

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
PEROXIDASE DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

Gengis Kami Ferro Kamimura

Araraquara - SP

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
PEROXIDASE DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

Gengis Kami Ferro Kamimura

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição, área de Ciência dos Alimentos da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
campus de Araraquara - UNESP.

Araraquara - SP

2006

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
(orientador)

Profa. Dra. Edwil Aparecida De Lucca Gattás
(membro)

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
(membro)

Araraquara - SP, 2006

Dedico,

Aos meus pais e meus irmãos, que sempre incentivaram e apoiaram meus estudos de forma incondicional.

A Anna Paula, que tem o dom de tornar melhores aqueles que têm o privilégio de sua amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara - UNESP.

Valdir, obrigado pela oportunidade de crescimento, obrigado por toda instrução, orientação e educação que me proporcionou, e acima de tudo, agradeço a paciência e a amizade.

Mara, obrigado pela forma como acolhe a todos no laboratório, sua maneira simples e organizada de trabalhar não ensina, faz aprender.

Obrigado aos colegas de bancada pela cooperação e pela amizade.

Obrigado a todos os funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição e do Departamento de Imunologia por toda colaboração.

Cláudia, Laura e Sônia, obrigado por todo apoio e informação oferecidos.

Agradeço também aos meus professores e colegas de curso.

Agradeço ao CNPQ pelo apoio.

"A ausência diminui as pequenas paixões e aumenta as grandes, da mesma forma como o vento apaga as velas e atiça as fogueiras."

François de La Rochefoucault (1747-1827)

RESUMO

Os frutos e vegetais apresentam-se fisiologicamente ativos após a colheita, dessa forma as perdas pós-colheita ocorrem pela influência de diferentes fatores onde se destacam a respiração, a temperatura, a umidade, a concentração de oxigênio e gás carbônico, a produção de etileno e a ação de enzimas endógenas associadas com processos de deterioração. As raízes de yacon têm sido cada vez mais consumidas devido à revelação de qualidades medicinais. A manutenção de sua qualidade in natura é um sério problema nos processos pós-colheita devido a inúmeras reações metabólicas. A peroxidase (POD, E.C.1.11.1.7) é largamente encontrada nos vegetais apresentando importante papel fisiológico/bioquímico embora uma precisa função não tenha ainda sido estabelecida. Sua importância para ciência dos alimentos evidencia-se pelas relações com alterações indesejáveis na qualidade e resistência dos vegetais, tornando interessante sua supressão parcial ou total no pós-colheita. Os objetivos desse trabalho foram isolar, purificar e caracterizar a peroxidase de raízes de yacon. Condições de extração para a POD de yacon foram estabelecidas e a enzima foi isolada por precipitação com sulfato de amônio, eluição em Sephadex G-25 e DEAE-celulose. Somente um pico de atividade foi eluído no processo de purificação com um fator de purificação de 222,33. O peso molecular determinado foi 34.8 kDa com valores de pH e temperatura ótima de 5,5 e 35°C, respectivamente. As constantes Km e Vmax foram de 14,227 mM e 17409 UA/mL, para σ -dianisidina, e de 14,434 mM e 14830 UA/mL, para H₂O₂. Foram testados os efeitos inibidores de sais, quelantes, compostos sulfidríla, ácidos fenólicos e outros. Estudos de inativação térmica da POD foram realizados, nos quais se verificou o efeito protetor da sacarose na inativação enzimática e o efeito promotor de inativação pela presença de sais. A energia de ativação (Ea) para inativação da peroxidase foi de 31,57 kcal/mol ou 132,12 kJ/mol. A Ea para inativação da enzima aumentou com o incremento nas concentrações de sacarose. A capacidade de regeneração da enzima foi maior quando a inativação se deu às temperaturas mais elevadas durante períodos de tempo mais curtos, e menor quando a inativação se deu sob temperaturas mais baixas durante tempos mais longos. Sendo que as maiores taxas de regeneração se deram durante as primeiras horas de incubação. A temperatura de incubação de 4°C favoreceu ligeiramente a regeneração da POD, em relação à temperatura de 30°C.

ABSTRACT

The fruits and vegetables still continue physiologically active after the crop, in that way the postharvest losses occurs by the influence of different factors, like the respiration, temperature, humidity, concentration of oxygen and carbonic gas, ethylene production and the action of endogenous enzymes associated with deterioration processes. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots has been more and more consumed by the revelation of prebiotic and medicinal properties. The maintenance of its quality in the postharvest is a serious problem due to several metabolic reactions. Peroxidase (POD, E.C.1.11.1.7) is widely found in plants, having physiological/biochemical importance, although a precise function has not still been established. The POD importance for food science is due to its relationships with alteration of the quality and resistance of the vegetables to the postharvest factors. Its total or partial suppression by thermal inactivation or inhibitor compounds may be interesting for postharvest interests. The objectives of this work were to isolate, purify and characterize the POD from yacon roots. Extraction conditions for yacon POD were determined and the enzyme was isolated by precipitation with ammonium sulfate, elution on Sephadex G-25 and DEAE-cellulose. Only one peak of enzyme activity was eluted on the purification process with a 222.33 fold purification factor. The determined molecular weight was 34.8 kDa. The optimum pH and temperature values were pH 5.5 and 35°C, respectively. Km and Vmax for o-dianisidine was 14.227 mM and 17409 UA/mL, and 14.434 mM and 14830 UA/mL for H₂O₂, respectively. The effects of metals, chelating agents, sulphidryl, phenolic acids and other compounds as POD inhibitors were evaluated. Thermal inactivation studies were realized and they showed a protective effect of sucrose over peroxidase from yacon roots, it also showed the effect of salts as promoters of enzyme inactivation. The activation energy (Ea) for thermal inactivation of peroxidase was 31.57 kcal/mol or 132.12 kJ/mol. The Ea for inactivation increased in the presence of various sucrose concentrations. The POD regeneration was greater when partial inactivation happened short-time at higher temperatures, and it was smaller when was performed at low temperatures and long incubation time. The highest regeneration rates took place during the first 3-5 hours after partial inactivation. Samples incubating at 4°C showed regeneration rates slightly superior at that incubated at 30°C.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁGINA
Ilustração 1: Raízes de yacon recém colhidas e na forma como são comercializadas.	1
Ilustração 2: Representação tridimensional da cristalografia por raios-X da estrutura da peroxidase de rabanete.	10
Ilustração 3: Equação geral da reação de peroxidação.	11
Ilustração 4: Formação de compostos intermediários na reação de peroxidação.	11
Ilustração 5: Exemplo de reação oxidativa.	12
Ilustração 6: Decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio.	12
Ilustração 7: Exemplo de reação de hidroxilação.	12
Ilustração 8: Formação de indol-3-metanol (IM) e 3-hidroximetil-oxi-indol (IOO ^o) a partir de ácido indol acético (IAA).	15
Ilustração 9: Radicais fenóxi formados pela oxidação de álcool coniferil pela POD	19
Figura 1: Eluição da POD em DEAE-celulose sob gradiente salino 0-0,5M de cloreto de potássio.	35
Figura 2: Perfil da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.	37
Figura 3: Curva de calibração com os padrões protéicos: soroalbumina bovina (BSA), ovoalbumina, inibidor de tripsina, citocromo C.	40
Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da POD de yacon, corada pela atividade enzimática.	42
Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da POD de yacon, coradas pela prata e atividade enzimática.	43
Figura 6: Atividade da POD em função do pH.	45
Figura 7: Atividade da POD em função da temperatura.	45
Figura 8: Efeito da temperatura na estabilidade da POD.	47
Figura 9: Efeito da concentração de o-dianisidina na atividade da POD na presença de H ₂ O ₂ .	49
Figura 10: Efeito da concentração de H ₂ O ₂ na atividade da POD na presença o-dianisidina.	49
Figura 11: Efeito da temperatura na inativação da peroxidase de yacon.	58
Figura 12: Curva de log k x 1/T para cálculo da energia de ativação.	58

Figura 13:	Efeito da sacarose na inativação térmica da POD de yacon a 60°C e 65°C.	60
Figura 14:	Efeito da sacarose na inativação térmica da POD de yacon 70°C e 75°C.	61
Figura 15:	Curva de $\log k \times 1/T$ para cálculo da energia de na presença de sacarose em diferentes concentrações.	62
Figura 16:	Efeito de CaCl_2 na inativação térmica da POD de yacon a 60°C e 65°C.	66
Figura 17:	Efeito de CaCl_2 na inativação térmica da POD de yacon a 70°C e 75°C.	67
Figura 18:	Efeito de KCl na inativação térmica da POD de yacon a 60°C e 65°C.	68
Figura 19:	Efeito de KCl na inativação térmica da POD de yacon a 70°C e 75°C.	69
Figura 20:	Efeito de NaCl na inativação térmica da POD de yacon a 60°C e 65°C.	70
Figura 21:	Efeito de NaCl na inativação térmica da POD de yacon a 70°C e 75°C.	71
Figura 22:	Curvas de $\log k \times 1/T$ para cálculo da energia de ativação na presença de sais em diferentes concentrações.	72
Figura 23:	Regeneração da POD de yacon após inativação a 65°C.	74
Figura 24:	Regeneração da POD de yacon após inativação a 70°C.	75
Figura 25:	Regeneração da POD de yacon após inativação a 75°C.	76
Figura 26:	Regeneração da POD de yacon após inativação a 80°C.	77
Figura 1 do apêndice:	Curva de calibração com BSA pelo método de Bradford.	97
Figura 2 do apêndice:	Determinação de K_i para ácido caféico.	98
Figura 3 do apêndice:	Determinação de K_i para ácido ferúlico.	99
Figura 4 do apêndice:	Determinação de K_i para DL-DOPA.	100

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1	Efeito da concentração da solução tampão na extração de POD de yacon. 31
Tabela 2	Efeito do pH da solução tampão na extração de POD de yacon. 31
Tabela 3	Efeito de inibidores de escurecimento na extração de POD de yacon. 33
Tabela 4	Purificação da peroxidase de yacon. 36
Tabela 5	Atividade da POD sobre alguns compostos. 48
Tabela 6	Efeito de sais na atividade da POD de yacon. 54
Tabela 7	Efeito de compostos quelantes na atividade da POD de yacon. 54
Tabela 8	Efeito de ácidos fenólicos na atividade da POD de yacon. 55
Tabela 9	Efeito de compostos “sulfidrila” na atividade da POD de yacon. 55
Tabela 10	Efeito de outros compostos na atividade da POD de yacon. 56
Tabela 1 do apêndice	Leituras de absorvância a 595nm. 95
Tabela 2 do apêndice	Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da POD de yacon. 95
Tabela 3 do apêndice	Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de sacarose em diferentes concentrações. 95
Tabela 4 do apêndice	Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de CaCl em diferentes concentrações. 96
Tabela 5 do apêndice	Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de KCl em diferentes concentrações. 96
Tabela 6 do apêndice	Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de NaCl em diferentes concentrações. 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A.E. - atividade específica

CaCl₂ - cloreto de cálcio

DTE - ditioeritritol

Ea - Energia de ativação

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

I[•] - radical metil-3-indol

IAA - ácido indol-acético

IM - indol-3-metanol

IOO[•] - 3-hidroximetil-oxi-indol

KCl - cloreto de potássio

K_m - constante de Michaelis

Mn²⁺ - cátion bivalente manganês

NaCl - cloreto de sódio

(NH₄)₂SO₄ - sulfato de amônio

O₂ - oxigênio molecular

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

Per-Fe^{II} - ferroperoxidase

POD - peroxidase

PPO - polifenoloxidase

rpm - rotações por minuto

UA - unidade de atividade

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de ilustrações	III
Lista de tabelas	V
Lista de abreviaturas e símbolos	VI
Sumário	VII
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica: peroxidases	7
2.1. Generalidades e tipos de reações catalisadas	9
2.2. Ocorrência e função biológica	13
3. Objetivos	23
4. Material e métodos	24
4.1. Material	24
4.2. Métodos	24
4.2.1. Extração	24
4.2.2. Otimização das condições de extração	24
4.2.3. Purificação	25
4.2.4. Ensaio de atividade enzimática	25
4.2.5. Determinação de proteína	26
4.2.6. Estimativa do peso molecular	26
4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	26
4.2.8. Condições ótimas de atividade (pH e temperatura)	27
4.2.9. Efeito da temperatura na estabilidade enzimática	27
4.2.10. Especificidade a substratos	27
4.2.11. Cálculo das constantes cinéticas (K_m e V_{max})	27
4.2.12. Efeito de inibidores na atividade enzimática	28
4.2.13. Estudos de inativação térmica	28
4.2.13.1. Efeito da temperatura na inativação enzimática e cálculo da energia de ativação (E_a)	28
4.2.13.2. Efeito da sacarose na inativação térmica	28
4.2.13.3. Efeito de sais na inativação térmica	28
4.2.14. Regeneração da POD após inativação térmica	29

5. Resultados e discussão	30
5.1. Extração	30
5.2. Otimização das condições de extração	30
5.3. Purificação	34
5.4. Estimativa do peso molecular	39
5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	41
5.6. Condições ótimas de atividade (pH e temperatura)	44
5.7. Efeito da temperatura na estabilidade enzimática	47
5.8. Especificidade a substratos e cálculo das constantes cinéticas (K_m e V_{max})	48
5.9. Efeito de inibidores na atividade enzimática	50
5.10. Estudos de inativação térmica	57
5.11. Regeneração de atividade da POD após inativação térmica	73
6. Conclusões	79
7. Referências bibliográficas	81
8. Apêndice	95
8.1. Tabelas do apêndice	95
8.2. Figuras do apêndice	97

1. INTRODUÇÃO

A yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é um vegetal pertencente à família Asteraceae sendo originária dos vales andinos, uma região que pode ser considerada rica quanto à variedade de raízes e tubérculos comestíveis. A maior parte destes alimentos, tal como a batata, é considerada como energética enquanto outras, como a yacon, são consideradas e consumidas como “frutas” (Zandstra *et al.*, 1999; Zardini, 1991). Tal classificação é especialmente reforçada no caso das raízes tuberosas de yacon (Ilustração 1) pois seu baixo valor calórico é conhecido há muito tempo, e também devido a sua textura suculenta e seu sabor doce e refrescante, que lembram uma maçã ou uma pêra.



Ilustração 1. Raízes de yacon recém colhidas e na forma como são comercializadas, à esquerda e à direita, respectivamente.

As raízes de yacon apresentam composição química peculiar com altas concentrações de fruto-oligossacarídeos do tipo inulina, contendo pouquíssimo ou não contendo amido (Fukai *et al.*, 1997; Ohyama *et al.*, 1990; Simonovska *et al.*, 2003). Para os agricultores andinos sua alta produtividade e outras características agrônômicas atrativas não são suficientes para compensar seu baixo valor nutricional, causando um menor interesse no vegetal em relação a outras culturas. Além disso, seu baixo teor calórico também contribui para redução em seu cultivo

como cultura de subsistência durante épocas de crise econômica na sua região original (Grau *et al.*, 1997). Entretanto estas mesmas características nutricionais tornam a yacon interessante em um outro contexto global, no qual amido, glicose e frutose são produtos relativamente abundantes e baratos.

Em entidades culturais diferentes da andina sob o ponto de vista sócio-econômico, a yacon pode ser uma boa opção para se reduzir os efeitos insalubres de uma vida sedentária, onde se deseja muitas vezes reduzir a ingesta calórica e aumentar o consumo de fibras. De fato, as raízes de yacon constituem produtos vegetais com crescente consumo pela população pela revelação de propriedades medicinais e nutracêuticas, com importância potencial para indústria de alimentos como produto não cariogênico em alimentos infantis, matéria-prima para produtos dietéticos e adoçante alternativo à sacarose (Aybar *et al.*, 2001; Grau *et al.*, 1997; Vilhena *et al.*, 2000; Voragen, 1998).

No Brasil a yacon foi introduzida recentemente por agricultores japoneses sendo consumida principalmente por indivíduos portadores de diabetes, hipercolesterolemia e problemas digestivos, sendo utilizadas suas raízes e também suas folhas na forma de chá (Grau *et al.*, 1997; Vilhena *et al.*, 2000). As raízes de yacon são geralmente comidas cruas, após um período de exposição ao sol, que aumenta seu sabor adocicado; mas podem ser consumidas de inúmeras outras formas, tais como sucos, xaropes e conservas (Grau *et al.*, 1997).

As raízes e tubérculos ocupam um lugar de destaque na alimentação mundial por constituírem, muitas vezes, o principal tecido de reserva da planta sendo portanto uma ótima fonte de amido e açúcares, além de fornecerem vitaminas, minerais, pigmentos e outros sintetatos necessários para a nutrição e saúde humana. Porém, tais produtos constituem essencialmente órgãos ou tecidos vegetais vivos e bioquimicamente ativos e dinâmicos, que depois de colhidos deixam de fazer parte da planta original e portanto não podem mais receber água e nutrientes normalmente, passando a realizar seus processos metabólicos como unidades autocontroladas. Desta forma, as reações de catabolismo logo tomam o lugar do anabolismo, prejudicando o valor nutricional e energético; além disso, a

perda de água decorrente resulta em murchamento e conseqüente desvalorização do produto. A yacon tem seu ponto crítico no pós-colheita devido a desconhecidas reações metabólicas responsáveis por sua deterioração (Quijano *et al.*, 2000; Zandstra *et al.*, 1999), de forma que a manutenção da sua qualidade in natura é um sério problema.

Além da degradação inerente ao alimento existe também aquela promovida ou acelerada por microrganismos, e tanto uma quanto à outra são favorecidas por processos que muitas vezes causam injúrias como choques mecânicos, lavagem, descascamento, corte, descaroçamento, entre outros. A seguir estão relacionados alguns fatores importantes no pós-colheita de frutas e vegetais, tais como a textura, o conteúdo de amido, açúcares, pigmentos e compostos fenólicos além de fenômenos fisiológico/bioquímicos como a respiração, a transpiração; estando todos relacionados direta ou indiretamente com as alterações enzimáticas.

Os açúcares e amido são sintetizados no vegetal pela fotossíntese, alguns carboidratos assim produzidos são transportados na forma de seiva elaborada para as partes em crescimento e órgãos de reserva, onde são consumidos ou armazenados principalmente na forma de amido. No pós-colheita, de acordo com as condições de armazenamento do produto e características fisiológicas, o amido tende a ser hidrolisado em sacarose, glicose e frutose pela ação das amilases e fosforilases (Eskin, 1990; Gunaratne *et al.*, 2002; Herppich *et al.*, 1999; Hover, 2001; Rubatzky *et al.*, 1999; Shibairo *et al.*, 1997; Zhang, 2002). Em um processo tradicional as raízes de yacon são expostas ao Sol para aumentar seu sabor doce resultante da hidrólise dos oligofrutanos em sacarose, frutose e glicose (Graefe *et al.*, 2003; Ohyama *et al.*, 1990).

A respiração é o processo fundamental pelo qual os seres vivos obtém a energia necessária à manutenção da vida a partir da oxidação dos compostos de reserva, principalmente carboidratos e gorduras. Nas plantas superiores as principais reservas de energia são os açúcares e o amido, os quais são completamente oxidados a dióxido de carbono e água com a produção de adenosina trifosfato e calor vital. Embora ela seja reduzida em tecidos de reserva

como raízes, tubérculos e bulbos; uma vez colhidos, a respiração passa a desempenhar um papel importante nas funções fisiológicas de catabolismo destes produtos, favorecendo o consumo das reservas energéticas e conseqüente perda de peso seco (Floros, 1993; Eskin, 1990; Kader *et al.*, 2000; Nourian *et al.*, 2003; O'hare, 1995; Rees *et al.* 2003; Rosa *et al.*, 1999; Veltman *et al.*, 2003).

O etileno é considerado um hormônio vegetal único devido a sua simplicidade estrutural e sua natureza gasosa. Afeta e regula essencialmente todas as fases do crescimento da maioria, ou talvez até de todas as plantas, atuando na maturação, abscisão, quebra de dormência e modificação da expressão sexual; quer seja de origem endógena ou externa. A relação entre o etileno e a respiração é estreita, sendo que sua atuação pode ser regulada de acordo com os níveis de oxigênio e gás carbônico na atmosfera onde o produto vegetal está armazenado (Beyer, 1981; Mahajan *et al.*, 2001; Watada *et al.*, 1996; Yang, 1981). Sua produção autocatalítica isto é, a estimulação de síntese de grandes quantidades de etileno nos tecidos vegetais em resposta ao contato com pequenas quantidades do gás ou outras substâncias como propileno e acetileno, é um fator muito importante no pós-colheita pois estimula a respiração e a maturação (Biale *et al.*, 1981).

Em raízes e tubérculos uma importante alteração de textura, além do murchamento causado pelo fenômeno da transpiração, é o aumento na dureza associada ao desenvolvimento dos vegetais, e ocorre devido ao crescimento da parede celular secundária como resultado do depósito de lignina (Chitarra *et al.*, 1997; Eskin, 1990).

Numerosos processos fisiológico/bioquímicos que ocorrem no corpo humano podem produzir radicais livres e outras substâncias altamente reativas como subprodutos. A alta produção de tais compostos pode causar danos oxidativos a macromoléculas orgânicas como lipídeos, proteínas e DNA, levando eventualmente a diversos males crônicos como aterosclerose, câncer, diabetes, envelhecimento e outras doenças degenerativas. As frutas, legumes, ervas medicinais e outros produtos e alimentos vegetais podem conter uma grande variedade de substâncias antioxidantes como polifenóis, vitaminas, carotenóides

entre outros metabólitos, que podem atuar no tratamento e prevenção de algumas doenças citadas (Cai *et al.*, 2004; Pyo *et al.*, 2004; Rauha *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1997).

Os carotenóides compreendem uma enorme variedade de pigmentos biossintetizados pelos vegetais, com estrutura básica semelhante. Estes compostos são responsáveis pela cor atraente de produtos como a cenoura e a beterraba. Devido à incapacidade animal de sintetizar estes pigmentos, sua importância na dieta se faz necessária (K'osambo *et al.*, 1998; Rodriguez-Amaya, 1997). Durante o preparo doméstico, processamento industrial, e estocagem dos alimentos, as condições para a degradação do carotenóide se fazem presente. Fatores como calor, luz e ácidos, podem promover certas alterações nos carotenóides que podem resultar em uma ligeira perda de cor e atividade biológica. Porém a oxidação é principal causa de sua degradação, sendo estimulada pela presença de enzimas, metais, peróxidos e também da luz e calor; acarretando em conseqüências mais severas, além de contribuir com o desenvolvimento de sabor desagradável em alguns alimentos (Eskin, 1990; Rodriguez-Amaya, 1993; Rodriguez-Amaya, 1997).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são largamente distribuídos no reino vegetal, geralmente ocorrendo como subprodutos do metabolismo, constituem portanto um componente comum da dieta humana. Do ponto de vista químico, podem ser definidos como um grupo bastante diversificado de substâncias que possuem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila ou outros grupos funcionais como ésteres, glicosídeos, etc., no qual os mais importantes são os ácidos fenólicos (caféico, clorogênico, ferúlico, gálico, p -cumárico), os flavonóides (antocianinas, flavanas, flavonas, flavononas, flavonóis, isoflavonas) e os taninos (Escarpa *et al.*, 2001; Salunkhe *et al.*, 1982). Para a ciência dos alimentos é importante o papel dos compostos fenólicos na qualidade organoléptica e nutricional dos produtos vegetais, além da sua capacidade de atuação na fisiologia e bioquímica dos vegetais, tais como crescimento, escurecimento enzimático, proteção a patógenos, atuação contra raios ultravioleta e

outras condições de estresse que podem interferir no pós-colheita (Escarpa *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 1969; Tuck *et al.*, 2002). Os ácidos fenólicos são derivados do ácido benzóico. Apesar de não estarem associados a efeitos adversos na qualidade nutricional dos alimentos, podem contribuir com alterações indesejáveis na coloração destes, pois servem de substrato a enzimas capazes de causar tais alterações, como a peroxidase e a polifenoloxidase (Escarpa *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2004; Richard-Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1996a; Robert *et al.*, 1996b; Vamos-Vigyazo, 1981). Embora muitas dessas reações metabólicas sejam inerentes ao produto agrícola, existe também a influência dos processos envolvidos em sua cultura, comercialização e consumo, em sua ativação; tornando indispensável para elucidação de seus mecanismos a compreensão de sua natureza endógena e exógena, bem como suas inter-relações. Dentre enzimas importantes podem-se destacar as oxidoredutases, peroxidase e polifenoloxidase, cuja principal relação com as alterações pós-colheita diz respeito a alterações indesejáveis na cor, sabor e aroma dos produtos vegetais. Existe uma lacuna na bibliografia das peroxidases que decorre, talvez, da complexidade de suas funções catalíticas nos diferentes sítios celulares onde atuam e das dificuldades operacionais de separação e purificação de cada uma das isoformas à homogeneidade; condição essencial ao conhecimento de suas propriedades bioquímicas e mecanismos de ação. A intenção deste trabalho foi trazer uma contribuição para melhor elucidar esses mecanismos, com o isolamento e caracterização da peroxidase de raízes de yacon.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: PEROXIDASES

A enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) pertence à classe das oxidoreduases, tendo sido sujeita a estudos em diversos vegetais pela sua importância tanto na fisiologia quanto na bioquímica (Burnette, 1977; Clemente *et al.*, 1998; Flurkey *et al.*, 1978; Neves *et al.*, 1998; Richard-Forget *et al.*, 1997). Embora uma função fisiológico/bioquímica precisa não tenha sido ainda estabelecida para esta enzima em vegetais; ela tem sido direta ou indiretamente relacionada a uma série de processos metabólicos, tais como: biogênese de etileno (Gorin *et al.*, 1976), balanço hormonal (Frenkel, 1972; Haard, 1977; Saijo *et al.*, 1974), amadurecimento e senescência (Flurkey *et al.*, 1978; Frenkel, 1972; Gorin *et al.*, 1976; Haard, 1973; Rothan *et al.*, 1989; Thomaz *et al.*, 1981), controle respiratório, oxidação de fenóis, de ácido indol acético, biossíntese de ligninas e modificações associadas a estes processos (Abeles *et al.*, 1991; Aparicio-Cuesta *et al.*, 1992; Beyer, 1981; Biale *et al.*, 1981; Bleinroth, 1982; Flurkey *et al.*, 1978; Frenkel, 1972; Gorin *et al.*, 1976; Haard, 1973; Huang *et al.*, 1990; Rothan *et al.*, 1989; Saijo *et al.*, 1974; Silva *et al.*, 1990; Vamos-Vigyazo, 1981; Veitch, 2004).

As necessidades de obtenção de peroxidases purificadas a preços viáveis para aplicação prática, como para produção industrial de aromatizantes ou uso como componente de reagentes para testes de diagnóstico clínico, demandam cada vez mais pesquisas de purificação e caracterização da enzima obtida de diferentes fontes, além do desenvolvimento de novas técnicas de extração e purificação (Aruna *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2004; Haandel *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Peralta *et al.*, 2004; Regalado *et al.*, 1996; Said *et al.*, 2004b; Veitch, 2004; Welinder, 1985).

A despeito da demanda comercial direta, sua importância para ciência dos alimentos fica evidenciada tanto por suas relações com as alterações na textura e sabor dos vegetais, quanto à susceptibilidade das plantas aos patógenos e choques mecânicos, estando envolvidas nas reações de escurecimento de vegetais crus e processados, na perda de qualidade nutricional e mesmo na completa deterioração

pós-colheita desses alimentos (Aparicio-Cuesta *et al.*, 1992; Bollen *et al.*, 2001; Böttcher *et al.*, 2003; Bruemmer *et al.*, 1976; Burnette, 1977; Duangmal *et al.*, 1999; Manzocco *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 1989; Richard-Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1996a; Vamos-Vigyazo, 1981; Yoshida *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2003).

A observação na literatura revela a importância da presença de diferentes formas da enzima, assim como sua variação em função de espécies e cultivares vegetais (Kahn *et al.*, 1981; Lourenço *et al.*, 1995; Neves, 2002; Rodriguez-López *et al.*, 2000; Rothan *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1990; Thomaz *et al.*, 1981; Vamos-Vigyazo, 1981; Welinder, 1985; Yoshida *et al.*, 2003). Embora, nem sempre uma relação causal tenha sido estabelecida entre sua presença, variação nos níveis de atividade e surgimento destas formas múltiplas, estudos sistemáticos sobre sua ocorrência, distribuição, purificação, assim como de sua cinética e propriedades em diferentes fontes, têm contribuído para a elucidação do seu papel fisiológico-bioquímico, como também em processos deteriorativos relacionados à industrialização de frutos e vegetais (Abeles *et al.*, 1991; Akissoe *et al.*, 2003; Akissoe *et al.*, 2004; Aparicio-Cuesta *et al.*, 1992; Benklebia, 2000; Robert *et al.*, 1996b; Said *et al.*, 2004a; Vamos-Vigyazo, 1981).

A primeira observação de uma reação catalisada por uma peroxidase de rabanete aparece registrada em um artigo publicado em 1810 por Louis Antoine Planché (1776 - 1840) descrevendo a análise de uma resina vegetal importada para França, provavelmente do Caribe, para fins medicinais. Planché investigava uma possível adulteração do produto com resinas de árvores caribenhas como *Guaiacum officinale* e *G. sanctum*, durante a pesquisa, notou que a tintura da resina se tornava azul quando um pedaço de rabanete fresco era adicionado. A reação observada foi, provavelmente, a oxidação de 2,5-di-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-3,4-dimetilfurano (um constituinte secundário da resina, que era conhecido como ácido guaiacônico), catalisada pela peroxidase. Embora o termo “peroxidase” tenha sido adotado desde o final do século 19, foi o trabalho de Robert Chodat (1865 - 1934) e Alexei Nikolaevich Bach (1857 - 1946) na

universidade de Genebra, durante o início do século 20, que iniciaram as pesquisas com peroxidases de rabanete e de outras fontes vegetais. Algumas de suas observações estimularam debates a respeito da natureza das oxidases e peroxidases, que em 1966 foram recontadas em um livro de David Keilin (1887 - 1963), outro pesquisador que contribuiu com o campo das peroxidases. A enzima purificada foi obtida por Richard Willstätter (1872 - 1942) e Hugo Theorell (1903 - 1982). Entre outros avanços alcançados em estudos subsequentes entre 1920 a 1945 pode-se citar a demonstração do grupamento heme e de carboidratos como componentes da peroxidase, a primeira observação de intermediários catalíticos conhecidos como compostos I e II e a primeira análise cinética de uma reação com peróxido de hidrogênio (Paul, 1986; Veitch, 2004).

