da polpa da azeitona. O protocolo de purificação foi optimizado, sendo as diversas isoperoxidasas da azeitona purificadas usando as seguintes técnicas: precipitação selectiva com sulfato de amónio, cromatografia de troca catiónica e de troca aniónica.

Na polpa de azeitona preta foram purificadas oito isoperoxidasas, quatro separadas por cromatografia de troca catiónica (C1, C2, C3 e C4) e quatro por troca aniónica (A1, A2, A3 e A4). Os factores de purificação obtidos para a maioria das isoenzimas purificadas foram superiores a 100. Todas as isoperoxidasas apresentaram valores de RZ reduzidos (< 1,0) em comparação com isoperoxidasas purificadas a partir de outros frutos e vegetais. O aparecimento de apenas uma banda na análise por SDS-PAGE e focagem isoelectrica para todas estas isoperoxidasas confirmou o seu elevado grau de purificação.

A peroxidase da azeitona verde era constituída por nove isoenzimas. Quatro foram isoladas pela cromatografia de troca catiónica e cinco pela de troca aniónica. Os factores de purificação obtidos foram, no geral, superiores às isoenzimas da azeitona preta.

Na peroxidase das azeitonas pretas a actividade das isoenzimas aniónicas predomina em relação à das catiónicas, representando 98% da actividade total. A isoperoxidase A4 foi a isoenzima purificada com maior actividade enzimática (79% da actividade total). Tal como se verificou na azeitona preta, na verde a actividade das isoperoxidasas aniónicas também foi superior à das catiónicas, constituindo cerca de 57% da actividade total.

As massas moleculares das isoperoxidasas catiónicas da polpa de azeitona preta variam entre 60 e 70 kDa, enquanto que todas as aniónicas são de aproximadamente 20 kDa. Nas isoenzimas catiónicas obtidas da polpa de azeitonas verdes, a C4 tem um peso molecular idêntico ao obtido para isoperoxidasas catiónicas das azeitonas pretas, cerca de 70 kDa. As outras três têm pesos muito inferiores de aproximadamente 20 kDa. As massas moleculares determinadas por SDS-PAGE na presença de β -mercaptoetanol foram

semelhantes às obtidas em condições não redutoras, indicando que todas as isoenzimas purificadas são constituídas por apenas uma cadeia peptídica.

Na peroxidase da azeitona verde a presença de mais uma isoenzima em relação à azeitona preta e as diferenças nas massas moleculares podem ser devido aos dois tipos de azeitonas serem provenientes de diferentes anos de colheita e de não haver a certeza de serem da mesma área geográfica. Por outro lado, estas diferenças podem estar relacionadas com o diferente estado de maturação das azeitonas, uma vez que as isoenzimas aniónicas e cationicas no mesmo fruto ou vegetal estão relacionadas com diferentes funções fisiológicas da peroxidase. Contudo, uma maior certeza nesta explicação só podia ser obtida se todas as isoperoxidasas da azeitona verde tivessem sido caracterizadas, para se saber quais as diferenças em comparação com as da azeitona preta.

Os valores calculados para os pontos isoeléctricos por focagem isoeléctrica para as quatro isoenzimas aniónicas revelaram que duas (A1 e A2) são neutras pois têm um ponto isoeléctrico de 6,9 e as outras duas (A3 e A4) apresentaram valores muito ácidos, de 4,4 e 4,6, respectivamente.

O pH óptimo, determinado para a isoperoxidase aniónica A4 da azeitona preta foi de 7,0 e a temperatura óptima foi de 35 °C, nas condições óptimas de actividade.

A isoenzima aniónica A4 da azeitona preta segue a cinética de Michaelis-Menten em relação ao fenol e ao peróxido de hidrogénio. Através da curva de Lineweaver-Burk o valor de K_M obtido para o fenol foi de 46 mM e para o peróxido de hidrogénio foi de 0,5 mM e uma velocidade máxima de 4,4 U e 3,1 U para o fenol e o peróxido de hidrogénio, respectivamente.

A análise de açúcares efectuada para a isoperoxidase A4 demonstrou que a fracção glicosídica representa 28% da massa total de enzima, sendo esta constituída principalmente por arabinose (64%). Também foram encontrados resíduos de glucose, ramnose e galactose. Contrariamente ao verificado noutras peroxidases de origem vegetal, a análise de açúcares não revelou a presença de açúcares aaminados.

