



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Química



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudos bioquímicos de tegumento de soja brasileira:
isolamento, purificação e caracterização de peroxidase com
guaiacol como substrato

MICHELLE CRISTINA DOS SANTOS

**Araraquara
2010**

MICHELLE CRISTINA DOS SANTOS

Estudos bioquímicos de tegumento de soja brasileira: isolamento,
purificação e caracterização de peroxidase com guaiacol como substrato

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química de Araraquara, para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof. Adj. OLGA
MARIA MASCARENHAS FARIA DE
OLIVEIRA**

**Araraquara
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

S237e	Santos, Michelle Cristina dos Estudos bioquímicos de tegumento de soja brasileira : isolamento, purificação e caracterização de peroxidase com guaiacol como substrato / Michelle Cristina dos Santos. – Araraquara : [s.n], 2010 111 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Olga Maria Mascarenhas Faria de Oliveira 1. Biotecnologia. 2. Parâmetros cinéticos. 3. Termoestabilidade. 4. Purificação de enzima. 5. Soja. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Adj. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira
Instituto de Química/UNESP/Araraquara

Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA-UEPG, PONTA GROSSA-PR

Profa. Adj. Ana Paula Rodrigues
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/UNESP/ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS -USP/ RIBEIRÃO PRETO

INFORMAÇÕES CURRICULARES

MICHELLE CRISTINA DOS SANTOS

1.DADOS PESSOAIS

1.1- Nascimento:	10/11/1975
1.2- Nacionalidade:	Brasileira
1.3- Naturalidade:	Ilha Solteira
1.4- Estado Civil:	Solteira
1.5- Filiação:	Vera Lúcia Meconi dos Santos Dorival Suriano dos Santos
1.6- Profissão:	Bióloga
1.7- RG	28.308.190-9
1.8- CPF:	308.685.268-27

2.FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1- Graduação em Ciências Biológicas

Curso concluído em 23/12/1999 na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil..

2.2- Mestrado em Agronomia

Título da Dissertação: “Carbono da Biomassa Microbiana, de CO₂ Liberado e Micorrização em Pastagens Degradadas”, realizada no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Microbiologia do Solo, UNESP. Data da defesa: 20 de agosto de 2004.

2.3- Doutorado em Biotecnologia

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, no Instituto de Química de Araraquara, UNESP. Defesa em agosto de 2010.

3- TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- 1 SANTOS, M. C.; SILVA, H. R.; BUZETTI, S.; CASSIOLATO, A. M. R. Caracterização química e microbiológica do solo e da produção de biomassa de *Brachiaria brizantha*, em diferentes épocas de amostragem. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 1, p. 6-13, 2008.
- 2 SANTOS, M. C.; TOGNOLLI, J.; Oliveira, O.M.M.F. Quimiometria como ferramenta analítica para definição das condições de ensaio da enzima peroxidase de soja, (Submetido a Eclét. Quím., 2010).

"O homem imagina muitos planos, mas o que permanece é o Projeto de Deus"
(Provérbio 19,21).

Com muito carinho aos meus pais:

Dorival e Vera

Aos meus irmãos Flávia e Dorival Junior

À minha cunhada Larissa

Pela união nos momentos importantes.

Agradecimentos

À Deus pela saúde que me concedeu nesta vida para enfrentar todos os obstáculos e por todas as graças recebidas, inclusive a conclusão do doutorado;

Aos meus familiares, pelos exemplos de amor, perseverança e retidão;

À professora Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira, pela orientação e incentivo;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela colaboração e fornecimento das cascas de soja;

À Universidade Estadual Paulista pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação;

Ao Profo Dr. João Olimpio Tognolli, pela colaboração aos estudos de planejamento estatístico;

À todos os funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca;

Aos meus grandes amigos: Omar e Zé Carlos, pelo apoio e incentivo sempre;

Aos Colegas do laboratório de enzimologia: Kátia, Kamila, Juliana e Mauro pelos momentos que passamos juntos no laboratório;

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica;

À minha amiga Monise pela nossa conversa e pelos momentos de lazer;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam a oxidação de vários xenobióticos na presença de peróxido. A soja é um dos principais produtos de exportação do Brasil e sua manufatura gera subprodutos em grande escala. Um destes, a casca, é uma fonte rica em peroxidase (SBP). Para a otimização da extração da SBP de casca de soja, e condições de ensaio, foi utilizado um planejamento fatorial com metodologia de superfície de resposta, resultando em 128 experimentos. Os dados definiram o meio reacional da SBP: pH 4,5 (transgênicas) e pH 7,0 (tradicionais); temperatura 50°C; tratamento do tegumento com obtenção do pó cetônico; NaCl 0,1 mol/L; volume de amostra da enzima 330µL, guaiacol 30mmol/L, H₂O₂ 46 mmol/L, em tampão 50mmol/L. Após, iniciou-se os estudos da SBP de diferentes cultivares: convencionais (BRS 258, BRS 260, BRS 262) e transgênicas (BRS 255 RR, BRS Charrua RR e BRS Pampa RR) de cascas de soja fornecidas pela EMBRAPA, visando estudo comparativo sobre o conteúdo de peroxidase (SBP), e posterior seleção para isolamento da enzima e estudos de seus parâmetros cinéticos. Para isso, a amostra, em pó cetônico, de cada cultivar foi ressuspensa em tampão extrator, a proteína precipitada com sulfato de amônio 70%, o precipitado ressuspensa em tampão extrator e eluído em coluna Sephadex G-25, para dessanilização. Nas frações (eluatos) foram realizados os *spots test* para identificação de SBP. As cultivares BRS 258, BRS 262, BRS 260 e BRS 255 RR foram selecionadas com maior conteúdo de enzima SBP. Assim, volumes (5mL) de tais cultivares foram eluídos em coluna Sephadex G-100 para purificação parcial e determinação da massa molecular. Com as frações (eluatos) obteve-se “pool” de enzima, onde se efetuou os estudos cinéticos: efeito de cátions mono e divalentes, determinação dos parâmetros cinéticos - k_M , v_{max} , pH ótimo, temperatura ótima. Os dados mostraram: i) pH ótimo 4,5; ii) temperatura ótima, BRS 260 e BRS 262 80°C, BRS 255 RR isoenzimas com 50°C e 70°C, BRS 258 70°C; iii) constante k_M , BRS 260 1,51 e 1,26 mmol/L, BRS 255 RR 224,0 mmol/L, BRS 258 1,91, BRS 262 3,0 e 1,61mmol/L; iv) constante v_{max} , BRS 260 0,038 e 0,067µmol/min; BRS 255 RR 0,186µmol/min; BRS 258 0,042µmol/min; BRS 262 0,043 e 0,045µmol/min, v) massa molecular, BRS 260 118,76 e 297,91kDa; BRS 255 RR 182,35 e 128 kDa; BRS 262 79,04 e 72,17 kDa; BRS 258 78,32 e 63,53 kDa. Estudos com extrato bruto de SBP (pó cetônico), com todas cultivares, verificando a estabilidade da enzima durante estocagem no *freezer*, mostraram: i) BRS 255 RR, estável 160 dias, e perda de atividade a partir de 1 ano; ii) BRS 258, estável até 30 dias; iii) BRS CHARRUA estável até 118 dias; iv) BRS PAMPA RR, estável até 84 dias; v) BRS 260 estável até 1 ano; vi) BRS 262 estável até 1 ano.

Palavras-chave: peroxidase da casca de soja, purificação de enzima, parâmetros cinéticos, soja, termoestabilidade

ABSTRACT

The peroxidases are hemeproteins that catalyze the oxidation of various xenobiotics in the presence of peroxide. Soybean is a major export products from Brazil and its manufacture creates byproducts in large scale. One of these, the bark is a rich source of peroxidase (SBP). To optimize the extraction of the SBP of soybean seed coat, and test conditions, we used a factorial planning with response surface methodology, resulting in 128 experiments. The data defined the reaction medium SBP pH 4.5 (transgenic) and pH 7.0 (traditional), temperature 50°C; treatment of sample to obtain the “acetone powder”, NaCl 0.1 mol / L, sample volume of the enzyme 330 µL, guaiacol 30 mmol / L, H₂O₂ 46 mmol / L in buffer 50mmol / L. After he began the studies of SBP from different cultivars: Conventional (BRS 258, BRS 260, BRS 262) and transgenic (BRS 255 RR, BRS and BRS Pampa RR) soybean seeds coat supplied by EMBRAPA, doing comparative study on the content of peroxidase (SBP), and subsequent selection to isolate the enzyme and studies of its kinetic parameters. For this, the sample in “acetone powder” of each cultivar was re-suspended in extraction buffer, the protein precipitated with ammonium sulfate 70%, the precipitate resuspended in extraction buffer and eluted in Sephadex G-25 column, for desalination. In the fractions (eluates) were performed to identify test spots SBP. BRS 258, BRS 262, BRS 260 and BRS 255 RR were selected with the highest content of enzyme SBP. Thus, volumes (5mL) of these cultivars were eluted in Sephadex G-100 column for partial purification and determination of molecular weight. With the fractions (eluate) obtained a pool of enzyme, which has made the kinetic studies: effects of mono-and divalent cations, determination of kinetic parameters - k_M , v_{max} , optimum pH, optimum temperature. The data showed: i) optimum pH 4.5, ii) the optimum temperature, BRS 260 and BRS 262 80°C, BRS 255 RR isoenzymes with 50°C and 70°C, 70°C BRS 258, and iii) constant k_M , BRS 260 1.51 and 1,26 mmol / L, BRS 255 RR 224.0 mmol/L, BRS 258 1.91mmol/L, BRS 262 3.0 and 1.61 mmol / L, iv) constant v_{max} , BRS 260 0.038 and 0.067 µ mol / min; BRS 255 RR 0.186 µ mol / min; BRS .042 258 µ mol / min; BRS 262 0.043 and 0.045 µ mol / min, v) molecular weight, BRS 260 118.76 and 297.91 kDa, BRS 255 RR 182.35 and 128 kDa; BRS 262 79.04 and 72.17 kDa, BRS 258 78.32 and 63.53 kDa. Studies with crude extract of SBP (“acetone powder”) with all cultivars, checking the stability of the enzyme during storage in the freezer, showed: i) BRS 255 RR, stable 160 days, and loss of activity from one year ii) BRS 258, stable up to 30 days iii) BRS CHARRUA RR stable up to 118 days, iv) BRS PAMPA RR, stable up to 84 days, v) BRS 260 stable until 1 year; vi) BRS 262 stable until 1 year.

Keywords: enzyme, peroxidase, soybean, transgenic soybean, kinectics parameters, thermostability, enzyme purification.

Lista de tabelas

Tabela 1	Relação de Nutrientes em Grãos de Soja e sua quantidade	22
Tabela 2	Relação de Nutrientes (%MS) de Tegumento de Soja e sua quantidade	23
Tabela 3	Relação da AE. de SBP, extrato com pó cetônico, com diluições da amostra	47
Tabela 4	Planejamento fatorial completo 1ªEtapa	48
Tabela 5	Planejamento fatorial completo 2ªEtapa	50
Tabela 6	Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais ótimos	52
Tabela 7	Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais para superfície de resposta e gráfico de contorno	52
Tabela 8	Análise qualitativo (<i>Spot test</i>) para a seleção das frações contendo peroxidase. Reação positiva (+) Reação negativa (-)	55
Tabela 9	Estabilidade a estocagem, no <i>freezer</i> (-10°C) de SBP de cascas de soja	66
Tabela 10	Valores de k_M e v_{max} das frações selecionadas	90

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química da Daidzeína	22
Figura 2	Estrutura tridimensional da enzima peroxidase e sítio ativo	24
Figura 3	Gráfico do Pareto dos efeitos investigados	48
Figura 4	Efeitos principais para absorbância	49
Figura 5	Gráfico do Pareto dos efeitos investigados	50
Figura 6	Efeitos principais para absorbância	51
Figura 7	Interações entre os fatores investigados	51
Figura 8	Gráficos de contorno de absorbância e de superfície	53
Figura 9	Gráfico de superfície da absorbância	53
Figura 10	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}	56
Figura 11	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}	57
Figura 12	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato	57

	concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm}	
Figura 13	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm}	58
Figura 14	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA,. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm}	58
Figura 15	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm}	59
Figura 16	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP de cultivares de soja brasileira. Cinética de reação a 50 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,01M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos..Cultivares BRS PAMPA RR (T); BRS	60

	CHARRUA RR (T); BRS 260; BRS 262; BRS 255 RR (T); E BRS 258	
Figura 17	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm}	61
Figura 18	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	62
Figura 19	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	62
Figura 20	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de	63

caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos

Figura 21	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	63
Figura 22	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	64
Figura 23	Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP de cultivares de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) ou fosfato/ citrato (pH 4,5) 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos. Cultivares BRS PAMPA RR (T, pH 4,5); BRS CHARRUA RR (T, pH 4,5); BRS 260 (pH 7,0); BRS 262 (pH 7,0), BRS 255 RR (T, pH 7,0); E BRS 258 (pH 7,0)	65
Figura 24	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima	68

(extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos

Figura 25	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	69
Figura 26	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	70
Figura 27	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	71
Figura 28	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar	72

transgênica da EMBRAPA.
Cinética de reação em pH 4,5,
330 µL de enzima (extrato
concentrado); guaiacol 30 mM,
H₂O₂ 46 mM, em tampão
fosfato/ citrato 50 mM com NaCl
0,1M, celas de 1 cm de caminho
ótico. Reação seguida à 470_{nm},
tempo de 60 segundos

Figura 29	Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato/ citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	72
Figura 30	Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 262	73
Figura 31	Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 260	74
Figura 32	Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 258	74
Figura 33	Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 255 RR	75
Figura 34	Coluna 1 Curva analítica de massa molecular, padrões protéicos eluídos em coluna de cromatografia Sephadex G-100	76
Figura 35	Coluna 2: Curva analítica de massa molecular, padrões protéicos eluídos em coluna de cromatografia de gel filtração Sephadex G-100	76
Figura 36	Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 260 (coluna 2)	77
Figura 37	Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 255 RR (coluna 2)	78

Figura 38	Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 262 (coluna 1)	79
Figura 39	Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 258 (coluna 1)	79
Figura 40	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 260 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.	80
Figura 41	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 262 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.	81
Figura 42	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 258 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	82
Figura 43	Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 255 RR de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.	83

Figura 44	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 15 a 18, cultivar de soja BRS 255 RR (transgênica) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	84
Figura 45	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 27 e 28, cultivar de soja BRS 255 RR (transgênica) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	84
Figura 46	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 12 a 20, cultivar de soja BRS 258 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	85
Figura 47	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 24 a 27, cultivar de soja BRS 258 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos	85
Figura 48	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 15 e 16, cultivar	86

	de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	
Figura 49	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 19 e 23, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de' caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	86
Figura 50	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 12 e 13, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	87
Figura 51	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 25 a 27, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 µL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	87
Figura 52	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 30 e 31, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de	88

	reação em pH 7,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	
Figura 53	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 14 a 17, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão citrato/fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	89
Figura 54	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 19 a 26, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão citrato/fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	89
Figura 55	Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 32 a 34, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H ₂ O ₂ 46 mM, tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470 _{nm} , tempo de 60 segundos	90
Figura 56	Exemplo do gráfico duplo recíproco, onde determina-se as constantes cinéticas	91
Figura 57	Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 260. A [KCl]; B	92

	[MgCl ₂] e C [NaCl]	
Figura 58	Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 258. A [KCl]; B [NaCl] e C [MgCl₂]	93
Figura 59	Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 255 RR. A [NaCl]; B [MgCl₂] e C [KCl]	94
Figura 60	Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 262. A [NaCl]; B[KCl] e C [MgCl₂]	94

Lista de abreviaturas e siglas

°C	graus Celsius
%	Por cento
Da	Dalton
KCl	cloreto de potássio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
mM	milimolar
µL	microlitros
mL	mililitros
HRP	Horserarch peroxidase
SBP	Soybean peroxidase
rpm	rotação por minuto
UV	ultravioleta
Fig	Figura
AE	atividade específica
UA	unidade de atividade
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
GM	genetic material
PVP	polivinilpirrolidona
mmol.L	milimol por litro
µmol.min	micromol por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Soja no Brasil	19
2.2	Dados Econômicos da Soja e sua produção no Brasil	20
2.3	Composição Química Média do Grão e Tegumento de Soja	22
2.4	Peroxidasas	23
2.5	Peroxidase de Soja	30
2.6	Ácido indol-3-acético	31
3	OBJETIVOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Materiais	34
4.2	Métodos	34
4.2.1	Obtenção das amostras de soja	34
4.2.2	Tratamento das amostras	34
4.2.3	Otimização das condições de extração da peroxidase da soja	35
4.2.4	Obtenção do pó cetônico das cascas de soja	36
4.2.5	Otimização da caracterização cinética da SBP de casca de soja através da metodologia de superfície de resposta	36
4.2.6	Concentração da enzima com sulfato de amônio	37
4.2.7	Determinação da atividade (U.A.) e atividade específica (A.E.) da enzima SBP de peroxidase das cascas de diferentes cultivares de soja	40
4.2.8	Determinação das condições ótimas de pH e de temperatura da SBP	41
4.2.9	Determinação térmica da SBP em relação a temperatura	41
4.2.10	Determinação da estabilidade da SBP em relação à armazenagem	42
4.2.11	Dosagem de Proteínas Totais	42
4.2.12	Eluição em coluna Sephadex	42

	G-25	
4.2.13	Eluição em coluna Sephadex G-100	42
4.2.14	Determinação da massa molecular (MM) da SBP	43
4.2.15	Determinação das constantes cinéticas k_M e v_{max}	43
4.2.16	Análise Estatística dos Dados	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Planejamento experimental	46
5.2	Eluição em coluna sephadex G-25 spot das amostras	54
5.3	Determinação do pH ótimo da SBP, com as cultivares de soja da EMBRAPA	55
5.4	Determinação da temperatura ótima com as cultivares de soja da EMBRAPA	60
5.5	Determinação da estabilidade da SBP das cultivares de soja da EMBRAPA frente ao armazenamento	66
5.6	Termoestabilidade da SBP das cultivares de soja estudadas	68
5.7	Purificação parcial de SBP de cultivares de tegumento de soja	73
5.8	Determinação da massa molecular de SBP obtidas das variedades de soja	75
5.9	Efeito do pH sobre amostras eluídas na coluna sephadex G-100	80
5.10	Efeito da temperatura na atividade da SBP das variedades de soja eluídas na coluna Sephadex G-100	83
5.11	Determinação de k_m e $v_{máx}$ das frações selecionadas de cada cultivar de soja	90
5.12	Efeito de sais mono e divalentes na cinética de reação da SBP de diferentes cultivares	92
6	RESUMO DOS RESULTADOS	95
7	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97
9	ANEXO I	111

1 INTRODUÇÃO

Conforme apontam Miranda et al. (2007), as exportações brasileiras de base agropecuária permanecem concentradas em um número restrito de produtos básicos, cujo ciclo de vida se encontra em fase de crescimento lento (soja em grão, café, açúcar, carne bovina, frango e pasta de papel). Entre estes, a soja movimenta anualmente um valor estimado de US\$ 32 bilhões anualmente e emprega cerca de 5,4 milhões de pessoas, constituindo-se num importante gerador de divisas no Brasil (WORD WIDE FUND, 2002). A opção do governo brasileiro pelo incentivo à produção de soja como uma *commodity* fez do Brasil um dos maiores produtores mundiais deste cereal, com sua produção basicamente destinada à exportação, visto que este produto não faz parte da cultura alimentar do brasileiro (MIRANDA et al., 2007).

Em relação à soja transgênica, seu plantio no Brasil começou ilegalmente em 1997, e sua legalização ocorreu em 2003 através da Medida Provisória 223/04. Este foi um fato marcante visto a polêmica, ainda existente, em relação aos organismos geneticamente modificados principalmente em alimentos.

Do plantio de soja obtêm-se diversos produtos, como: i) o próprio grão e o óleo para alimentação humana ou animal; e ii) as biomoléculas isoflavonas, com emprego farmacoterapêutico em alguns sintomas do climatério. Do processamento do grão, como em outros casos na agricultura, geram-se subprodutos considerados resíduos que são descartados com pouca utilização. Entre estes, exemplifica-se a casca da soja, que tem pouca aplicação, sendo utilizada para ração animal visto ser uma fonte rica de fibra (AMORIM et al., 2008). Geng et al. (2001) verificaram que a casca de soja também é fonte da enzima peroxidase (SBP). Embora esta enzima possa ser encontrada em outras partes da planta, a casca constitui a sua maior fonte.

Peroxidases (EC 1.11.1.7) são hemoproteínas que catalisam a oxidação de vários xenobióticos na presença de peróxido. Estas enzimas contém o grupo prostético ferriprotoporfirina IX, e sua massa molecular varia de 30,000 a 150,000 Da dependendo da fonte. Dentre dessa classe de enzimas, tem-se enzimas específicas como a NADH peroxidase (EC 1.11.1.1), a mieloperoxidase (EC 1.11.1.8) e a

glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), bem como enzimas não específicas, simplesmente definidas como peroxidases (HAMID e REHMAN, 2009).

As peroxidases podem se encontradas tanto em fonte animal como em vegetal, sugerindo que devem ter ação essencial nestes seres (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1996).

No caso das plantas, estas enzimas desempenham funções como: i) defesa contra patógenos e condições de estresse, ii) biossíntese e degradação de lignina, iii) remoção de peróxido de hidrogênio e iv) oxidação de xenobióticos tóxicos (O'BRIEN, 2000). Também exercem funções importantes em seu crescimento e no processo de diferenciação e desenvolvimento celular (MENEZES et al, 2004).

As peroxidases de fonte vegetal, como a *horseradish peroxidase* - HRP – em geral possuem cadeia polipeptídica com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, com um grupo heme ligado não covalentemente na estrutura protéica, enquanto que peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 resíduos de aminoácidos) e apresentam o grupo heme ligado covalentemente à estrutura protéica (O'BRIEN, 2000).

Em relação a ação catalítica da enzima peroxidase, a capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas (REGALADO, GARCIA-ALMENDÁREZ, DUARTE-VÁSQUEZ, 2004). A enzima peroxidase vem há muito tempo sendo utilizada como importante ferramenta analítica em processos industriais e em análises clínicas, como exemplo pode-se citar a dosagem de peroxidase como controle de qualidade de leite pasteurizado, uso na forma imobilizada no processo de análise clínica do ELISA, em fluidos biológicos. A enzima HRP degrada alguns compostos orgânicos recalcitrantes, como fenóis e fenóis substituídos via mecanismo de polimerização (TATSUMI et al., 1996), ação que pode ter aplicação em despoluição de descartes industriais. Além disso, a enzima HRP é considerada como padrão de peroxidase em estudos de peroxidases de outras fontes biológicas.

Os radicais livres produzidos por catálise de peroxidases podem atuar em diferentes reações pós-enzimáticas como a polimerização oxidativa de compostos aromáticos mediados por oxidoreduases, que é um campo muito estudado para a criação de novos polímeros funcionais. (HUTTERMAN et al., 2001). Em estudos conduzidos por Kim et al. (2003), SBP catalisou a polimerização oxidativa do cardanol (derivado de fenol usado na síntese de resinas e biofilmes) com o uso de

metanol, etanol, 2-propanol, álcool t-butílico e 1-4-dioxano. A produção de polímeros condutores (como a polianilina) catalisado por peroxidases tem interesse destacado devido ao amplo campo de aplicação (RAITMAN et al., 2002).

Compostos aromáticos, como fenóis e seus derivados, são a maior classe de poluentes encontrados em efluentes de indústrias químicas e alimentícias (NICELL et al., 1993). Alguns fenóis são perigosos compostos carcinogênicos e podem ser acumulados na cadeia alimentar. Devido à toxicidade, os fenóis são regulados em muitos países, e devem ser removidos dos efluentes antes do despejo no meio ambiente (KARAM e NICELL, 1997). Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual age como aceptor de elétrons, peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos em oligômeros insolúveis (DUNFORD e STILLMAN, 1976). Estes oligômeros insolúveis podem então ser removidos usando simples sedimentação ou sistemas de filtração (KLIBANOV et al., 1983). Grande parte dos trabalhos de desintoxicação de efluentes contaminados com fenóis, cresóis e fenóis clorinados utilizam HRP. Recentemente, peroxidases de outras fontes, como de soja (CAZA et al., 1999; KINSLEY e NICELL, 2000; KENNEDY, ALEMANY, WARITH, 2002) tem sido sugeridos como alternativas à HRP.

Outro campo que tem mostrado ser de grande potencial para aplicação de peroxidases é o emprego de biosensores eletroquímicos. Recentemente, eletrodos baseados em peroxidases foram utilizados em sistemas analíticos para a determinação de peróxidos (JIA et al., 2002). Quando co-imobilizadas com H_2O_2 , são explorados para determinação de glicose, álcoois, glutamato e cloreto, principalmente em fluidos biológicos (RUZGAS et al., 1996).

Estudos a partir da década de 90 tem mostrado o potencial de aplicação da SBP em biociências, como biocatálise, biorremediação e diagnóstico (KENNEDY; ALEMANY; WARITH, 2002). Na área de biorremediação, embora a maioria dos trabalhos aponte o uso da *horseradish peroxidase* (HRP) para a detoxificação de águas contaminadas principalmente por compostos fenólicos e clorados, atualmente a SBP tem-se mostrado uma alternativa, com estudos em relação aos efeitos do pH, concentração de substrato, tempo de reação e efeito de alguns aditivos para otimizar as condições de reação (KENNEDY; ALEMANY; WARITH, 2002).

Um promissor emprego de SBP está na área de saúde, particularmente na terapêutica do câncer. Entre as novas estratégias nesta área, há a terapia que

envolve o uso de pró-fármacos ativados por enzimas de células tumorais, tais como na estratégia ADEPT ("antibody-directed enzyme-prodrug therapy"). A vantagem desta técnica é aumentar a toxicidade dos quimioterápicos, devido a sua maior seletividade para os tecidos tumorais (KAMAL et al., 2008). Folkes, Candeias e Wardman (1998) e Folkes et al. (2002) apontam o uso da técnica ADEPT com o uso de peroxidase e de derivados do ácido 3-indolacético, obtendo promissores resultados.