Mais detalhes históricos a respeito da descoberta e do desenvolvimento da pesquisa das peroxidases estão disponíveis na literatura, e demonstram a importante contribuição inicial que os estudos com a peroxidase de rabanete forneceram para os avanços e a compreensão das peroxidases em geral.

2.1. GENERALIDADES E TIPOS DE REAÇÕES CATALISADAS

De acordo com o “Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular” (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a classe das oxidoreduases (1) compreende todas as enzimas que catalisam reações de óxido-redução, o substrato oxidado é considerado como doador de hidrogênio ou elétron. E a subclasse que atua sobre o peróxido como acceptor (1.11) contém a POD (1.11.1.7). Seu nome sistemático baseado em “doador:acceptor oxidoreduase” é portanto doador:peróxido de hidrogênio oxidoreduase (Webb, 1992).

As peroxidases podem ser divididas em duas categorias principais: (1) peroxidases que contêm ferro (ilustração 2), as quais possuem grupamento heme como grupo prostético e (2) peroxidases de flavoproteína, que contêm flavina-adenina-dinucleotídeo como grupo prostético. As primeiras ocorrem em plantas

superiores, animais e microrganismos, as peroxidases de flavoproteínas ocorrem também em microrganismos e em tecidos animais (O'Brien, 2000; Vamos-Vigyazo, 1981; Veitch, 2004).

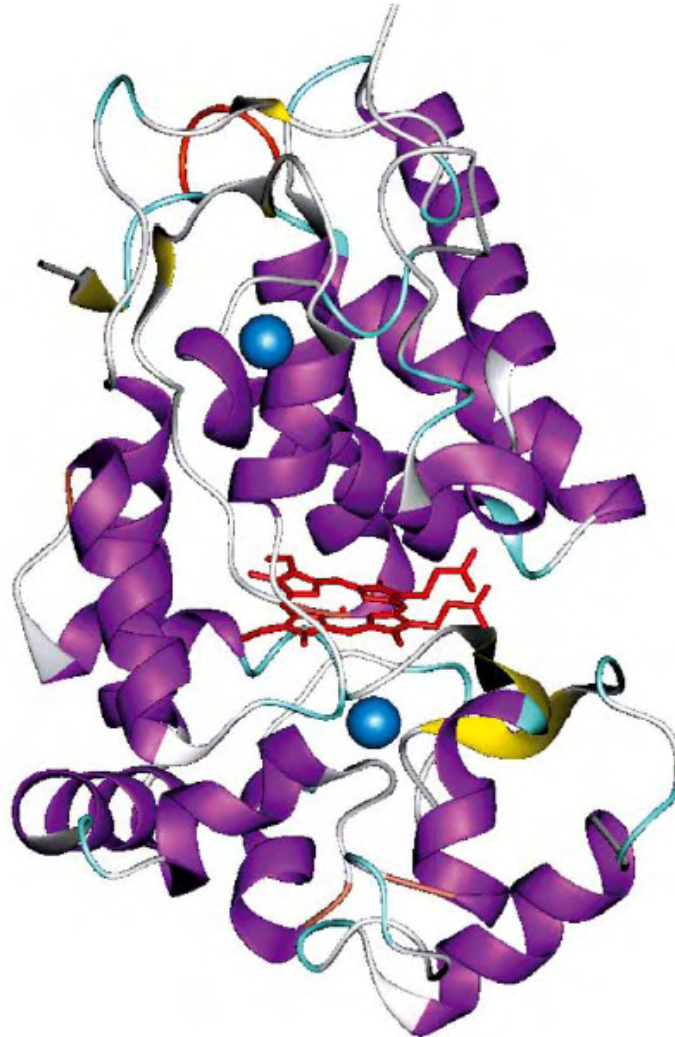


Ilustração 2. Representação tridimensional da cristalografia por raios-X da estrutura da peroxidase de rabanete, reproduzida de Veitch (2004). O grupamento heme está representado em vermelho está localizado entre dois átomos de cálcio, representados como esferas azuis. Em roxo há uma α -hélice em amarelo uma folha β -pregueada.

As peroxidases são capazes de catalisar quatro tipos de reações, são elas: (a) peroxidação, (b) oxidação, (c) decomposição catalítica e (d) hidroxilação.

A equação geral da reação de peroxidação pode ser dada como na ilustração 3 (O'Brien, 2000; Robinson *et al.*, 1991; Vamos-Vigyazo, 1981; Veitch, 2004). No decorrer da reação, compostos intermediários são formados (ilustração 4):

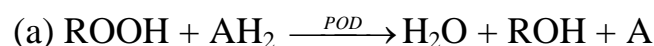


Ilustração 3. (R) H⁺, CH₃ ou C₂H₅; (AH₂) doador de hidrogênio na forma reduzida; (A) doador de hidrogênio na forma oxidada.

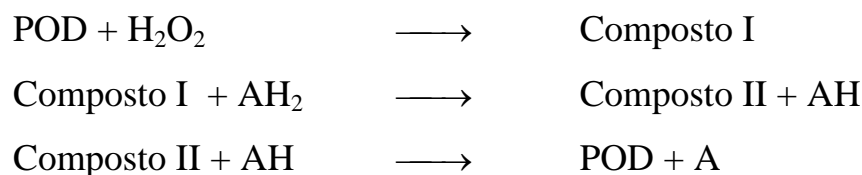


Ilustração 4. (Compostos I e II) formas altamente oxidantes da enzima; (AH₂ e AH) doador de hidrogênio em formas reduzidas; (A) doador de hidrogênio na forma oxidada.

Entre a grande variedade de compostos que podem atuar como doador de hidrogênio estão os fenóis (*p*-cresol, guaiacol, resorcinol), aminas aromáticas (anilina, benzidina, *o*-fenilenediamina, *o*-dianisidina), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzidas.

A reação oxidativa (ilustração 5) pode ocorrer na ausência do peróxido de hidrogênio, e necessita de oxigênio e cofatores Mn²⁺ e um fenol. Novamente uma grande variedade de substratos pode ser transformada nesta reação, como oxalato, oxaloacetato, ketomalonato, di-hidroxifumarato ou ácido indol-acético (Robinson *et al.*, 1991; Vamos-Vigyazo, 1981).

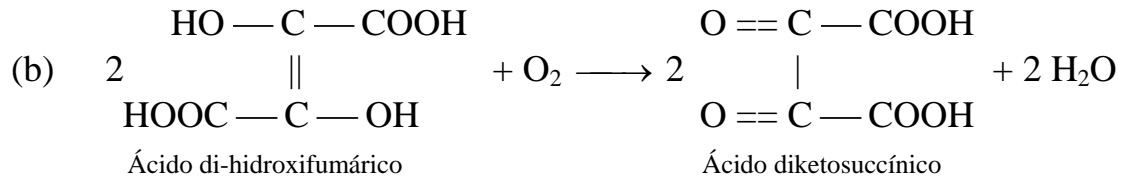


Ilustração 5. Exemplo de reação oxidativa, com a formação de ácido diketosuccínico a partir de ácido di-hidroxifumárico.

A decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio (ilustração 6) ocorre a taxas desprezíveis em comparação das reações peroxidativas e oxidativas, e se dá na ausência de um doador de hidrogênio, de acordo com a equação a seguir (Vamos-Vigyazo, 1981):

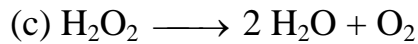


Ilustração 6. Decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio.

A reação de hidroxilação (ilustração 7) produz o-di-hidroxifenóis a partir de monofenóis e oxigênio, mas necessita de um doador de hidrogênio como fonte de radicais livres (Vamos-Vigyazo, 1981).

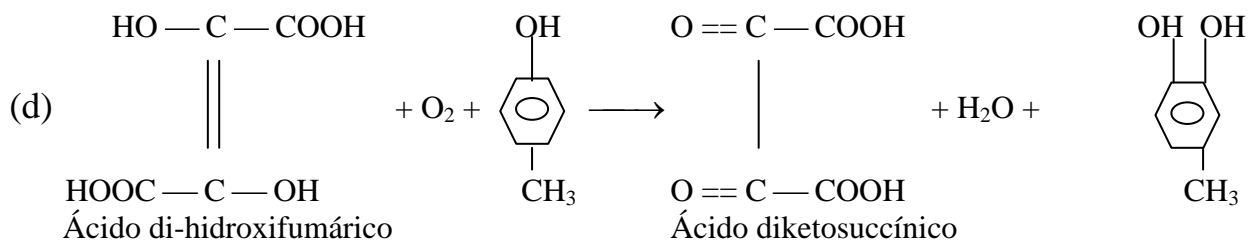


Ilustração 7. Hidroxilação de ác. didroxifumárico em ác. diketosuccínico.

Segundo Vamos-Vigyazo (1981) é possível que as reações de oxidação e de hidroxilação não sejam resultados diretos da atividade enzimática, mas ocorrem em reações secundárias decorrentes da formação de radicais livres do peróxido de hidrogênio.

2.2. OCORRÊNCIA E FUNÇÃO BIOLÓGICA

Como já foi dito, a POD é de distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontrada nas células parcialmente na forma solúvel, no citoplasma, e outra porção na forma insolúvel, ligada à parede e à membrana celular, bem como às estruturas sub-celulares, tais como mitocôndrias e cloroplastos. A forma particulada pode estar ligada ionicamente ou covalentemente (O'Brien, 2000; Vamos-Vigyazo, 1981; Veitch, 2004). As formas solúveis podem ser obtidas de homogenatos dos tecidos com soluções tampão de baixa força iônica (0.05 - 0.18 mol/L), enquanto que as enzimas ligadas ionicamente precisam ser extraídas com tampões de força iônica maiores (como por exemplo, NaCl 1 mol/L ou CaCl₂ 0,1 mol/L a 1,4 mol/L). A extração da peroxidase ligada covalentemente requer digestão das pectinas e/ou celulose com uma preparação enzimática (Eisenthal *et al.*, 1993; Hamed *et al.*, 1998; Vamos-Vigyazo, 1981). Estudos de isolamento e purificação de isoenzimas solúveis e ligadas têm sido realizados com muitas espécies vegetais, incluindo principalmente frutas e raízes, tais como banana (Toraskar *et al.*, 1984), maçã (Moulding *et al.*, 1987), mamão papaia (Lourenço *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1990), pêssigo (Neves *et al.*, 1998; Neves, 2002), pêra (Moulding *et al.*, 1989), batata (Kahn *et al.*, 1981) e nabo (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000).

O papel desempenhado pela POD no ciclo de vida dos vegetais é um dos tópicos menos elucidados no que diz respeito à enzima. No entanto inúmeras evidências do envolvimento da peroxidase em diversos processos fisiológico/bioquímicos foram apontadas pela literatura. Levando-se em consideração os fatores capazes de favorecer ou inibir sua biossíntese e ação, é

possível concluir que ferimentos no vegetal, infecção por patógenos e outras causas de estresse fisiológico são capazes de alterar os padrões de atividade da enzima. Inúmeros trabalhos com peroxidases de diferentes origens sugerem e/ou demonstram que a ocorrência da enzima nos vegetais está intimamente relacionada com sua função biológica, e portanto, com a parte da planta, sua idade, grau de maturação, condições ambientais, injúrias mecânicas e infecção por agentes patogênicos.

As peroxidases desempenham importante papel na maturação de frutos, crescimento vegetativo e brotamento, sendo geralmente bem aceito que, a despeito das reações catalisadas por outras enzimas, a degradação do ácido indol-acético (IAA) pela POD atua na regulação da concentração deste fitormônio *in vivo* nas plantas (Robinson *et al.*, 1991; Vamos-Vigyazo, 1981). A inativação deste regulador de crescimento vegetal ocorre principalmente por uma reação oxidativa com consumo de O₂ catalisada pela POD. A seqüência completa da reação por via oxidativa incluindo o mecanismo de ativação do oxigênio, tem sido difícil de elucidar porque a enzima é capaz de degradar o IAA com ou sem o envolvimento de pequenas quantidades de H₂O₂ e compostos fenólicos (Robinson *et al.*, 1991; Veitch, 2004). Em um estudo de armazenamento de cebolas durante 22 semanas, sob várias condições, foi observado que o decréscimo da atividade da POD coincidiu com o surgimento e desenvolvimento de brotos nos bulbos, indicando seu papel catalítico sobre o IAA, que é considerado um promotor efetivo do brotamento em cebolas (Benkeblia, 2000).

Os principais produtos da oxidação do IAA são indol-3-metanol, indol-3-aldeído e 3-metileno-2-oxido-indol, sendo o último provavelmente uma conversão não enzimática de indol-3-metil-hidroperóxido. Um esquema da reação de formação de indol-3-metanol (IM) e 3-hidroximetil-oxi-indol (IOO[•]), após a remoção de um elétron do IAA pela POD (ilustração 8) foi proposto por Robinson e colaboradores (1991), no qual a ferropoxidase (Per-Fe^{II}) e o radical IAA[•] são supostamente formados, este então é descarboxilado para formar um radical metil-3-indol (I[•]). A ferropoxidase tem alta afinidade por oxigênio formando o

composto III; o radical metil-3-indol é então peroxidado pela peroxidase oxigenada (composto III) e reduzido peroxidativamente a indol-3-metanol. Contudo, tais mecanismos de degradação constituem uma área em constante debate (Robinson *et al.*, 1991; Veitch, 2004).

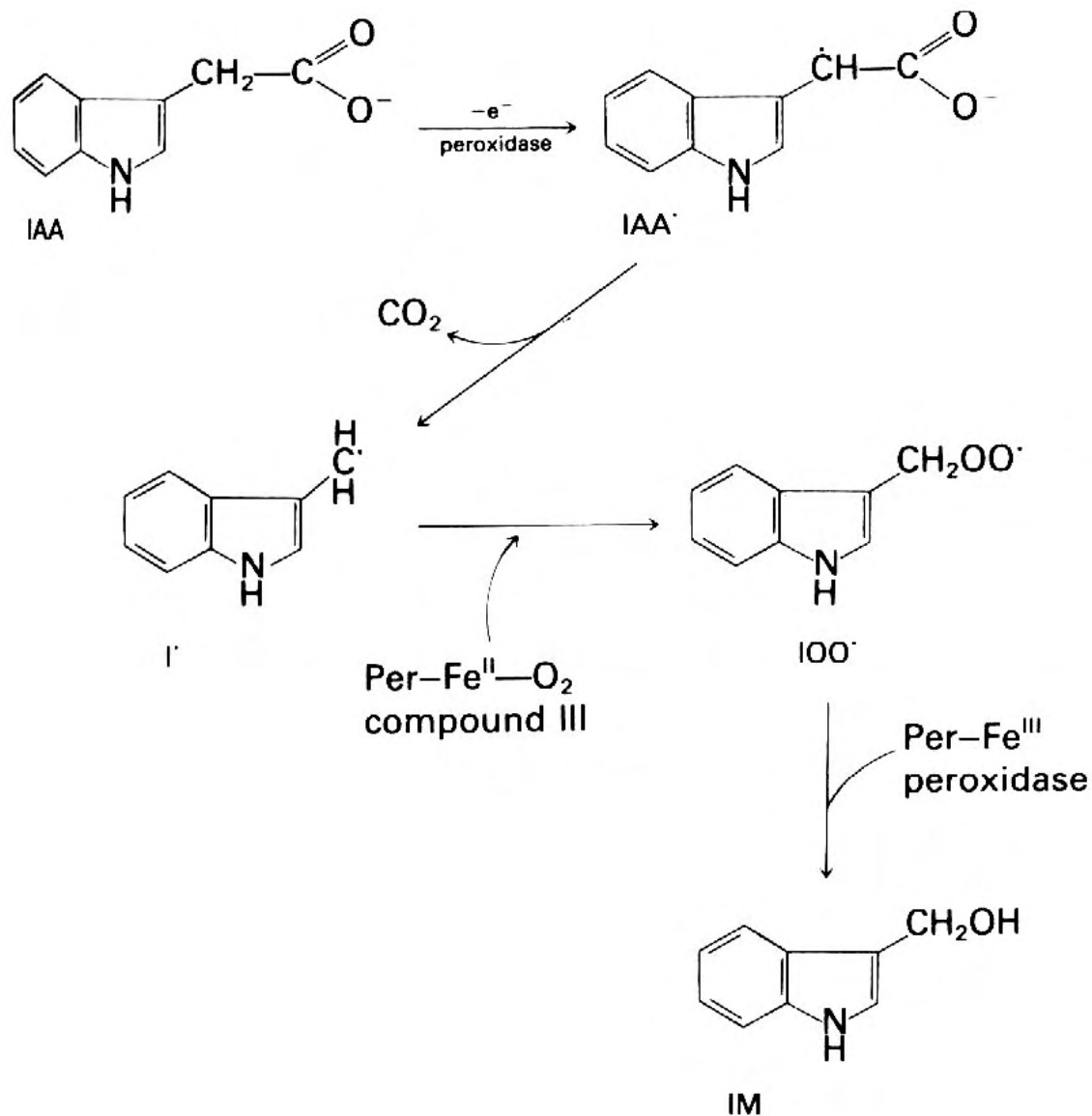


Ilustração 8. Formação de indol-3-metanol (IM) e 3-hidroximetil-oxi-indol (IOO•) a partir de ácido indol acético (IAA). Sendo I•, radical metil-3-indol. (reproduzido de Robinson *et al.*, 1991).

A clorofila é um dos principais pigmentos de vários produtos vegetais como os brócolis, azeitonas e outros; no entanto sua relevância é reduzida quando se trata de raízes e tubérculos, geralmente estando associada à depreciação destes produtos. Batatas e cebolas, por exemplo, quando expostas a luz natural ou artificial, dependendo da intensidade e tempo de exposição, sintetizam clorofila nas camadas superficiais, prejudicando seu valor e aceitação comercial (Bleinroth, 1982; Rubatzky *et al.*, 1999). Embora duas outras enzimas, clorofilase e clorofila oxidase, sejam responsáveis pela degradação da clorofila, existem evidências ainda não completamente esclarecidas de que as peroxidases possam desempenhar algum papel neste processo, associado a senescência e amarelamento em folhas e frutos. Sabe-se que a atividade da POD e os níveis de peróxido aumentam durante a senescência e amadurecimento de frutos, inclusive em processos induzidos de senescência (Robinson *et al.*, 1991; Vamos-Vigyazo, 1981). Como exemplo pode-se citar o trabalho de Starzynska e colaboradores (2003), que pesquisaram o amarelamento em brócolis, um dos principais fatores envolvidos na perda da sua qualidade e valor comercial, sendo causada pela degradação da clorofila. Funamoto e colaboradores (2002) verificaram que tal fenômeno pode ocorrer durante o armazenamento do vegetal a 15°C, condições sob as quais também se verificou um aumento na atividade de POD, correlacionando as duas observações. Em outro trabalho (Funamoto *et al.*, 2003) os autores, trabalhando com marcadores enzimáticos, verificaram a ocorrência de atividade de degradação de clorofila catalisada por peroxidase em cloroplastos, mitocôndrias e outras frações celulares, bem como no citoplasma. Em ambas publicações o tratamento térmico foi considerado eficaz na conservação do vegetal estudado por inibir a atividade da POD, prevenindo assim a degradação da clorofila.

Numerosos estudos apontam para o papel geral desempenhado pela peroxidase na proteção dos tecidos vegetais a injúrias mecânicas e infecção por patógenos, uma de suas principais funções no ciclo de vida das plantas, estando muitas vezes associado a biossíntese de lignina.

Bernards e colaboradores (1999) verificaram a ocorrência de uma peroxidase aniônica nos tecidos de suberização em batatas, temporal e espacialmente relacionada a injúrias induzidas.

Takahama e colaboradores (2000) encontraram peroxidase presente em vacúolos, em coexistência com compostos fenólicos; e em folhas de tabaco, estando relacionada com a idade e o escurecimento das mesmas.

Chaman e colaboradores (2001) trabalharam com mudas de cevada infestadas por afídeos e verificaram que tal condição elevou os níveis de atividade de várias isoformas de POD solúveis e ligadas à parede celular, e causou a manifestação de uma nova isoforma particulada. Evidenciando o papel da enzima nos mecanismos de defesa da planta, mas sugerindo uma possível contaminação de uma peroxidase proveniente de outro vegetal e injetada pelos parasitas. A remoção dos pulgões acarretou em redução nos níveis de atividade da POD na cevada.

Ippolito e colaboradores (2000) em seu estudo de biocontrole de degradação pós-colheita em maçã afirmam que, além de outros fatores, o microrganismo usado como agente de biocontrole aumenta a atividade enzimática no fruto, contribuindo com a redução na ocorrência de infecções.

Em um estudo com *Aloe barbadensis* Esteban-Carrasco e colaboradores (2001) postularam que a oxidação de compostos fenólicos pela peroxidase pode ter um efeito cicatrizante e anti-infeccioso no vegetal após injúrias.

Rodriguez-López e colaboradores (2000) afirmaram que a atividade da POD em melões aumenta em condições de estresse como resposta celular ao aumento das condições de salinidade do meio de cultivo, e tem relação com o aumento na firmeza destes frutos, devido à atuação da enzima na formação de lignina e suberina. Um resultado diferente foi apresentado por Rivero e colaboradores (2001), que estudando o estresse pelo frio em melancia e pelo calor em tomates, verificaram que estes vegetais apresentam uma resposta a estas condições baseada no acúmulo de compostos fenólicos pela ativação de sua biossíntese associada a inibição de sua degradação pela POD e polifenoloxidase (PPO), que normalmente têm suas atividades aumentadas em condições de estresse.

A lignina é um polímero heterogêneo capaz de formar uma rede tridimensional e é geralmente considerada responsável pela dureza e firmeza nos alimentos vegetais. São materiais resistentes que ocorrem associados com a celulose e outros polissacarídeos na parede celular dos vegetais superiores. As duas reações envolvidas nos processos de lignificação são polimerizações oxidativas de monolignóis e a geração de peróxido de hidrogênio com gasto de NADH. A POD primeiro catalisa a oxidação do monolignóis para formar radicais fenoxi, os quais podem constituir dímeros (ilustração 9), que podem apresentar uma grande variedade de funções biológicas antioxidantes e antimicrobianas. Contudo, tais dímeros não são os produtos finais desta via metabólica, podendo ser oxidados pela peroxidase, resultando em polímeros que poderão permanecer associados a parede celular, formando as macromoléculas de lignina (Barceló *et al.*, 2004; Mayer *et al* 2002; Robinson *et al.*, 1991; Vamos-Vigyazo, 1981).

Doblinski e colaboradores (2003) mostraram que os ácidos ρ -cumárico e ρ -hidroxibenzóico promoveram um aumento na atividade da POD em raízes de soja, relacionando-a com a diminuição da taxa de crescimento do vegetal devido ao aumento da lignificação no tecido.

É sugerido que os componentes fenólicos das paredes vegetais suberizadas são polimerizados em processos mediados pela POD. Em corroboração a esta afirmação foi observada a presença de uma peroxidase aniônica nos tecidos de suberização e um incremento gradual de sua atividade nas células próximas aos ferimentos induzidos em batatas, indicando o provável papel da enzima nos processos de suberização e também seu envolvimento com a recuperação de tecidos (Bernards *et al.*, 1999).

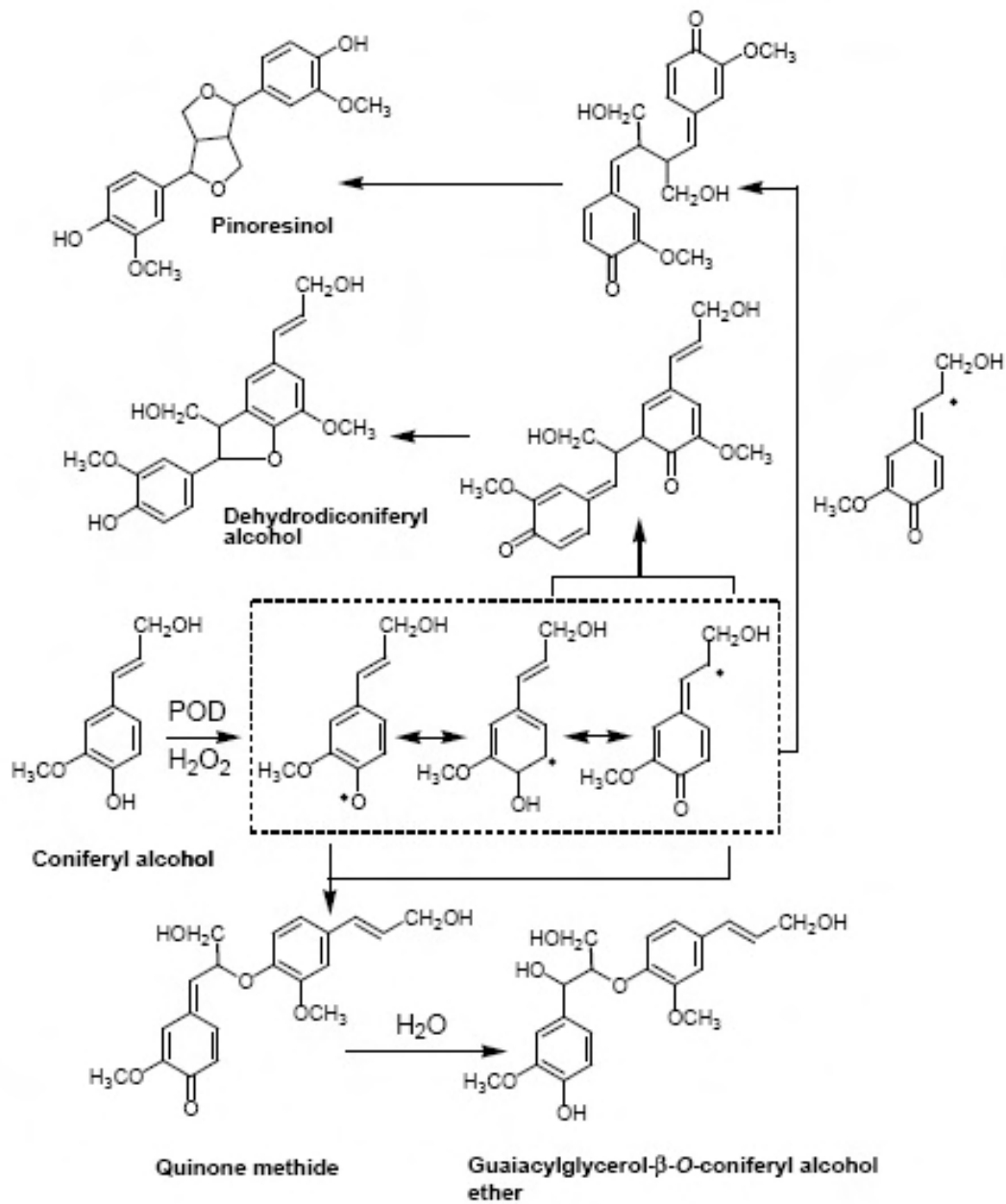


Ilustração 9. Radicais fenoxi formados pela oxidação de álcool coniferil pela POD, e subsequente formação dos dímeros pinosresinol, álcool desidrodiconiferil e álcool éter guaiacil-glicerol- β -o-coniferil, via metil-quinonas (reproduzido de Barceló *et al.*, 2004).

Evidências do envolvimento da POD e sua importância em reações de escurecimento enzimático em vegetais têm sido apresentadas por muitos autores (Avallone *et al.*, 2004; Clemente *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1990; Richard-Forget *et al.*, 1997; Valderrama *et al.*, 2001; Vamos-Vigyazo, 1981; Zhou *et al.*, 2003), assim como sua associação com o surgimento de caracteres sensoriais prejudiciais, principalmente em produtos industrializados como os minimamente processados (Aparicio-Cuesta *et al.*, 1992; Bruemmer *et al.*, 1976; Burnette, 1977; Vamos-Vigyazo, 1981). Este aspecto tem fortalecido a suposição de uma relação entre atividade de peroxidase e qualidade do alimento processado. Geralmente observa-se uma correlação entre o aumento na concentração de compostos fenólicos com o aumento de atividade da POD, resultando então na diminuição dos primeiros; e devido a sua grande estabilidade térmica a enzima tem sido utilizada como um índice de controle de operações de processamento de frutos e vegetais (Bruemmer *et al.*, 1976; Burnette, 1977; Kahn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 1998; Vamos-Vigyazo, 1981).

A capacidade da peroxidase de oxidar diversos compostos, como por exemplo os fenóis, tem sido bastante estudada, já que implica na capacidade da enzima em atuar no fenômeno de escurecimento dos alimentos de origem vegetal e na resposta do vegetal às condições de estresse. Dois mecanismos podem ser implicados no envolvimento da POD no escurecimento enzimático. Primeiramente a geração de peróxido de hidrogênio durante a oxidação de alguns compostos fenólicos e o uso desse em oxidações subseqüentes, atuando no “turnover” desses compostos (Barceló *et al.*, 2004; O’Brien, 2000; Robinson *et al.*, 1991; Takahama *et al.*, 2000; Vamos-Vigyazo, 1981; Vamos-Vigyazo *et al.*, 1982; Veitch, 2004); e também o uso de quinonas como substrato da enzima, contribuindo na formação das melaninas (Barceló *et al.*, 2004; Richard-Forget *et al.*, 1997). De uma maneira simplificada, as quinonas, formadas pela atividade enzimática da polifenoloxidase, podem sofrer uma série de reações não enzimáticas de polimerização, resultando em compostos insolúveis escuros ou avermelhados, como por exemplo, as

melaninas. Os tecidos impregnados com estes polímeros atuam como barreiras para as infecções (Ho, 1999; Vamos-Vigyazo, 1981).