O estudo preliminar de inactivação térmica indica que o extracto de peroxidase da polpa de azeitona preta, obtido por precipitação com sulfato de amónio, tem uma estabilidade térmica reduzida, ao contrário da generalidade das peroxidases dos frutos e vegetais. Temperaturas de 35 e 40 °C durante 15 minutos provocam uma inactivação completa da peroxidase, não ocorrendo a regeneração de actividade ao fim de 24 horas a

4 °C. Este facto pode dever-se às isoenzimas aniónicas representarem a quase totalidade da actividade de peroxidase na azeitona preta e estas vêm descritas na literatura como sendo pouco estáveis termicamente.

Bibliografia

- Agostini, E.; Medina, M. I.; Milrad de Forchetti, S. R.; Tigier, H. A. Properties of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from Turnip (*Brassica napus* L.) Roots. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 596 – 598.
- Agostini, E.; Milrad de Forchetti, S. R.; Tigier, H. A. Characterization and Application of an Anionic Peroxidase Isoenzyme from *Brassica Napus* Roots. *Plant Perox. Newslett.*, **1999**, 13.
- Bakardjieva, N.; Christova, N.; Nenkova, R.; Christov, K. Calcium Ions, Proline, Tryptophan, Valine and Alanine are Effectors of the Activity and Thermostability of Horseradish Peroxidase. *Plant Perox. Newslett.*, **1999**, 12, 47 - 52.
- Barros, A.S.; Safar, M.; Devaux, M.F.; Robert; Bertrand, D.; Rutledge, D.N. Relations between mid-infrared and near-infrared spectra detected by analysis of variance of an intervariable matrix. *Appl. Spectrosc.*, **1997**, 51, 1384-1393.
- Ben-Shalom N.; Kahn V.; Harel E.; Mayer A. M. Olive Catechol Oxidase – Changes during Fruit Development. *J. Sci. Food Agric.*, **1977**, 28, 545-550.
- Bianchi, G.; Murelli, C.; Vlahov, G. Surface Waxes from Olive Fruits. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3503 – 3506.
- Blakeney, A.B.; Harris, P.J.; Henry, R. J.; Stone, B. A. A Simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis. *Carbohydr. Res.*, **1983**, 113, 291 - 299.
- Boucoiran, C.; Kijne, J.; Recourt, K. Isolation and Partial Characterization of Thermostable Isoperoxidases from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber Sprouts. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 701 - 707.

- Burnette, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavour and Quality: a review. *J. Food Sci.*, **1977**, 42, 1 – 6.
- Cella, R.; Carbonera, D. Peroxidases and Morphogenesis. *Plant Perox. Newslett.*, **1997**, 10, 24 - 29.
- Chen, Z.; Mabrouk, P. A. Isolation and Purification of Soybean Peroxidase from “Montsew” Chinese Soybeans. *National Undergraduate Research Clearinghouse*, **2000**, 2 - 7.
- Civello, P. M.; Martínez, G. A.; Chaves, A. R.; Añón, M. C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2596 – 2601.
- Coimbra, M. A.; Waldron, K. W.; Selvendran, R. R. Isolation and Characterisation of Cell Wall Polymers from Olive Pulp (*Olea europaea* L.). *Carbohydr. Res.*, **1994**, 252, 245 – 262.
- Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C.; Pasta, P. Recent Biotechnological Developments in the Use of Peroxidases. *Tib. Tech.*, **1999**, 17, 163 – 168.
- Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. Var. *esculenta* D.C.) Peroxidases. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1574 - 1579.
- Esnault, R.; Chibbar, R. N. Peroxidase and plant defence. *Plant Perox. Newslett.*, **1997**, 10, 34 - 41.
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A.; Heredia, A. Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiol. Plant.*, **1995**, 93, 651 – 658.
- Fernández Diez; Castro, R.; Garrido, F. A.; González, C. F.; González, P. F.; Nosti, V. M.; Heredia, M. A.; Mínguez, M.; Rejano, N. L.; Durán Q.; Sánchez R. F.; García G. P.;