Sabe-se que uma das maiores metas em relação às terapias antitumorais é atingir as células-alvo, de forma seletiva, com agentes tóxicos e com poucos danos em tecidos normais. Isto pode ser alcançado pela terapia gênica, que combina ligadores de genes altamente específicos e expressão gênica. Tais resultados foram alcançados utilizando o sistema HRP/IAA por Greco et al. 2000. Com relação ao conjugado SBP/AIA como pró-fármaco contra o câncer, abre-se alternativa para uso da SBP da casca de soja, que esta passaria então de sub-produto de soja a fonte de enzima de grande interesse farmacológico.

Assim, a padronização de uma metodologia extrativa acessível da SBP pode levar a um maior valor agregado do subproduto casca de soja, já que esta poderia ser fonte alternativa de peroxidase substituindo a HRP, principalmente na indústria de alimentos e na área clínica.

A proposta deste trabalho é desenvolver: i) estudos bioquímicos da casca de soja brasileira de diferentes cultivares, transgênicas ou não e ii) isolamento, purificação parcial, caracterização cinético-enzimática de SBP com guaiacol, como substrato

Assim, a SBP de casca de soja, dada a quantidade de soja produzida e processada no Brasil, pode-se tornar uma atraente ferramenta na área biotecnológica, podendo ser aplicada em áreas diversas como a biorremediação e saúde. É importante que sejam aprofundados os estudos relacionados a esta enzima, como os propostos por este trabalho, para iniciar a viabilidade de futuras aplicações dela.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, a soja cultivada é classificada como *Glycine max* (L.) Merrill, e de acordo com Bonetti (1977) pertence a família *Leguminosae*. Essa planta (Ilustração 1) é considerada importante fonte de alimento para homens e animais, com elevado valor nutricional em relação às biomoléculas proteínas e triglicerídeos (óleo; HADLEY e HYMOWITZ, 1973).



Ilustração 1. Planta e os Grãos de Soja recém colhidos para comercialização.

Fonte: www.riobranco.org.br

As primeiras citações sobre o grão de soja aparecem no período entre 2883 e 2838 aC, quando era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milheto. Um dos primeiros registros está no livro *Pen Ts'ao Kong Mu*, que descrevia as plantas da China ao Imperador Sheng-Nung. Entretanto, para alguns autores, há referências ainda mais antigas sobre a soja, como o Livro de Odes, publicado em chinês arcaico (MORAES et al, 2006).

Até meados de 1894 (término da guerra entre a China e o Japão), a produção de soja era praticamente restrita à China. Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental por milhares de anos, só foi introduzida na Europa no final do século XV, como planta ornamental, nos jardins botânicos da Inglaterra, da França e da Alemanha (www.cnpso.embrapa.br).

Na segunda década do século XX, o teor de óleo e proteína do grão começou a despertar o interesse das Indústrias de Alimentos. No entanto, as tentativas de produção comercial do cultivo na Rússia, na Inglaterra e na Alemanha fracassaram devido às condições climáticas desfavoráveis (www.cnpso.embrapa.br).

2.1 Soja no Brasil

No final da década de 60, dois fatores levaram o Brasil a enxergar a soja como um produto comercial, fato que mais tarde influenciaria no cenário mundial de produção do grão. Na época, o trigo era a principal cultura do sul do Brasil e a soja surgia como uma opção de verão, em sucessão ao trigo. Também se iniciava no Brasil um esforço para a produção de suínos e aves, gerando assim demanda por farelo de soja. Em 1966, a produção comercial de soja já era uma necessidade estratégica, sendo produzidas cerca de 400 mil toneladas no País (www.cnpso.embrapa.br).

A explosão do preço da soja no mercado mundial em meados de 1970 despertou ainda mais os agricultores e o próprio governo brasileiro. Quando comparado aos demais países, o Brasil vem se beneficiando de uma vantagem competitiva: o escoamento da safra ocorre na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. A partir de 1970, o nosso país passou a investir em tecnologia para adaptação da cultura às condições locais (www.cnpso.embrapa.br). Dados destacam que entre 1998 e 1999 a produção mundial foi estimada em 157,75 milhões de toneladas, com maiores produtores sendo os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai (LIU et al., 1999).

2.2 Dados Econômicos da Soja e sua produção no Brasil

O Brasil em 1998 produziu apenas um quarto da produção mundial de soja, seguido dos Estados Unidos, ambos constituíram como os maiores produtores

de grãos de soja, produzindo aproximadamente metade da produção mundial (BROWN, RENNER, HALWEIL, 1999).

A área colhida de soja no Brasil (1999) foi de 13 milhões de hectares (Brazil, CNPSO-EMBRAPA 1999). O Brasil possui estações climáticas variadas e extensas ao longo de seu território, o que é uma grande vantagem competitiva em relação aos países de clima temperado. Assim, além de possibilitar maiores rendimentos na colheita dos grãos de soja, há também a possibilidade de mais do que um período completo de cultivo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1999).

A soja constitui como um dos principais produtos da pauta de exportações brasileiras (BRASIL, 2005). Em 2004, o País exportou aproximadamente 19,25 milhões de toneladas de soja em grão, 14,48 milhões de farelo de soja e 2,50 milhões de óleo, entre bruto e refinado. As exportações de soja representam aproximadamente 25,75% das exportações do agronegócio brasileiro, e em torno de 10,41% de nossas exportações totais, segundo estatísticas da Companhia Nacional do Abastecimento (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2005).

A produção anual de soja no mundo é de 189,12 milhões de toneladas, sendo que a área plantada é de 87,81 milhões de hectares. O complexo agroindustrial da soja movimenta cerca de US\$ 215 bilhões por ano. No Brasil, a produção anual é de 49,71 milhões de toneladas e a área plantada é de 21,24 milhões de hectares. O complexo agroindustrial da soja movimenta US\$ 30 bilhões por ano (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2005).

Na safra 2008 e 2009, a cultura de soja ocupou uma área de 21,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 57,1 milhões de toneladas. Enquanto que, nos Estados Unidos, foram produzidos 80,5 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no Estado de Mato Grosso (EMBRAPA, 2009). De acordo com CONAB, 2009, o Estado de Mato Grosso é o maior produtor de grãos de soja, totalizando uma produção de 17,9 milhões de toneladas. O segundo produtor é o Estado do Paraná, com 9,5 milhões de toneladas.

2.3 Composição Química Média do Grão e Tegumento de Soja

O maior destaque da soja como alimento é o seu alto teor em proteínas. A composição média de nutrientes é apresentada na Tabela 01. Deve-se considerar também a importante presença de certos metabólitos secundários nesta planta. Entre eles, há um forte apelo na mídia pelas isoflavonas (daidzeína, (Fig 1) genisteína e gliciteína), utilizadas como auxiliares no tratamento para redução de colesterol (ESTEVES e MONTEIRO, 2001) e para alívio dos sintomas da menopausa (DOG, 2005).

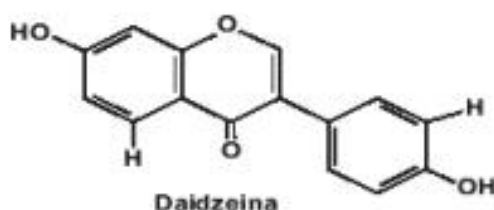


Figura 1 - Estrutura química da Daidzeína.

Fonte: CESAR et al. (2007).

Tabela 1 – Relação de nutrientes em grãos de soja e sua quantidade.

METABÓLITOS PRIMÁRIOS, ENERGIA, CINZAS E UMIDADE (g/100g)									
Proteínas		Lipídios		Carboidratos Açúcares/Fibras *		Umidade		Energia (Kcal)	Cinzas
38,0		19,0		23,0 / 4,0		11,0		417	5,0
MINERAIS (íons;mg/100g)									
Ca ²⁺	PO ₄ ³⁻	Fe ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	A (U/100g)	
240	580	9,4	1,0	1900	220	3,2	0,98	12	

Fonte: www.cnpso.embrapa.br, Kawaga, 1995

* A fibra alimentar é constituída pelo teor dos carboidratos insolúveis

Tabela 2 – Relação de nutrientes (% MS) de tegumento de soja e sua quantidade.

matéria seca (MS)	90,7
matéria orgânica (MO)	95,53
cinza	4,47
proteína bruta (PB)	9,99
extrato etéreo (EE)	1,38
fibra bruta (FB)	42,76
fibra em detergente neutro (FDN)	69,2
fibra em detergente ácido (FDA)	43,02
lignina	8,2
sílica	0,4
energia bruta* (EB)	4,03

EB dada em Mcal/Kg de MS
 Fonte: ZAMBOM et al. (2001)

Entre as proteínas da soja estão glicinina e β -conglucina, enzima lipoxigenase, inibidor de tripsina Kunitz, inibidores de protease de baixa massa molecular (dos quais o melhor estudado é o inibidor Bowman-Birk), lectina, enzima urease (MORAES et al., 2006) e enzima peroxidase (MENEZES et al., 2004).

O óleo da soja é uma excelente fonte de ácidos graxos, em relação ao conteúdo total de óleo: linoléico (50 %), linolênico (7%), e oléico (24 %), além de tocoferol (vitamina E) e com baixa taxa de óleos saturados (TSUTSUMI, 2004). Além disso, o consumo moderado de soja, apesar do alto conteúdo de óleo, numa dieta adequada pode trazer ótimos benefícios para ser humano. A lecitina de soja, um dos constituintes do óleo de soja, é eficaz na redução da agregação das plaquetas do sangue, prevenindo a trombose ou entupimento de vasos. (TSUTSUMI, 2004).

2.4 Peroxidases

Entre as proteínas existentes no grão de soja, é de interesse a enzima peroxidase.

A atividade enzimática das peroxidases foi observada pela primeira vez em 1855 por Schönbein, ao notar que no extrato de plantas em soluções de guaiacol causava o aparecimento da cor azul na presença de peróxido de hidrogênio. Linossier em 1898 isolou esta enzima do tecido de raiz forte denominada

peroxidase HRP (sigla de *Horseradish peroxidase*). As investigações fundamentais sobre a estrutura química, cinética e mecanismo destas enzimas foram detalhadamente estudadas por diversos pesquisadores a partir de 1920 (DUNFORD e STILLMAN, 1976; VÁMOS-VIGYÁZO, 1981; WHITAKER, 1985; ROBINSON, 1991; DUNFORD, 1991; CAMPA, 1991; BRUNETTI e FARIA-OLIVEIRA, 1996).

As peroxidases são enzimas classificadas como oxidoreductase (EC 1.11.1.7; doador: H_2O_2). Pertence a uma classe de proteínas que tem como função oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio com consumo de peróxido de hidrogênio ou oxigênio molecular, assim como acceptor de elétrons em reações de oxidação (VIERLING e WILCOX, 1996). Possuem um grupamento heme, geralmente ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Fe (III). A quinta posição de coordenação na porção proximal da estrutura heme está ocupada por um resíduo de histidina. A sexta posição de coordenação permanece livre na enzima nativa na porção distal do heme (O'BRIEN, 2000). Peroxidases têm massa molecular variando entre 30.000 a 150.000 Da (REGALADO; GARCIA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁSQUEZ, 2004; HAMID e REHMAN, 2009). A figura 1 mostra a estrutura tridimensional de peroxidase da raiz forte e seu respectivo sítio ativo.

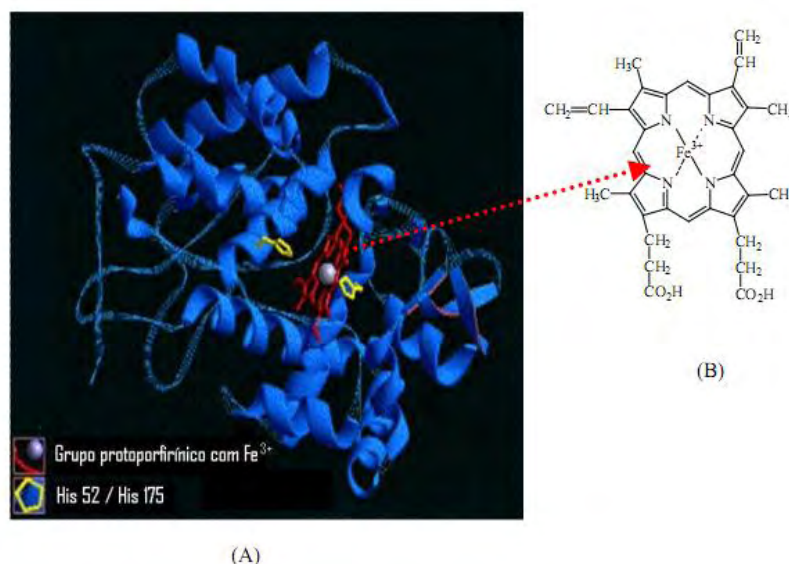


Figura 2. (A) Estrutura tridimensional da enzima peroxidase e (B) sítio ativo. Fonte: OLIVEIRA (2007).

