



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS PEROXIDASES DA SEMENTE DE BURITI

BARBOSA, A.S.¹; KANO, R.S.¹; SILVA, F.D.A.²; SAMPAIO, R.M.³; OLIVEIRA, J.T.A.²;
SOARES, A.M.S.¹

¹Laboratório de Bioquímica Vegetal, Coordenação do Curso de Engenharia Química,
Universidade Federal do Maranhão, Brasil.

²Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

³Laboratório de Surfactantes e Sistemas Complexos, Coordenação do Curso de Engenharia
Química, Universidade Federal do Maranhão
E-mail para contato: alexandra@ufma.br

RESUMO - As peroxidases são enzimas com ampla aplicação tecnológica e em processos industriais. O objetivo deste trabalho foi padronizar a extração de peroxidases da semente do buriti, *Mauritia flexuosa* e verificar a estabilidade destas enzimas. O extrato total (ET) foi obtido em diferentes condições visando otimização da recuperação das peroxidases. Dois ensaios de estabilidade das peroxidases foram realizados: (a) ET esterilizado e incubado a 30°C por 24 - 96 h; (b) ET submetido a diferentes temperaturas (40°C - 80°C) por 3 horas. Entre as condições testadas, as peroxidases foram melhor extraídas quando utilizado tampão borato pH 9,0 com 0,1 M de NaCl; (relação 1:10 (m/v), apresentando 4,66 mgP de proteína total solúvel e atividade peroxidásica 2,43 UA/mgP. A análise por SDS-PAGE evidenciou a presença de cinco bandas de proteínas. A atividade peroxidásica ótima foi a 40°C e se manteve estável por 96 h a 30°C. Conclui-se que as sementes de *M. flexuosa* possuem peroxidases estáveis com potencial para exploração em processos industriais.

Palavras-chave: peroxidases das plantas, *Mauritia flexuosa* L., estabilidade térmica.

1. INTRODUÇÃO

Peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas classificadas como oxirredutases que podem ser usadas na redução do peróxido de hidrogênio enquanto oxida um segundo substrato. Estas enzimas têm sido usadas extensivamente como um componente importante de reagentes para diagnósticos clínicos e em vários experimentos laboratoriais (LAVERY *et al*, 2010). Peroxidases ainda apresentam importância industrial sendo usadas para construção de biosensores, tratamento de rejeitos industriais contendo compostos fenólicos (remoção de fenois), descoloração de rejeitos e, ainda, remoção de peróxido de alimentos e efluentes industriais (MOHSINA & REHMAN, 2009). Para aplicação em escala industrial é necessário que essas enzimas apresentem

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



estabilidade térmica em processos que exigem trocas de calor, liberação de energia e também propriedades que viabilizem seu transporte e armazenamento.

Diferentes organismos possuem peroxidases e as plantas são fontes potenciais de obtenção destas enzimas. O buriti (*Mauritia flexuosa* L.) (Fig.1) é uma espécie de palmeira de origem amazônica geralmente encontrada na região Norte, porém ocorre com frequência nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Minas Gerais, Mato Grosso e Distrito Federal. Dos seus frutos são processadas as polpas para obtenção de óleos e sucos, sendo as sementes um resíduo desta produção (BARRETO & JARDINI, 2013).

A produção da agroindústria, ao mesmo tempo em que proporciona benefícios, gera uma grande quantidade de resíduos que, se não tratados de forma adequada, trazem malefícios à sociedade e ao meio ambiente. A utilização destes subprodutos diminui os custos de produção, aumenta o aproveitamento total do alimento e reduz o impacto ambiental. Esses subprodutos muitas vezes são fontes de compostos bioativos (RODRIGUES, 2010).

Não existem relatos sobre estudos de enzimas nas sementes desta planta, motivo pelo qual o objetivo deste trabalho foi identificar a presença de peroxidases em extrato de sementes de *M. flexuosa*, assim como verificar a estabilidade desta enzima em diferentes condições de temperatura.