- Castro, G. M. *Biología de la aceituna de mesa*. Consejo Superior de investigaciones Científicas, Instituto de la Grasa: Madrid y Sevilla. **1985**.
- Fernández, G.A.; Fernández Diéz, M.J.; Adams M.R. *Table Olives – production and processing*. Chapman & Hall: London, 1st Ed. **1997**.
- Gacesa, P.; Hubble, J. *Enzyme Technology*. Open University Press: Great Britain, 1st Ed. **1990**.
- Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L. M.. Purification and Unusual Kinetic Properties of a Tobacco Anionic Peroxidase. *Phytochemistry*, **1996**, 41(4), 1029 – 1034.
- Gijzen, M.. Seed peroxidase. *Plant Perox. Newslett.*, **1997**, 10, 30 - 33.
- Goupy P.; Fleuriet A.; Amiot M.; Macheix J. Enzymatic Browning, Oleuropein Content, and Diphenol Oxidase Activity in Olive Cultivars (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 92-95.
- Halpin, P.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzyme from Green Peas (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.*, **1989**, 54, 644 – 649.
- Harris, E. L. V.; Angal, S. *Protein Purification Methods – a practical approach*. Oxford University Press: New York, 1st Ed. **1989**.
- Harris, P.J.; Blakeney, A.B.; Henry, R. J.; Stone, B. A. Gas Chromatographic Determination of the Monosaccharide Composition of Plant Cell Wall Preparations. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **1988**, 71, 272-275.
- Heidrich, E.; Lorenz, G.; Schreier, P. Ultrathin-layer Isoelectric Focusing of Partially Purified Peroxidase from Tomato Fruit. *Food Chem.*, **1983**, 10, 285 – 296.
- Huisman, M. M. H.; Schols, H. A.; Voragen A. G. J. Changes in Cell Wall Polysaccharides from Ripening Olive Fruits. *Carbohydr. Polym.*, **1996**, 31, 123 – 133.
- Ingham, L. M.; Parker, M. L.; Waldron, K. W. Peroxidase: Changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiol. Plant.*, **1998**, 102, 93 – 100.

- International Olive Oil Council, IOOC. *Unified Qualitative Standard Applying to Table Olives in International Trade*. Madrid. **1980**.
- Karam, J.; Nicell, J.A. Potencial Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1997**, 69, 141 – 153.
- Kay, E; Shannon, L. M.; Lew, J. Y. Peroxidase Isoenzyme from Horseradish Roots. II Catalytic Properties. *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242, 2470 – 2473.
- Khan, A. A.; Robinson, D. S. Purification of an Anionic Peroxidase Isoenzyme from Mango (*Mangifera indica* L. var. *Chaunsa*). *Food Chem.*, **1993a**, 46, 61 – 64.
- Khan, A. A.; Robinson, D. S. The Thermostability of Purified Mango Isoperoxidases. *Food Chem.*, **1993b**, 47, 53 – 59.
- Kokkinakis, D. M.; Brooks, J. L. Tomato Peroxidase. Purification, Characterization and Catalytic Properties. *Plant Physiol.*, **1979**, 63, 93 – 99.
- Lee, C. Y.; Pennesi, A. P.; Dickson, M. H. Characterization of the Cauliflower Peroxidase Isoenzyme. *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, 32, 18 - 21.
- Lee, M. Y.; Kim, S. S. Characteristics of Six Isoperoxidases from Korean Radish Root. *Phytochemistry*, **1994**, 35, 287 – 290.
- Mafra, I.; Lanza, B.; Reis, A.; Marsilio, V.; Campestre, C.; De Angelis, M.; Coimbra, M.A. Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea. europaea*). *Physiol. Plant.*, **2001**, 111, 439 – 447.
- Marangoni, A. G.; Brown, E. D.; Stanley, D. W.; Yada, R. Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. *J. Food Sci.*, **1989**, 54, 1269 – 1271.
- McLellan, K. M.; Robinson, D. S. Cabbage and Brussels Sprout Peroxidase Isoenzymes Separated by Isoelectric Focussing. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 645 - 647.
- McLellan, K. M.; Robinson, D. S. Purification and Heat Stability of Brussels sprout Peroxidase Isoenzymes. *Food Chem.*, **1987**, 23, 305.

- McManus, M. T.; Ashford, D. A. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox. Newslett.*, **1997**, 10, 15 - 23.
- Miller, R. A.; Kelley, T. J.; Mujer, C. V. Anodic Peroxidase Isoenzymes and Polyphenol Oxidase Activity from Cucumber Fruit: Tissue and Substrate Specificity. *Phytochemistry*, **1990**, 29(3), 705 – 709.
- Moreno, A.H.; Mínguez Mosquera, M.I. “Celulasas” en aceitunas y su posible influencia en los cambios de textura. I – Estudio de estas enzimas. *Grasas Aceites*, **1981**, 32, 319 - 325.
- Moreno, A.H.; Fernández-Bolaños, G. J. “Celulasas” en aceitunas y su posible influencia en los cambios de textura. II – Actividad celulolítica en la variedad Hojiblanca. *Grasas Aceites*, **1985**, 36, 130 - 133.
- Moreno, M.R.; Smith J.F.; Smith R.V. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels: Increased Sensitivity through a Combined Coomassie blue-Silver Staining Procedure. *Anal. Biochem.*, **1985**, 151, 466 - 470.
- Moreno, A.H.; Fernández-Bolaños, G. J.; Guillén, B. R. Actividad celulolítica en aceitunas durante su maduración y ablandamiento. *Alimentaria*, **1988**, 49 - 52.
- Moreno, A.H.; Fernández-Bolaños G. J.; Guillén B. R. Caracterización y purificación parcial de enzimas celulolíticos en aceitunas. *Grasas Aceites*, **1989**, 40, 190 - 193.
- Morales, M.; Pedreño, M.A.; Ros Barceló, A.; Calderón, A.A. Purification and Kinetic Characterization of a Basic Peroxidase Isoenzyme Responsible for Lignification in Gamay Rouge Grape (*Vitis vinifera*) Berries. *Food Chem.*, **1993**, 48, 391 - 394.
- Moulding, P. H.; Singleton, D. E.; McLellan, K. M.; Robinson, D. S. Purification and Heat Stability of Cox’s Apple Pulp Peroxidase Isoenzymes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **1988**, 23, 343 – 351.
- Pomar, F.; Bernal, M. A.; Díaz, J.; Merino, F. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase. *Phytochemistry*, **1997**, 46, 1313–1317.