Estas enzimas podem ser encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados (DAWSON, 1988, BRUNETTI e FARIA-OLIVEIRA, 1996). Em vegetais as peroxidases podem participar de um grande número de reações oxidativas e de biodegradação, tais como: mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético, biossíntese da lignina, e muitos destes fatores também podem estar associados com cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (BRUEMMER, BONGWOO, e BOWEN, 1976; BURNETTE, 1977; CARVALHO et al., 1985; CLEMENTE, 1995; CLEMENTE e PASTORE, 1998; VAMOS-VIGYAZO, 1981). O controle da atividade de peroxidase é de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que sua ação catalítica pode ser responsável pelo escurecimento em frutas, vegetais em geral e seus produtos processados (ALVIM e CLEMENTE, 1998; BENDER, 1986; VAMOS-VIGYAZO, 1981; PRABHA e PATWARDHAN, 1986; CLEMENTE e GALDINO, 2008). Os extratos preparados de plantas para verificar a atividade enzimática da peroxidase têm mostrado que esta enzima pode ocorrer tanto na forma solúvel, no citoplasma, como também na forma iônica, ligada à parede e à membrana celular, bem como às estruturas sub-celulares, como mitocôndrias e cloroplasto (CLEMENTE, 1998; CLEMENTE e ROBINSON, 1995; FREITAS et al., 2008). As formas solúveis podem ser obtidas de homogenatos dos tecidos com soluções tampão contendo PVP – polivinilpirrolidona-, enquanto que as enzimas ligadas ionicamente precisam ser extraídas com solução tampão contendo sais de NaCl ou CaCl₂. Estudos de isolamento e purificação de isoenzimas solúveis e ligadas têm sido realizados com muitas espécies vegetais, incluindo principalmente frutas e raízes, como: banana (TORASKAR et al., 1984), maçã (MOULDING et al., 1987), mamão papaia (LOURENÇO et al., 1995; SILVA et al., 1990), pêssego (NEVES et al., 1998; NEVES, 2002), pêra (MOULDING et al., 1989), batata (KAHN et al., 1981), nabo (DUARTE-VÁZQUEZ et al., 2000), *Vigna Mungo* (AJILA e RAO, 2009), folha de palmeira (DEEPA e ARUMUGHAN 2002), raízes de *Armoracia rusticana* - HRP e casca de soja - SBP (MIRANDA et al., 2002).

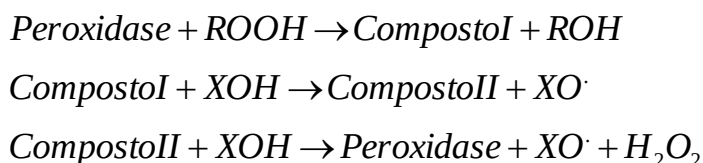
Como as peroxidases são encontradas nas células eucarióticas e procarióticas, podem ser classificadas de acordo com a superfamília a que pertencem:

- i) superfamília de peroxidases de mamíferos, que incluem enzimas como a lactoperoxidase e mieloperoxidase;
- ii) superfamília das peroxidases de vegetais, que foram divididas em três classes (DUNFORD, 1999):
 - a. Classe I: peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura (CCP), cloroperoxidase (CPO) e citosol ascorbato peroxidase (CAP);
 - b. Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares, tais como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium*, e outras peroxidases que degradam ligninas obtidas a partir de basidiomicetos;
 - c. Classe III: peroxidases vegetais tais como a peroxidase de raiz forte (HRP - *horseradish peroxidase*).

A peroxidase extraída da raiz forte (HRP - *horseradish peroxidase*) é a principal representante dessa classe de enzimas, sendo a mais estudada e de maior importância comercial. A enzima HRP, por cadeia polipeptídica, contém cerca de 300 resíduos de aminoácidos, com um grupamento heme ligado não covalentemente a cadeia, enquanto que peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 resíduos de aminoácidos por cadeia) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente a estrutura protéica (O'BRIEN, 2000).

Estudos relacionados à extração, purificação, identificação e propriedades catalíticas das peroxidases tem sido investigados em diversos vegetais, tais como: pêssago, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo, aspargo, uva, ervilha, casca de maçã, kiwi, manga, morango, couve de bruxelas, laranja, carambola, chicória, açaí, abacaxi, casca de feijão-da-índia, vagens secas de baunilha, lichia entre outros (BRUNETTI e FARIA-OLIVEIRA, 1996; FORSYTH e ROBINSON, 1998; AJILA e RAO, 2009, OFELIA MÁRQUEZ et al, 2008, MIZOBUTSI et al., 2010). Nas plantas as peroxidases exercem várias funções importantes como: em seu crescimento, no processo de diferenciação e desenvolvimento celular (MENEZES et al, 2004), e na resistência contra o patógenos (TIJSKENS et al., 1997).

Uma característica essencial do mecanismo de ação da peroxidase HRP é o seu ciclo catalítico, que envolve formação de três complexos intermediários durante a catálise (WONG, 1995), que pode ser representada pela sequência de reações apresentada em seguida:



No passo inicial a enzima férrica nativa é oxidada por peróxido de hidrogênio ou outro peróxido para formar um intermediário instável chamado Composto I (Col), e a conseqüente redução do peróxido. Então, Col oxida um substrato doador de elétron (XOH) formando o Composto II (Coll), liberando um radical livre. Posteriormente, Coll é reduzido por um segundo substrato, regenerando Fe (III), constituinte do heme da enzima, e produzindo outro radical livre.

A capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas. Esta atividade catalítica oxidativa é utilizada em várias técnicas oxidantes usuais para o monitoramento do processo catalítico destas enzimas (REGALADO; GARCIA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁSQUEZ, 2004).

É estimado que existam comercialmente disponíveis mais de dez mil tipos de corantes, com uma produção de mais de 7×10^5 toneladas por ano (FU e VIRARAGHAVAN, 2001). Contudo, em torno de 10-15% dos corantes sintéticos produzidos são descartados em efluentes industriais, causando problemas ambientais (SPADARO et al., 1992). Alguns autores têm mostrado que a destruição oxidativa de compostos coloridos é significativamente estimulada por enzimas oxidativas (SHIN e KIM, 1998; BHUNIA et al., 2002; YANG et al., 2003), e podem ser de interesse prático para descoloração de corantes sintéticos. A HRP degrada alguns compostos orgânicos recalcitrantes, como fenóis e fenóis substituídos, via um mecanismo de polimerização radical livre (TATSUMI et al., 1996).

Os radicais livres produzidos por catálise de peroxidases podem participar em diferentes reações pós-enzimáticas. Polimerização oxidativa de compostos aromáticos mediados por oxidoredutases é um campo muito estudado para a criação de novos polímeros funcionais e para a síntese de resinas fenólicas com boa conversão quimioseletiva. Uma das vantagens é o fato desta reação ser catalisada sem a presença de formaldeído, substância tóxica, a qual é utilizada em polimerizações químicas (HUTTERMAN et al., 2001). Em estudos conduzidos por Kim et al. (2003) peroxidase de soja catalisou a polimerização oxidativa do cardanol (derivado de fenol usado na síntese de resinas e biofilmes) com o uso de metanol, etanol, 2-propanol, álcool t-butílico e 1-4-dioxano. A produção de polímeros condutores (como a polianilina) catalisado por peroxidases tem interesse destacado devido ao amplo campo de aplicação (RAITMAN et al., 2002).

Compostos aromáticos, como fenóis e seus derivados, são a maior classe de poluentes encontrados em efluentes de indústrias químicas e alimentícias (NICELL et al., 1993). Alguns fenóis são perigosos carcinogênicos e podem ser acumulados na cadeia alimentar. Devido à toxicidade, os fenóis são regulados em muitos países, e devem ser removidos dos efluentes antes do despejo no meio ambiente (KARAM e NICELL, 1997). Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual age comoceptor de elétrons, peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos em oligômeros insolúveis (DUNFORD e STILLMAN, 1976). Estes oligômeros insolúveis podem ser removidos usando simples sedimentação ou sistemas de filtração (KLIBANOV et al., 1983). Grande parte dos trabalhos de desintoxicação de efluentes contaminados com fenóis, cresóis e fenóis clorinados utilizam HRP. As peroxidases de outras fontes, como de soja (CAZA et al., 1999; KINSLEY e NICELL, 2000; KENNEDY et al., 2002) e nabo (DUARTE-VAZQUEZ et al., 2003) tem sido sugeridos como alternativas à HRP. A análise cinética de peroxidases envolve parâmetros importantes como: o pH e a temperatura do meio reacional, a concentração do substrato, o tempo de reação, e efeitos de alguns aditivos (como PVP) que precisam ser estudados para otimizar as condições de ensaio (HAMID e REHMAN, 2009).

Duarte-Vazquez et al. (2003) estudaram o rendimento de peroxidase de raízes de nabo para remover vários compostos fenólicos diferentes: phenol, 2-chlorophenol, 3-chlorophenol, o-cresol, m-cresol, 2,4-dichlorophenol e bisphenol. Pelo menos 85 % dos compostos fenólicos estudados foram removidos na faixa de

pH 4 a 8. WRIGHT e NICELL (1999) e CAZA et al. (1999) usando peroxidase de soja (SBP) encontraram resultados semelhantes aos de Duarte-Vazquez et al. (2003).

Outro campo que oferece grande potencial para aplicação de peroxidases é o emprego de biosensores eletroquímicos. Recentemente, eletrodos baseados em peroxidases foram utilizados em sistemas analíticos para a determinação de peróxidos (JIA et al., 2002). Quando co-imobilizadas com H_2O_2 , são explorados para determinação analítica de teores de: glicose, álcoois, glutamato e íons cloreto (RUZGAS et al., 1996).

Devido à habilidade das peroxidases em produzir produtos cromogênicos em baixas concentrações, e sua razoável estabilidade, essas enzimas são adequadas para preparação de conjugados enzima-anticorpo e, sua aplicação em kits diagnósticos (KRELL, 1991). O método diagnóstico ELIZA - *Enzyme linked immunosorbent assays* - é utilizado para detectar antígenos ou anticorpos, pois pela ação enzimática produz composto colorido (cromóforo) com alteração da cor da solução. A HRP é provavelmente a enzima mais utilizada em imunoensaios (REGALADO; GARCIA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁSQUEZ, 2004).

A peroxidase é uma enzima resistente a temperaturas elevadas, e sua inativação tem sido freqüentemente usada como índice de efetividade do branqueamento industrial. O branqueamento é um tratamento térmico, geralmente aplicado em alimentos, destruição de microorganismos patógenos e/ou desnaturação de enzimas indesejáveis (RUDRA et al., 2008). Gonçalves et al. (2010) estudaram peroxidase de cenoura e mostraram que seis minutos à 80° C foi suficiente para inativar 90 % da atividade da peroxidase. Inativação térmica de peroxidase em temperaturas não superior 80 – 90 ° C tem sido observada (RUDRA et al., 2008).

Lopez e Burgos (1995) submetendo a enzima peroxidase de HRP à 126,5°C numa faixa de pH 5,2 a 8,0, observaram uma diminuição contínua de atividade enzimática. Na mesma faixa de pH, Vámos-Vigyazo (1981), estudando peroxidase em frutas e vegetais, observou uma mudança conformacional da parte protéica da enzima e modificação do grupo prostético.

A inativação térmica de HRP foi estudada em valores de pH 3,0 a 12,5, e em temperaturas variando de 40 °C – 95 °C, neste caso foi observado que a enzima mostrou alta estabilidade em pH neutro. (Lemos et al., 2000).

O valor do pH do meio reacional é um fator determinante para a expressão de uma atividade enzimática. O pH ótimo da peroxidase de HRP, é 4,6-5,8 (AJILA e RAO, 2009) o da lichia 6,5 (MIZOBUTSI, 2010). Galdino e Clemente (2008) determinaram que pH 5,5 é o ideal para peroxidase de palmito.

O sítio ativo da enzima é composta principalmente de grupos iônicos adequados para manter a conformação do seu sítio ativo para ocorrer a interação com o substrato e catálise da reação (GERSHENSON; SCHAUERTE; GIVER, 2000). Estudos de pH ótimo de ensaio tem sido apresentado em várias fontes vegetais de peroxidases (KLIBANOV, 1983; DEC e BOLLAG, 1990; BEWTRA e NICELL, 1995; WRIGHT e NICELL, 1999; DUARTE-VAZQUEZ et al., 2003).

Em relação à estabilidade ao pH os autores Fong e Cruess (1929) estudando a peroxidase de damasco, pêssego, pêra e abacate, encontraram ser estável em pH 7. Um estudo realizado com peroxidase de espargos também mostrou maior estabilidade em pH 6 (GANTHAVORN, NAGEL e POWERS 1991).

Segundo Vamos-Vigyazo. (1981) três processos principais envolvem a inativação térmica de peroxidases: i) dissociação do grupo prostético (heme) da holoenzima (principal constituinte do centro de catálise da enzima); ii) mudança conformacional da estrutura protéica, e iii) modificação ou degradação do grupo prostético.