Figura 1 - Frutos do Buriti (*Mauritia flexuosa* L.)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos do buriti foram obtidos em uma propriedade particular localizada no município de Chapadinha ao leste do Maranhão e coletados aleatoriamente. Inicialmente as sementes foram trituradas em moinho de café até o estágio de farinha, delipidadas com hexano e mantidas sobre refrigeração a -20 °C até o momento dos ensaios.

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de NaCl (0 a 181 mM) e de tempos de extração (18 a 102 min) na atividade da peroxidase, empregou-se um Delineamento com Composto Central e Rotacional (DCCR), totalizando 11 experimentos. Para análise estatística dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software Statistica

10.0. Para obtenção da melhor condição de extração, também se avaliou a influência de diferentes tampões (acetato, fosfato e borato) e da presença de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) 1%. Os extratos foram centrifugados a 15.000 x g por 30 min, e os sobrenadantes novamente centrifugados nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi chamado de extrato total (ET) e utilizado para os ensaios. A concentração de proteínas totais solúveis dos ET foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976) e expressos em miligramas de proteína (mgP).

A atividade da peroxidase foi estimada pela tetramerização do guaiacol, segundo metodologia descrita por URBANEK et al. (1990), com modificações. O meio de reação composto de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,2), guaiacol (20 mM), de água oxigenada 10 mM. A reação iniciada com a adição de 200 µL de extrato a 2 mL da solução de guaiacol. Durante três minutos, a reação acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) com um branco contendo igual volume de reação livre de extrato enzimático. A atividade guaiacol-peroxidase foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

O perfil proteico das sementes de *M. flexuosa*, foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% pelo método de LAEMMILI (1970) e as proteínas reveladas pelo método do nitrato de prata (BLUM et al, 1987)

Para avaliar a estabilidade térmica das peroxidases das sementes de *M. flexuosa*, o ET foi esterilizado em câmara de fluxo laminar por filtração (membrana de 22 µm). Em seguida, o ET foi incubado a uma temperatura de 30°C por 24-96. Em outro experimento de estabilidade, o ET foi incubado por 3 horas em temperaturas que variavam de 45°C - 80°C. Após ambos os procedimentos, a atividade peroxidásica de cada amostra foi calculada e comparada aos da amostra que não recebeu tratamento térmico (controle). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos ensaios de atividade peroxidásica realizados durante o estudo, verificou-se que as melhores condições de extração para obtenção das peroxidases da semente de *M. flexuosa* foram: extração com tampão borato pH 9,0 sem PVPP, contendo 100 mM de NaCl, na proporção de 1:10, por 1 hora (Tab 1; Fig 2). O ET obtido nestas condições apresentou 4,66 mgP de proteínas totais solúveis e atividade enzimática específica de 2,43 (UA/mgP). Observou-se por eletroforese do extrato das sementes de *M. flexuosa*, apenas 5 bandas de proteínas como mostra a Figura 3.

Tabela 1 - Padronização da *M. flexuosa* L. com suas respectivas atividades peroxidásicas

| Amostras | Atividade Peroxidásica (UA/mgP) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Proporções (m/v) | |
| 1:05 | 1,99 |
| 1:10 | 3,01* |
| 1:15 | 1,97 |
| pH | |
| 3,0 | 1,73 |
| 4,0 | 2,60 |
| 5,0 | 1,88 |
| 7,0 | 2,10 |
| 9,0 | 3,01* |
| 11,0 | 2,44 |
| PVPP (extração em pH 9, 1:10) | |
| Sem PVPP | 3,01 |
| Com PVPP 1% | 2,63 |

*Apresentaram maior atividade enzimática para seguinte padronização com ou sem PVPP.