Em um estudo sobre escurecimento enzimático e perda de qualidade durante armazenamento pós-colheita de lichia foram observados o escurecimento da polpa da fruta durante os 14 dias do experimento, assim como o aumento na atividade de POD e diminuição de compostos fenólicos (Zhang *et al.*, 1997). Apesar da capacidade oxidativa dependente da presença de peróxido de hidrogênio, López-Serrano e colaboradores (1996) chamaram a atenção para a possibilidade das peroxidases estarem exibindo sua capacidade de oxidar compostos fenólicos na ausência de H₂O₂ em morangos, informação importante a ser considerada nos estudos de conservação desses alimentos e produtos derivados.

O escurecimento de alimentos de origem vegetal e seus produtos derivados podem resultar da combinação entre as reações enzimáticas e não enzimáticas, como os mecanismos de Maillard e Strecker, tornando a investigação dos processos envolvidos mais complexa. Além disso, os processos empregados na fabricação dos alimentos desta categoria, tais como congelamento e descongelamento, descascamento, dessecamento, entre outros, podem causar rompimento celular, colocando em contato as enzimas com seus potenciais substratos. Assim, se faz necessário o emprego de técnicas que permitam a inativação ou inibição enzimática. Cano e colaboradores (1997) observaram correlação entre o conteúdo fenólico e o escurecimento em bananas fatiadas e congeladas; verificaram também que o branqueamento por microondas e por vapor reduziu significativamente as atividades da POD, sem contudo obter uma redução significativa no escurecimento do produto, sugerindo a ocorrência concomitante de um processo de escurecimento não enzimático.

Akissoe e colaboradores (2003) estudando “amala”, uma pasta feita com farinha de inhame, comum no oeste africano, verificaram que o branqueamento reduziu a atividade enzimática da POD e a desidratação reduziu a atividade da PPO, porém verificaram valores altos e correlacionados da taxa de escurecimento com o conteúdo fenólico durante as operações finais da fabricação do produto e

com a atividade da POD no inhame fresco. Sugeriram um mecanismo em duas fases para explicar o fenômeno: a primeira fase ocorre antes do branqueamento terminar e poderia ser POD dependente, levando a precursores de fenóis; a segunda ocorreria durante a secagem, e poderia ser um processo não enzimático. Em um trabalho posterior com o mesmo alimento (Akissoe *et al.*, 2004), foi verificado que os processos de branqueamento reduziram as atividades da POD e da PPO, mas não afetaram o escurecimento ou o conteúdo de fenóis no produto final.

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi isolar, purificar e caracterizar algumas propriedades da peroxidase solúvel de raiz de yacon.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

As raízes de yacon foram adquiridas no comércio, mantidas em bandejas de isopor e protegidas por filme plástico sob refrigeração a 4°C até o momento da extração da peroxidase, quando foram limpas de sujidades, imersas em água contendo 0,1% de hipoclorito de sódio por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e secagem com papel toalha.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. EXTRAÇÃO

Amostras de raízes de yacon descascadas e picotadas foram adicionadas a solução tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0 contendo 5 mM de ácido ascórbico, seguidas de homogeneização em homogeneizador do tipo Ultra Turrax seguido de filtração em gaze. O homogenato obtido foi centrifugado a 8000 rpm durante 20 a 30 minutos, desprezou-se então o resíduo precipitado, constituindo-se assim o extrato bruto. Todas as etapas do processo foram realizadas a 4°C ou em banho de gelo.

4.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Foram realizados estudos referentes às condições de extração da peroxidase de yacon para obtenção do melhor rendimento durante a preparação do extrato bruto, tais como efeito da força iônica do tampão, pH e inibidores. Cada extração foi obtida a partir de 10 g de yacon com 20 mL da solução tampão. Verificou-se o efeito da concentração da solução tampão na extração da POD em extrações com solução tampão fosfato de potássio pH 6,8 nas concentrações de 0,05 M, 0,1 M,

0,15 M e 0,2 M. Para verificar o efeito do pH na extração, foram utilizadas as soluções tampão citrato-fosfato de potássio pH 5,4 e fosfato de potássio pH 6,0; 6,6 e 7,0.

Também foi testado o efeito de inibidores de escurecimento enzimático na extração da enzima. Utilizaram-se como inibidores o ácido ascórbico nas concentrações de 2 mM, 4 mM e 5 mM, e ácido cítrico nas concentrações de 5 mM e 10 mM.

4.2.3. PURIFICAÇÃO

O extrato bruto foi submetido a um processo de concentração que consistiu de precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) até 85% de saturação sob agitação lenta durante 3 horas, seguida de centrifugação a 8000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5 contendo 3 mM de ácido ascórbico.

O material da etapa anterior foi aplicado em coluna de cromatografia de filtração em gel Sephadex G-25 (30,0 cm x 2,0 cm), e eluído com solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5.

As amostras do eluato da coluna Sephadex G-25 foram então submetidas à cromatografia de troca iônica em resina DEAE-celulose (20,0 cm x 1,5 cm), da qual um único pico de proteína foi eluído com solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5 sob um gradiente linear de cloreto de potássio (0 a 0,5 M). A fração referente ao pico de atividade foi utilizada nos estudos subseqüentes.

4.2.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da peroxidase foi determinada pela alteração da absorvância a 460nm devido à oxidação de o-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio. O ensaio consistiu de 0,2 mL de solução de o-dianisidina 15 mM, 0,2 mL de solução de peróxido de hidrogênio 30 mM e a solução enzimática em tampão

citrato-fosfato de potássio pH 5,5 com volume total de 3 mL. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a alteração de 0,001 unidade de absorvância por minuto sob as condições do ensaio.

4.2.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação do teor de proteínas totais nas etapas de purificação da peroxidase foi feita de acordo com microensaio do kit “Bio-Rad”, baseado no método de Bradford (1976), 0,8 mL de solução protéica adicionou-se 0,2 mL do corante “Coomassie Brilliant Blue G-250”, 10 minutos após homogeneização foi realizada leitura de absorvância a 595 nm. A curva de calibração foi obtida usando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão (apêndice figura 1).

4.2.6. ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da POD de yacon foi estimado pela eluição em coluna de filtração em gel (Andrews, 1965) Sephadex G-100 (50,0 cm x 2,0 cm), previamente calibrada com soroalbumina bovina (PM 67000), ovoalbumina (PM 45000), inibidor de tripsina (PM 21500) e citocromo C (PM 12400).

4.2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Os experimentos de eletroforese em disco e em placa foram realizados de acordo com o método proposto por Davis (1964). A coloração da proteína foi feita com a técnica de coloração pela prata. A coloração das bandas enzimáticas foi realizada a 35°C com a imersão dos géis em solução tampão citrato-fosfato de potássio pH 5,5, contendo o-dianisidina e peróxido de hidrogênio de acordo com o ensaio previamente descrito. A interrupção da reação se deu pela retirada do meio de reação seguido de enxágüe dos géis em água destilada.

4.2.8. CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE (pH E TEMPERATURA)

A atividade enzimática em função do pH foi determinada usando-se soluções tampão citrato-fosfato de potássio, com valores de pH entre 2,6 e 7,0; fosfato de sódio com valores de pH entre 7,0 e 8,0 e TRIS-HCl entre pH 8,0 e 9,0.

A atividade da peroxidase em função da temperatura foi realizada entre 15°C e 60°C, com valores intermediários tomados a cada 5°C.

4.2.9. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade da peroxidase foi verificada pela incubação da enzima sob condições de temperaturas entre 30°C e 80°C durante 30 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo por 1 a 2 minutos, e leitura de atividade residual.

4.2.10. ESPECIFICIDADE A SUBSTRATOS

Foram testados os compostos *p*-cresol, *o*-dianisidina, DL-DOPA, *p*-fenilenediamina, guaiacol, 4-metil-catecol e pirogallol como potenciais doadores de hidrogênio para oxidação pela POD, na presença de peróxido de hidrogênio.

4.2.11. CÁLCULO DAS CONSTANTES CINÉTICAS (Km E Vmax)

O efeito da concentração de substratos na atividade da peroxidase foi verificado para *o*-dianisidina e H₂O₂. Os valores de Km e Vmax foram determinados segundo o método gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (1934).

4.2.12. EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A capacidade de inibição enzimática de alguns compostos foi testada com sua adição no ensaio sob diferentes concentrações. Os valores das constantes de inibição (K_i) foram obtidos segundo o método gráfico proposto por Dixon (1953).

4.2.13. ESTUDOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

4.2.13.1. EFEITO DA TEMPERATURA NA INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E CÁLCULO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO (E_a)

A inativação da POD foi realizada pela exposição da enzima às temperaturas de 60°C, 65°C, 70°C e 75°C por diferentes períodos de tempo. A atividade residual foi medida após resfriamento em banho de gelo por 1 a 2 minutos.

Após a inativação enzimática foi feita a determinação da energia de ativação (E_a) para inativação da POD, de acordo com a equação de Arrhenius.

4.2.13.2. EFEITO DA SACAROSE NA INATIVAÇÃO TÉRMICA

Foi verificado o efeito da sacarose na inativação térmica da peroxidase. Os ensaios consistiram na adição do açúcar na solução enzimática em concentrações finais de 10%, 20% e 30%, e incubação sob as condições de inativação descritas em 4.2.13.1.

4.2.13.3. EFEITO DE SAIS NA INATIVAÇÃO TÉRMICA

Foram verificados os efeitos de cloreto de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de sódio na inativação térmica da peroxidase. Os ensaios foram realizados com a adição dos sais na solução enzimática nas concentrações de 0,1M, 0,5M e 1,0M, e incubação sob as condições de inativação descritas em 4.2.13.1.

4.2.14. REGENERAÇÃO DA POD APÓS INATIVAÇÃO TÉRMICA

A capacidade de regeneração da peroxidase foi estudada pelo acompanhamento da atividade residual durante 24 horas de incubação a 4°C e a 30°C, após inativação parcial a 65°C, 70°C, 75° e 80°C sob diversos períodos de tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXTRAÇÃO

O escurecimento enzimático observado nas raízes pode ser considerado intenso, e se iniciava imediatamente após o descascamento. Tal fenômeno se deve principalmente à ruptura das células e estruturas celulares que contém enzimas e seus substratos, colocando-os em contato no meio aquoso, favorecendo assim sua ação sobre os mesmos. O extrato de raiz de yacon passava de amarelo claro a marrom em poucos minutos. A fim de minimizar tal escurecimento, todas as etapas dos processos de extração e de purificação foram realizadas a 4°C ou em banho de gelo, e também se realizou um estudo de extração na presença de inibidores de escurecimento, comentado detalhadamente no item 5.2.

As extrações respeitaram a proporção de 1:2 (massa de yacon em gramas:volume de tampão em mililitros). Para cada extração foram utilizados de 40 g a 100 g de raízes de yacon, totalizando 400 g da raiz e 800 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0 contendo 5 mM de ácido ascórbico. Tais condições permitiram a extração da forma solúvel da POD. A forma ligada da enzima, referida anteriormente na revisão bibliográfica, foi retida durante o processo de filtração em gaze (conforme descrito em material e métodos) e não se destinou ao estudo neste trabalho.

5.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Os estudos de otimização das condições de extração consistiram da verificação do efeito de alguns parâmetros na extração, tais como: concentração da solução tampão, efeito do pH da solução tampão e efeito de inibidores de escurecimento. Cada extração realizada nos estudos de otimização se obteve a partir de uma relação massa:volume de 1:2 (10 g de raiz de yacon com 20 mL da solução tampão).

Realizaram-se extrações com tampão fosfato de potássio pH 6,8 nas concentrações de 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M e 0,2 M. A concentração adotada como ideal foi de 0,05 M devido à diferença pouco significativa de atividade entre as diferentes condições de extração, mesmo quando o aumento da molaridade do tampão foi de 4 vezes (tabela 1). Utilizando a mesma solução tampão de extração deste trabalho, Neves e colaboradores (1985) não verificaram diferença significativa da força iônica na atividade da peroxidase de batata-doce.

Tabela 1. Efeito da concentração da solução tampão na extração de POD de yacon.

Concentração da solução tampão (M)	Volume do extrato bruto (mL)	UA/mL	UA total	UA/g
0,05	27,5	5480	150700	15070
0,10	28,0	5670	158760	15876
0,15	32,0	5400	172800	17280
0,20	31,5	5640	177660	17766

Dentre as soluções tampão utilizadas, citrato-fosfato de potássio pH 5,4 e fosfato de potássio 0,05 M pH 6,0; 6,5 e 7,0, aquela de 0,05 M pH 6,0 se mostrou ideal para extração de POD de yacon, resultando em um valor superior de atividade por grama de material (tabela 2).

Tabela 2. Efeito do pH da solução tampão na extração de POD de yacon.

pH da solução tampão	Volume do extrato bruto (mL)	UA/mL	UA total	UA/g
5,4	24	4140	99360	9936
6,0	36	4390	158040	15804
6,5	24	6070	145680	14568
7,0	33	3890	128370	12837

Com o objetivo de se obter amostras enzimáticas que se apresentem adequadas ao estudo bioquímico, a extração de enzimas de tecidos vegetais requer o emprego de agentes com propriedades de adsorção de compostos fenólicos e outros elementos que atuem na prevenção da oxidação e conseqüente polimerização destes, que resultaria em indesejável escurecimento da amostra.

O ácido ascórbico tem sido usado há mais de 50 anos como inibidor de escurecimento enzimático em alimentos de origem vegetal, muitas vezes combinado com ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico. Tal papel se dá principalmente pela redução das quinonas em difenóis, evitando a formação de melaninas, mas também pode atuar na inibição enzimática como acidulante (Ashie *et al.*, 1996; Sapers *et al.*, 1993). O próprio ácido cítrico também é amplamente empregado como acidulante, mas também é capaz de atuar como um composto quelante (Sapers *et al.*, 1993). Tais compostos foram testados como inibidores de escurecimento na extração de POD de yacon, conforme descrito em material e métodos. O escurecimento foi avaliado subjetivamente com base na comparação visual em relação à amostra padrão, a qual não continha inibidor de escurecimento.

O ácido ascórbico a 5 mM apresentou os melhores resultados pois evitou o escurecimento da amostra durante 24 horas e não inibiu significativamente a atividade da enzima em relação às concentrações menores, embora tenha mostrado uma redução de aproximadamente 27% de atividade em relação à amostra controle. O ácido cítrico se mostrou eficiente apenas na concentração de 10 mM, porém reduziu a atividade enzimática em cerca de 48% em relação ao controle (tabela 3). Talvez a maior inibição enzimática obtida com o ácido cítrico seja resultado da capacidade do composto de atuar como quelante, além do efeito antioxidante, funcionando assim como um inibidor mais eficiente em relação ao ácido ascórbico, o qual atua principalmente sobre os produtos da reação.

Tabela 3. Efeito de inibidores de escurecimento na extração de POD de yacon.

Inibidor de escurecimento	Atividade após extração (UA/mL)	Atividade após 24 horas (UA/mL)	Escurecimento após a extração	Escurecimento após 24 horas
Controle	5800	5860	++++	++++
Ác. ascórbico 2mM	4320	4440	+++	++++
Ác. ascórbico 4mM	4180	4280	-	++
Ác. ascórbico 5mM	4220	4220	-	-
Ác. cítrico 5mM	3300	3380	++	+++
Ác. cítrico 10mM	3020	2800	-	-

(++++) escurecimento máximo; (+) escurecimento mínimo; (-) ausência de escurecimento.

5.3. PURIFICAÇÃO

A purificação da peroxidase de yacon a partir do extrato bruto se iniciou com a concentração da amostra pela precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 85% de saturação sob agitação lenta durante 3 horas. A realização de um fracionamento não foi necessária pois a amostra não apresentou problemas com perda de atividade ou alterações indesejadas na fluidez, como por exemplo, o aumento da viscosidade ou a formação de gel durante a centrifugação refrigerada, causada algumas vezes por excesso de substâncias pécnicas na amostra.

O precipitado protéico obtido pela saturação com sulfato de amônio (0-85%) foi dissolvido em solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5 contendo 3 mM de ácido ascórbico, e aplicado na coluna contendo Sephadex G-25 (30,0 cm x 2,0 cm). As tentativas de não se utilizar o inibidor de escurecimento resultaram no escurecimento quase imediato das amostras, inutilizando a extração.

O eluato resultante da coluna de Sephadex G-25 apresentou uma coloração com tom amarelado, assemelhando-se à cor do extrato bruto, porém muito menos intenso. Não apresentou escurecimento pronunciado indicando que esta etapa de purificação separou da amostra, entre outros compostos de baixo peso molecular, o sulfato de amônio, o ácido ascórbico e algumas substâncias, tais como compostos fenólicos, que poderiam servir de substrato para peroxidase e/ou polifenoloxidase (PPO) presentes na amostra.

Alíquotas do eluato da coluna de Sephadex G-25 foram então aplicados na coluna de troca iônica contendo DEAE-celulose (20,0 cm x 1,5 cm) da qual um único pico de proteína foi eluído com solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5 sob um gradiente linear de cloreto de potássio (0 a 0,5 M). A eluição da enzima se deu a 0,06 M de KCl, a fração referente ao pico de atividade (figura 1) foi utilizada nos estudos subseqüentes. Esse perfil se repetiu nas várias extrações realizadas.

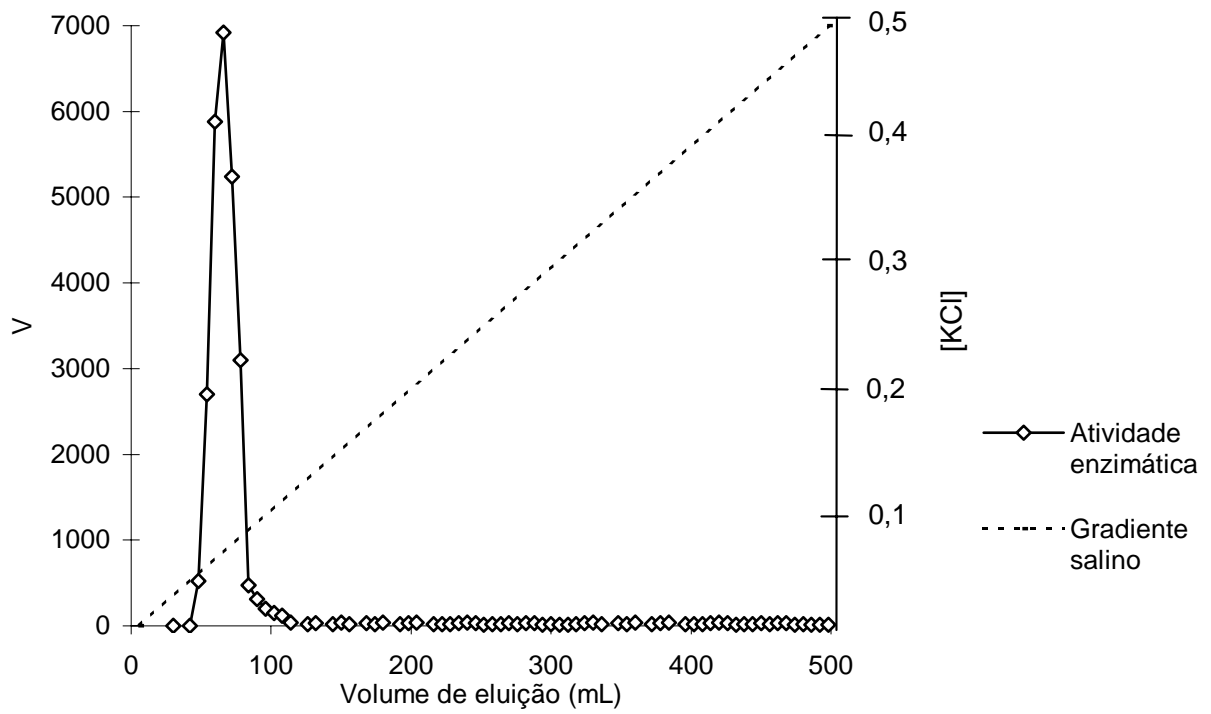


Figura 1. Eluição da POD em DEAE-celulose sob gradiente salino 0-0,5M de cloreto de potássio. (V) atividade enzimática (UA/mL).

Os dados experimentais referentes às etapas de purificação da POD de yacon estão resumidos na tabela 4. Comparando-se a relação entre proteína total e volume, do extrato bruto e da concentração com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 85% de saturação, verifica-se que houve uma concentração de 3,43 vezes entre as etapas. Essa retirada de proteína mesmo associada uma perda de atividade enzimática (47%) entre as etapas ainda manteve um fator de purificação de 1,89.

Tabela 4. Purificação da peroxidase de yacon.

Procedimento	Volume (mL)	Atividade total (UA)	Proteína total (mg)	A.E. (UA/mg de proteína)	Fator de purificação
Extrato bruto	180	964800	44,622	21621,62	1,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0-85%	15	522000	12,768	40883,46	1,89
Sephadex G-25	24	402552	11,474	35083,84	1,62
DEAE- Celulose	72	484560	0,101	4807142,86	222,33

(A.E.) Atividade específica.

O fator de purificação observado para o eluato da Sephadex G-25 foi de 1,62. A purificação final da POD de yacon foi de aproximadamente 222 vezes em relação ao extrato bruto, o alto grau de purificação se deve a grande redução protéica conseguida com a ultima etapa da purificação (figura 2).

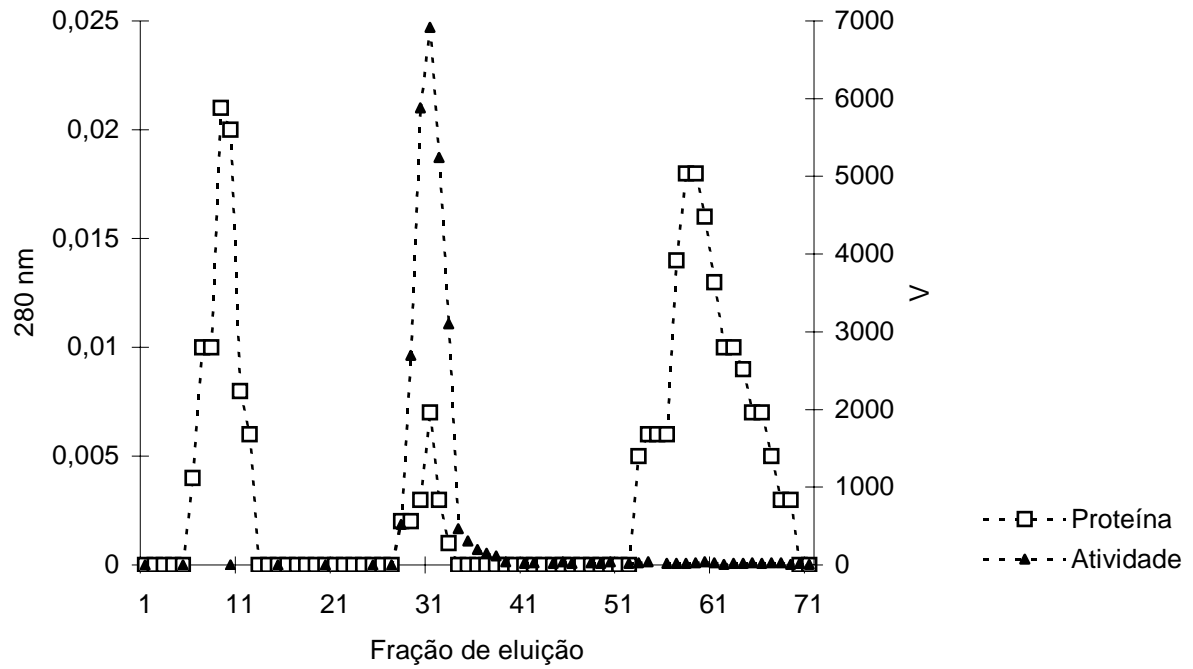


Figura 2. Perfil da cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose. (V) unidade de atividade (UA/mL). O gradiente salino se iniciou na fração 21, após 126 mL de eluição. Cada fração de eluição corresponde a 6 mL.

A literatura revela fatores de purificação de peroxidases variando bastante com a fonte da enzima, condições de extração e métodos de purificação. Neves e colaboradores (1998) encontraram uma forma solúvel de peroxidase em pêssego e obtiveram um fator de purificação igual a 28,9 após purificação com cromatografia de troca iônica DEAE-celulose e filtração em gel Sephadex G-100.

Duarte-Vázquez e colaboradores (2000) pesquisando peroxidases de nabo, encontraram dois grupos de isoenzimas, que foram obtidos com cromatografia de troca iônica. O primeiro grupo apresentou fator de purificação igual a 89, o segundo grupo foi dividido em 3 frações denominadas C1, C2 e C3; as quais apresentaram fatores de purificação de 210, 136 e 186, respectivamente. As isoenzimas isoladas são geralmente referidas por códigos baseados nos valores de seus pontos isoelétricos, A1-A3 (ácidas), B1-B3 e C1-C3 (neutras ou básico-neutras) e D, E1-E6 (básicas).

O primeiro pico de proteína, na leitura a 280 nm, é observado com 54 mL de eluição. O segundo pico protéico correspondeu a peroxidase purificada, sendo eluído com 186 mL. Após eluição de 354 mL, um terceiro valor foi registrado à 280 nm. Portanto a purificação da POD de yacon obtida com a DEAE-celulose se deu pela separação da enzima em relação às duas outras porções protéicas que não apresentaram atividade enzimática.

A pequena quantidade de proteína eluída no pico da DEAE-celulose exigiu que se fizesse uma concentração da amostra para quantificá-la pelo método de Bradford, contrário às etapas de purificação anteriores, nas quais foram necessárias as diluições das amostras. Os valores obtidos com a leitura de absorvância a curva de calibração estão no apêndice (tabela 1 e figura 1, respectivamente).

5.4. ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da POD de yacon foi estimado em 34,8 kDa, conforme descrito em material e métodos, o volume de eluição da enzima na coluna Sephadex G-100 (50,0 cm x 2,0 cm) foi de 164,45 mL. A curva de calibração, os respectivos padrões protéicos e a representação da eluição da POD de yacon estão na figura 3.

Os valores de peso molecular das peroxidases de vários vegetais estão normalmente entre 30 kDa e 54 kDa (Vamos-Vigyazo, 1981). Regalado e colaboradores (1996) isolaram uma peroxidase de rabanete com PM igual a 43,8 kDa. Leon e colaboradores (2002) isolaram uma isoforma de peroxidase de batata-doce com peso molecular de 37 kDa. Já foram isoladas isoformas de peroxidases de nabo com pesos moleculares entre de 39,2 kDa e 42,5 kDa (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000). Em um trabalho mais recente com o mesmo vegetal, foi isolada outra forma da POD com peso molecular de 33,9 kDa (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

Bernards e colaboradores (1999) identificaram 3 isoperoxidasas (formas catiônicas, neutras e aniônicas) em tecidos de suberização induzidos por fermentos em batatas, com pesos moleculares de 45,8 kDa, 35,3 kDa e 44,9 kDa.

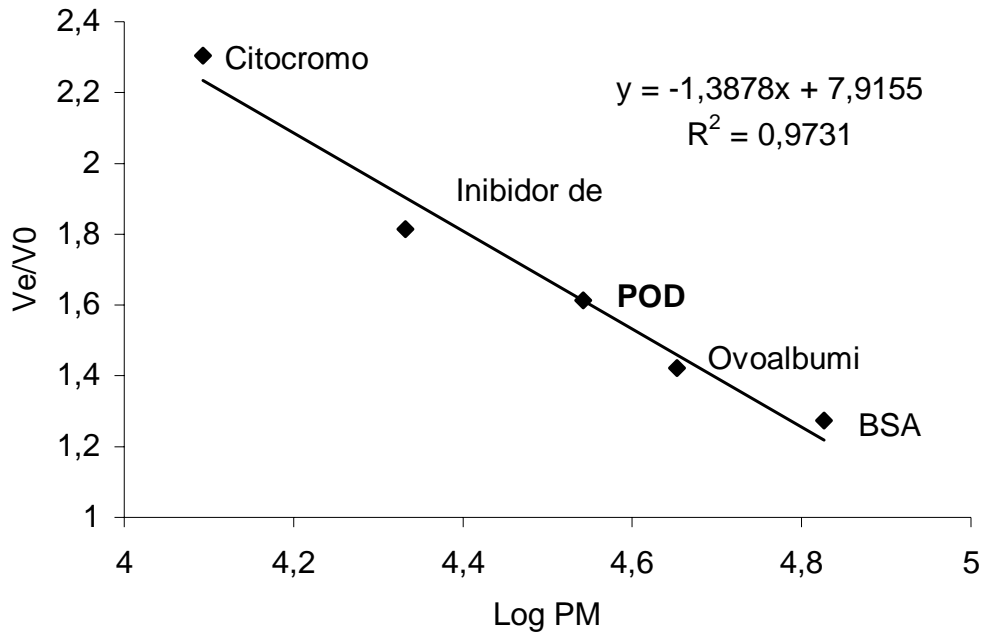


Figura 3. Curva de calibração com padrões os protéicos: soroalbumina bovina (BSA), ovoalbumina, inibidor de tripsina, citocromo C. (Ve) volume de eluição; (V₀) volume de eluição de “blue dextran”; (PM) peso molecular.