2.5 Peroxidase de Soja

Peroxidase de soja – SBP - pertence à classe III da superfamília de peroxidase de plantas. A SBP e a isoenzima HRP-C possuem grande similaridade em suas estruturas tridimensionais, com uma homologia seqüencial de 57% (HENRIKSEN et al., 2001). Suas características em comum incluem ferriprotoporfirina IX como grupo prostético e mecanismo catalítico. Gillkin & Graham, 1991, ao estudar SBP, cultivar *Glycine max* var Williams 82 mostraram que esta possui massa molecular de 37.000 Da.

A considerável atenção biotecnológica para peroxidase de soja deve-se a sua alta estabilidade e atividade. SBP está presente em altas concentrações na casca do grão de soja (GIJZEN, 1997). Características interessantes incluem alta estabilidade à temperatura e ao pH do meio reacional, atuação em solventes orgânicos, e

propriedades catalíticas específicas (MUNIR e DORDICH, 2000). SBP é uma glicoproteína, sendo que os glicanos representam aproximadamente 18% da massa molecular da molécula (GRAY et al., 1996; GRAY e MONTGOMERY, 1997). Além disso, a SBP é uma enzima aniônica, com ponto isoelétrico em 4,1 (GILLIKAN e GRAHAM, 1991).

2.6 Ácido indol-3-acético

O ácido indol-3-acético – AIA - é um metabólico do aminoácido triptofano, produzido nas células vegetais, nos animais, inclusive no homem e em alguns microrganismos como bactérias e fungos. (GORDON, BARR, FRY, 1972). Conhecido como hormônio vegetal pertencente ao grupo das auxinas, é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, frutos e flores das plantas (MILLS, FINLAY, HADDAD, 1991).

Em animais o AIA está presente na urina (KOGL et al., 1993), no líquido cefalorraquidiano (BERTILSSON e OALMER, 1972), no plasma (MARTINEZ et al., 1993) e em diversos órgãos como pulmão, rim, fígado e cérebro (TUSELL et al., 1984).

A presença de AIA nos animais pode ser devida a duas vias: a) síntese a partir do triptofano (GORDON et al., 1972); b) absorção intestinal via dieta rica em vegetais (WEISSABACH et al., 1959; MARTINEZ et al., 1993). Segundo alguns autores a administração intragástrica de AIA não apresenta toxicidade para ratos (PUGINE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007) ou camundongos (MOURÃO, 2007).

Em plantas, o AIA é sintetizado em folhas jovens e sementes, principalmente por via dependente de triptofano, tendo seus níveis celulares controlados pelas taxas relativas de biossíntese, catabolismo, conjugação e transporte (CATALÁ et al., 1994). O AIA em plantas pode ser metabolizado através de duas vias: a) uma via de oxidação descarboxilativa, catalizada por peroxidases cujos principais produtos são o 3-metilenoxindol, o 3-hidroximetilenoxindol, o indol-3-aldeído e o indol-3-metanol (BRANDURSKI et al., 1995) sendo a formação dos vários produtos, dependente de fatores como a razão enzima/substrato, cofatores e

pH da reação (CATALÁ et al., 1992); e b) uma via de oxidação não descarboxilativa, onde o principal produto formado é o oxindol-3-acético (MARCHIORO, 2005).

A atividade do hormônio AIA é regulada através de duas vias de metabolização irreversíveis: oxidação por peroxidases levando à descarboxilação da molécula e reação de não-decarboxilação formando conjugados não reativos. A primeira delas, catalisada por enzimas peroxidases, tem sido extensivamente estudada e envolve vias complexas, formando radicais livres (BANDURSKI, COHEN, SLOVIN, REINECKE, 1995).

Na planta *Aromacia rusticana* encontra-se HRP, que é uma enzima que pode oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e não-orgânicos utilizando peróxido de hidrogênio e é intensamente explorada comercialmente. Interesse especial é que a enzima é capaz de oxidar o AIA, formando compostos com capacidade citotóxica para células tumorais, mesmo sem a presença de peróxido de hidrogênio (FOLKES et al., 1998; FOLKES et al., 1999; FOLKES e WARDMAN., 2001, PEREIRA, 2008).

A HRP e o hormônio vegetal AIA, podem tornar-se uma ferramenta importante para o tratamento do câncer (GRECO et al., 2001). É interessante que a molécula AIA sozinha não tem efeito citotóxico, e é biotransformada em uma molécula ativa após descarboxilação oxidativa pela HRP (GRECO et al., 2001). Estudos de Greco et al (2001) apontam que HRP e AIA possuem potencial como eficiente sistema enzima-pró-fármaco para tratamento anticâncer. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é a principal causa de morte no mundo: de um total de 58 milhões de mortes em 2005, 7,6 milhões (13%) foram devido ao câncer. A OMS ainda revela um dado preocupante: “mais de 70% das mortes por câncer ocorridas em 2005 aconteceram em países emergentes de médio e baixo porte”, como o Brasil. Ainda, estimam-se nove milhões de mortes no mundo, em 2015, em decorrência do câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Portanto, é interessante verificar se a peroxidase de soja – SBP - tem o mesmo potencial da HRP, visto que esta poderia se uma fonte alternativa, mais econômica e abundante de enzima peroxidase.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como proposta:

- i) desenvolver metodologia de extração, isolamento, purificação parcial e caracterização cinético-enzimática de SBP de soja;
- ii) comparar o rendimento e a eficácia destas metodologias em relação à variedade de soja utilizada (cultivares convencional e transgênica);
- iii) promover estudos cinéticos da SBP de cultivares de casca de soja brasileira, de diferentes fontes, com o substrato clássico guaiacol e
- iv) estabelecimento das condições de ensaio da SBP utilizando a metodologia de superfície resposta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Guaiacol, soroalbumina bovina, Sephadex G-25, Sephadex G-100, peróxido de hidrogênio, e ácido-indol-acético foram comprados da Sigma Chemical Co. Ltda.(St. Louis).

Cascas de soja foram cedidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Londrina (PR) e pela UNISOJA. (Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção das amostras de tegumento de soja

Para os estudos iniciais foram utilizadas amostras de tegumentos ou cascas de soja fornecidas pelo Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi, do Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP – que desenvolve trabalho com usina de soja, fabricando leite de soja e iogurte de soja para as Prefeituras Municipais de Araraquara e região.

Para os estudos de isolamento, purificação e parâmetros cinéticos, foram utilizadas amostras de soja, de diferentes cultivares, transgênicas (BRS 255 RR, BRA Pampa RR e BRS Charrua RR) e convencionais (BRS 258, BRS 262 e BRS 260) da EMBRAPA.

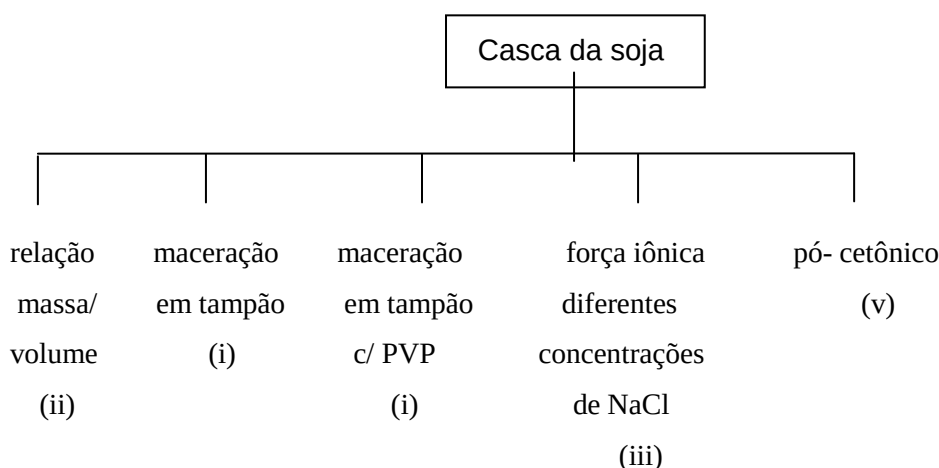
4.2.2 Tratamento das amostras

As amostras foram mantidas sob refrigeração (-10°C) e posteriormente congeladas até serem utilizadas para a extração da enzima

4.2.3 Otimização das condições de extração da peroxidase da soja

Estudos iniciais foram realizados para padronização das condições e escolha do método de extração inicial de peroxidase de tegumento de soja (esquema 1): i) maceração em tampão, com e sem PVP (polivinilpirrolidona), ii) relação massa/volume, maceração com tampão, iii) variação da força iônica do meio, com NaCl, e v) pó cetônico.

Esses estudos iniciais foram realizados com os tegumentos de soja (subproduto) fornecidas pela UNISOJA. Neste caso, a soja é proveniente de diferentes fornecedores, mas não há soja transgênica envolvida no processamento.



Esquema 1 Obtenção do extrato bruto

Embora estas amostras tenham várias cultivares misturadas, esta parte da metodologia foi planejada e executada com a função de determinar as melhores condições de ensaio para serem aplicadas no estudo com as cultivares da EMBRAPA.

Testando-se as diferentes metodologias (esquema 1) estabeleceu-se o pó cetônico como melhor técnica de extração inicial da SBP de nossas amostras baseado na atividade relativa. Em seguida, foram realizados estudos definindo o processo de extração e concentração da SBP: i) pó cetônico seguido de precipitação salina (70%, sulfato de amônio); e ii) precipitação salina (sem formação do pó

cetônico), com ou sem PVP, e posterior eluição em coluna de Sephadex G-25. Definiu-se a escolha da realização do pó cetônico seguido de precipitação salina como a melhor metodologia para obtenção do extrato concentrado de SBP. O pó cetônico de cascas de soja foi mantido sob congelamento para estudos de extração da SBP.

4.2.4 Obtenção do pó cetônico de tegumentos de soja

Para obtenção do pó cetônico e demais testes e ensaios deste trabalho, os estudos foram baseados e realizados com os tegumentos de sojas convencionais (cultivares BRS 258, BRS 260, BRS 262) e transgênicas (cultivares BRS 255 RR, BRS Charrua RR e BRS Pampa RR) fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Londrina-PR. Com os tegumentos de soja (subproduto), foi obtido o pó cetônico da seguinte maneira: uma determinada quantidade de tegumentos de soja é congelada com auxílio de nitrogênio líquido e triturada em almofariz até a obtenção de um pó, que em seguida deve ser lavado várias vezes com acetona a -20 °C até que a última lavagem não apresente coloração. O pó cetônico de tegumentos de soja obtido é mantido sob congelamento para estudos de extração da SBP.

4.2.5 Otimização da caracterização cinética da SBP de tegumento de soja através da metodologia de superfície de resposta

Com o objetivo de verificar-se a interação dos efeitos: pH, temperatura, concentração de NaCl, concentração de guaiacol como substrato, concentração de peróxido de hidrogênio, tempo de reação, e volume da amostra enzimática, fez-se um planejamento estatístico fatorial 2^7 , resultando 128 experimentos com três repetições de cada ponto cinético experimental. Com os dados, realizou-se a modelagem gráfica de interações dos parâmetros em estudo, sendo que os valores dos efeitos principais e de interação foram calculados empregando o programa estatístico MINITAB *Statistical Software Release 13*. Tal estudo foi realizado após determinar os parâmetros cinéticos qualitativamente, onde se estabeleceu o planejamento estatístico utilizando a metodologia de superfície resposta. Este planejamento foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. João Olimpio Tognolli, do

Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara.

Para a execução desse planejamento fatorial (tabela 4 pág. 48), trabalhou-se com extrato concentrado de SBP de tegumento de soja da UNISOJA. Assim, no pó cetônico da amostra de SBP adicionou-se tampão extrator na razão de 1:5 (grama de cascas de soja/mL de tampão), nas concentrações de 0,1mol/L, 0,03mol/L e 0,05mol/L de NaCl e sem NaCl, e efetuou-se a obtenção da peroxidase na forma de extrato bruto concentrado utilizando sal de sulfato de amônio, conforme esquema 2. A saturação (70%) foi realizada segundo o nomograma de Dixon (1979). O precipitado contendo a enzima foi ressuspenso com o tampão extrator na razão de 1:3 (g/mL).

Para a determinação das condições ótimas de atividade (pH e temperatura) utilizou-se soluções tampão citrato-fosfato de sódio, com valores de pH entre 3,0 e 5,0; fosfato de sódio pH 7,0 e Glicina-NaOH pH 9,0. Os experimentos cinéticos foram realizados e com os dados obtidos foram construídos os gráficos de superfície resposta, que forneceram as condições ótimas de: pH, temperatura, peróxido de hidrogênio, tempo, guaiacol, quantidade da enzima (extrato bruto) e concentração de NaCl.