A partir dos ensaios de atividade peroxidásica realizados durante o estudo, verificou-se que as melhores condições de extração para obtenção das peroxidases da semente de *M. flexuosa* foram: extração com tampão borato pH 9,0 sem PVPP, contendo 100 mM de NaCl, na proporção de 1:10, por 1 hora (Tab 1; Fig 2). O ET obtido nestas condições apresentou 4,66 mgP de proteínas totais solúveis e atividade enzimática específica de 2,43 (UA/mgP). Os resultados do planejamento experimental indicaram que a influência da concentração de NaCl (C) e do tempo de extração (t) na atividade da peroxidase (A) foram melhor relacionadas por um modelo quadrático com interação, como na Equação 1, que, a um nível de confiança de 95%, explicou 71,67% da variação dos resultados obtidos. Observou-se por eletroforese do extrato das sementes de *M. flexuosa*, apenas 5 bandas de proteínas como mostra a Figura 3.

$$A (A/mg) = 1,0242 + 0,0079C - 0,00005C^2 + 0,0388t - 0,00033t^2 - 0,00004C.t \quad (1)$$

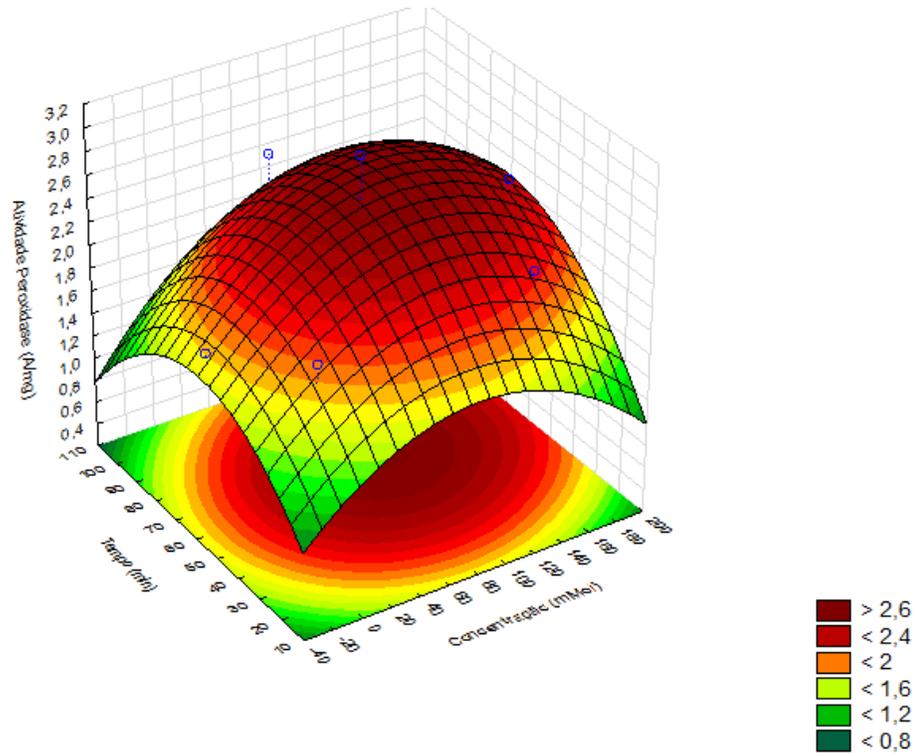


Figura 2 - Superfície de Resposta para Atividade da Peroxidase (UA/mgP) em função da Concentração (mMol) e tempo (min)

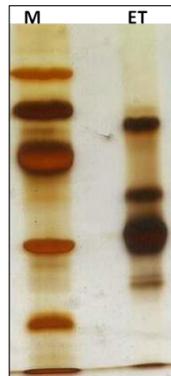


Figura 3 - Perfil proteico das sementes de *M. flexuosa* L. em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). M= marcador molecular (97; 66; 45; 30; 20; 14 kDa); ET= extrato total das proteínas obtidas a partir da extração das sementes de *Mauritia flexuosa*.