5.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A peroxidase solúvel isolada de raízes de yacon apresentou apenas uma isoforma, como pode ser observado desde a extração até a etapa final de purificação (figura 4). Estudos de isolamento e purificação de isoenzimas solúveis e ligadas têm sido realizados com muitas espécies vegetais (Doblinski *et al.*, 2003; Duarte-Vázquez *et al.*, 2003; Kahn *et al.*, 1981; Lourenço *et al.*, 1995; Moulding *et al.*, 1987; Moulding *et al.*, 1989; Neves, 2002; Silva *et al.*, 1990; Toraskar *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1999), sendo que, somente em rabanetes já foram isoladas pelo menos 15 isoperoxidases (Veitch, 2004).

A comparação entre bandas de proteína e de atividade está ilustrada na figura 5. Devido aos baixos teores de proteína da yacon, não foi possível utilizar o corante “coomassie brilliant blue”, foi então utilizada a técnica de coloração pela prata (conforme descrito em material e métodos), que apresenta uma sensibilidade maior. Contudo, a solução enzimática purificada (DEAE-celulose) apresentou um teor protéico de 0,0014 mg/mL e foi necessário concentrá-la 40-50 vezes para permitir sua coloração, motivo pelo qual a banda de proteína correspondente a POD não aparece nas etapas de purificação anteriores. A concentração da enzima do tubo pico na coluna de DEAE-celulose foi feita por ultracentrifugação a vácuo. A alíquotas protéicas aplicadas nos géis para coloração pela prata foram aproximadamente de $4,96 \times 10^{-3}$ mg, $4,26 \times 10^{-3}$ mg, $4,78 \times 10^{-3}$ mg e $1,89 \times 10^{-3}$ mg, para extrato bruto, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, eluato da Sephadex G-25 e DEAE-celulose, respectivamente.

Uma pequena descaracterização das bandas de atividade pode ser observada nas figuras 4 e 5. Tal artefato ocorreu devido à persistência da atividade enzimática por alguns minutos após a tentativa de interrupção por remoção do substrato e enxágüe com água destilada. Para caracterização da atividade da POD nos géis de poliacrilamida foram aplicadas alíquotas proporcionais a atividade de cada etapa de purificação: 30 μL de extrato bruto, 5 μL da solução precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 μL do eluato da Sephadex G-25 e 30 μL da enzima purificada.

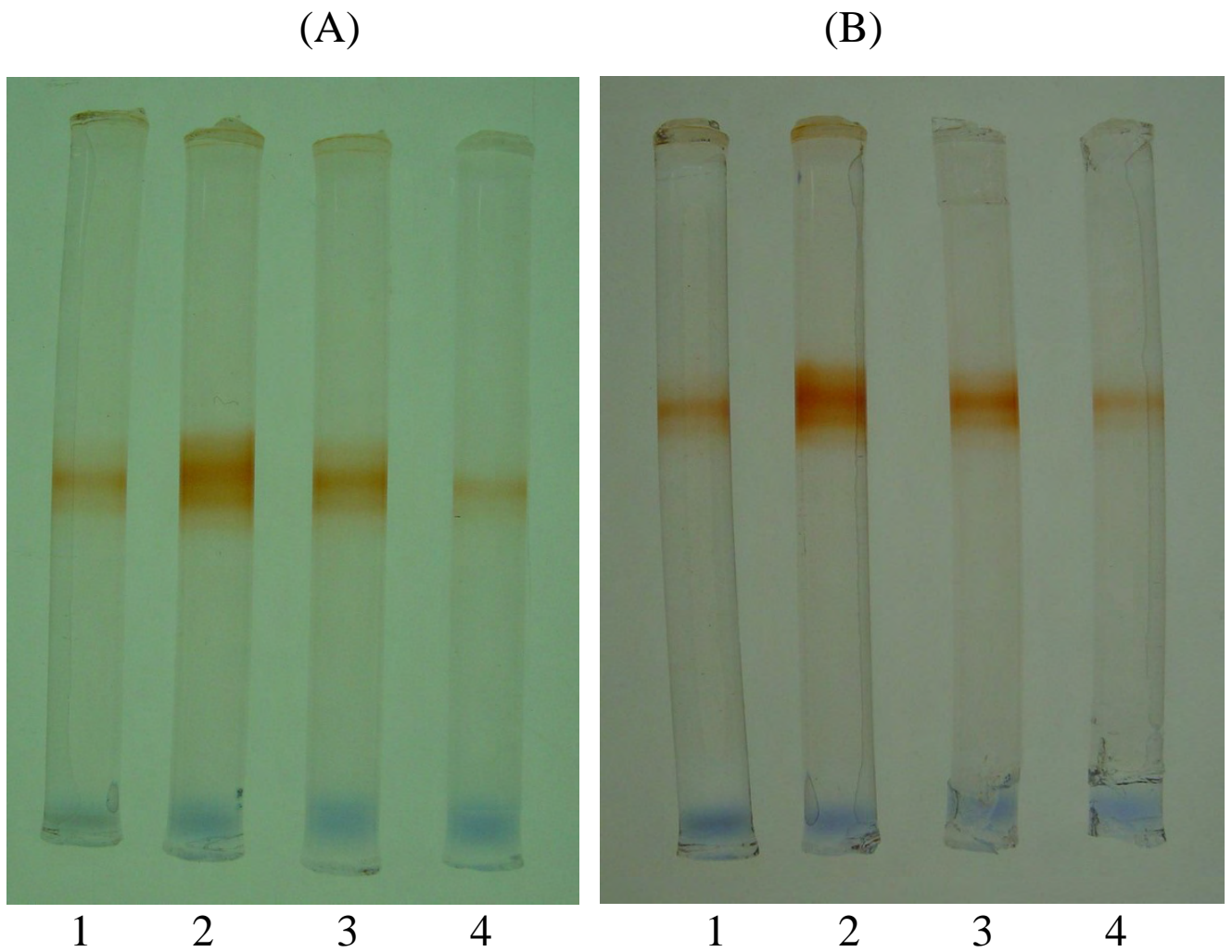


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da POD de yacon. Etapas: (1) extrato bruto, (2) concentrado protéico precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (3) cromatografia em Sephadex G-25 e (4) cromatografia em DEAE-celulose. Concentração dos géis de 10% (A) e 12 % (B), corados pela atividade enzimática.

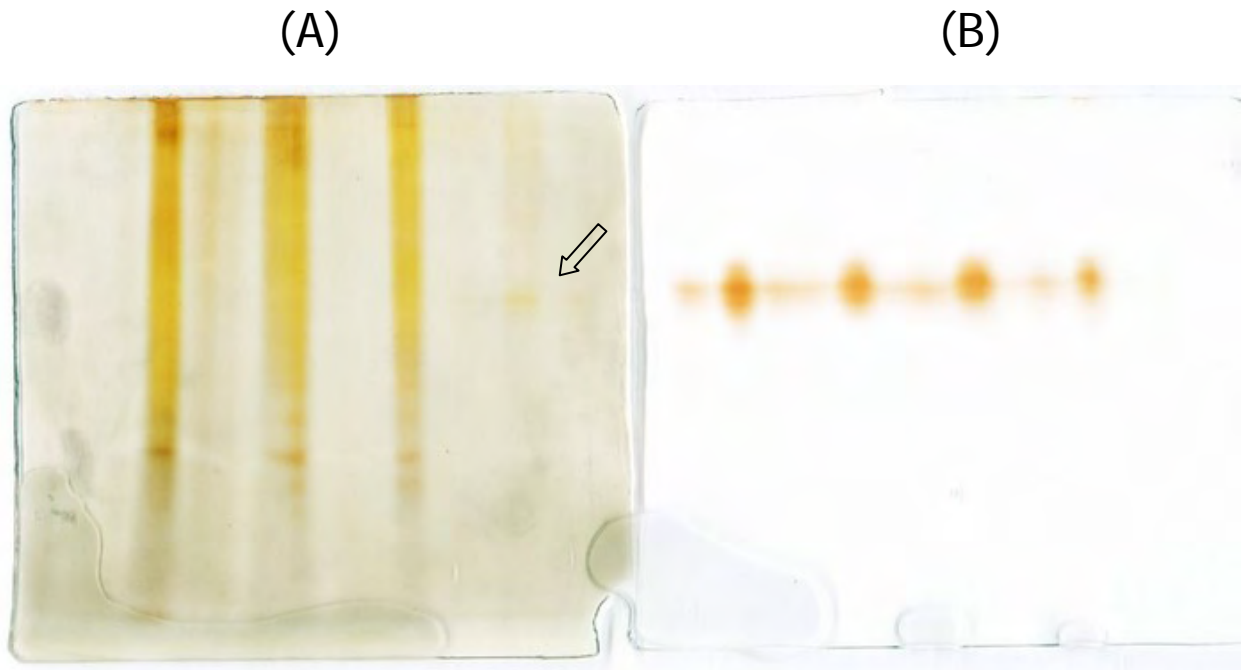


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da POD de yacon. Etapas: extrato bruto, concentrado protéico precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografia em Sephadex G-25 e cromatografia em DEAE-celulose. (A) proteína corada com prata, (B) atividade enzimática conforme descrito em material e métodos.

5.6. CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE (pH E TEMPERATURA)

A ação catalítica das enzimas geralmente é alcançada dentro de uma estreita faixa de pH. Cada reação tem um valor ótimo, geralmente situado entre 4,5 e 8,0, no qual a sua atividade é máxima. O pH ótimo para POD de yacon foi de 5,5, com a solução tampão citrato-fosfato de potássio e valor máximo de atividade igual a 11800 UA/mL. Sob valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0 a atividade da POD caiu rapidamente, alcançando valores abaixo da metade no pH 4,5 e 7,5. Com valores inferiores a pH 4,0 não houve atividade enzimática (figura 6).

Valores extremos de pH, em geral desnaturam as proteínas, causando a inativação das enzimas. A perda da capacidade de atividade das peroxidases com a acidificação do meio de reação pode ser atribuída a alteração na forma da proteína, passando do estado nativo para o desnaturado reversível, devido ao desligamento de seu grupamento heme, que pode ser total a pH 2,4 e 25°C (Adams, 1997; Vamos-Vigyazo, 1981). Tais alterações na interação entre grupamento heme e proteína podem causar perda de estabilidade, e a mudança da enzima do estado desnaturado reversível para o irreversível é uma função do pH e temperatura (Adams, 1997; Vamos-Vigyazo, 1981).

Assim como nas reações químicas, a velocidade das reações enzimáticas aumenta com o incremento da temperatura. Porém isto ocorre até que se atinja a velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. A POD de yacon apresentou maior valor de atividade sob temperatura de reação de 35°C, com valores relativamente altos entre 30°C e 45°C. A velocidade de reação caiu para 58% e 59% do máximo, quando ocorreu sob as temperaturas de 15°C e 60°C, respectivamente (figura 7). O efeito da temperatura na atividade enzimática é complexo e pode ser devido a vários fatores. Inicialmente, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é maior aumentando assim a formação do complexo enzimático; porém com valores de temperatura muito elevados inicia-se o processo de inativação gradual da enzima, podendo chegar até a sua completa inativação, causada pela desnaturação protéica.

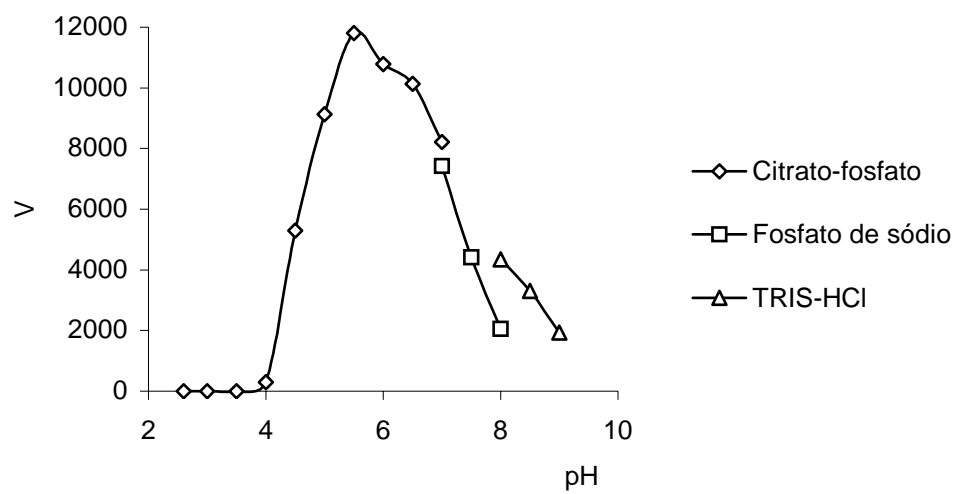


Figura 6. Atividade da POD em função do pH. (V) velocidade de reação (UA/ml).

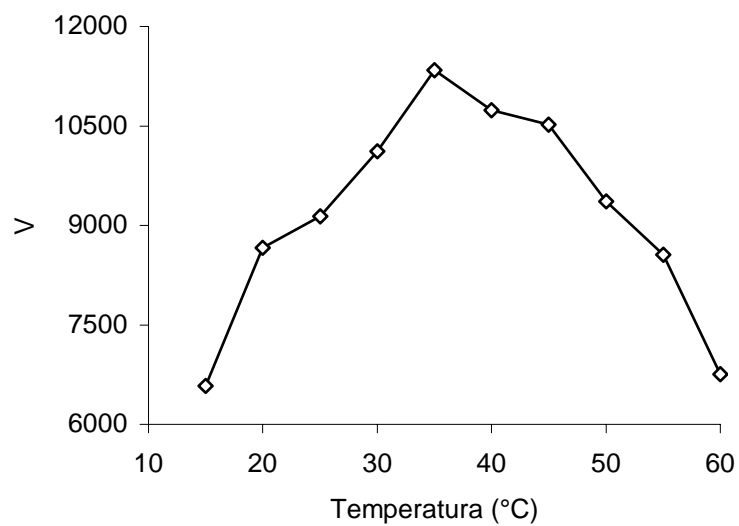


Figura 7. Atividade da POD em função da temperatura. (V) velocidade de reação (UA/mL).

Valores ótimos de pH e temperatura para atividade das peroxidases apresentados na literatura, variaram de acordo com a fonte das enzimas, presença de isoformas, substratos doadores e soluções tampão utilizadas, mas situando-se entre 35°C e 55°C, e entre pH 4 e pH 6 (Vamos-Vigyazo, 1981).

Em três isoformas de peroxidase de batata isoladas em tecidos de suberização induzidos por ferimentos, foram verificadas temperaturas ótimas entre 40°C e 60°C, e valores de pH ótimos de 4,5, para ácidos fenólicos e 6,5 para monolignóis como substratos (Bernards *et al.*, 1999).

Em trabalhos com mamão papaia e utilizando os mesmos substratos usados neste trabalho, foram constatados valores ótimos de pH igual a 6,0 para forma solúvel da peroxidase e pH 5,5 para forma ligada da enzima (Lourenço *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1990).

Três isoperoxidasas isoladas de nabo apresentaram temperaturas ótimas de 40°C, 45°C e 55°C, com pH ótimo entre 5,0 e 5,5 (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000). Valores de pH ótimos iguais a 5,0 e 5,5 também corresponderam às condições ótimas de reação para peroxidase de pêssegos (Neves *et al.*, 1998) e melões (Rodriguez-López *et al.*, 2000). Em relação a POD de batata-doce foram descritos valores de pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 40°C (Neves *et al.*, 1985).

Criquet e colaboradores (2001) pesquisando o uso de 2,7-diaminofluoreno como possível substrato para detecção e caracterização de peroxidase de *Medicago sativa* L., uma espécie de trevo de forragem, encontraram um pH ótimo de atividade da POD próximo a 6,0 e temperaturas ótimas de 35°C com o substrato 2,7-diaminofluoreno, e de 60°C quando usaram pirogalol e guaiacol. Os autores concluíram que o primeiro substrato é mais adequado para estudos com a enzima por atuar melhor sob temperaturas mais adequadas aos sistemas enzimáticos, corroborando com seu trabalho anterior no qual foi afirmado que o guaiacol não era adequado para estudos com peroxidase vegetal (Criquet *et al.*, 2000).

5.7. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A peroxidase de yacon mostrou-se estável quando incubada a temperaturas abaixo de 60°C por 30 minutos, e tornou-se termolábil a partir desta temperatura, sendo inativada completamente quando incubada a 80°C. Comportamento semelhante foi observado com peroxidase de batata (Kahn *et al.*, 1981), de maçã (Moulding *et al.*, 1987), mamão papaia (Lourenço *et al.*, 1995) e peroxidase de pêssego (Neves *et al.*, 1998).

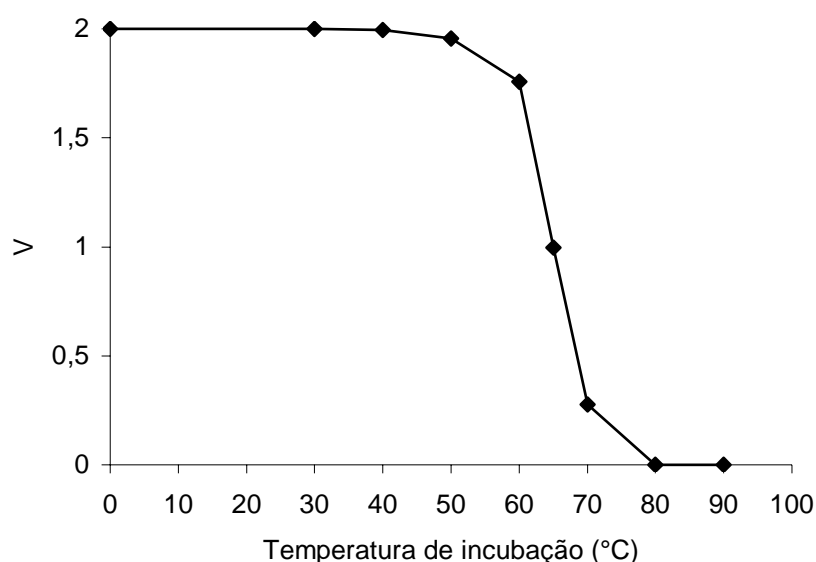


Figura 8. Efeito da temperatura na estabilidade da POD. (V) Atividade residual ($\text{Log } A/A_0 \times 100$); (A) atividade residual (UA/mL); (A_0) atividade inicial (sem incubação, UA/mL).

5.8. ESPECIFICIDADE A SUBSTRATOS E CÁLCULO DAS CONSTANTES CINÉTICAS (Km E Vmax)

Alguns compostos foram testados como potenciais substratos para POD de yacon, a qual apresentou maior afinidade pela o-dianisidina, seguido de ρ -fenilenediamina, pirogalol e guaiacol. A enzima não mostrou capacidade de catalisar a oxidação dos fenóis DL-DOPA, catecol e ρ -cresol nas condições estudadas (tabela 5).

Tabela 5. Atividade da POD sobre alguns compostos.

Substrato	Concentração no ensaio	Atividade (UA/mL)
o-dianisidina	1 mM	7900
o-dianisidina	0,67 mM	6500
ρ -fenilenediamina	0,07%	2300
Pirogalol	3,33 mM	965
Guaiacol	0,17%	275
DL-DOPA	3,33 mM	0
Catecol	3,33 mM	0
ρ -cresol	0,83 mM	0

As constantes de Michaelis para o-dianisidina e H_2O_2 foram 14,227mM e 14,434mM, respectivamente. Os valores de Vmax foram 17409 UA/mL e 14830UA/mL (figuras 9 e 10). As razões Vmax/Km de 1219,4 e 1027,4 para o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente, indicam ação preferencial da peroxidase pelo primeiro substrato.

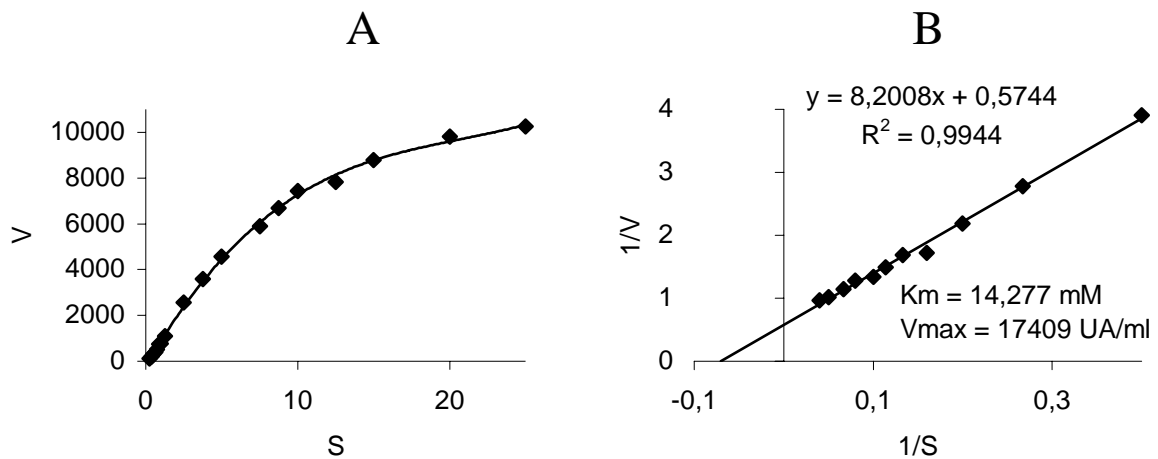


Figura 9. Efeito da concentração de o-dianisidina na atividade da POD na presença de H_2O_2 (30mM). (V) Atividade enzimática (UA/mL); (S) concentração de substrato (mM). (A) Gráfico Michaelis-Menten; (B) gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk.

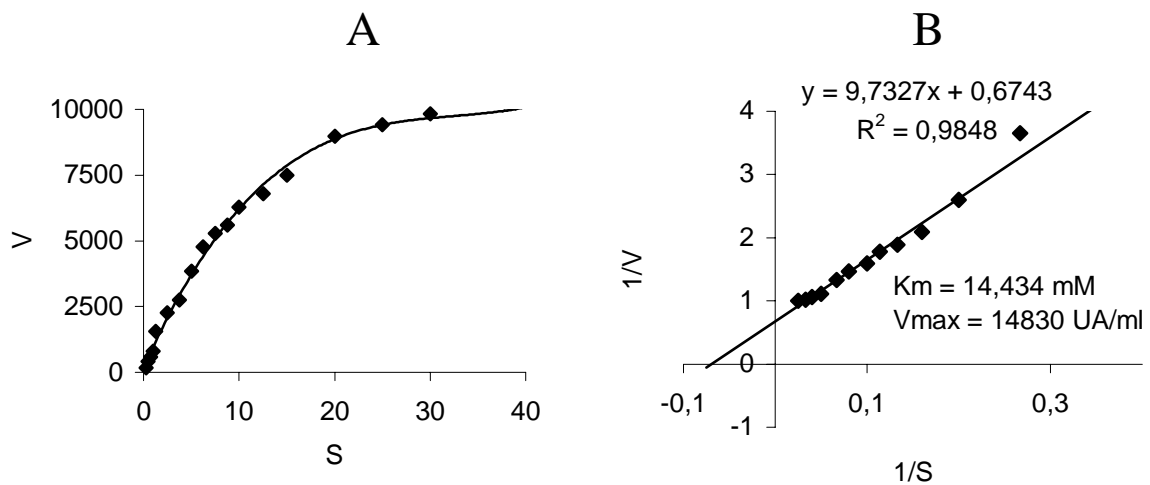


Figura 10. Efeito da concentração de H_2O_2 na atividade da POD na presença o-dianisidina (15mM). (V) Atividade enzimática (UA/mL); (S) concentração de substrato (mM). (A) Gráfico Michaelis-Menten; (B) gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk.

5.9. EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Como as degradações oxidativas dos alimentos promovidas pelas enzimas ocorrem em meio aquoso, e não se pode ter total controle sobre a presença neste dos fatores envolvidos no processo, tais como a ocorrência de substratos, cofatores, oxigênio e radicais livres, torna-se importante o uso de inibidores enzimáticos. Tais agentes podem ser os antioxidantes, quelantes e até compostos que seriam substratos preferenciais em relação aos presentes no próprio alimento. É importante observar que na seleção de antioxidantes e outros conservantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações; ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento, sendo que o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores do que as que normalmente seriam ingeridas no alimento (Bobbio *et al.*, 1992; Ramalho *et al.*, 2005). Além disso deve-se considerar também outros fatores, como legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Ramalho *et al.*, 2005).

Nas reações de oxidação e redução que ocorrem naturalmente nos alimentos, e que podem ser catalisadas pela POD, atuam como intermediários o oxigênio e determinados radicais livres. A fase inicial da reação de oxidação pode ser originada pela decomposição de substâncias presentes no próprio alimento. A fase de propagação inclui a interação dos radicais livres com oxigênio, e depois com compostos do próprio alimento, resultando na formação de ácidos e mais radicais livres. A fase seguinte consiste na decomposição dos ácidos em hidróxidos e peróxidos. A última fase tem lugar na combinação de dois radicais oxigenados em um hidroperóxido que se estabiliza, ficando incapaz de prosseguir a cadeia reacional (Bobbio *et al.*, 1992; Sgarbieri, 1996). O metabissulfito de sódio e a cisteína são exemplos de compostos redutores que inibem a formação de radicais livres.

Alguns antioxidantes denominados removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são os melhores exemplos deste grupo. O ácido ascórbico pode atuar também como sinergista na regeneração de outros antioxidantes, tais como os compostos fenólicos (Ramalho *et al.*, 2005).

A alta resistência da POD à inativação térmica faz com que a inativação dessas enzimas por processos térmicos convencionais seja ineficaz, uma vez que o tratamento na temperatura de desnaturação da enzima poderia levar ao comprometimento da textura e do sabor dos produtos, tornando o estudo dos efeitos de inibidores sobre a enzima especialmente importante. Neste trabalho foram testados os efeitos de alguns grupos de compostos na inibição da atividade da peroxidase. É importante notar que os inibidores exercem diferentes efeitos sobre as enzimas, de acordo com a natureza dos compostos envolvidos, a fonte da enzima e as condições do ensaio.

Os sais testados foram: sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de magnésio, cloreto de manganês, sulfato de amônio e sulfato de zinco (tabela 6). Afetaram ligeiramente a atividade da enzima, excetuando-se os sulfatos de cobre e ferro, os quais, sob a mesma concentração, promoveram uma inibição de 13,1% e 53,6%, respectivamente. A presença de íons, resultantes da dissociação dos sais, no ensaio enzimático não demonstrou, necessariamente, uma capacidade inibitória sobre a POD. Porém, a atividade da enzima sofreu uma redução na presença dos sais que continham cobre e ferro, dois metais intimamente relacionados às peroxidases, pois podem integrar seu grupo prostético. No caso da POD de yacon, há em seu sítio ativo um grupamento heme, que pode estar relacionado com a maior capacidade de inibição obtida com o sulfato de ferro.

Os compostos quelantes de metais são aqueles que apresentam capacidade de reagir com alguns metais, principalmente cobre e ferro, impedindo-os de atuar como cofatores enzimáticos e como promotores também de oxidações não

enzimáticas. Assim, quando tais substâncias afetam a atividade enzimática, supõem-se que estes metais podem apresentar algum papel nos processos envolvidos na catálise em questão. Um par de elétrons não compartilhado na estrutura molecular do composto quelante promove a reação de formação do complexo. Os agentes quelantes mais comuns são: ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (Ramalho *et al.*, 2005). Dentre os compostos quelantes de metais estudados, o dietilditiocarbamato de sódio foi o mais eficiente, seguido da azida sódica. O EDTA apresentou uma capacidade de inibição sobre a POD extremamente baixa (tabela 7). As discrepâncias observadas entre os compostos citados podem ser explicadas pela maior ou menor capacidade quelante de cada substância, bem como a especificidade em relação a um ou outro metal. Além disso, é importante considerar que os compostos quelantes também podem reagir com aminoácidos, grupamento carboxila e outros elementos que podem ser importantes para a atividade enzimática (Ashie *et al.*, 1996).

Os ácidos fenólicos estão incluídos em um conjunto de substâncias que podem ocorrer naturalmente nos alimentos, e podem contribuir com a inibição enzimática por apresentar capacidade de funcionar como agentes redutores, quelantes de metais e seqüestradores de oxigênio (Ashie *et al.*, 1996, Sapers *et al.*, 1993). Os efeitos de alguns ácidos fenólicos sobre a atividade da peroxidase de yacon são mostradas na tabela 8. As capacidades de inibição mais acentuadas foram observadas com os ácidos caféico e ferúlico, seguidas pelo ácido ρ -cumárico. A constante de inibição para o ácido caféico foi de $1,08 \times 10^{-3}$ mM e $0,5 \times 10^{-3}$ mM para a o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente. Quanto ao ácido ferúlico, os valores de K_i obtidos foram $1,61 \times 10^{-3}$ mM e $2,73 \times 10^{-3}$ mM para a o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente. Apenas a inibição do ácido ferúlico sobre peróxido de hidrogênio foi do tipo não competitivo, as demais foram do tipo competitivo. A inibição do tipo competitiva é resultante de uma interação do agente inibidor com a enzima de tal forma que prejudica a interação com o substrato; já a do tipo não competitiva apresenta um efeito negativo sobre a

catálise, contudo, sem impedir a formação do complexo enzima-substrato. Os valores de K_i foram dos ácidos caféico e ferúlico foram determinados pelo método proposto por Dixon (1953) (apêndice figuras 2 e 3, respectivamente).

Em geral, os chamados compostos “sulfidrila” apresentam uma grande capacidade redutora, tornando-os muito úteis na prevenção da deterioração de alimentos pela oxidação enzimática ou de outra origem. Eles são capazes de interagir com diversos compostos intermediários das reações enzimáticas, e também de clivar pontes dissulfeto, afetando assim a atividade enzimática (Ashie *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1992). Entre os compostos “sulfidrila” (tabela 9), o DTE (ditioeritritol) e o mercaptoetanol foram os mais eficientes, enquanto que os outros precisaram estar, pelo menos, 10 vezes mais concentrados para inibir a POD.