- Price, N. C.; Stevens, L. *Fundamentals of Enzimology*. Oxford University Press Inc.: New York, 2nd Ed. **1989**.
- Robinson, D. S.; Bretherick, M. R.; Donnelly, J. K. The Heat Stability and Isoenzyme Composition of Peroxidases in Ohane grapes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **1989**, 24, 613 – 618.
- Rodríguez-López, J. N.; Espín, J.C.; Tudela, J.; Martínez, V.; Cerdá, A.; García-Cánovas, F. Purification and Kinetic Characterization of Peroxidase from Tomato Cultivated under Different Salinity Conditions. *Food Chem. Toxicol.*, **2000a**, 65, 15 – 18.
- Rodríguez-López, J. N.; Espín, J.C.; Amor, F.; Tudela, J.; Martínez, V.; Cerdá, A.; García-Cánovas, F. Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **2000b**, 48, 1537 – 1541.
- Saraiva, J.; Oliveira, J.C.; Lemos, A.; Hendrickx, M. Analysis of the Kinetic Patterns of Horseradish Peroxidase Thermal Inactivation in Sodium Phosphate Buffer Solutions of Different Ionic Strength. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **1996**, 31, 223 – 231.
- Sciancalepore, V.; Longone, V. Poliphenol Oxidase Activity and Browning in Green Olives. *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, 32, 320 - 321.
- Sciancalepore, V. Enzymatic Browning in Five Olive Varieties. *J. Food Sci.*, **1985**, 50, 1194 - 1195.
- Sessa, D. J.; Anderson, R. L. Soybean Peroxidases: Purification and Some Properties. *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 960 – 965.
- Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A. *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall: Great Britain, 1st Ed. **1993**.
- Shannon, L. M.; Kay, E.; Lew, J. Y. Peroxidase Isoenzyme from Horseradish Roots. I Isolation and Physical Properties. *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241, 2166 – 2171.

- Shewry, P.R.; Tathan, A.S.; Fido, R.J. *Separation of plant Proteins by Electrophoresis*. in Plant Gene Transfer and Expression Protocols (H. Jones, ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, **1995**, 399 - 418.
- Silva, E.; Lourenço, E. J.; Neves, V. A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 1051 – 1056.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, 150, 76 - 85.
- Sun, Y.; Lige, B.; van Huystee, R. B. HPLC Determination of the Sugar Compositions of the Glycans on the Cationic Peanut Peroxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 4196 – 4200.
- Tucker, G. A.; Woods, L. F. J. *Enzymes in food processing*. Chapman & Hall: Great Britain, 2nd Ed. **1995**.
- Vámos-Vigázó, L. Peroxidase. *CRC Critical Reviews in food Science and Nutrition*. **1981**, 84 - 110.
- Whitaker, John R. *Principles of Enzimology for the Food Sciences*. Marcel Dekker Inc.: New York, 2nd Ed. **1994**.
- Winton; Winton. *Structure and Composition of Foods*. Chapman & Hall: London, 1st Ed. **1982**.
- Worthington Biochemical Corporation. *Enzymes and Related Biochemicals*. Bedford, MA: Millipore Corporation. **1978**.
- Wong, D.W.S. *Food Enzymes – Structure and Mechanism*. Chapman & Hall: New York, 2nd Ed. **1995**.
- Yemenicioglu, A.; Özkan, M.; Cemeroglu, B. Thermal Stabilities of Peroxidases from Fresh Pinto Beans. *J. Food Sci.*, **1998**, 63, 987 – 990.