

DEFINIÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASE EXTRAÍDA DE *Ficus auriculata* Lour

Isabela Marinho Silva Werlang¹, Eduarda Baggio Paglia², Aline Haas³, Cleiton Vaz, Anieli Pinto Kempka⁵

^{1,2} Acadêmico (a) do Curso de Engenharia Química – CEO

³ Acadêmico(a) do Mestrado em Ciências Ambientais, CAV – PPGCAMB - Bolsista PROMOP

⁴ Pesquisador, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – CEO

⁵ Orientadora, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – CEO –
aniela.kempka@udesc.br.

Palavras – chave: enzima, atividade, extração, efluente.

As peroxidases (E.C 1.11.1) são predominantemente heme proteínas pertencentes à classe das oxirredutases que catalisam a transferência de elétrons de um substrato para outro, onde utilizam o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou hidroperóxidos orgânicos como substrato para oxidar uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. São enzimas solúveis em água e, por isso, são facilmente extraídas homogeneizando a fonte de enzima com água e filtrando o homogeneizado. O filtrado obtido é uma fonte de enzima de baixa pureza que pode ser utilizado diretamente ou pode ser tratado para remover parte das impurezas antes da sua utilização. As peroxidases são encontradas em diversas espécies do reino vegetal e a mais importante, do ponto de vista comercial, é a enzima isolada da raiz forte (*Armoracia rusticana*) também conhecida como raiz forte na forma purificada (Horseradish peroxidase - HPR). A raiz forte é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio e a peroxidase tem em média, atividade em torno de 83,0 U/mg. O objetivo do presente estudo foi a extração da enzima peroxidase de folhas jovens e adultas de *Ficus auriculata* Lour, espécie do gênero *Ficus* e que não possui estudos em relação a extração de peroxidase, e a definição da metodologia de determinação da atividade enzimática com base em diferentes literaturas. A coleta das folhas jovens e adultas de *Ficus* foi realizada em Pinhalzinho – SC e para obtenção do extrato enzimático bruto, as folhas foram higienizadas com água destilada, secas com papel absorvente e trituradas com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0), em separado, para folhas jovens das adultas. Os extratos das folhas foram filtrados e centrifugados a 12.200 rpm, visando uma pré-purificação. Cada uma dessas etapas foi realizada mantendo-se as amostras em banho de gelo. Para a determinação da atividade da enzima misturou-se adição de 2,8 mL de H₂O₂ 0,1 % em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,6), 0,4 mL do extrato após a centrifugação e 2,8 mL de solução aquosa de guaiacol 0,5 % (substrato da reação), sendo as misturas submetida a tratamento térmico. Testaram-se três diferentes metodologias para a mistura dos reagentes: I – levando ao banho, a 30°C, alíquotas contendo o peróxido de hidrogênio e o extrato enzimático e adicionando-se a solução de guaiacol posteriormente; II - levando ao banho, a 30°C, alíquotas contendo o extrato enzimático para posterior adição dos outros reagentes, e III - levando ao banho, a 30°C, alíquotas contendo H₂O₂,

o extrato enzimático e a solução de guaiacol. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância, em espectrofotômetro, a 420 nm, anotando-se os valores de t_1 (1 minuto) e t_5 (5 minutos depois) que, posteriormente foram subtraídos obtendo-se somente um valor para a absorbância em cada réplica. A atividade de peroxidase foi expressa em U/mL (atividade capaz de alterar 0,001 de absorbância a 470 nm). Utilizou-se água destilada para a calibração do equipamento. Para o branco de reação foi utilizado 2,8 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, 2,8 mL de solução de guaiacol 0,5 % e 0,4 mL de extrato enzimático (tanto da folha jovem quanto da adulta), realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na Tabela 1 estão os resultados de atividade enzimática para as metodologias I, II e III. Os resultados de atividade enzimática entre as amostras, verifica-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para a atividade da peroxidase da folha jovem e adulta da Metodologia II. Entre as metodologias testadas, verifica-se, tanto para a folha jovem como para a folha adulta, que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as três metodologias. Portanto, a forma como é conduzido o experimento pode influenciar no resultado da atividade da enzima. O ciclo catalítico realizado pelas peroxidases ocorre em 3 etapas, sendo: 1) peroxidase + $H_2O_2 \rightarrow$ composto I + H_2O ; 2) composto I + RH \rightarrow composto II + R^* e 3) composto II + RH \rightarrow peroxidase + R^* + H_2O . Para a metodologia I, onde o peróxido de hidrogênio e o extrato enzimático foram levados ao tratamento térmico, e somente após este foi adicionado o substrato (guaiacol), pode ter ocorrido uma degradação do peróxido pela ação da temperatura, e havendo esta degradação a conversão na etapa 1 da reação pode ser afetada. Para a metodologia II, III – onde foi levado ao banho a mistura de todos os reagentes (H_2O_2 , o extrato enzimático e a solução de guaiacol), o valor de atividade enzimática obtido foi superior ao da metodologia I, porém, ainda inferior ao da metodologia III (tratamento térmico apenas do extrato enzimático e posterior adição dos outros reagentes). Para a metodologia 3, também pode ter havido uma degradação do peróxido de hidrogênio até que fosse atingida a temperatura de 30°C (temperatura ótima da enzima), afetando assim no valor de atividade. Para a metodologia 2, cujos valores de atividade da peroxidase foram os maiores, o que indica que a exposição do extrato enzimático a temperatura de 30°C ativa a enzima, e assim que adicionados os demais reagentes, todas as etapas da reação ocorrem de forma mais rápida, ocasionado uma maior atividade da peroxidase. A atividade de uma enzima está relacionada com a conversão de substrato ou de produtos por um determinado tempo (geralmente 1 minuto). Portanto, a metodologia 2 caracterizou-se como a mais promissora para ser utilizada na sequência da pesquisa.

Tabela 1 – Resultados de atividade da peroxidase (U/mL) para as metodologias I, II e III, dos extratos das folhas jovens e adultas de *Ficus auriculata* Lour.

Amostras	Atividade da peroxidase (U/mL)		
	Metodologia I	Metodologia II	Metodologia III
Folha Jovem	2,33 ^{aA}	58,07 ^{aC}	12,43 ^{aB}
Folha Adulta	2,37 ^{aA}	25,30 ^{bC}	10,40 ^{aB}

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem em nível de 95% de pelo teste de Tukey, comparando-se uma mesma metodologia. Médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem em nível de 95% de pelo teste de Tukey, comparando-se uma mesma amostra.