Os compostos DTE e mercaptoetanol são eficientes inibidores enzimáticos, porém sua aplicação em alimentos pode não ser permitida devido ao seu potencial tóxico. Por outro lado, o papel desempenhado por aminoácidos que contém enxofre, tais como cistina e cisteína, na inibição do escurecimento enzimático é conhecido há anos, e sua aplicação pode ser mais viável. A cisteína é capaz de prevenir a formação de pigmentos escuros por reagir com compostos intermediários da oxidação de compostos fenólicos, formando compostos incolores estáveis (Lourenço *et al.*, 1992; Sapers *et al.*, 1993); podendo ser até mais eficiente que o metabissulfito de sódio e o sulfito de sódio, porém pode apresentar efeitos negativos sobre o sabor dos alimentos (Ashie *et al.*, 1996). Uma notória característica da inibição pela L-cisteína foi observada em relação a peroxidase de yacon (tabela 9), trata-se da ocorrência de uma crescente fase “lag” proporcional a sua concentração no ensaio, comportamento semelhante foi observado para o ácido ascórbico (tabela 10).

Na tabela 10 estão ilustrados os efeitos inibitórios de vários compostos sobre a POD, sendo que o DL-DOPA exibiu a maior capacidade de inibição, com valores de K_i de $1,23 \times 10^{-3}$ mM e $5,96 \times 10^{-3}$ mM para a o-dianisidina e H_2O_2 , respectivamente (apêndice figura 4). Ambas do tipo competitivo. O ácido benzóico

não mostrou capacidade de inibição sobre a atividade enzimática. O resorcinol se mostrou mais eficiente que o ácido indolacético. E o ácido ascórbico apresentou uma capacidade de inibição baixa, com a apresentação de um período inicial sem atividade enzimática (fase lag), proporcional à sua concentração no ensaio.

Tabela 6. Efeito de sais na atividade da POD de yacon.

Composto	Concentração no ensaio (mM)	Inibição (%)^a
CuSO ₄	0,333	13,1
FeSO ₄	0,333	53,6
MgSO ₄	0,333	1,1
MnCl ₂	0,333	0,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,333	0,0
ZnSO ₄	0,333	0,3

(a) % inibição em relação ao controle.

Tabela 7. Efeito de compostos quelantes na atividade da POD de yacon.

Composto	Concentração no ensaio (mM)	Inibição (%)^a
EDTA	0,333	1,0
	0,667	1,2
Dietilditiocarbamato de sódio	0,333	30,6
	0,500	66,7
Azida sódica	0,667	28,4
	1,333	50,1

(a) % inibição em relação ao controle.

Tabela 8. Efeito de ácidos fenólicos na atividade da POD de yacon.

Composto	Concentração no ensaio (mM)	Inibição (%)^a
Ácido caféico	0,017	81,9
	0,033	83,4
Ácido p-cumárico	0,333	48,9
	0,667	63,1
Ácido ferúlico	0,017	58,6
	0,033	81,9

(a) % inibição em relação ao controle.

Tabela 9. Efeito de compostos “sulfidril” na atividade da POD de yacon.

Composto	Concentração no ensaio (mM)	Inibição (%)^a
Ditioeritritol (DTE)	0,017	34,9
	0,025	76,8
L-cisteína	0,033	3,7 ^b
	0,167	32,8 ^c
2-mercaptoetanol	0,017	53,0
	0,025	81,9
Metabissulfito de sódio	0,167	46,8
	0,208	83,0
Sulfito de sódio	0,333	35,3
	0,667	96,5

(a) % inibição em relação ao controle; (b) após lag* de alguns segundos; (c) após lag* de 2 minutos.

* lag corresponde, em uma curva exponencial, a uma fase linear que a precede.

Tabela 10. Efeito de outros compostos na atividade da POD de yacon.

Composto	Concentração no ensaio (mM)	Inibição (%) ^a
Ácido ascórbico	0,020	1,3 ^b
	0,090	6,1 ^c
Ácido benzóico	0,667	0,0
	0,333	29,3
Ácido indolacético	0,667	59,0
	0,003	18,4
DL-DOPA	0,033	75,1
	0,167	30,5
Resorcinol	0,333	42,5

(a) % inibição em relação ao controle; (b) após lag* de 60 segundos; (c) após lag* de 85 segundos.

* lag corresponde, em uma curva exponencial, a uma fase linear que a precede.

Em um estudo recente (Carneiro *et al.*, 2003) a guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) foi submetida a tratamento com soluções contendo inibidores da peroxidase e da polifenoloxidase, tais como ácido cítrico, ácido láctico e bissulfito de sódio. Para a PPO o bissulfito de sódio foi o composto mais eficiente, chegando a 98% de inibição. O composto também promoveu uma inconveniente perda de fenóis pela fruta, causando um aumento em suas solubilidades devido à oxidação do íon sulfito a sulfato. Os autores lembram que apesar de sua eficiência, o uso do bissulfito de sódio é limitado pela legislação por ser tóxico e seu resíduo ser causa de problemas ambientais. Em relação a POD, o inibidor mais eficiente foi o ácido láctico, que reduziu a atividade da enzima em 81% e não causou alterações significativas no teor de compostos fenólicos, o principal mecanismo sugerido foi o controle do pH, que foi mantido abaixo de 4 pela solução do inibidor. Os autores concluíram que o uso do ácido láctico como inibidor da POD e PPO é uma boa escolha para se evitar a depreciação da guariroba e dos produtos derivados.

5.10. ESTUDOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

Talvez o aspecto mais importante no estudo das peroxidases seja seu comportamento frente às condições de temperatura. O fato das peroxidases apresentarem uma alta resistência térmica tem motivado grande interesse dos pesquisadores quanto aos estudos de inativação, tornando-a a principal referência para se determinar quando o processamento térmico de frutas e vegetais foi ou não suficiente para manutenção de sua qualidade como alimentos. Se após um processo como o branqueamento sua atividade não for detectada, assume-se que as outras enzimas menos estáveis foram inativadas.

A presença de isoenzimas com diferentes estabilidades tem sido apontada como principal explicação para a ocorrência de um possível comportamento bifásico a temperaturas de inativação inferiores a 80-90°C (Ling *et al.*, 1978; Neves *et al.*, 1998; Valderrama *et al.*, 2001), sendo que a ausência das mesmas pode explicar o oposto (Lu *et al.*, 1974). Tal observação, considerando-se que o comportamento da peroxidase de yacon frente à inativação térmica foi monofásica (figura 11), reforça a afirmação de que apenas uma isoforma foi isolada neste trabalho. Moulding e colaboradores (1987) obtiveram, com peroxidases extraídas de maçãs, um comportamento de rápida inativação inicial seguido de um padrão mais lento após 1 ou 2 minutos de inativação. E embora tenham considerado o comportamento de inativação como não linear, sugeriram que foi devido à presença de isoenzimas com diferentes estabilidades térmicas.

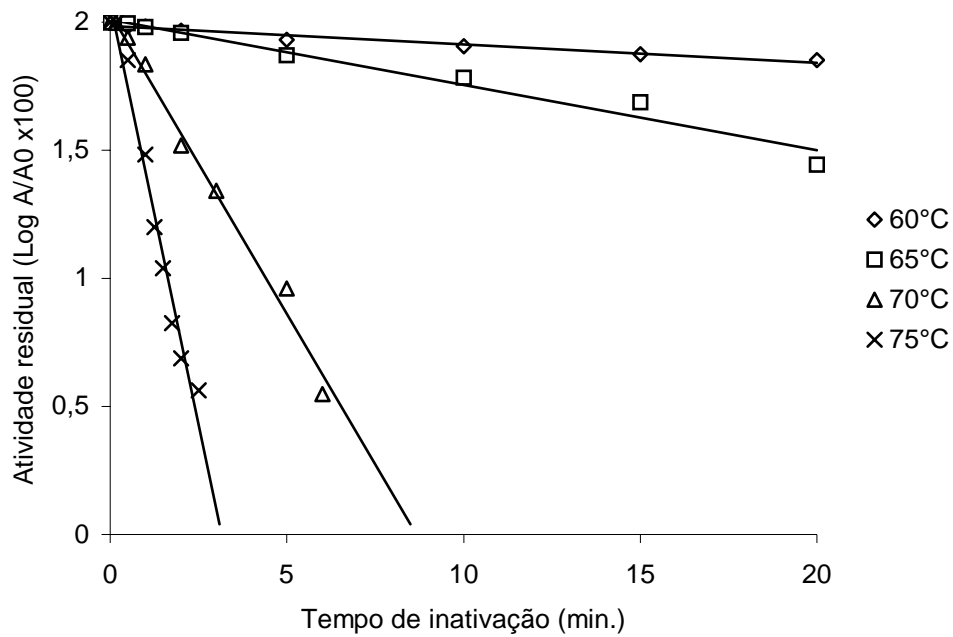


Figura 11. Efeito da temperatura na inativação da peroxidase de yacon. Conforme descrito em material e métodos.

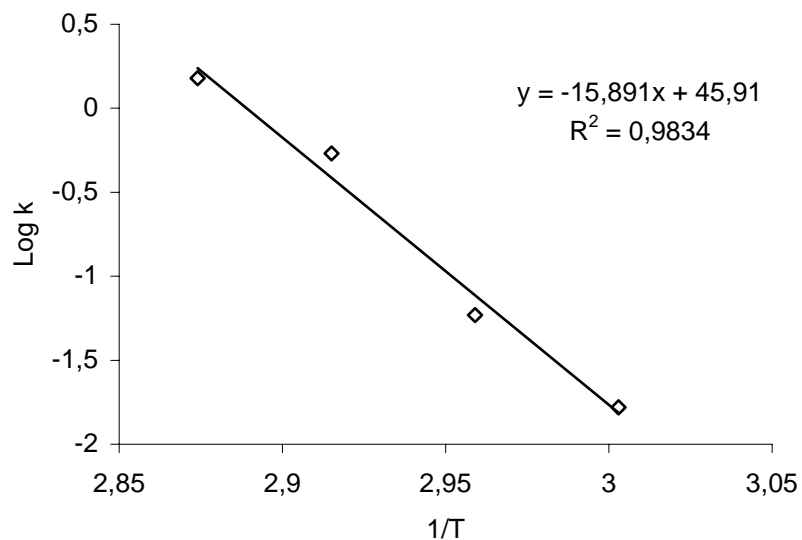


Figura 12. Curva de log k x 1/T para cálculo da Ea (energia de ativação para a reação de inativação). (k) $-2,3 \times T_g$; (T) temperatura absoluta (°K). Os dados das constantes cinéticas referentes ao gráfico estão descritos na tabela 2 do apêndice.

A partir dos dados de inativação térmica mostrados na figura 11, foram obtidos os valores utilizados para o cálculo do valor de energia de ativação (E_a) para reação de inativação da enzima (figura 12), que foi de 31,57 kcal/mol ou 132,12 kJ/mol. Os dados referentes às constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica estão resumidos na tabela 2 do apêndice. É importante observar que valores de E_a mais altos estão associados com maior estabilidade térmica, da mesma forma, valores de E_a mais baixos correspondem a menor estabilidade térmica. Wang e colaboradores (1999) relataram valores de E_a de 36,4 kcal/mol e 38,2 kcal/mol para duas formas de peroxidases de repolhos. Valores de energia de ativação mais baixos, de 29,6 kcal/mol e 32,0 kcal/mol, foram obtidos com POD de pêssegos (Neves *et al.*, 1998) e rabanete (Lu *et al.*, 1974), respectivamente. De acordo com o trabalho de Vamos-Vigyazo (1981), os valores de energia de ativação para inativação das peroxidases de rabanete variaram de 88,0 kJ/mol (21,0 kcal/mol) a 100,0 kJ/mol (23,9 kcal/mol) para frações termolábeis; e de 134,0 kJ/mol (32,0 kcal/mol) a 142,5 kJ/mol (34,0 kcal/mol) para as frações termoestáveis.

A inativação da POD pelo calor mostra diferentes graus de dependência de fatores relacionados tanto com a fonte de enzima, gênero, espécie e cultivar; quanto às condições e/ou parâmetros de inativação (Ling *et al.*, 1978; López-Serrano *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 1998; Rodriguez-López *et al.*, 2000; Valderrama *et al.*, 2001, Vamos-Vigyazo, 1981). O efeito protetor da sacarose, bem como de outros açúcares, exercido sobre a inativação térmica da peroxidase é bastante estudado (Lu *et al.*, 1974; Neves *et al.*, 1998; Valderrama *et al.*, 2001; Vamos-Vigyazo, 1981) e seu efeito na inativação da POD de yacon (conforme descrito em material e métodos) está representado nas figuras 13 e 14.

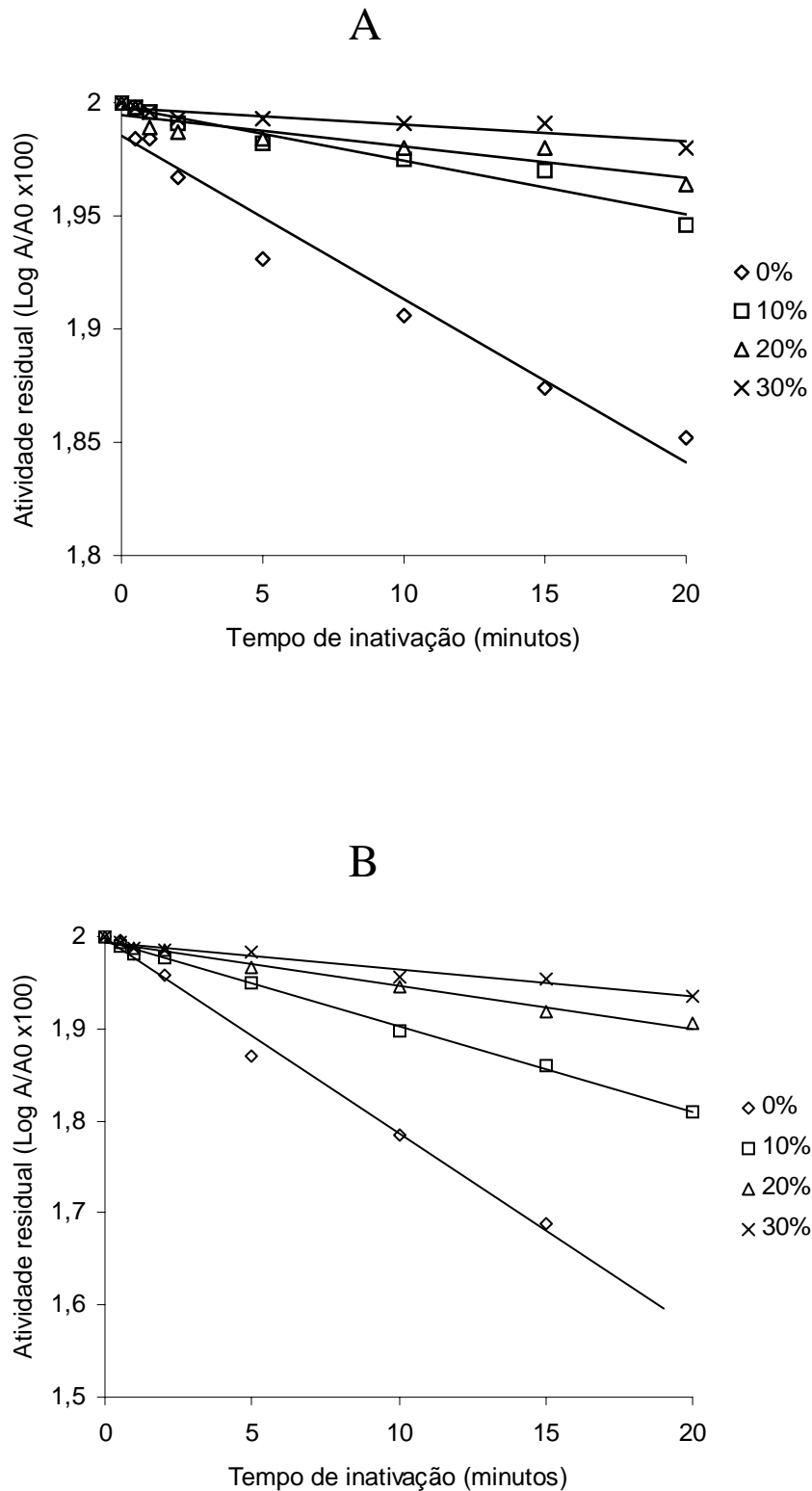


Figura 13. Efeito da sacarose na inativação térmica da POD de yacon. (A) 60°C; (B) 65°C. A POD purificada foi incubada na presença de 0, 10%, 20% e 30% de sacarose, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

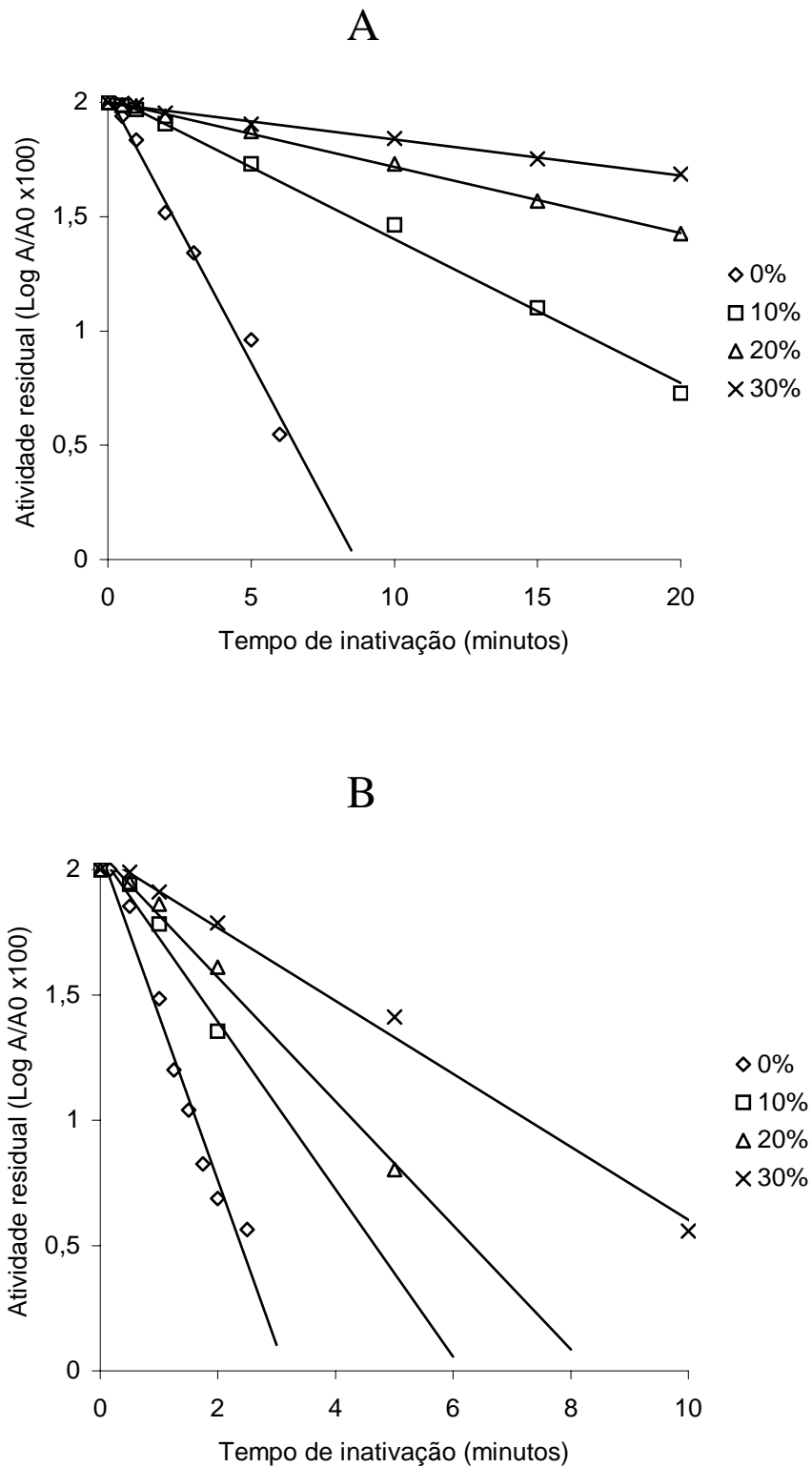


Figura 14. Efeito da sacarose na inativação térmica da POD de yacon. (A) 70°C; (B) 75°C. A POD purificada foi incubada na presença de 0, 10%, 20% e 30% de sacarose, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

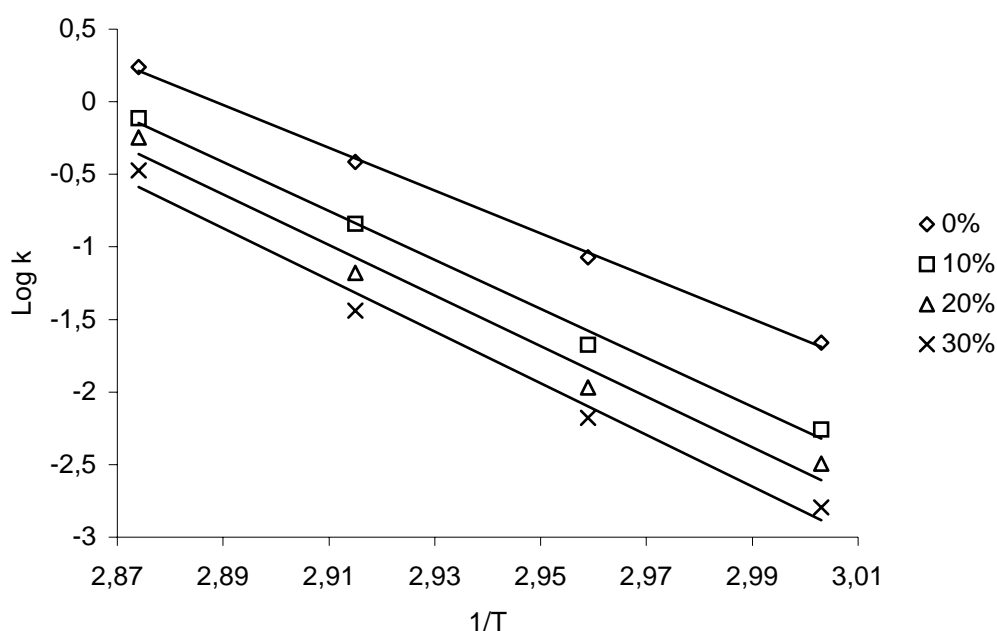


Figura 15. Curva de $\log k \times 1/T$ para cálculo da E_a (energia de ativação para a reação de inativação) na presença de sacarose em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30%). (k) $-2,3 \times T_g$; (T) temperatura absoluta ($^{\circ}K$). Os dados das constantes cinéticas referentes ao gráfico estão descritos na tabela 3 do apêndice.

A sacarose mostrou-se eficiente agente protetor à inativação térmica da POD de yacon em todas as temperaturas testadas, desde aquelas que pouco afetaram a estabilidade da enzima ($60^{\circ}C$ e $65^{\circ}C$) até valores mais elevados ($70^{\circ}C$ e $75^{\circ}C$), que foram capazes de promover a inativação da enzima em poucos minutos. O efeito protetor aumentou com concentrações crescentes do açúcar, conseqüentemente, os valores de energia de ativação (E_a) também se elevaram com o incremento na concentração de sacarose no meio de incubação; apresentando valores de 33,48 kcal/mol, 34,65 kcal/mol e 35,39 kcal/mol, para concentrações do açúcar de 10%, 20% e 30%, respectivamente (figura 15). Os valores equivalentes em kJ/mol, foram de 140,10, 144,98 e 148,09, respectivamente. A presença de sacarose durante a inativação térmica de peroxidase de pêssigo apresentou incrementos ainda maiores em sua energia de

ativação (E_a de 29,6 kcal/mol), com valores de 39,6 kcal/mol e 49,6 kcal/mol, para concentrações de 10% e 20% de sacarose, respectivamente (Neves *et al.*, 1998). Os mesmos autores sugerem que o efeito dos mesmos aditivos na inativação de peroxidases de diferentes fontes pode ser diferente devido, entre outros fatores, ao balanço hidrofílico-hidrofóbico de cada enzima.

É aceito que os açúcares podem apresentar um efeito protetor sobre as proteínas quanto à perda de solubilidade durante a secagem, e também podem reduzir sua coagulação pelo calor (Bach *et al.*, 1979). A estabilidade protéica resulta da combinação de vários fatores, tais como, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações com metais, íons e cofatores, bem como as propriedades do solvente (Bach *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981). Portanto, o efeito de quaisquer compostos frente à inativação térmica de uma proteína deve estar relacionado a tais fatores.

Alguns autores (Bach *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981) afirmam que o efeito protetor dos açúcares na estabilidade térmica das proteínas se deve, principalmente, ao efeito destes sobre a estrutura da água onde a proteína se encontra. O que determinaria a força das interações hidrofóbicas da macromolécula sobre sua desnaturação. É sugerido em alguns trabalhos (Bach *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981; Thimasheff, 2002; Xie *et al.*, 1997) que os açúcares, em geral, não interagem diretamente com a estrutura protéica. Assim, em um sistema trifásico constituído de água, proteína e um co-solvente, no caso o açúcar; este seria excluído da água de hidratação da proteína. Na desnaturação, a superfície da proteína aumenta devido; principalmente, ao rompimento de pontes de hidrogênio e pela exposição de regiões apolares, que na forma nativa estariam cercadas no interior de estruturas globulares. Tal incremento em porções apolares expostas ao solvente pela macromolécula pode corresponder a um aumento na hidratação preferencial, pois há uma maior necessidade de água disponível para hidratação da proteína na forma desenovelada em relação à forma nativa (Thimasheff, 2002; Xie *et al.*, 1997). Assim, as alterações na estrutura da água, promovidas pelos açúcares, contribuiriam para tornar as interações hidrofóbicas da macromolécula tanto mais

estáveis, quanto maior fosse a concentração do co-solvente. Tal hipótese foi verificada em um recente trabalho (Sola-Penna *et al.*, 1998), no qual os autores investigaram o efeito da trealose sobre a estabilidade térmica das proteínas. O dissacarídeo apresenta maior eficiência na promoção da termoestabilidade protéica, em relação a outros açúcares. De acordo com os autores, tal propriedade se deve ao maior volume que ocupado pelo carboidrato quando hidratado. Verificaram que ao se concentrar outros açúcares de forma a ocuparem o mesmo volume da trealose em relação ao solvente, se obtinha a mesma eficiência.

O estudo dos efeitos de sais sobre a atividade enzimática e sua inativação térmica é bastante complexo, envolvendo efeitos diretos sobre a termoestabilidade, estrutura da água e reações com diversos constituintes da proteína, incluindo seu sítio ativo, bem como reações com os seus potenciais substratos e eventuais produtos de catálise (Hippel *et al.*, 1965; Park *et al.*, 2001). Sabe-se que certos sais neutros interagem com sistemas protéicos de maneira que vão além dos simples e não específicos efeitos de carga. A presença de sais em uma solução protéica pode ter efeito protetor (Inouye *et al.*, 1998) ou favorável (Hippel *et al.*, 1965) em relação a desnaturação, porém o efeito desestabilizante predomina (Hippel *et al.*, 1965; Lu *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 1999). Independentemente do tipo de efeito exercido pelo sal sobre a termoestabilidade protéica, ele é linearmente proporcional à sua concentração no meio.

Já foi sugerido que a incubação de peroxidases na presença de sais e/ou cátions pode ter efeito favorável na inativação térmica (Lu *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 1999). Gonçalves e colaboradores (2000) verificaram a influência da aplicação, pós-colheita, de cloreto de cálcio associada ao tratamento hidrotérmico na composição de fenólicos, na atividade enzimática, e na suscetibilidade ao escurecimento interno do abacaxi (*Ananas comosus* Mill.) e concluíram que houve redução no escurecimento interno da fruta, associada à redução nas atividades das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônio liase, com redução também no teor de compostos fenólicos quando associado ao tratamento hidrotérmico, independentemente do tempo de imersão. A redução da atividade

enzimática pelo tratamento de abacaxis com cloreto de cálcio foi atribuída pelos autores à ação do sal na manutenção da integridade celular, reduzindo assim o contato das enzimas com seus substratos.

No presente trabalho foi verificado que os efeitos de cloreto de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de sódio, nas concentrações de 0,1M, 0,5M e 1,0M, sobre a inativação térmica da POD às temperaturas de 60°C, 65°C, 70°C e 75°C (figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Todos os sais favoreceram a inativação da enzima, concordando com a literatura (Lu *et al.*, 1974; Gonçalves *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999). Porém apenas o CaCl_2 nas concentrações de 0,5M e 1,0M provocou uma redução significativa nos valores de energia de ativação (E_a) para 29,98 kcal/mol e 19,48 kcal/mol (figura 22) com valores equivalentes de 125,45 kJ/mol e 81,51 kJ/mol, respectivamente. Os dados das constantes cinéticas referentes aos valores de energia de ativação (E_a) na presença de sais estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6 do apêndice.