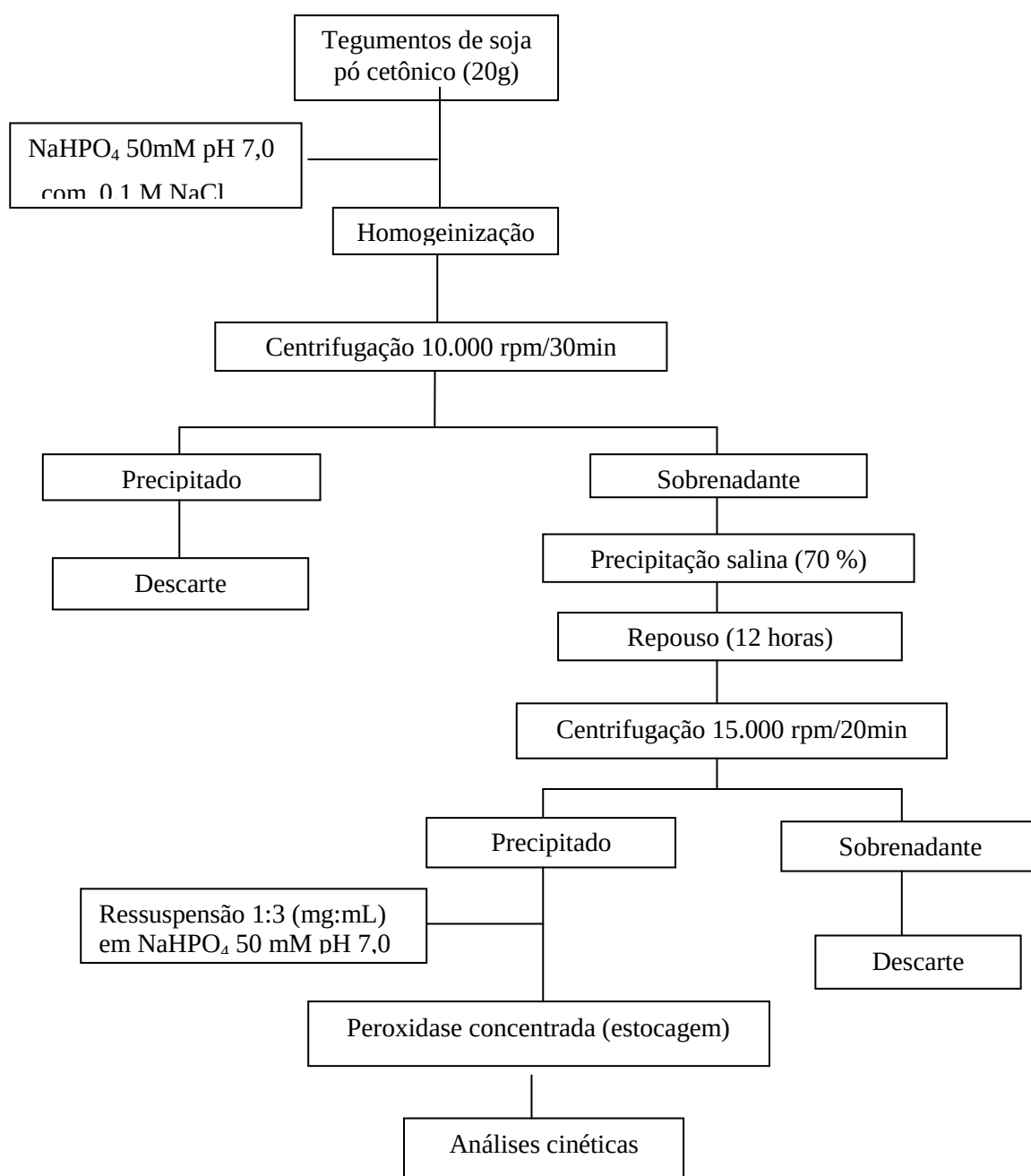
Definida a metodologia de extração e as condições ideais de cinética de reação da SBP, prosseguiram-se os estudos com as cultivares fornecidas pela EMBRAPA.

4.2.6 Concentração da enzima com sulfato de amônio

Partindo-se do pó cetônico de tegumento de soja, adicionou-se tampão extrator, fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, na razão de 1:5 (gramas do pó cetônico de cascas de soja/mL de tampão), na presença de NaCl 0,1mol/L e efetuou-se o isolamento da SBP e a obtenção na forma de extrato bruto concentrado (esquema 2). Após homogeneização por um determinado tempo, foi submetido à centrifugação sob refrigeração.

Ao sobrenadante foi adicionado sal de sulfato de amônio, sob agitação lenta e constante, de forma a atingir a saturação desejada. A quantidade de sulfato de amônio foi determinada utilizando o nomograma de Dixon (1979).

Após adição de todo sal, a solução foi deixada em repouso e depois submetida à centrifugação. O precipitado obtido contendo a enzima foi ressuspenso com o tampão extrator na razão de 1:3 (g/mL).



Esquema 2. Procedimento para extração de peroxidase

4.2.7 Determinação da unidade de atividade (U.A.) e atividade específica (A.E.) da enzima SBP de peroxidase de tegumentos de diferentes cultivares de soja

4.2.7.1 Determinação da atividade da enzima SBP de tegumento de soja (UA)

Para a determinação da atividade de peroxidase, utilizou-se como meio de reação: 1218 μL de tampão fosfato-citrato de sódio 50 mM, pH 4,5; 300 μL de guaiacol (30 mM); 330 μL da amostra enzimática e 150 μL de H_2O_2 (46 mM). A reação foi seguida pela formação do produto, à 470_{nm}, durante 60 segundos, à 45°C, e leituras feitas no Espectrofotômetro UV/VIS HP 8452, *diode array*, acoplado a um microcomputador HP-PC III. (MAKINEN; TENOVUO, 1982; GAZARIAN; LAGRIMINI, 1996; KHALIL, 2002).

Os ensaios foram realizados em triplicatas. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por mL de extrato – UA/mL. A UA da SBP foi definida como: “*uma unidade de atividade é a quantidade de enzima ativa que leva a uma variação de 0,010 de absorbância em um minuto, nas condições ótimas de ensaio*”. A unidade de atividade foi calculada utilizando a velocidade inicial da reação, determinada graficamente, para um mL da amostra da enzima em estudo, conforme a fórmula:

$$\text{UA} = \alpha / \text{mL SBP}$$

onde:

$\alpha = v_0$ (velocidade inicial da reação)

mL= volume de enzima utilizado na análise cinética.

4.2.7.2 Determinação da atividade específica (AE) e conteúdo proteico total

A proteína (em mg/mL de extrato) foi determinada pelo método de Bradford utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. As leituras em $A_{610\text{nm}}$ foram realizadas através do espectrofotômetro UV/VIS DIODE ARRAY da Hewlett-Packard, Modelo Agilent 8453.

A atividade específica da SBP foi calculada pela razão:

$$AE = UA/mg \text{ de proteína}$$

4.2.8 Determinação das condições ótimas de pH e de temperatura da SBP

Para a determinação das condições ótimas de pH, utilizou-se de solução tampão citrato-fosfato de sódio (pH: 2,8, 3,0, 4,5 e 5,0), tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e tampão glicina-NaOH (pH 9,0). Os estudos cinéticos foram realizados em cada pH, mantendo-se constante as demais condições de ensaio, determinando-se a velocidade inicial de reação para cada ponto experimental.

Para a determinação das condições ótimas de temperatura, de maneira análoga, estudou-se a cinética de reação da SBP nos valores de temperatura: 25 °C; 30 °C; 35 °C; 40 °C; 45 °C e 60 °C, e em alguns casos, 70 °C, mantendo-se constante as demais condições de ensaio.

Os ensaios cinéticos foram feitos todos em triplicata.

4.2.9 Estabilidade térmica da SBP em relação a temperatura

As SBP obtidas do tegumento das cultivares foram incubadas em tubos de igual tamanho e peso, em banho-maria. Após incubação, as SBP foram inseridas em banho de gelo e a atividade residual foi determinada. Os tempos e temperaturas utilizados foram: 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C e 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

4.2.10 Determinação da estabilidade da SBP em relação à armazenagem

Com o objetivo de verificar a estabilidade da SBP à estocagem, amostra de SBP foi dividida e estocada em *ependorfs*, sob refrigeração (*freezer*), sendo que em cada tempo de estocagem previamente definido (0, 1, 10, 30, 60, 90, 160, 256 dias e 1 ano) foi feita análise cinética, nas condições ótimas de ensaio, e determinado a velocidade inicial de reação.

4.2.11 Dosagem de Proteínas Totais

Para a dosagem de proteínas totais foi utilizado o Kit Microprote[®], método: coomassie blue usando soroalbumina bovina como padrão de proteína (metodologia Bradford). As leituras em A_{610nm} foram realizadas através do espectrofotômetro UV/VIS DIODE ARRAY da Hewlett-Packard, Modelo Agilent 8453.

4.2.12 Eluição em coluna Sephadex G-25

Para a seleção das cultivares de SBP a serem estudadas quanto a parâmetros cinéticos e eluição em coluna Sephadex G-100, as amostras concentradas de: BRS 262, BRS 260, BRS 258, BRS PAMPA RR, BRS CHARRUA RR E BRS 255 RR, foram eluídas em coluna Sephadex G-25, 8 cm de altura e 1,2 cm de diâmetro. Tal eluição foi realizada com objetivo de: i) dessanilização da amostra, ii) identificação de amostra (*spot test*) com maior ação catalítica (SBP), visando seleção para estudos cinéticos objeto do trabalho.

4.2.13 Eluição em coluna Sephadex G-100

Amostra enzimática (5,0 mL) foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-100, de 1,2 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com *bed volume* de 45,2 mL. A enzima foi eluída com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0, coletando-se automaticamente frações de aproximadamente 2mL por tubo de ensaio. Os eluatos,

coletados em um coletor da Pharmacia Biotech. Modelo Frac 100, foram monitorados através de leituras de absorbância à 280 nm, para detecção de proteína e posterior realização dos testes cinéticos da enzima SBP e, em sequência cálculo da unidade de atividade enzimática. Em cada fração foi realizada a dosagem de proteínas totais. Os dados foram analisados graficamente (atividade específica versus número da fração ou volume de eluição), visando separação das frações contendo SBP para posteriores estudos cinéticos e, possível identificação de isoenzimas. Essa etapa foi realizada para as amostras de SBP das cultivares: BRS 260, BRS 262, BRS 255 RR, E BRS 258.

4.2.14 Determinação da massa molecular (MM) da SBP

A massa molecular da SBP, de cada amostra estudada, foi determinada através da eluição na coluna Sephadex G-100, previamente calibrada com soroalbumina (MM 66.000), quimiotripsinogenio A (MM 25.000.), ribonuclease A (MM 13.000). Através do gráfico log MM versus volume de eluição, determinou-se a MM das amostras objeto de estudo.

4.2.15 Determinação das constantes cinéticas k_M e v_{max}

Para a obtenção das constantes cinéticas k_M e v_{max} característica da SBP, de diferentes cultivares, realizou-se a cinética enzimática em diferentes concentrações de guaiacol (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 mmol/L) nas condições ótimas de ensaio de cada amostra em estudo. Para a determinação das constantes cinéticas fez-se análise gráfica do duplo recíproco segundo Assis et al., 2002.

4.2.16 Análise Estatística dos Dados

Os resultados (triplicatas) foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Análises foram realizadas por meio de ANOVA, na qual se estabelece o nível de significância como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As enzimas ocorrem em todos os organismos e catalisam reações bioquímicas necessárias para a manutenção da vida (OLEMPSKA-BEER, 2006). Devido às suas propriedades catalíticas, como atividade específica e alta eficiência sob condições moderadas de operação, as enzimas são consideradas como excelentes ferramentas na biotecnologia moderna em várias áreas da atividade humana. Sua obtenção a partir de fontes renováveis e biodegradabilidade têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores e das indústrias em relação aos processos químicos catalíticos não enzimáticos (KRAJEWSKA, 2009).

O Brasil possui forte reconhecimento agrícola no mundo. Um dos seus produtos de maior destaque é a soja. Atualmente, o apelo aos produtos biodegradáveis, auto-sustentáveis e ao aproveitamento total do que a natureza oferece é como jamais visto antes. Assim, para a soja, uma boa forma de aliar estas práticas ecológicas é o seu aproveitamento total, e se possível, poder gerar divisas com seus subprodutos, como a casca, fonte rica e inexpensiva de peroxidase, uma enzima versátil e com ampla gama de aplicações nas áreas de biorremediação e saúde.

Embora as raízes de rábano silvestre (*horseradish: Armoracia rusticana*) sejam tradicionalmente as fontes comerciais de peroxidase, muitos estudos são realizados para encontrar novas fontes desta enzima com propriedades mais atraentes como maior concentração, estabilidade e diferentes especificidades de substrato (AJILA e RAO, 2009). Assim, este trabalho pode contribuir a esta procura, promovendo estudos com a casca de diferentes cultivares de soja.

Inicialmente, os estudos desta tese procuraram estabelecer a melhor forma para o início do processo extrativo de SBP a partir das cascas das cultivares de soja. Para tal, foi executada a metodologia obtenção do pó cetônico, segundo Leite (2006). Os ensaios detalhados no item 2.7 (p.11, dados não demonstrados) deste trabalho indicaram ser esta uma boa metodologia inicial para extração da SBP.