O tratamento térmico realizado no período de 24- 96 horas mostrou que a peroxidase presente na semente do buriti é estável, mantendo-se constante durante todo período avaliado, a 30°C conforme observado na Figura 4. Não há diferença significativa entre os pontos avaliados, apenas numérica. Observou-se ainda, que a enzima apresentou atividade peroxidásica ótima a 40 °C (3,1 UA/mgP) mantendo-se inalterada até 55 °C, 3,1 UA/mgP e ainda apresentando atividade residual a 65 °C conforme mostra a Figura 5. A estabilidade térmica das peroxidases estudadas indica um ponto favorável no desenvolvimento de produtos, levando-se em conta aspectos como transporte e armazenamento.



Figura 4 - Atividade peroxidásica após incubação do Extrato Total (ET) à 30°C de 24 a 96 horas.

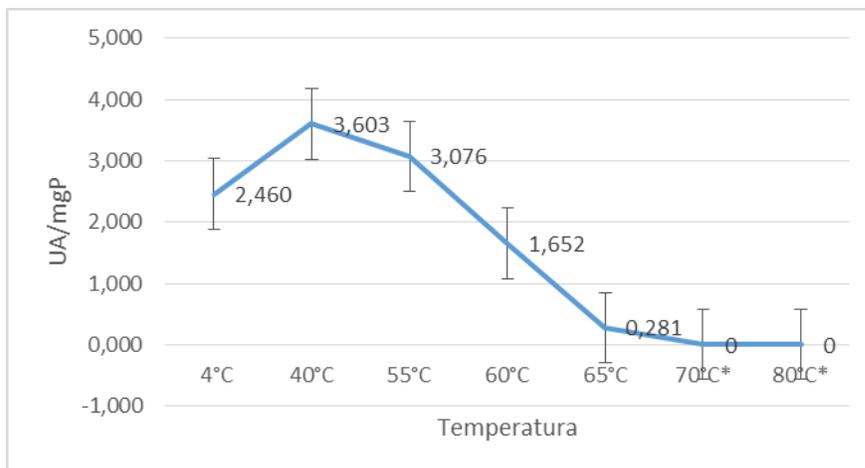


Figura 5 - Atividade peroxidásica do Extrato Total (ET) após incubação em diferentes temperaturas (40°C- 80°C) por 3 horas.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que existem peroxidases nas sementes do buriti. Essas peroxidases são melhor obtidas com extração por 1 h, em tampão pH 9,0 contendo 100 mM de NaCl; sem PVPP, na proporção de 1:10 (m/v). A atividade peroxidásica nos extratos manteve-se estável a 30 °C por todo período de análise (24 - 96 h). A temperatura ótima de atividade das peroxidases foi de 40°C, resistindo até 65°C. Estudos posteriores serão conduzidos com o intuito de isolar e caracterizar peroxidases da semente do buriti, além de investigar seu potencial biotecnológico.

5. REFERÊNCIAS

BARROS, T.D.; JARDINI, J.G. *Revista Embrapa*. 2013. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fb123vmz02wx5eo0sawqe3flbr6im.html>> Acesso em 04 fev. 2016

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. V. 8, p. 93-99, 1987

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **1976**, 72, 248-254



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

GROMOVA, I; CELIS, J.E. Protein detection in Gels by Silver Stainig: A procedure compatible with Mass-Spectrometry. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook, 3rd Edition, vol.4: Celis, J.E., Carter, N., Humber, T., Simons, K., Small, J.V., and Shotton, D.(eds). *Academic Press, Elsevier*. 2006.

KRUGER N. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:9-15

LAVERY, C.B.et al. Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticans*) roots. *Journal of Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (15), pp 8471–8476

MOHSINA, H.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*: volume 115, Issue 4, 15 August 2009, Pages 1177–1186

RODRIGUES, B.S. Resíduos da agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queirós”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