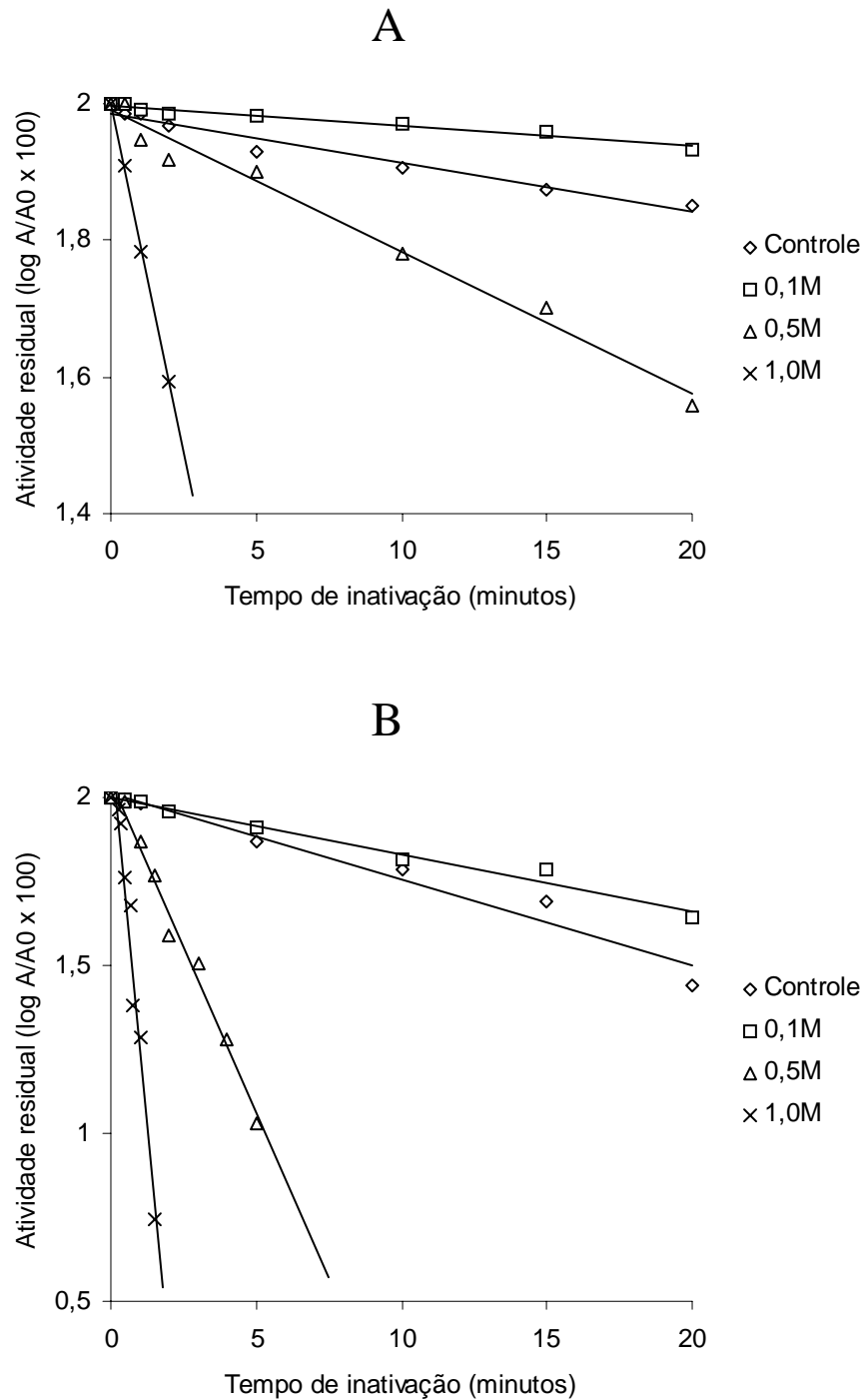


Figura 16. Efeito de CaCl_2 na inativação térmica da POD de yacon. (A) 60°C ; (B) 65°C . A POD purificada foi incubada na presença de CaCl_2 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

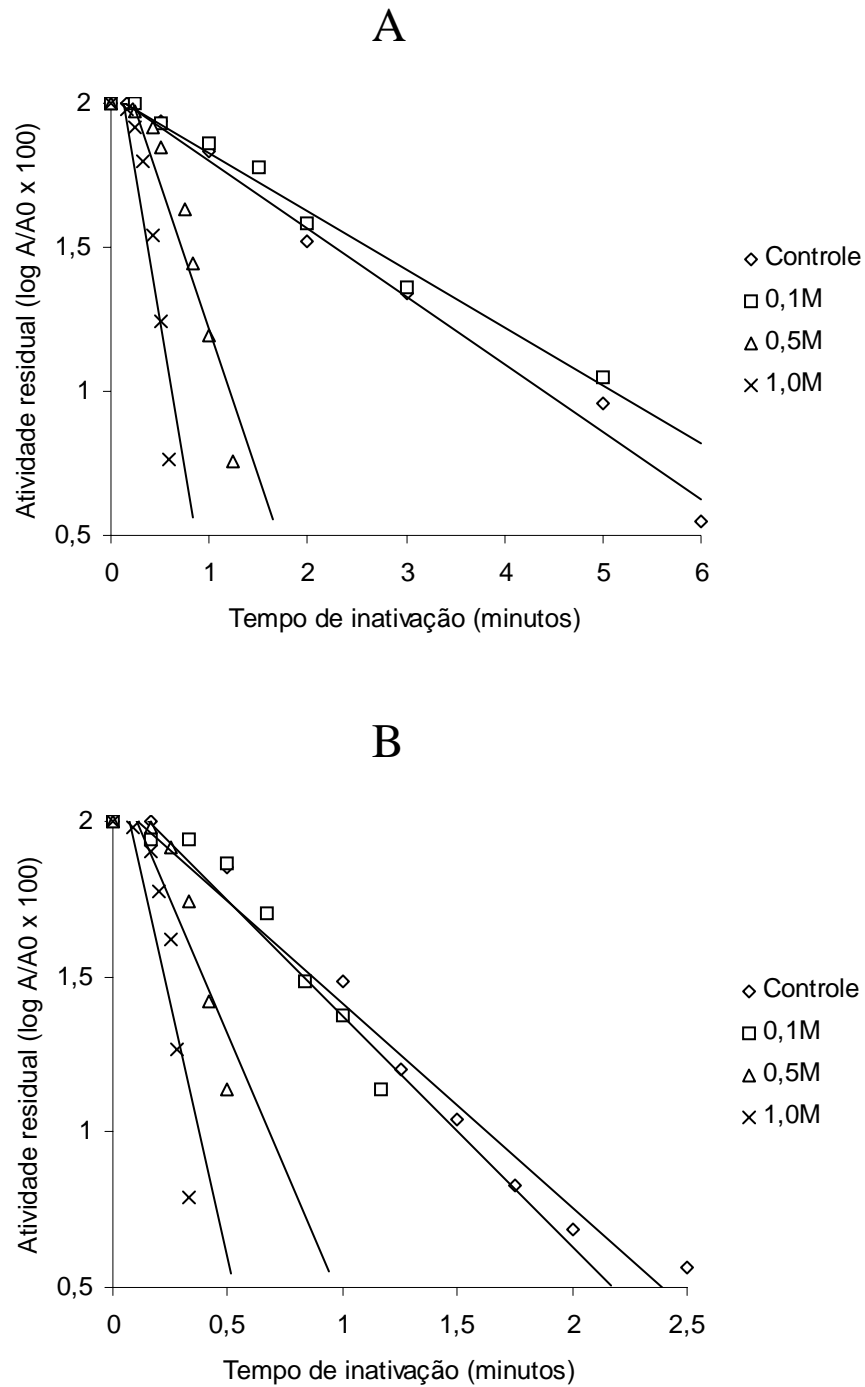


Figura 17. Efeito de CaCl_2 na inativação térmica da POD de yacon. (A) 70°C ; (B) 75°C . A POD purificada foi incubada na presença de CaCl_2 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

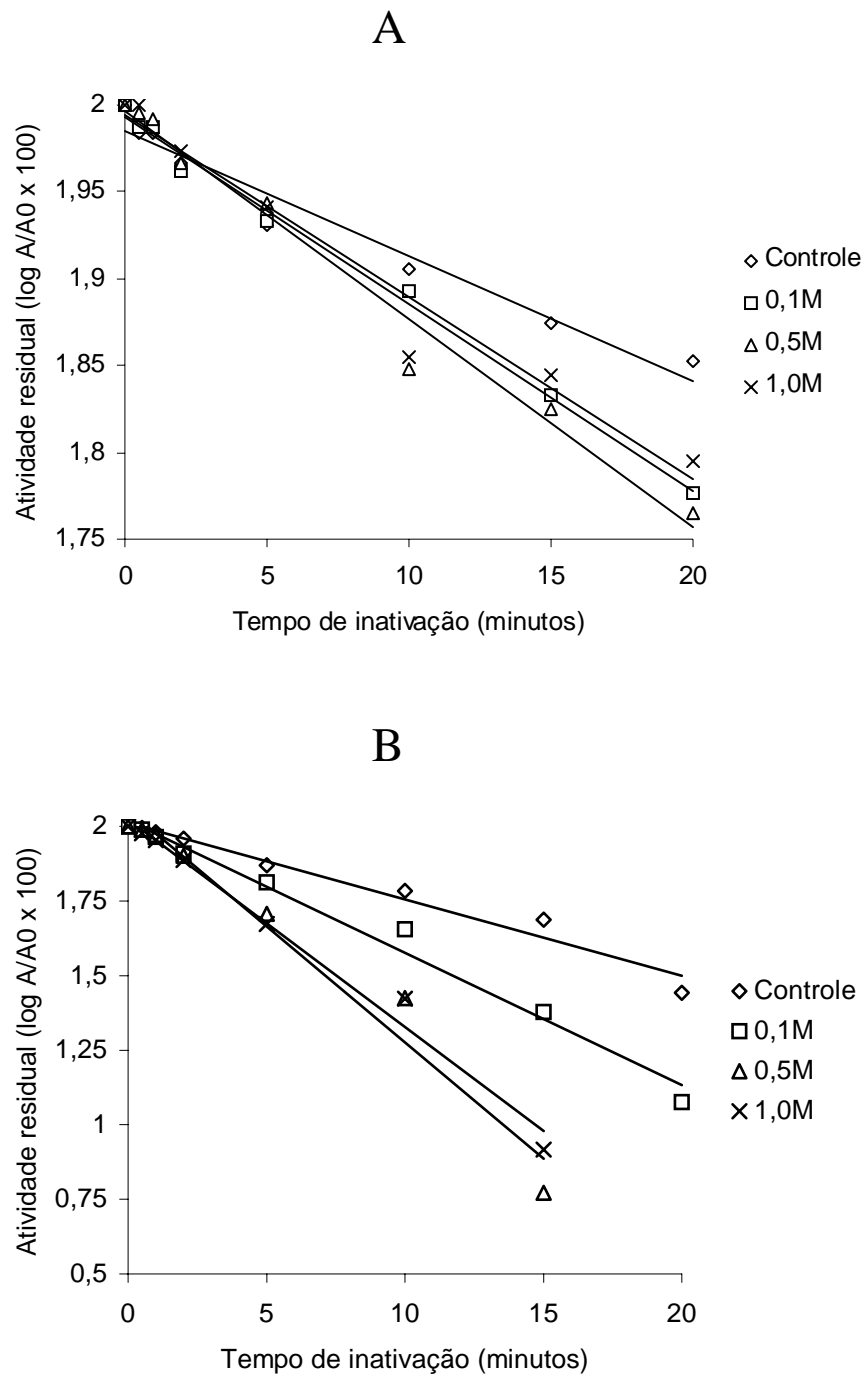


Figura 18. Efeito de KCl na inativação térmica da POD de yacon. (A) 60°C; (B) 65°C. A POD purificada foi incubada na presença de KCl 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

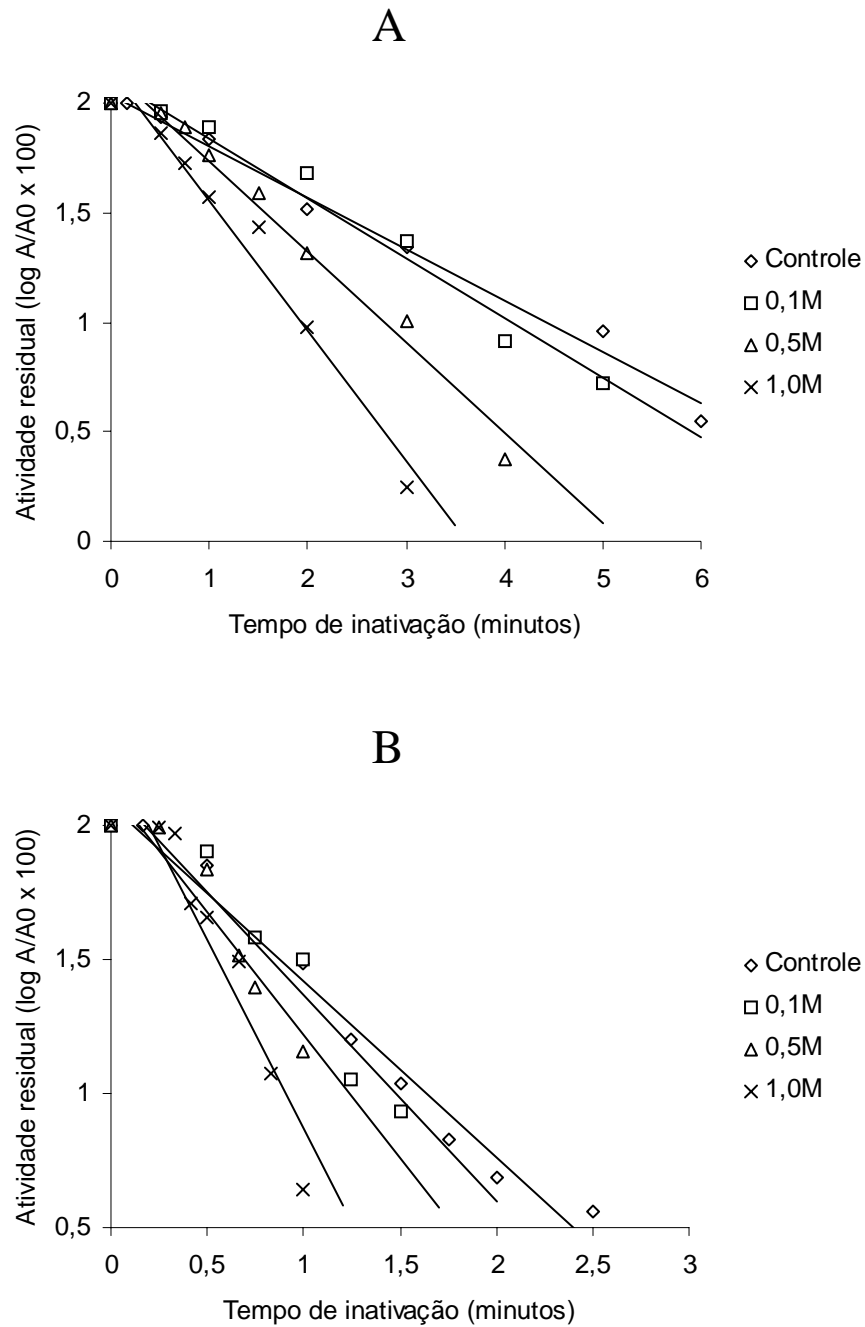


Figura 19. Efeito de KCl na inativação térmica da POD de yacon. (A) 70°C; (B) 75°C. A POD purificada foi incubada na presença de KCl 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

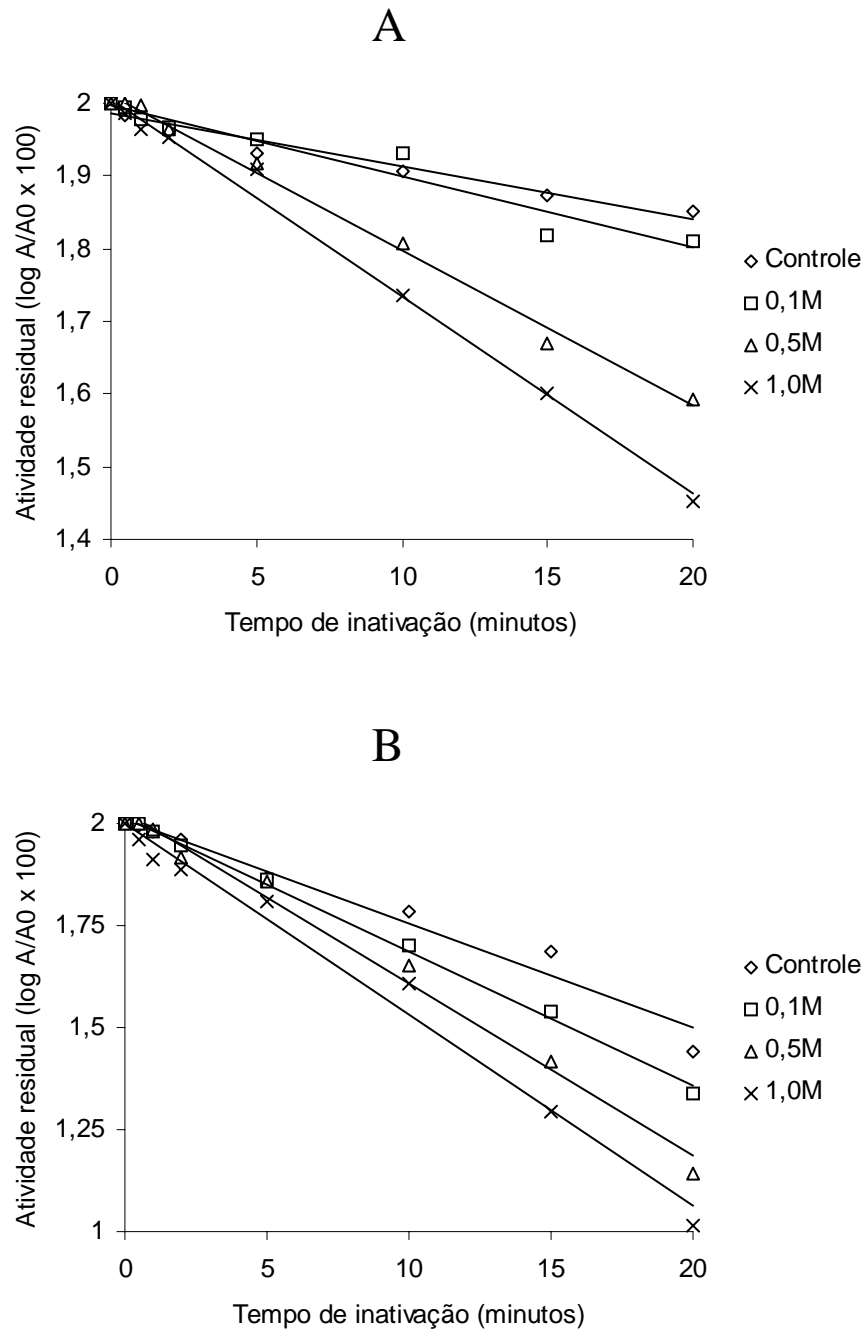


Figura 20. Efeito de NaCl na inativação térmica da POD de yacon. (A) 60°C; (B) 65°C. A POD purificada foi incubada na presença de NaCl 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

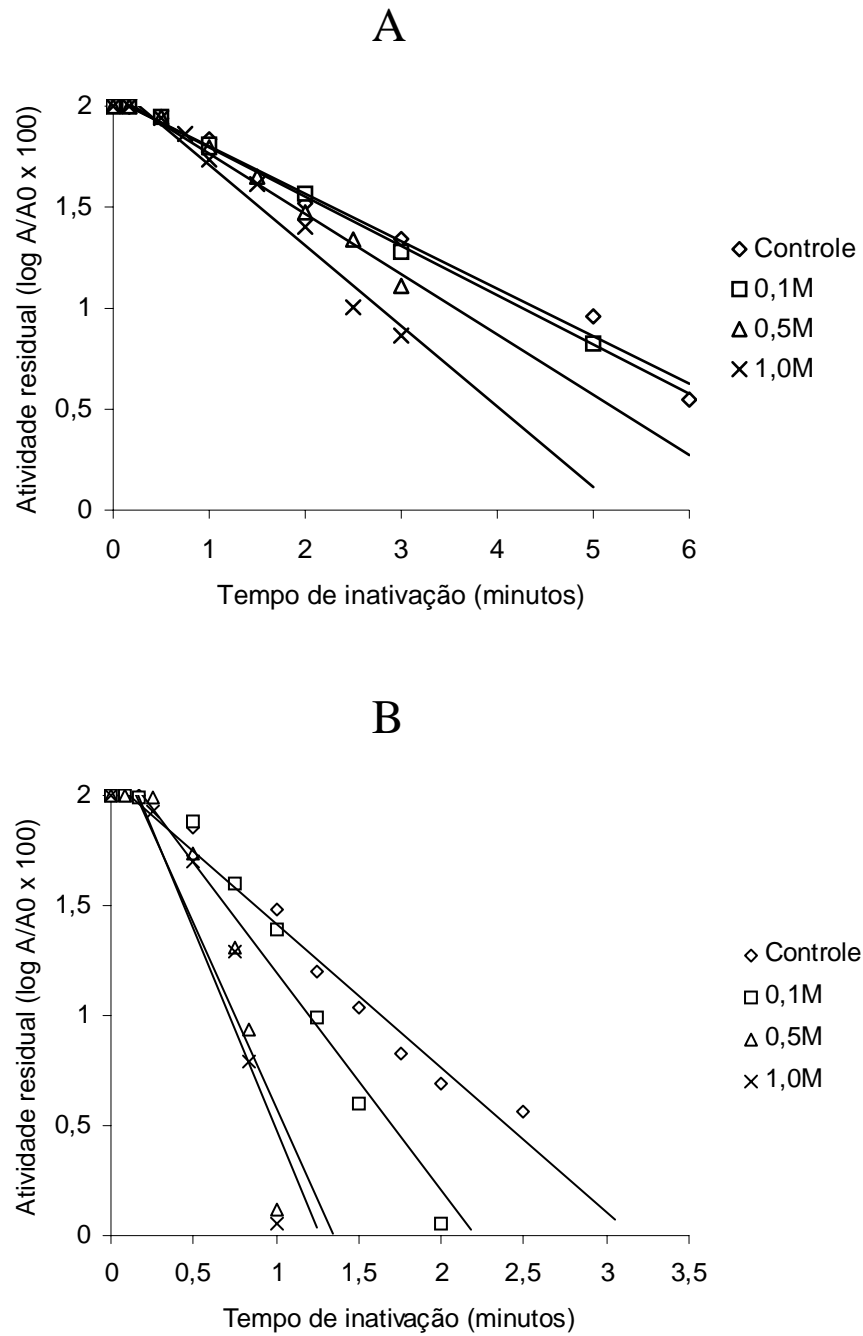


Figura 21. Efeito de NaCl na inativação térmica da POD de yacon. (A) 70°C; (B) 75°C. A POD purificada foi incubada na presença de NaCl 0,1M, 0,5M e 1,0M, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

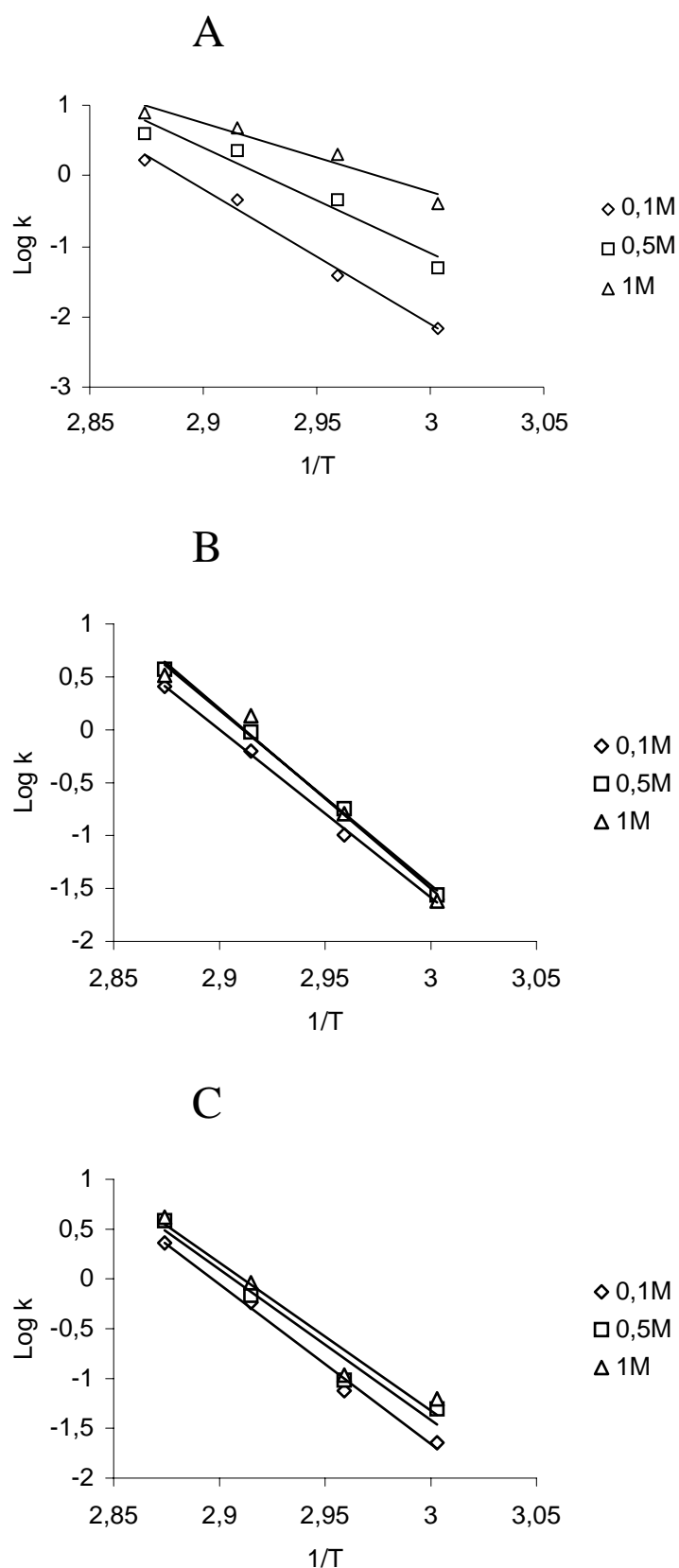


Figura 22. Curvas de $\log k \times 1/T$ para cálculo da E_a na presença de sais em diferentes concentrações (0,1M; 0,5M e 1,0M). (k) $-2,3 \times T_g$; (T) temperatura absoluta ($^{\circ}K$). (A) $CaCl_2$; (B) KCl ; (C) $NaCl$. Os dados das constantes cinéticas referentes aos gráficos estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6 do apêndice.

5.11. REGENERAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE APÓS INATIVAÇÃO TÉRMICA

Nos trabalhos sobre o comportamento das peroxidases frente à inativação térmica há um aspecto importante e ainda muito pouco elucidado, que diz respeito à sua capacidade de regeneração. Tal fenômeno ocorre em vários vegetais durante o armazenamento, causando alterações indesejadas no sabor e aroma, sendo observado principalmente após condições de inativação sob altas temperaturas e curtos períodos de exposição (Lu *et al.*, 1974). Para melhor compreensão do processo de regeneração da POD de yacon, a capacidade de regeneração da enzima foi estudada pelo acompanhamento da sua atividade residual durante 24 horas de incubação a 4°C e a 30°C, após inativação parcial em diversas condições de tempo e temperatura (figuras 23, 24, 25 e 26).

O comportamento geral observado para todas as condições de inativação foi de que a maior porcentagem de regeneração ocorre durante as primeiras 3 a 5 horas, com pouca ou nenhuma recuperação de atividade no período entre 6 e 24 horas de armazenamento. As amostras armazenadas a 4°C apresentaram maior capacidade de regeneração em relação às aquelas armazenadas a 30°C, com exceção das condições de inativação a 60°C, quando a temperatura de armazenamento não influenciou no processo.

As inativações realizadas a 65°C, cujos tempos de inativação superaram os 10 minutos, apresentaram menor porcentagem de regeneração em relação às condições com tempos de inativação menores e temperaturas mais altas. Quando inativada por 30 minutos a 65°C, até 4% de atividade, a peroxidase recuperou de 10 a 12% da atividade original após 24 horas (figura 23). Mas quando inativada por 3 minutos a 75°C, até 2% da atividade original, foi capaz de regenerar até 32 a 34% da atividade após 24 horas de armazenamento (figura 25); tendo atingido picos de aproximadamente 38% de regeneração. Quando a POD foi inativada até 4 a 5% da atividade original pela incubação a 80°C por 1 a 1,3 minuto, mostrou uma regeneração até 41 a 47% da atividade original (figura 26).