As cultivares de soja podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com seu fenótipo em relação à expressão de peroxidase na casca: os fenótipos de alta concentração de peroxidase e os fenótipos de baixa concentração de peroxidase (BUTTERY; BUZZELL, 1968). Neste trabalho, as cultivares foram

selecionadas baseando-se em dados obtidos da EMBRAPA (anexo I), que apontam as variedades escolhidas (BRS 258, BRS 262, BRS 260, BRS 255 RR, BRS Charrua RR e BRS Pampa RR) como fenótipos de alta concentração de peroxidase.

Para a realização de suas funções, as enzimas necessitam de condições que incluem entre outros, pH, temperatura e meio (local) adequados.

Jayani, Saxena e Gupta (2005) apontam a importância da verificação de condições ótimas de ensaios como o pH e temperatura para a caracterização de uma enzima. Entretanto, salienta-se que a análise da atividade de uma enzima deve levar em conta os fatores de forma mais integrada possível em um estudo de cinética enzimática. Entre estes fatores, tem-se o pH, a temperatura, força iônica, meio (tampão) utilizado, concentração e especificidade de substrato, entre outros (DE CORDT et al., 1992).

Conforme apontam Lemos, Oliveira e Saraiva (2000), informações sobre a influência do pH e da temperatura em enzimas podem ser encontradas na literatura da área. Em relação à SBP, alguns trabalhos são encontrados, mas esta pesquisa realizou os estudos de forma comparativa entre variantes convencionais e transgênicas.

Em relação aos tampões escolhidos, Wright e Nicell (1999) citam os tampões fosfato e o citrato-fosfato (pH entre 5,7 e 7,0) como os que propiciaram a máxima atividade para SBP. Neste trabalho, de forma semelhante, as melhores atividades para a SBP foram obtidas com o tampão fosfato de sódio pH 7,0 (BRS 258, BRS 260, BRS 262 e BRS 255 RR, figuras 8, 9, 10 e 11) e com o citrato-fosfato de sódio pH 4,5 (BRS Charrua RR e BRS Pampa RR, fig. 12 e 13). Entretanto, Welinder e Larsen (2004) obtiveram alta atividade para SBP em pH ácido utilizando o álcool 3,4-dimetoxibenzílico como substrato, o que demonstra a versatilidade desta enzima.

Entretanto, Caza et al. (1999) não verificaram perda de atividade de SBP quando testaram a atividade da enzima em soluções sem tampão. Em seus experimentos direcionados a remoção de fenóis em uma solução aquosa com fenóis, eles relatam que a atividade de SBP foi maior em meio com o pH entre 6,0 e 7,0.

Em relação à estabilidade frente à temperatura, estes autores apontam uma queda de aproximadamente 30% na atividade da SBP (em pH 6,0) após 160 minutos incubada a 80 °C. Neste trabalho, a SBP de BRS PAMPA RR (figura 23) teve uma apenas leve queda após 120 minutos.

Wang et al. (1999) verificaram uma leve queda na atividade de SBP imobilizada quando estocada a 4 °C após 90 dias. Neste trabalho, em relação à estabilidade, SBP de BRS 255 RR (após 160 dias de armazenamento, tabela 6), surpreendentemente apresentou um aumento na atividade. A SBP das demais cultivares também obtiveram uma queda na atividade, situação mais esperada em ensaios de atividade X tempo. Entretanto, embora seja uma situação mais incomum o aumento de atividade ao longo do tempo, a literatura cita alguns exemplos como o aumento do conteúdo em antraquinonas em *Cascara sagrada* (planta seca) após um ano de armazenagem em temperatura ambiente, o que inclusive a torna mais apropriada para uso terapêutico (AKISUE; AKISUE, 1996).

Wang et al. (1999) verificaram atividade máxima de SBP em temperatura próxima aos 60 °C. Neste trabalho, a máxima atividade de SBP foi obtida em BRS 258 (figura 22) em 80 °C. Já a SBP de BRS 255 RR (figura 25) obteve máxima atividade em 50 °C, em acordo com a literatura que aponta termoestabilidade para SBP. Destaca-se que se excetuando a SBP de BRS 258 (figura 22), as demais (figuras 23, 24, 25, 26 e 27), além de apresentar atividade em altas temperaturas, mantiveram ou obtiveram aumento na atividade ao longo do tempo. Mceldoon e Dordick (1996) também descrevem a alta estabilidade da SBP em relação à temperatura, uma vez que obtiveram atividade enzimática a 90,5 °C em pH 8,0, na presença de 1 mM CaCl₂. Tal característica (termoestabilidade) torna a SBP mais atraente como ferramenta biotecnológica. Alguns trabalhos enfatizam o interesse crescente em SBP devido a sua boa atividade e estabilidade frente a altas temperaturas e faixas de pH (MUNIR; DORDICK, 2000; WELINDER; LARSEN, 2004).

5.1 Planejamento experimental

Primeiramente foram realizados os ensaios exploratórios, planejamento experimental, definindo as condições de ensaio e da metodologia para a extração da SBP.

A extração de SBP a partir do pó cetônico proporciona a obtenção de maior quantidade de enzima ativa quando comparada à extração salina partindo das

cascas de soja congelada. Os estudos de otimização das condições de extração consistiram da verificação de alguns parâmetros na extração, tais como: concentração de NaCl, efeito do pH da solução tampão, obtenção do pó cetônico e temperatura. Cada extração realizada nos estudos de otimização se obteve a partir de uma relação *massa:volume* de 1g:3ml de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0. Foi realizada também a extração clássica, precipitação salina com sulfato de amônio. Nos estudos preliminares observou-se que nas concentrações de sulfato de amônio entre 85 e 90% de saturação, atividade da peroxidase no sobrenadante diminuiu cerca de 85 %. A tabela 3 relaciona os dados de atividade específica (AE) da SBP com três diluições diferentes.

Tabela 3- Relação da AE. de SBP, extrato com pó cetônico, com diluições da amostra.

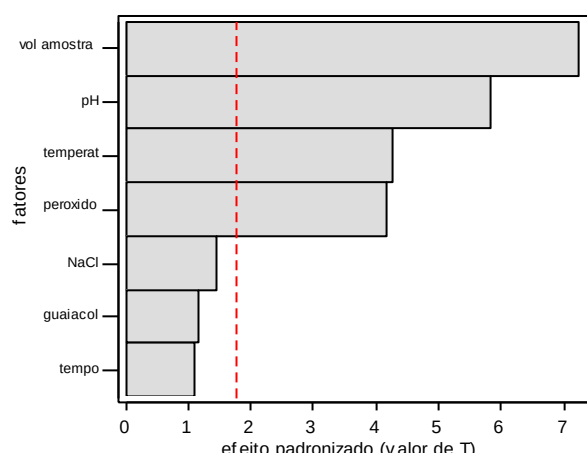
Diluições enzima: tampão	Atividade Específica AE (U/mg)	Unidade Atividade UA (mg/mL)	Conteúdo Protéico (mg/mL)
1:1	12,16	10,45	0,85
1:2	66,7	12,02	0,18
1:3	108,78	8,87	0,08

Realizaram-se estudos com concentrações de NaCl tais como: 0,1M; 0,03M; 0,05M de NaCl e sem NaCl. A concentração adotada como ideal foi 0,1M de NaCl. Com os dados obtidos o programa construiu os gráficos de superfície resposta (figuras 1 à 7), que forneceram as condições ótimas de: pH, temperatura, peróxido de hidrogênio, tempo de reação, guaiacol, quantidade da enzima (extrato bruto) e concentração de NaCl.

O planejamento fatorial completo 2^7 mostra os 7 fatores estudados com seus respectivos níveis +1 e -1, resultando em 128 experimentos que forneceram as condições ótimas para pH, temperatura, peróxido de hidrogênio, tempo, guaiacol, quantidade de enzima (extrato bruto) e concentração de NaCl (Tabela 4).

Tabela 4- Planejamento fatorial completo 1ªEtapa

Fatores	Nível -1	Nível +1
pH	4	5
Tempo	20segundos	40segundos
Temperatura	30° C	40° C
Guaiacol	100µL	300µL
NaCl	Sem	Com
Peróxido	40µL	100µL
Volume da amostra (Enzima)	50µL	200µL

**Figura 3** Gráfico do Pareto dos efeitos investigados

No gráfico do Pareto, figura 3, pode-se observar os efeitos investigados. Aqueles que superam a linha tracejada são significativos (enzima, pH, temperatura, e peróxido). Enquanto os outros fatores que estão abaixo não são significativos (NaCl, guaiacol e tempo) pouco contribuindo para a absorbância de atividade ao nível de significância de 95 %.

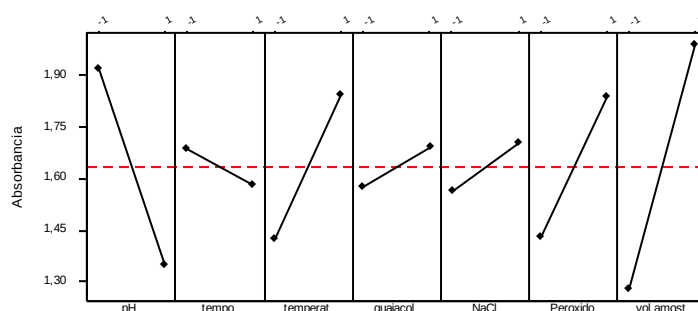


Figura 4. Efeitos principais para absorbância.

A figura 4 apresenta os efeitos principais (similar ao do Pareto), onde os segmentos de reta com maiores inclinações são mais significativos, enquanto que os segmentos de reta com menores inclinações são pouco significativos. Para cada fator também pode-se observar no topo a indicação -1 e +1 (indicado os dois níveis investigados) para avaliar qual o nível melhor para cada fator. Assim tem-se:

- pH => melhor no nível -1 → **pH 4,0**
- temperatura => melhor no nível +1 → **40° C**
- peróxido => melhor no nível +1 → **100μL**
- volume amostra => melhor no nível +1 → **200μL**

Quanto aos menos significativos:

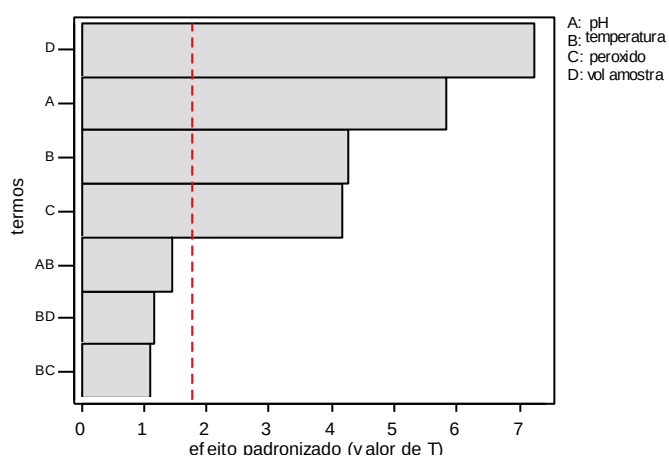
- tempo => melhor no nível -1 → **20segundos**
- guaiacol => melhor no nível +1 → **300μL**
- NaCl => melhor no nível +1 → **com NaCl (0,1M)**

Após a obtenção dos dados, elaborou-se o planejamento experimental, (Tabela 5) para análise de superfície de resposta, descrito a seguir

Tabela 5- Planejamento fatorial completo 2ªEtapa

Fatores	Nível -1	Nível +1
pH	3,5	4,5
Temperatura	40° C	50° C
Peróxido	100µL	150µL
Volume da amostra (Enzima)	200µL	350µL

O próximo planejamento (Figura 5) mostra os 4 fatores investigados que são significantes, enquanto que as suas interações não são significantes. Fica evidente que o volume da amostra (fator D) é o mais significativo, seguido pelo pH (fator A), enquanto que o pH e peróxido (fatores B e C) apesar de serem significantes são os de menor importância dos quatro fatores considerados e comportam-se forma similar (Figura 4).

**Figura 5.** Gráfico do Pareto dos efeitos investigados

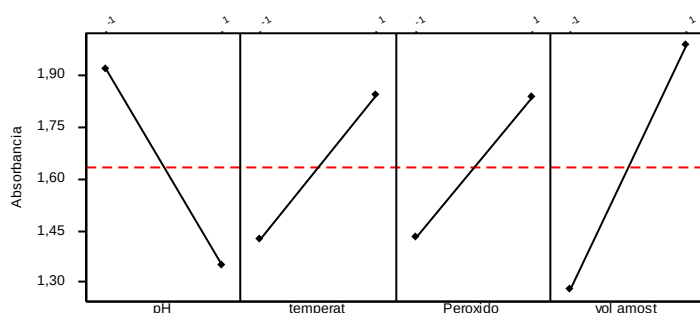


Figura 6. Efeitos principais para absorbância

O gráfico dos efeitos principais (figura 6) apresenta pelas inclinações dos segmentos de reta que todos os fatores são importantes, sendo as melhores condições obtidas para maiores leituras de absorbância, quando o pH está em -1; enquanto que a temperatura, peróxido e volume da amostra estão em +1.