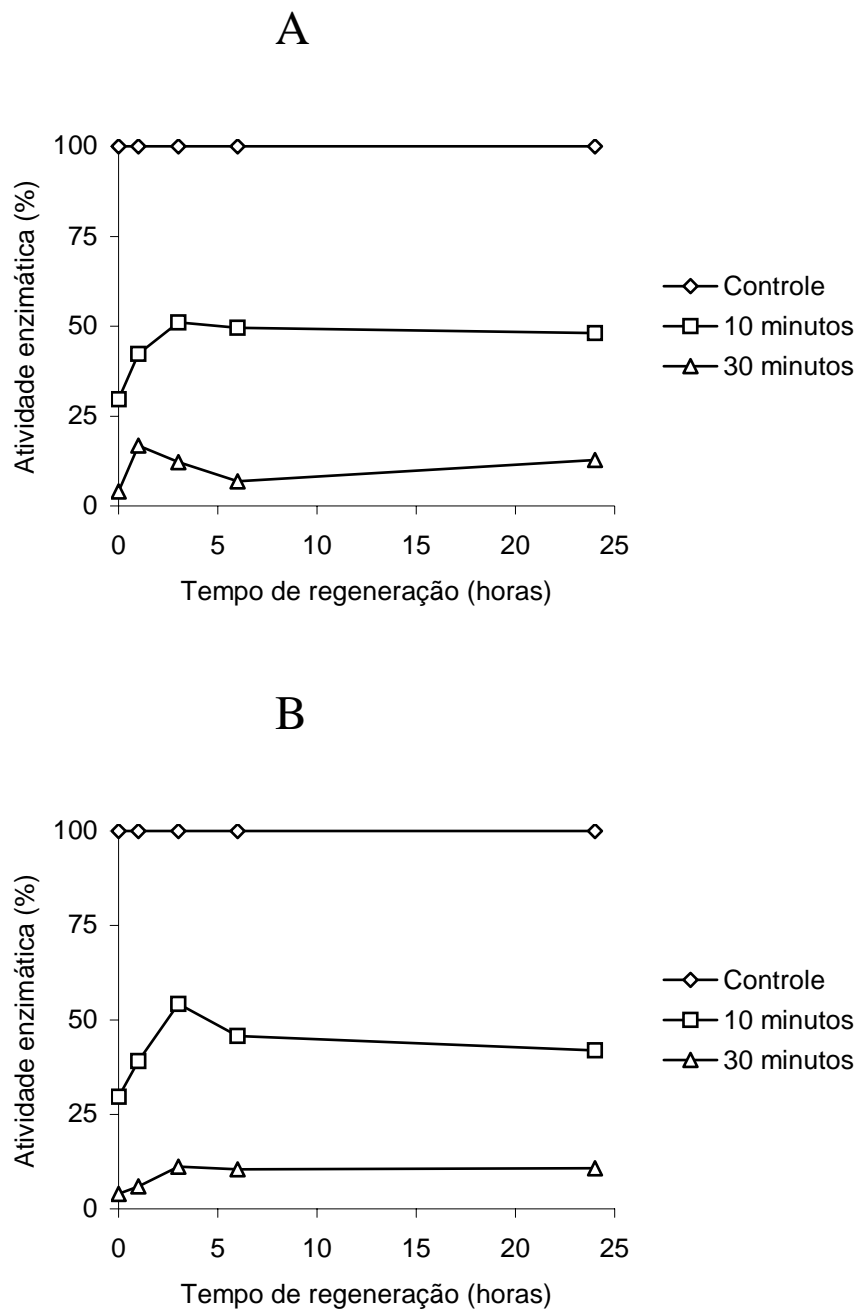


Figura 23. Regeneração da POD de yacon após inativação a 65°C por 10 e 30 minutos. (A) Regeneração a 4°C; (B) regeneração a 30°C. O controle representa a enzima não submetida à inativação térmica.

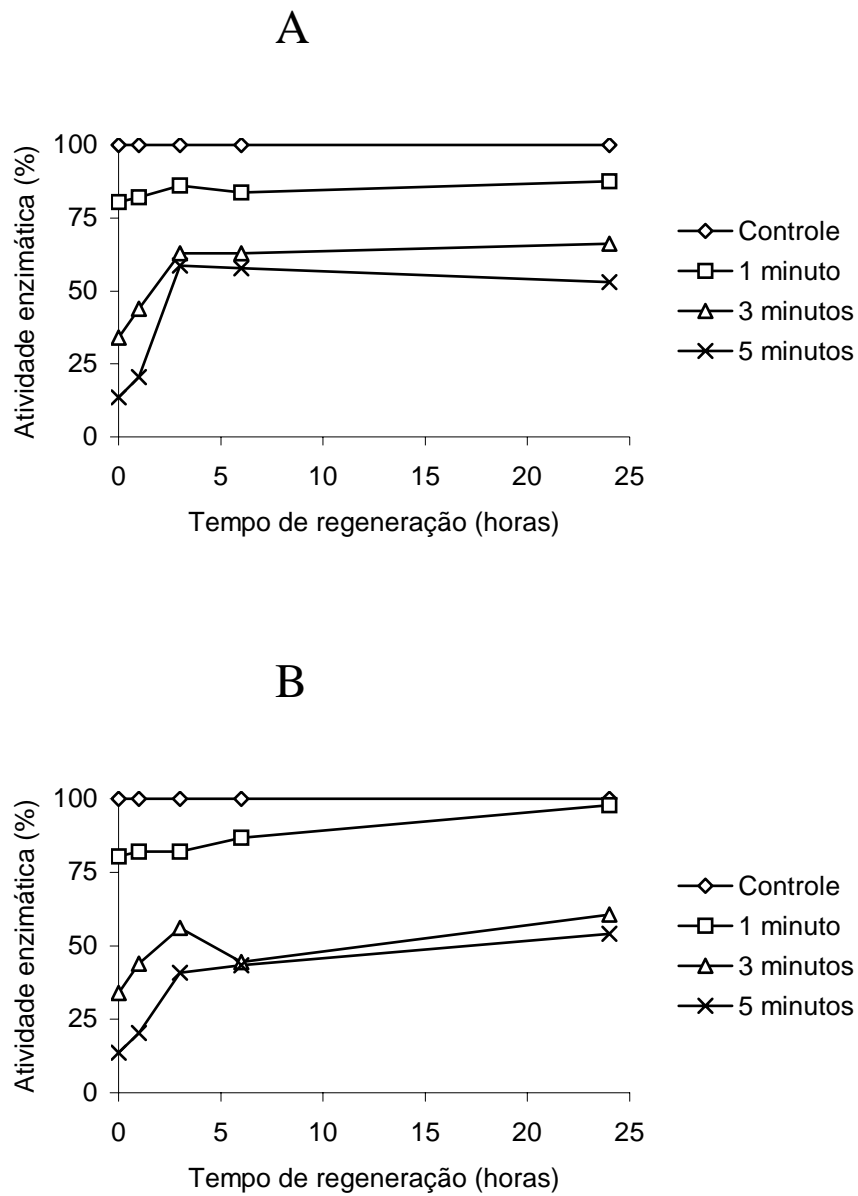


Figura 24. Regeneração da POD de yacon após inativação a 70°C por 1, 3 e 5 minutos. (A) Regeneração a 4°C; (B) regeneração a 30°C. O controle representa a enzima não submetida à inativação térmica.

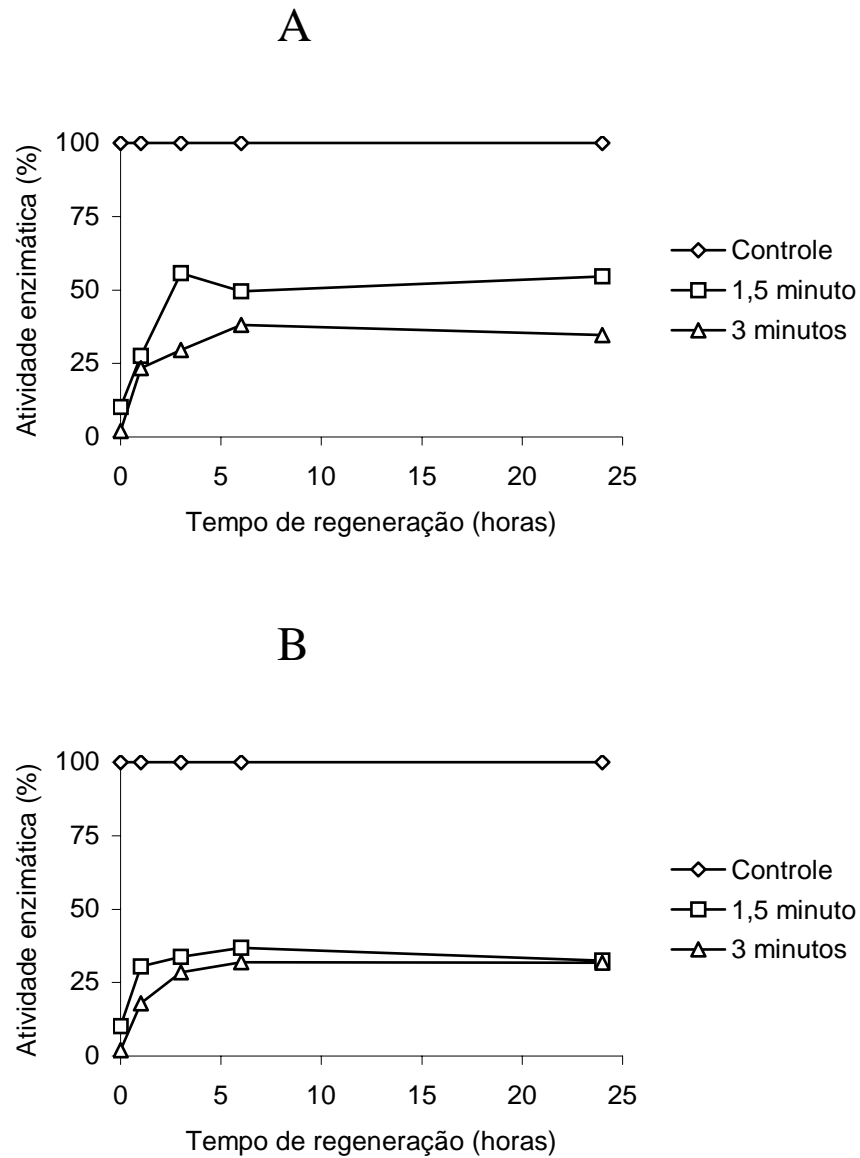


Figura 25. Regeneração da POD de yacon após inativação a 75°C por 1,5 e 3 minutos. (A) Regeneração a 4°C; (B) regeneração a 30°C. O controle representa a enzima não submetida à inativação térmica.

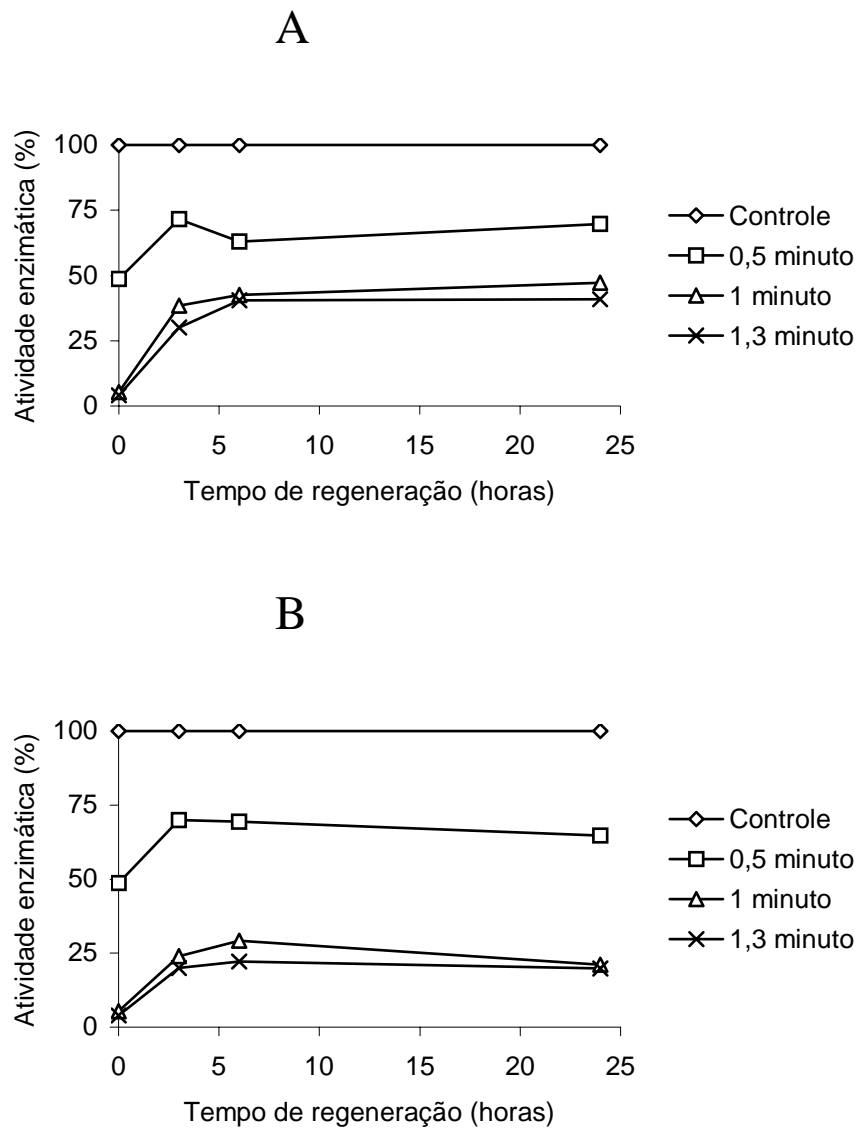


Figura 26. Regeneração da POD de yacon após inativação a 80°C por 0,5, 1 e 1,3 minutos. (A) Regeneração a 4°C; (B) regeneração a 30°C. O controle representa a enzima não submetida à inativação térmica.

Como já mencionado, algumas vezes a inativação das peroxidases se deve a perda do grupamento heme (Adams, 1997; Vamos-Vigyazo, 1981). E a regeneração da enzima está, algumas vezes, relacionada à recombinação desse grupamento com sua apoenzima, resultando na POD em forma nativa ou semelhante, fenômeno que é favorecido por tempos de inativação mais curtos (Adams, 1997). Analogamente, após tempos de inativação mais longos, a regeneração tende a ser menor, pois ocorrem alterações irreversíveis na apoenzima e polimerização de grupamentos heme (Adams, 1997).

O conhecimento de tal fenômeno além de contribuir para a compreensão do próprio processo de regeneração, fornece dados importantes sobre a inativação térmica das peroxidases. Mais especificamente sobre o comportamento ora linear ora bifásico da enzima, durante os processos de inativação térmica, pois a regeneração ocorre mais intensamente nos primeiros momentos após a inativação (Lu *et al.*, 1974); e pode continuar ocorrendo durante todo processo de inativação, contribuindo assim com o comportamento não linear (Adams, 1997). Assim, a inativação da POD se mostraria como um fenômeno linear quando se tratasse de isoformas com a mesma estabilidade térmica, e sem uma regeneração acentuada.

6. CONCLUSÕES

- O isolamento da POD da raiz de Yacon indicou pequena dependência da força iônica do tampão e a necessidade de uso de inibidores do escurecimento enzimático.
- O processo de purificação adotado resultou em um único pico de atividade com fator de purificação final de 222,3.
- A eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima purificada demonstra a ocorrência de uma única forma enzimática sem a presença de isoenzimas.
- A POD de yacon apresentou um peso molecular de 34,8 kDa, pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 35°C, valores próximos aos encontrados na literatura para a enzima de diferentes fontes vegetais.
- A enzima apresentou maior especificidade para o-dianisidina comparativamente a outros substratos doadores comumente utilizados nos estudos de peroxidases vegetais. Valores de K_m e V_{max} de 14,227 mM, 14,434 mM e 17409 UA/mL, 14830 UA/mL, para o-dianisidina e peróxido de hidrogênio, respectivamente. A razão V_{max}/K_m indica maior afinidade pelo substrato doador.
- A enzima não mostrou capacidade de oxidação de alguns compostos fenólicos como catecol, DL-DOPA e p-cresol.
- Dentre os inibidores enzimáticos usados, o dietilditiocarbamato de sódio foi o mais eficiente dos compostos quelantes de metais, seguido da azida sódica. Com exceção do sulfato de ferro, os sais metálicos tiveram pequeno efeito inibidor sobre a enzima.

- Vários ácidos fenólicos apresentaram capacidade de inibição sobre a POD, com destaque para ácido caféico e ferúlico, ambos apresentando baixas constantes de inibição frente aos dois substratos, sendo o primeiro do tipo competitivo e o segundo não competitivo. O composto DL-DOPA inibiu com eficiência a enzima apresentando-se com uma ação do tipo competitiva.
- Compostos sulfidrilas foram eficientes inibidores da atividade da POD de yacon com destaque para ditioeritritol e 2-mercaptoetanol em relação à L-cisteína e sulfitos.
- Os estudos de inativação térmica demonstram que a POD de yacon apresentou um comportamento monofásico com um valor de energia de ativação (E_a) de 31,57 kcal/Mol ou 132,12 kJ/Mol.
- A sacarose mostrou um efeito protetor à inativação térmica de POD de yacon em diferentes temperaturas. O aumento na sua concentração correspondeu a maior estabilidade da enzima, com valores de E_a de 33,5, 34,6 e 35,4 kcal/Mol para concentrações de sacarose de 10%, 20% e 30%, respectivamente.
- Contrário aos açúcares, os sais CaCl_2 , KCl e NaCl favoreceram a inativação térmica da enzima com aumento da concentração de 0,1 até 1,0 M, e apresentaram diferentes efeitos na energia de ativação da reação.
- O comportamento da POD frente à regeneração após inativação térmica apresentou dependência da temperatura e tempo de inativação. Altas temperaturas e tempos curtos favoreciam maior regeneração que baixas temperaturas por tempos longos. Observaram-se maiores taxas de regeneração durante as primeiras horas após a inativação, com pequena dependência da temperatura de incubação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABELES, F. B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit. endocarp. **Plant Physiol.** v. 95, p. 269-73, 1991.
2. ADAMS, J. B. Regeneration and the kinetic of peroxidase inactivation. **Food Chem.** v. 60, n. 2, p. 201-206, 1997.
3. AKISSOE, N.; HOUNHOUIGAN, J.; MESTRES, C.; NAGO, M. How blanching and drying affect the colour and functional characteristics of yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) flour. **Food Chem.** v. 82, p. 257-264, 2003.
4. AKISSOE, N.; HOUNHOUIGAN, J.; MESTRES, C.; NAGO, M. Effect of tuber storage and pre- and post-blanching treatments on the physicochemical and pasting properties of dry yam flour. **Food Chem.** v. 85, p. 141-149, 2004.
5. ANDREWS, P. The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochem. J.** v. 95, p. 595-606, 1965.
6. APARICIO-CUESTA, M. P.; MATTOS-NOTARIO, M. P.; RIVAS, J.C. Sensory evaluations and changes in peroxidase activity during storage of frozen green beans. **J. Food. Sci.** Chicago, v. 57, p. 1129-31, 1992.
7. ARUNA, N.; LALI, A. Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer. **Process Biochem.** v. 37, p. 431-437, 2001.
8. ASHIE, I. N. A.; SIMPSON, B. K.; SMITH, J. P. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. **C. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 36, p. 1-30, 1996.
9. AVALLONE, S.; GUIRAUD, J.; BRILLOUET, J.; TEISSON, C. Enzymatic browning and biochemical alterations in black spots of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Current Microbiol.** v. 47, p. 113-118, 2003.
10. AYBAR, M. J.; RIERA, A. N. S.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S. S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifollius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 74, p. 125-132, 2001.
11. BACK, J. B.; OAKENFULL, D.; SMITH, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. **Biochem.** v. 18, n. 23, p. 5191-5196, 1979.

12. BARCELÓ, A. R.; POMAR, F.; LÓPEZ-SERRANO, M.; PEDREÑO, M. A. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. **Functional Plant Biol.** v. 30, p. 577-591, 2003.
13. BENKEBLIA, N. Phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, pyruvic acid and total phenolics variations in onion bulbs during long-term storage. **Lebensm. Wiss. Technol.** v. 33, p. 112-116, 2000.
14. BERNARDS, M. A.; FLEMING, W. D.; LLEWELLYN, D. B.; PRIEFER, R.; YANG, X.; SABATINO, A.; PLOURDE, G. L. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiol.** v. 121, p. 135-145, 1999.
15. BEYER JR., E. M. Ethylene action and metabolism. In: FRIEND, J.; RHODES, M. J. C. **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables.** (Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe. n.19), Academic Press, London, p.107-121, 1981.
16. BIALE, J. B.; YOUNG, R. E. Respiration and ripening in fruits - Retrospect and prospect. In: FRIEND, J.; RHODES, M. J. C. **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables.** (Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe. n.19), Academic Press, London, p.1-39, 1981.
17. BLEINROTH, E. W. **Curso de pós-colheita e armazenamento de hortaliças.** Campinas SP: Instituto de tecnologia de alimentos - ITAL, 1982.
18. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** São Paulo, SP. Livraria Varela. 223 p. 1992.
19. BOLLEN, A. F.; COX, N. R.; DELA RUE, B. T.; PAINTER, D. J. A descriptor for damage susceptibility of a population of produce. **J. Agric. Engng. Res.** v. 78, n.4, p.391-395, 2001.
20. BÖTTCHER, H.; GÜNTHER, I.; KABELITZ, L. Physiological postharvest responses of Common Saint-John's wort herbs (*Hypericum perforatum* L.). **Postharvest Biol. Technol.** v.29, p.342-350, 2003.
21. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
22. BRUEMMER, J.H.; ROE, B.; BOWER, E.R. Peroxidase reactions and orange juice quality. **J. Food Sci.** Chicago, v. 141, p. 186-9, 1976.

23. BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: A Review. **J. Food Sci.** Chicago, v. 42, p. 1-6, 1977.
24. CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.** v.74, p.2157-2184, 2004.
25. CANO, M. P.; ANCOS, B.; LOBO, M. G.; SANTOS, M. Improvement of frozen banana (*Musa cavendishii*, cv Enana) colour by blanching: relationship between browning, phenols and polyphenol oxidase and peroxidase activities. **Z. Lebensm Unters Forsch A.** v.204, p.60-65, 1997.
26. CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidase e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biol. Sci.** v.25, n.1, p.189-193, 2003.
27. CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. A biologia molecular e a produção de enzimas de interesse comercial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 21-34, 2004.
28. CHAMAN, M. E.; CORCUERA, L. J.; ZÚNINGA, G. E.; CARDEMIL, L.; ARGANDONA, V. H. Induction of soluble and cell wall peroxidases by aphid infestation in barley. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 2249-2253, 2001.
29. CHITARRA, A. B. Bioquímica aplicada na pós-colheita (avanços da bioquímica na textura de frutos e hortaliças). In: RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PASTORE, G. M. **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas na América latina.** Anais do I simpósio latino americano de ciência dos alimentos. Campinas SP: Fundação Cargill, p. 156-159, 1997.
30. CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Bol. SBCTA**, v. 32, n. 2, p. 167-171, set/dez 1998.
31. CRIQUET, S.; JONER, E. J.; LEGLIZE, P.; LEYVAL, C. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and rhizosphere of lucerne (*medicago sativa* L.). **Biotechnol. Lett.** v. 22, p. 1733-1737, 2000.
32. CRIQUET, S.; JONER, E. J.; LEYVAL, C. 2,7-Diaminofluorene is a sensitive substrate for detection and characterization of plant root peroxidase activities. **Plant Sci.** v. 161, p. 1063-1066, 2001.

33. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 121, p. 404-427, 1964.
34. DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochem. J.** v. 55, p. 170-171, 1953.
35. DOBLINSKI, P. M. F.; FERRARESE, M. L. L.; HUBER, D. A.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to ρ -coumaric and ρ -hydroxybenzoic acids. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.46, n.2, p.193-198, 2003.
36. DUANGMAL, K.; APETEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chem.** v. 64, p. 351-359, 1999.
37. 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.** v. 48, p. 1574-1579, 2000.
38. DUARTE-VÁZQUEZ, M. A.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; WHITAKER, J. R.; ARROYAVE-HERNÁNDEZ, C.; REGALADO, C. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme. **Phytochem.** v. 62, p. 5-11, 2003.
39. EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. **Enzyme assays: a practical approach.** New York, USA: Oxford University Press Inc. 351 p. 1993.
40. ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **C. Rev. Anal. Chem.** v.31, n.2, p.57-139, 2001.
41. ESKIN, N. A. M. **Biochem. Foods.** 2. ed. USA: Academic Press, 557 p. 1990.
42. ESTEBAN-CARRASCO, A.; LÓPEZ-SERRANO, M.; ZAPATA, J. M.; SABATER, B.; MARTÍN, M. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbarensis* by peroxidase activity: possible involvement in defense reactions. **Plant Physiol. Biochem.** v.39, p.521-527, 2001.
43. FLOROS, J. D. The shelflife of fruits and vegetables. In: CHARALAMBOUS, G. **Shelf life studies of food and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects.** Amsterdam: Elsevier science publishers, p. 195-216, 1993.

44. FLURKEY, W. H.; JEN, J. J. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. **J. Food Sci.** Chicago, v. 43, p. 1826-1828, 1978.
45. FRENKEL, C. Involvement of peroxidase and indole-3-acetic oxidase isoenzymes from pear, tomato and blueberry fruit in ripening. **Plant Physiol.** v.49, p.757-60, 1972.
46. FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Sci. Plant Nutr.** v. 43, n. 1, p. 171-177, 1997.
47. FUNAMOTO, Y.; YAMAUCHI, N.; SHIGENAGA, T.; SHIGYO, M. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) and inhibition of the activity by heat treatment. **Postharvest Biol. Technol.** v. 24, p. 163-170, 2002.
48. FUNAMOTO, Y.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) and inhibition of the activity by heat treatment. **Postharvest Biol. Technol.** v. 28, p. 39-46, 2003.
49. GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D.; GONÇALVES, J. R. A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. **Pesq. agropec. bras.** v.35, n.10, p.2075-2081, 2000.
50. GORIN, N.; HEIDEMA, F.T. Peroxidase activity in Golden Delicious apples as a possible parameter of ripening and senescence. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 24, p. 200-1, 1976.
51. GRAEFE, S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S.; BUERKERT, A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the peruvian Andes. **Field crops Res.** (artigo em impressão), 2003.
52. GRAU, A.; REA, J. Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. **Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** n. 21, 242 p. 1997.
53. GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and roots starches. **Carbohydrate Polymers.** v.49, p.425-437, 2002.

54. HAANDEL, M. J. H.van; SARABÈR, F. C. E.; BOERSMA, M. G.; LAANE, C.; FLEMING, Y.; WEENEN, H.; RIETJENS, M. C. M. Characterization of different commercial soybean peroxidase preparations and use of the enzyme for N-demethylation of metil N-methylantranilase to produce the food flavor. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, p. 1949-1954, 2000.
55. HAARD, N. F. Upsurge of particulate peroxidase in ripening banana fruit. **Phytochem.** Oxford, v. 12, p. 555-60, 1973.
56. HAARD, N. F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. In: ORY, R.L. & St. ANGELO, A.J., eds. **Enzymes in food and beveraged processing.** Washington, Amer. Chem. Society. cap.9. p.143 (Symposium series 47), 1977.
57. HAMED, R. R.; MAHAREM, T. M.; FATAH, M. M. A.; ATAYA, F. S. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. **Phytochem.** v. 48, p. 1291-1294, 1998.
58. HERPPICH, W. B.; MEMPEL, H.; GEYER, M. Effects of postharvest mechanical and climatic stress on carrot tissue water relations. **Postharvest Biol Technol.** v. 16, p. 43-49, 1999.
59. HIPPEL, P. H.; WONG, K. The effects of various electrolytes and nonelectrolytes on the thermal ribonuclease transition. **J. Biol. Chem.** v. 240, n. 10, p. 3909-3923, 1965.
60. HO, K. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* 'Christine 130'. **Plant Physiol. Biochem.** v. 37, n. 11, p. 841-848, 1999.
61. HOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers.** v.45, p.253-267, 2001.
62. HUANG, S.; HART, H.; LEE, H. and WICKER, L. Enzymatic and color changes during post-harvest storage of lychee fruit. **J. Food Sci.** Chicago, v. 55, p. 1762-63, 1990.
63. INOUYE, K.; KUZUYA, K.; TONOMURA, B. Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1388, p. 209-214, 1998.

64. IPPOLITO, A.; GHAOUTH, A. E.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biol. Technol.** v. 19, p. 265-272, 2000.
65. KADER, A. A.; BEN-YEHOSHUA, S. Effects of superatmospheric oxygen levels on postharvest and quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biol. Technol.** v.20, p.1-13, 2000.
66. KAHN, V.; GOLDSHMIDT, S.; AMIR, J.; GRANIT, R. Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. **J. Food Sci.** v.46, p.756-764, 1981.
67. KIM, Y. H.; KIM, J. H.; YOO, Y. J. Enhanced secretion of peroxidase from carrot hairy roots using polyethylene glycol. **J. Ferment. Bioengng.** v. 83, n. 4, p. 397-400, 1997.
68. KIM, Y. H.; YOO, Y. J. Peroxidase production from carrot hairy cell culture. **Enzyme Mic. Technol.** v. 18, p. 531-535, 1996.
69. K'OSAMBO, L. M.; CAREY, E. E.; MISRA, A. K.; WILKES, J.; HAGENIMANA, V. Influence of age, farming site and boiling on pro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) storage roots. **Journal of Food Compos. Anal.** v. 11, p. 305-321, 1998.
70. LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. **J. Biol. Chem.** v. 256, n. 14, p. 7193-7201, 1981.
71. LEON, J. C.; ALPEEVA, I. S.; CHUBAR, T. A.; GALAEV, I. Y.; CSOREGI, E.; SAKHAROV, I.Y. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Sci.** v. 163, p. 1011-1019, 2002.
72. LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. A. Chem. Soc.** v. 56, p. 658-666, 1934.
73. LING, A.C.; LUND, D.B. Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isoenzymes from thermal destruction curves. **J. Food Sci.** v. 43, 1978.
74. LÓPEZ-SERRANO, M.; BARCELÓ, A. R. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. **Food Chem.** v.55, n.2, p.133-137, 1996.

75. LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A.; da SILVA, M. A. Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. **J. Agric. Food Chem.** v. 40, n. 12, p. 2369-2373, 1992.
76. LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A.; da SILVA, M. A. Heat inactivation of soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Bol. SBCTA.** v. 29, n. 2, p. 155-158, 1995.
77. LU, A. T.; WHITAKER, J. R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **J. Food Sci.** V. 39, p. 1173-1178, 1974.
78. MAHAJAN, P. V.; GOSWAMI, T. K. Enzyme kinetics based modelling of respiration rate for apple. **J. Agric. Engng. Res.** v. 79, n. 4, p. 399-406, 2001.
79. MANZOCCO, L.; NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PITOTTI, A.; MALTINI, E. Polyphenoloxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties. **Food Res. Int.** v. 31, n. 5, p. 363-370, 1999.
80. MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochem.** v. 60, p. 551-565, 2002.
81. MOULDING, P. H.; GOODFELLOW, J.; McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. The occurrence of isoperoxidases in conference pears. **Int. J. Food Science and Technol.** v. 24, p. 269-275, 1989.
82. MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **Int. J. Food Sci. Technol.** v. 22, p. 391-397, 1987.
83. NAKAYAMA, T.; AMACHI, T. Fungal peroxidase: its structure, function and application. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.** v. 6, p. 185-198, 1999.
84. NEVES, V. A. Ionically bound peroxidase from peach fruit. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** v. 45, n. 1, p. 7-16, 2002.
85. NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Extração e atividade da peroxidase e polifenoloxidase de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.). **Rev. Ciênc. Farm.** v. 7, p. 101-107, 1985.
86. NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Peroxidase from peach fruit: Thermal stability. **Braz Arch. Biol. Technol.** v. 41, n. 2, p. 179-186, 1998.

87. NOURIAN, F.; RAMASWAMY, H. S.; KUSHALAPPA, A. C. Kinetics of quality change associated with potatoes stored at different temperatures. **Lebensm. Wiss. U. Technol.** v. 36, p. 49-65, 2003.
88. O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chem.-Biol. Interact.** v. 129, 113-139, 2000.
89. O'HARE, T. J. Postharvest physiology and storage of rambutan. **Postharvest Biol. Technol.** v. 6, 189-199, 1995.
90. OHYAMA, T.; Ito, O.; YASUYOSHI, S.; IKARASHI, T.; MINAMISAWA, K.; KUBOTA, M.; TSUKIHASHI, T.; ASAMI, T. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Sci. Plant Nutr.** v. 36, n. 1, p. 167-171, 1990.
91. PARK, C.; RAINES, R. T. Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis. **J. A. Chem. Soc.** v. 123, n. 46, p. 11472-11479, 2001.
92. PAUL, K. G.; Peroxidases: historical background. In: GREPPIN, H; PENEL, C.; GASPARD, T. **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases.** Genebra, University of Geneva, p. 1-14, 1986.
93. PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G. as principais oxidorredutases de uso industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 1-7, 2004.
94. PONCE, A. G.; del VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Natural Essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. **Lebensm. Wiss. u. Technol.** v.37, p.199-204, 2004.
95. PYO, Y.; LEE, T.; LOGENDRA, L; ROSEN, R. T. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. **Food Chem.** v.85, p.19-26, 2004.
96. QUIJANO, F. G.; VILHENA, S. M. C.; LIMA, G. P. P.; CÂMARA, F. L. A. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase durante armazenamento de yacon. **Horticult. Bras.** v. 18, p.888-889, 2000.
97. RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova.** v. 15, p. 1-6, 2005.
98. RAMASWAMY, H.S.; RANGANA, S. Residual peroxidase activity as influenced by blanching, SO₂-treatment and freezing of cauliflowers. **J. Sci. Food Agricult.,** v. 47, p. 376-82, 1989.

99. RAUHA, J.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.** v.56, p.3-12, 2000.
100. REES, D.; van OIRSCHOT, Q. E. A.; AMOUR, R.; RWIZA, E.; KAPINGA, R.; CAREY, T. Cultivar variation in keeping quality of sweetpotatoes. **Postharvest Biol. Technol.** v. 28, p. 313-325, 2003.
101. REGALADO, C.; ASENJO, J. A.; PYLE, D. L. Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reverse micelles. **Enzyme Microbial Technol.** v. 18, p. 332-339, 1996.
102. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends plant sci.** v. 2, n.4, p.152-159, 1997.
103. RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 2472-2476, 1997.
104. RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Sci.** v.160, p.315-321, 2001.
105. ROBERT, C.; CADET, F. The inhibition of studies on polyphenoloxidase by cysteine. **Biochem. Education.** v. 24, n. 3, p. 157-159, 1996a.
106. ROBERT, C.; RICHARD-FORGET, F.; PABION, M.; CADET, F. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 28, n. 4, p. 457-463, 1996b.
107. ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods.** Belfast, Northern Ireland: Elsevier science publishers, 314 p. 1991.
108. RODRIGUEZ-AMAYA, D. Stability of carotenoids during the storage of foods. In: CHARALAMBOUS, G. **Shelf life studies of food and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects.** Amsterdam: Elsevier science publishers, p. 591-628, 1993.

109. RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. In: RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PASTORE, G. M. **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas na América latina**. Anais do I simpósio latino americano de ciência dos alimentos. Campinas SP: Fundação Cargill, p. 20-31, 1997.
110. RODRIGUEZ-LÓPEZ, J. N.; ESPÍN, J. C.; AMOR, F.; TUDELA, J.; MARTÍNEZ, V.; CERDÁ, A.; GRACÍA-CÁNOVAS, F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. **J. Agric. Food Chem.** v.48, p.1537-1541, 2000.
111. ROSA, M. de C.; FARIA, O.; AMANTE, E. R. O padrão respiratório na estocagem de produtos vegetais - uma revisão. **Bol. SBCTA**, v. 33, n. 2, p. 207-214, 1999.
112. ROTHAN, C.; NICOLAS, L. Changes in the acidic and basic peroxidase activities during tomato fruit ripening. **Hort. Sci.** v. 24, p. 340-42, 1989.
113. RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI, M. **World vegetables: principles, production and nutritive values**. 2. ed. Gainthersburg, Maryland: Aspen Publications, 843 p. 1999.
114. SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 416 p. 2004a.
115. SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 1-7, 2004b.
116. SAIJO, R.; TAKEO, T. Induction of peroxidase activity by ethylene and indol-3-acetic acid in tea shoots. **Agric. Biol. Chem.**, Kioto, v. 38, p. 2283, 1974.
117. SALUNKHE, D. K.; JADHAV, S. J.; KADAM, S. S.; CHAVAN, J. K. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **C. Rev. Food Sci. Nutr.** v.17, n.3, p.277-305, 1982.
118. SAPERS, G. M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technol.** p. 75-84, 1993.
119. SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo, SP. Livraria Varela. 517 p. 1996.

120. SHIBAIRO, S. I.; UPADHYAYA, M. K.; TOIVINEN, P. M. A. Postharvest moisture loss characteristics of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars during short-term storage. **Sci. Horticult.** v. 71, p. 1-12, 1997.
121. SILVA, E.; LOURENÇO, E.J.; NEVES, V.A. Soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Phytochem.** v.29, p.1051-6, 1990.
122. SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENSEK, S.; VALENTOVA, K.; ULRICHOVA, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **J. Chromatography A.** v. 1016, p. 89-98, 2003.
123. SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. **J. Agric. Food Chem.** v.17, p.497-502, 1969.
124. SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? **Arch. Biochem. Biophys.** v. 360, n. 1, p. 10-14, 1998.
125. STARZYNSKA, A.; LEJA, M.; MARECZEK, A. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. **Plant Sci.** v.165, p.1387-1395, 2003.
126. TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. **J. Plant Res.** v.113, p.301-309, 2000.
127. THOMAZ, R.L.; JEN, J.J.; MORR, C.V. Changes in soluble and bound peroxidase-IAA oxidase during tomato fruit development. **J. Food Sci.** Chicago, v. 47, p. 158-61, 1981.
128. TIMASHEFF, S. N. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. **Biochem.** v. 41, n. 46, p. 13473-13482, 2002.
129. TORASKAR, M. V.; MODI, V. V. Peroxidase and chilling injury in banana fruit. **J. Agric. Food Chem.** v. 32, p. 1352-1354, 1984.
130. TUCK, K. L.; HAYBALL, P. J. Major phenolics compounds in olive oil: metabolism and health effects. **J. Nutr. Biochem.** v.13, p.636-644, 2002.

131. VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 321-325, 2001.
132. VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruit and vegetables. **CRC C. Rev. Food Sci. Nutr.** v.15, p.49-127, 1981.
133. VAMOS-VIGYAZO, L.; NÁDUDVARI-MÁRRUS, V. Enzymatic browning, polyphenol content, polyphenol oxidase and peroxidase activities in pear cultivars. **Acta Alimentaria.** v.11, n.2, p.157-168, 1982.
134. VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochem.** v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.
135. VELTMAN, R. H.; LENTHÉRIC, I.; Van der PLAS, L. H. W.; PEPPELENBOS, H. W. Internal browning in pear fruit (*Pyrus communis* L. cv Conference) may be a result of a limited availability of energy and antioxidants. **Postharvest Biol. Technol.** v.28, p.295-302, 2003.
136. VILHENA, S. M. C.; CÂMARA, F. L. A.; KAKIHARA, S. T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticult Bras.** Brasília, v. 18, n. 1, p. 5-8, 2000.
137. VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Sci. Technol.** v.9, p.328-335, 1998.
138. WANG, M.; LEE, S.; RHEE, H. Properties of anionic peroxidases purified from chinese cabbage roots. **Plant Physiol. Biochem.** v. 37, n. 6, p. 459-464, 1999.
139. WATADA, A. E.; KO, N. P.; MINOTT, D. A. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. **Postharvest Biol. Technol.** v. 9, p. 115-125, 1996.
140. WEBB, E. C. **Enzyme nomenclature: Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes.** San Diego, California, USA: Academic Press, Inc. 862 p. 1992.
141. WELINDER, K. G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. **European J. Biochem.** v. 151, p. 497-504, 1985.

142. XIE, G.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. **Protein Sci.** v. 6, p. 211-221, 1997.
143. YANG, S. F. Biosynthesis of ethylene and its regulation. In: FRIEND, J.; RHODES, M. J. C. **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables.** (Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe. n.19), Academic Press, London, p.89-106, 1981.
144. YOSHIDA, K.; KAOTHIEN, P.; MATSUI, T.; KAWAOKA, A.; SHINMYO, A. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 665-670, 2003.
145. ZANDSTRA, H.; SCOTT, G.J.; SANSAVINI, S. (ed.); CANTLIFFE, D. (ed.); CORELLI-GRAPPADELLI, L. (ed.); VERZONI, D. (ed.); AVERMAETE, U. (ed.); GANRY, J. (ed.); ROBITAILLE, H. (ed.); JANICK, J. A global research agenda for horticultural crops: CIP and the role of roots and tubers. **Acta-Horticult.** v. 495, p. 363-372, 1999.
146. ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on "Yacon," *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economic-Botany.** EUA, v. 45, n. 1, p. 72-85, 1991.
147. ZHANG, D; QUANTICK, P. C. Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biol. Technol.** v. 12, p. 195-202, 1997.
148. ZHANG, Z.; WHEATLEY, C. C.; CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. **Postharvest Biol. Technol.** v. 24, p. 317-325, 2002.
149. ZHOU, Y.; DAHLER, J. M.; UNDERHILL, S. J. R.; WILLS, R. B. H. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. **Food Chem.** v. 80, p. 565-572, 2003.

8. APÊNDICE

8.1. TABELAS DO APÊNDICE

Tabela 1. Leituras de absorvância a 595nm.

Trélicas	Extrato Bruto	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sephadex G-25	DEAE-celulose
1	*0,222	0,395	*0,210	*0,040
2	0,234	0,395	0,222	0,026
3	0,231	0,390	0,226	0,023
Média	0,232	0,393	0,224	0,024

* Valores desconsiderados.

Tabela 2. Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da POD de yacon.

Temperatura	Eq. da reta		Eq. da reta 2 Log k x 1/T	Ea (kcal/mol)	Ea (kJ/mol.)
	Log (A/Ao 100) x Tempo (min.)	Log k			
60°C	y = -0,0072x + 1,9855	-1,7809			
65°C	y = -0,0256x + 2,0112	-1,2300	y = -15,891x +	31,57	132,12
70°C	y = -0,2349x + 2,0361	-0,2674	45,91		
75°C	y = -0,656x + 2,0723	0,1786			

(k) -2,3 x Tg; (T) temperatura absoluta.

Tabela 3. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de sacarose em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq. da reta		Eq. da reta 2 Log k x 1/T	Ea (kcal/mol)	Ea (kJ/mol.)
		Log (A/Ao 100) x Tempo (min.)	Log k			
Sacarose 10%	60°C	y = -0,0024x + 1,9981	-2,2581			
	65°C	y = -0,0092x + 1,995	-1,6745	y = -16,85x +	33,4810	140,10
	70°C	y = -0,063x + 2,032	-0,8389	48,279		
	75°C	y = -0,3341x + 2,0618	-0,1144			
Sacarose 20%	60°C	y = -0,0014x + 1,9945	-2,4921			
	65°C	y = -0,0047x + 1,994	-1,9662	y = -17,437x +	34,6473	144,98
	70°C	y = -0,0289x + 2,0072	-1,1774	49,756		
	75°C	y = -0,2475x + 2,0657	-0,2447			
Sacarose 30%	60°C	y = -0,0007x + 1,9976	-2,7932			
	65°C	y = -0,0029x + 1,9941	-2,1759	y = -17,811x +	35,3905	148,09
	70°C	y = -0,0158x + 1,9959	-1,4396	50,603		
	75°C	y = -0,1457x + 2,0586	-0,4748			

Tabela 4. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de CaCl em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq. da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (min.)	Log k	Eq. da reta 2 Log k x 1/T	Ea (kcal/mol)	Ea (kJ/mol.)
CaCl 0,1M	60°C	$y = -0,0029x + 1,9971$	-2,176	$y = -19,282x + 55,724$	38,31	160,32
	65°C	$y = -0,017x + 2,0012$	-1,408			
	70°C	$y = -0,2023x + 2,0311$	-0,332			
	75°C	$y = -0,742x + 2,1142$	0,232			
CaCl 0,5M	60°C	$y = -0,0208x + 1,9899$	-1,320	$y = -15,089x + 44,154$	29,98	125,45
	65°C	$y = -0,1966x + 2,0461$	-0,345			
	70°C	$y = -1,0118x + 2,2265$	0,367			
	75°C	$y = -1,7369x + 2,1823$	0,602			
CaCl 1,0M	60°C	$y = -0,1717x + 1,9376$	-0,403	$y = -9,8028x + 29,164$	19,48	81,51
	65°C	$y = -0,8956x + 2,152$	0,314			
	70°C	$y = -2,0426x + 2,2635$	0,672			
	75°C	$y = -3,3098x + 2,2408$	0,881			

Tabela 5. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de KCl em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq. da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (min.)	Log k	Eq. da reta 2 Log k x 1/T	Ea (kcal/mol)	Ea (kJ/mol.)
KCl 0,1M	60°C	$y = -0,0108x + 1,9934$	-1,6048	$y = -15,862x + 46,001$	31,52	131,89
	65°C	$y = -0,0443x + 2,019$	-0,9919			
	70°C	$y = -0,2732x + 2,1118$	-0,2018			
	75°C	$y = -1,119x + 2,3358$	0,4105			
KCl 0,5M	60°C	$y = -0,012x + 1,997$	-1,5591	$y = -16,515x + 48,077$	32,81	137,29
	65°C	$y = -0,0778x + 2,0534$	-0,7473			
	70°C	$y = -0,4131x + 2,1429$	-0,0222			
	75°C	$y = -1,6149x + 2,3844$	0,5699			
KCl 1,0M	60°C	$y = -0,0105x + 1,9947$	-1,6171	$y = -17,019x + 49,556$	33,82	141,52
	65°C	$y = -0,0696x + 2,0228$	-0,7957			
	70°C	$y = -0,592x + 2,1427$	0,134			
	75°C	$y = -1,4138x + 2,2749$	0,5121			

Tabela 6. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de NaCl em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq. da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (min.)	Log k	Eq. da reta 2 Log k x 1/T	Ea (kcal/mol)	Ea (kJ/mol.)
NaCl 0,1M	60°C	$y = -0,0098x + 1,9964$	-1,647	$y = -16,024x + 46,413$	31,84	133,23
	65°C	$y = -0,0328x + 2,0153$	-1,122			
	70°C	$y = -0,2536x + 2,0503$	-0,234			
	75°C	$y = -0,9932x + 2,1893$	0,359			
NaCl 0,5M	60°C	$y = -0,0214x + 2,0117$	-1,308	$y = -15,1x + 43,883$	30,00	125,53
	65°C	$y = -0,042x + 2,0275$	-1,015			
	70°C	$y = -0,2983x + 2,0625$	-0,164			
	75°C	$y = -1,6624x + 2,2539$	0,582			
NaCl 1,0M	60°C	$y = -0,0272x + 2,0068$	-1,204	$y = -14,824x + 43,153$	29,45	123,23
	65°C	$y = -0,0469x + 1,9998$	-0,967			
	70°C	$y = -0,399x + 2,109$	-0,037			
	75°C	$y = -1,8088x + 2,3004$	0,619			

8.2. FIGURAS DO APÊNDICE

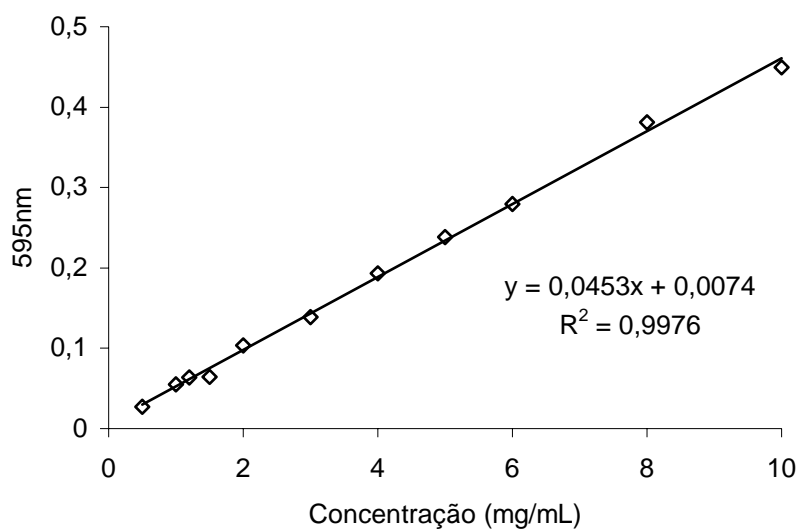


Figura 1. Curva de calibração com BSA pelo método de Bradford (1976).

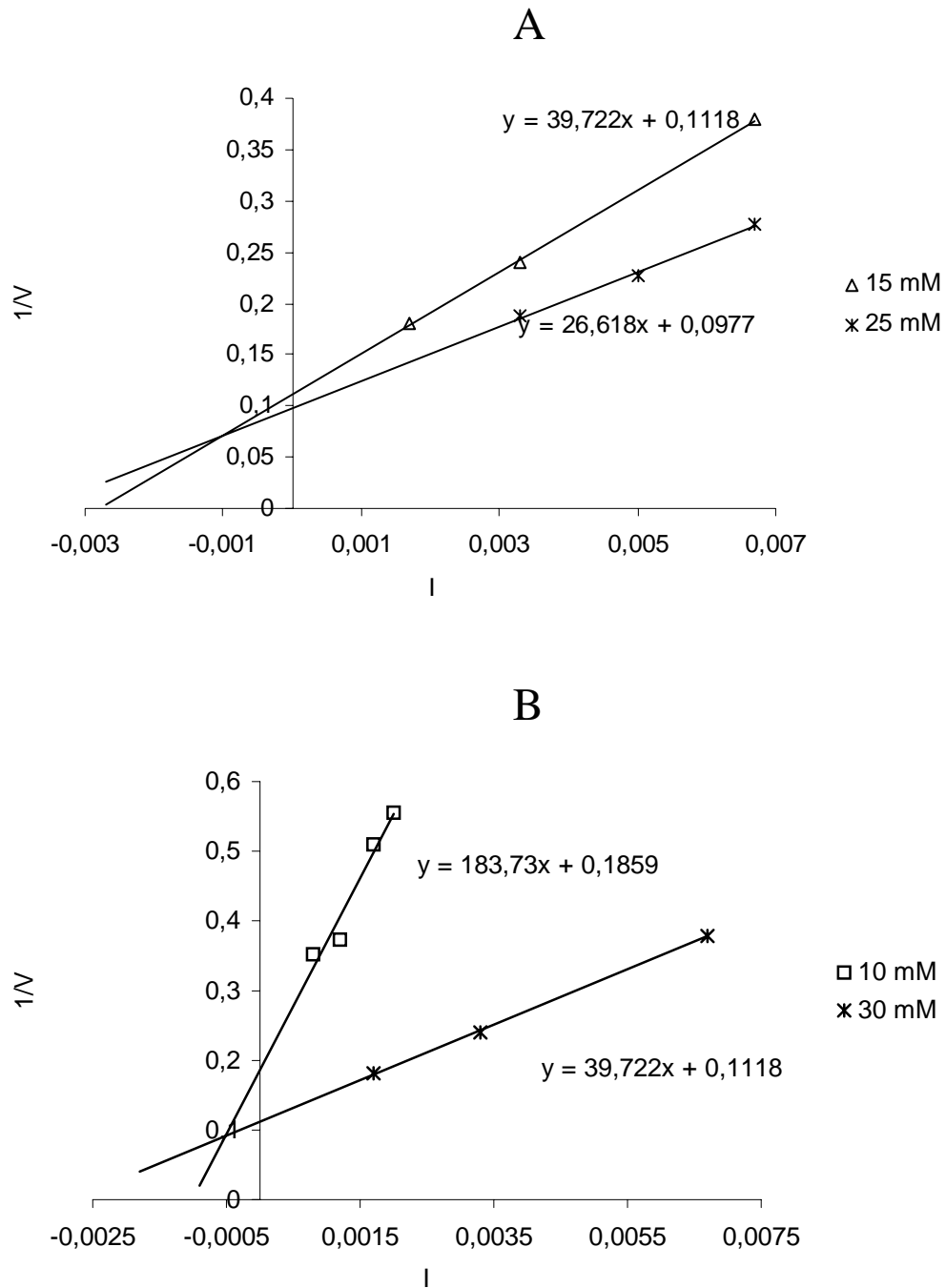


Figura 2. Determinação de K_i (Dixon, 1953) para ácido caféico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração de inibidor (mM). Substratos, (A) o-dianisidina e (B) H_2O_2 .

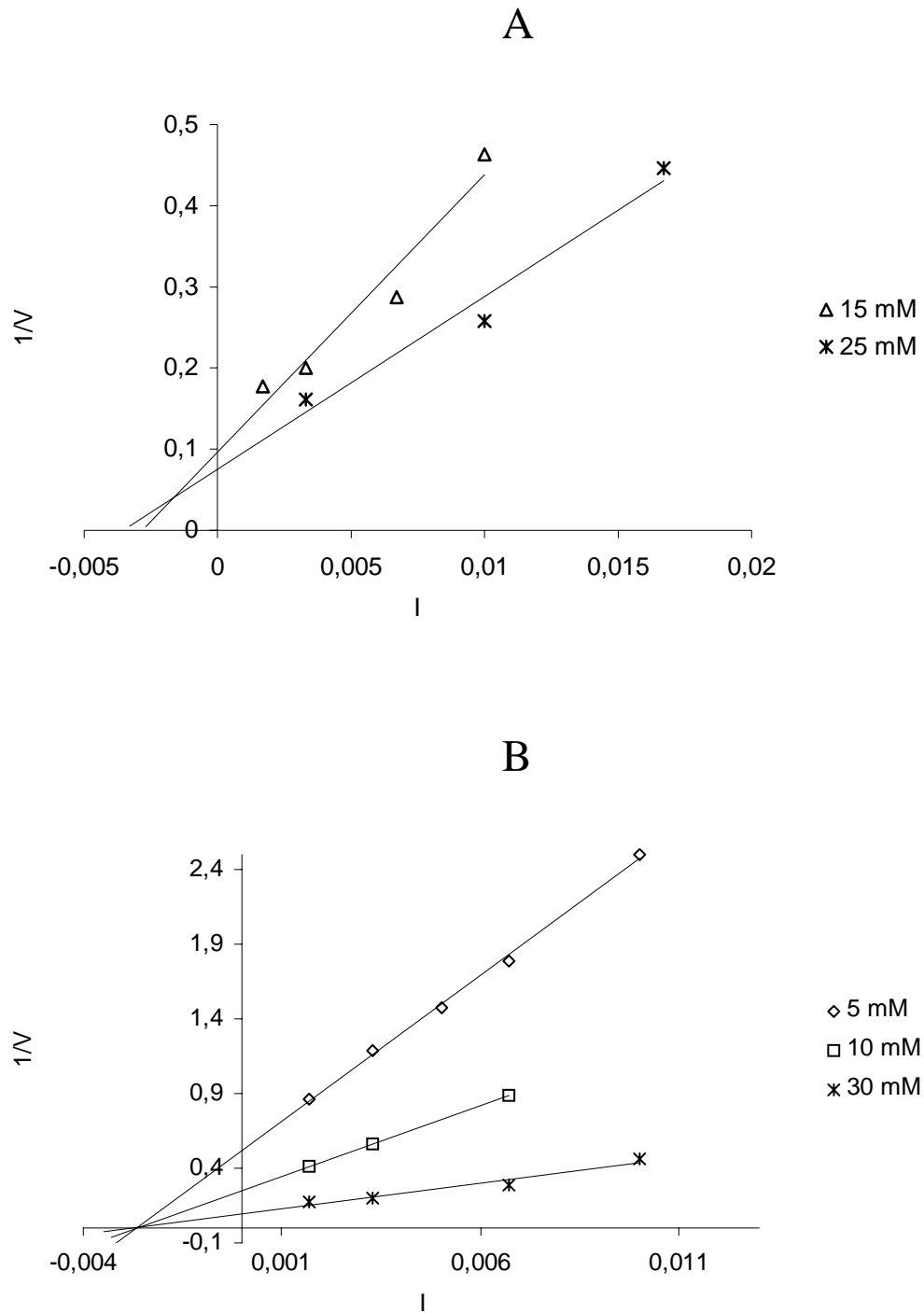


Figura 3. Determinação de K_i (Dixon, 1953) para ácido ferúlico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração de inibidor (mM). Substratos, (A) o-dianisidina e (B) H_2O_2 .

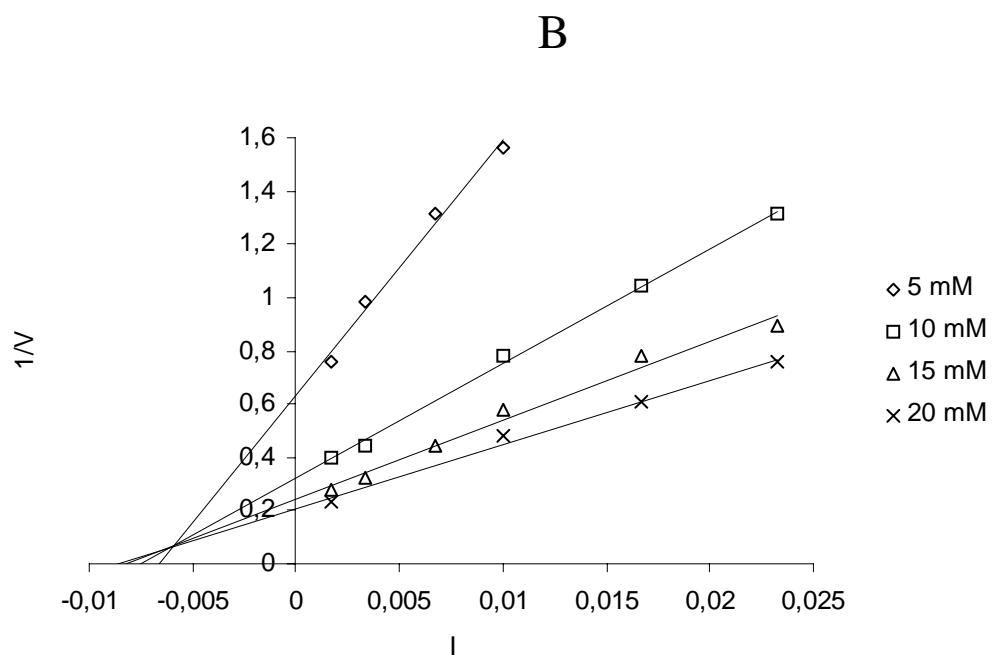
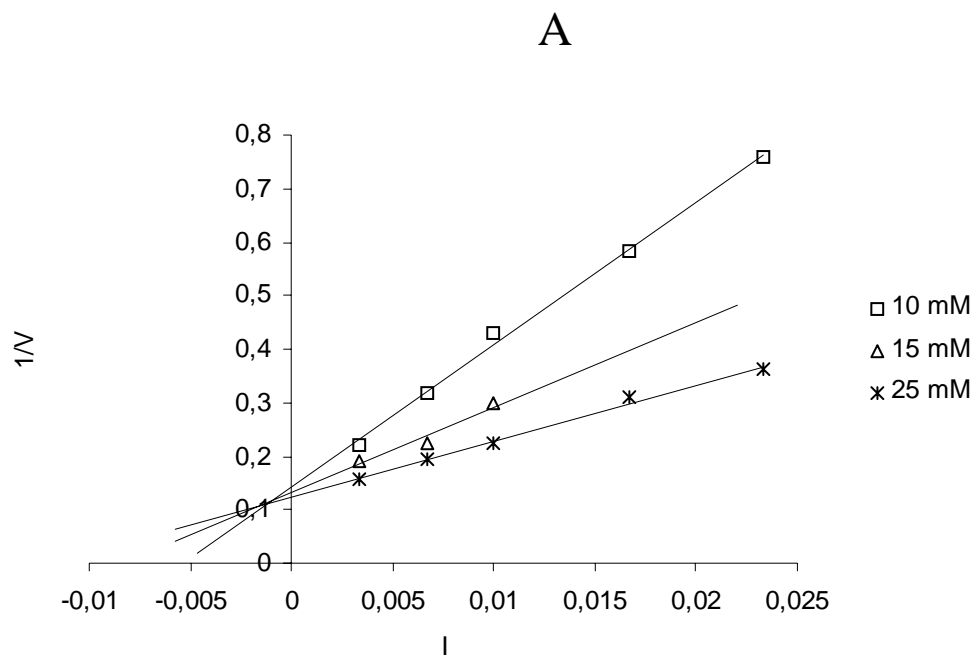


Figura 4. Determinação de K_i (Dixon, 1953) para DL-DOPA. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração de inibidor (mM). Substratos, (A) o-dianisidina e (B) H_2O_2 .