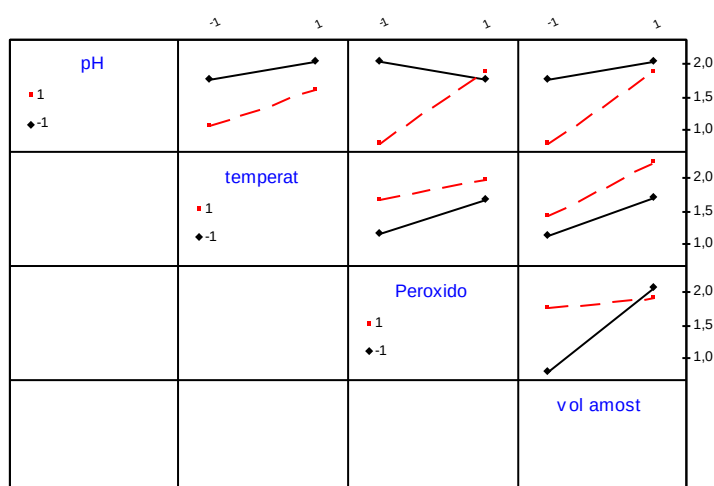


Figura 7. Interações entre os fatores investigados.

O gráfico das interações entre os fatores investigados, figura 6, apresenta os resultados, onde as linhas tracejadas são para o nível +1 e as contínuas para o nível -1. Quando os dois segmentos são paralelos ou quase

paralelos entre si indicam que a interação entre os fatores envolvidos não existe ou é de pequena importância. Quando os segmentos se cruzam indicam que a interação entre os fatores envolvidos existe.

Em resumo pode-se dizer que a condição que apresenta maior leitura de absorbância corresponde quando se tem pH em nível -1 e os demais fatores em nível +1 (Tabela 6).

Tabela 6- Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais ótimos

Fatores	Nível -1	Nível +1
pH	3,5	
Tempo	20segundos	
Temperatura		50° C
Guaiacol		300µL
NaCl		Com
Peróxido		150µL
Volume da amostra (Enzima)		350µL

Finalizando, realizou-se outro estudo de superfície de resposta envolvendo novos ensaios com os dois principais fatores: pH e volume de amostra, como pode ser verificado na (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais para superfície de resposta e gráfico de contorno.

Valor de pH	Volume da amostra (µL)
3,0	279
3,5	300
2,8	350
4,0	400
4,2	421

Os gráficos de contorno (Figura 8) e de superfície (Figura 9) mostram as melhores condições experimentais para os dois fatores analisados (pH e volume de amostra). A região de melhor resposta é observada de forma mais nítida pelo gráfico de contorno. Assim, as melhores condições estão dentro do elipsóide menor. Isto corresponde a pH entre 3,1 a 3,6 e volume de amostra de 290 μL a 380 μL , mas as melhores condições estariam no centro do elipsóide com pH=3,3 e volume de amostra de 330 μL a 340 μL .

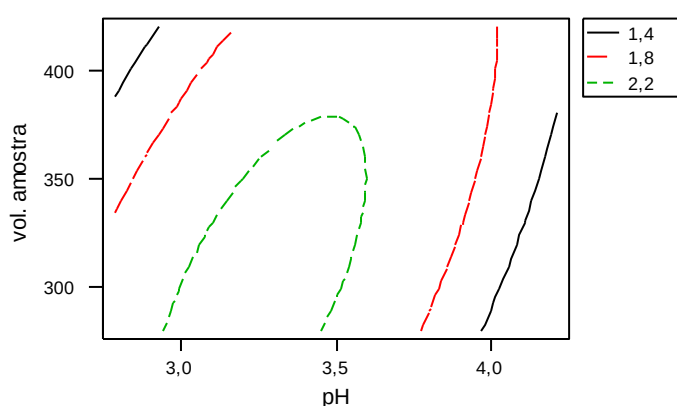


Figura 8. Gráficos de contorno de absorvância e de superfície.

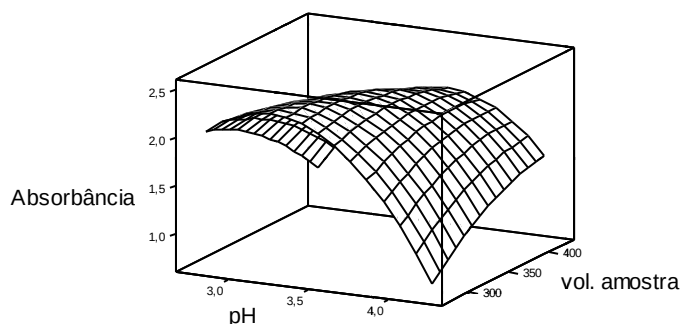


Figura 9. Gráfico de superfície da absorvância.

5.2 Eluição em coluna Sephadex G-25 e *spot test* das amostras

Após a obtenção do “pó cetônico” das amostras de cultivares de tegumento de soja, estes foram ressuspensos e diluídos (1g:3mL) com solução tampão extrator, e em seguida submetidos a precipitação salina, individualmente, com cristais de sulfato de amônio a 70% para obtenção do extrato bruto da SBP de cada cultivar cedida pela EMBRAPA.

O extratos enzimático bruto das amostras BRS 262, BRS 260 e BRS 258 - cultivares de soja convencionais -, e BRS PAMPA RR, BRS CHARRUA RR e BRS 255 RR - cultivares de soja transgênica - foi aplicado em uma coluna Sephadex G-25 (8 x 1,2 cm) para dessanilização, através da eluição em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0, e posterior detecção de SBP em cada amostra.

Com o objetivo de identificar a presença da SBP nas frações, foram realizados *spot test*, meio reacional contendo 0,750 µL de guaiacol (50 mM), 0,350 µL de enzima (fração da eluição em coluna Sephadex G-25) e 10 µL de H₂O₂ (10mM). Os testes foram realizados em todas as frações obtidas de cada amostra, e esperou-se 60 minutos de reação. Em seguida, avaliou-se a formação ou não de coloração no tubo, que fica mais evidente após 1 a 25 segundos, quando se tem atividade significativa da enzima.

Tabela 8 - Análise qualitativo (*Spot test*) para a seleção das frações contendo peroxidase. Reação positiva (+) Reação negativa (-)

Frações	BRS 258	BRS 260	BRS 262	BRS CHARRUA RR	BRS PAMPA RR	BRS 255 RR
1	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	+
3	+	+	+	-	-	+
4	+	+	+	-	-	+
5	+	+	+	-	-	+
6	-	+	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+
11 a 30	-	-	-	-	-	-

As frações (Tabela 8) com alta atividade da peroxidase produzem uma cor marrom avermelhada, designada como reação positivo (+). Enquanto, as de baixa atividade ou nenhuma atividade, apresentam levemente castanho ou nenhuma coloração, designada como reação negativo (-). As frações contendo atividade de SBP foram reunidas formando um “pool” para posteriores estudos.

5.3 Determinação do pH ótimo da SBP, com as cultivares de soja da EMBRAPA

Com as condições de ensaio e extração da SBP estabelecidas, foram realizados os estudos com as amostras da EMBRAPA, 06 cultivares de soja, cujas cascas foram enviadas pela EMBRAPA: cultivares BRS 255 RR (transgênica); BRS 260; BRS 262; BRS 258; BRS PAMPA RR (transgênica); BRS CHARRUA RR (transgênica).

As cultivares BRS 255 RR, BRS 262, BRS 260, e BRS 258 apresentaram maior atividade enzimática no pH 7,0 (respectivamente Figuras 10,11, 12 e 13 pág. 56, 57 e 58). As 6 cultivares de soja apresentaram baixo valor de atividade e pH 2,8. As cultivares BRS 255 RR (transgênica) e a BRS 260, apresentaram pH 7,0 como de maior atividade, mas há indicativo de um pico em pH 4,5. Apenas com esses dados não se pode afirmar, que essas amostras apresentem isoenzimas. As cultivares de soja transgênicas BRS PAMPA RR e BRS CHARRUA

RR (Figuras 14 e 15 pág. 58 e 59) apresentaram valor de pH ótimo de atividade enzimática igual a 4,5. Estes resultados são similares aos obtidos para as peroxidases dos abacaxis “IAC Como-de-mel” e do Clone IAC-1, que apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e baixa atividade em pH 2,6 (DE BRITO, 2005). As peroxidases de soja das 6 cultivares apresentaram ação catalítica em pH ácido, em concordância com os resultados obtidos por Liu et al., (1999, 785p) e Sousa (2001, 78p.) que relataram que a peroxidase de soja apresentou atividade ótima em pH 4,6.

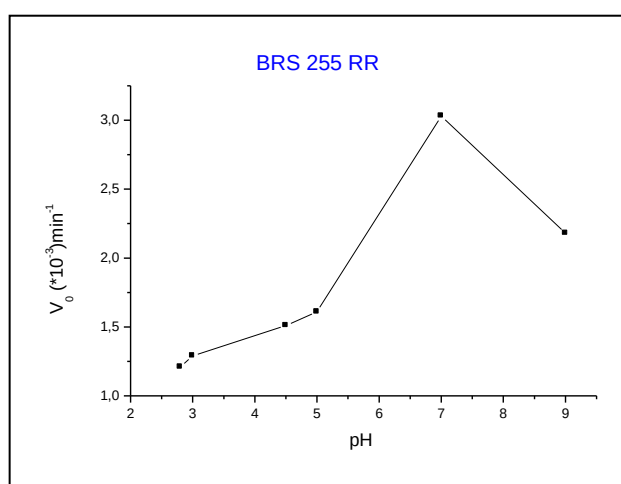


Figura 10. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm}.

Wright e Nicell (1999) verificaram que a peroxidase de soja apresentou valor ótimo em pH 6,4, enquanto que Kinsley e Nicell (2000) em pH 6,5 para peroxidase de soja (SBP) e *Horseradish* peroxidase (HRP). Sessa e Anderson (1981) encontraram atividade máxima em pH 5,5. Pelas informações apresentadas os dados obtidos estão em concordância com os da literatura. Como estão sendo correlacionadas cultivares transgênicas e não transgênicas e, pelo comportamento das curvas de pH ótimo, observa-se que as transgênicas a tendência é para pH ótimo com valores baixos (4,5, ácido) e as não transgênicas em valores próximo da neutralidade (7,0, neutro).

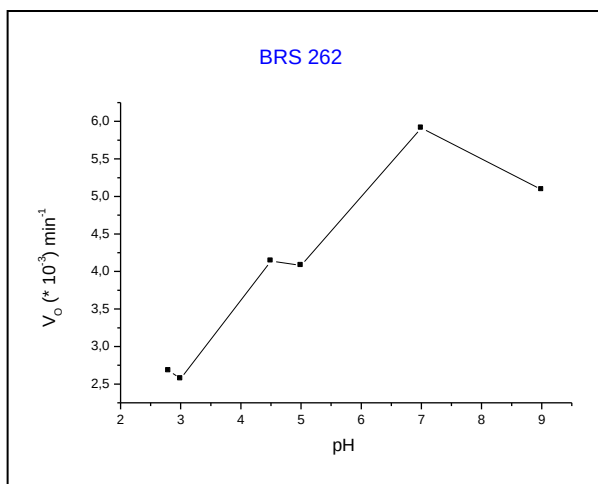


Figura 11. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$.

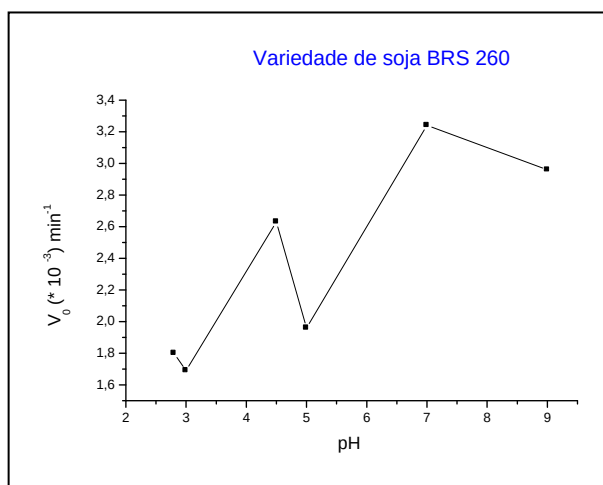


Figura 12. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$.

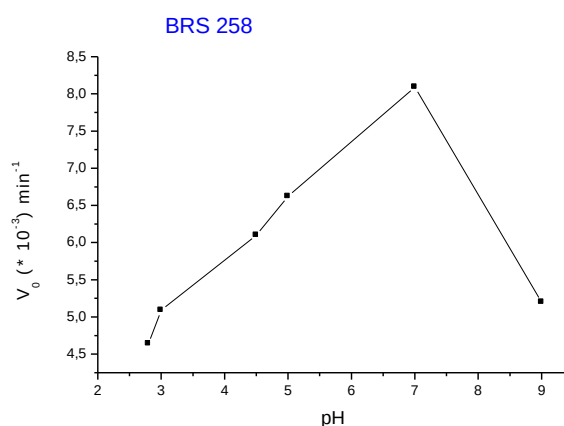


Figura 13. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$.

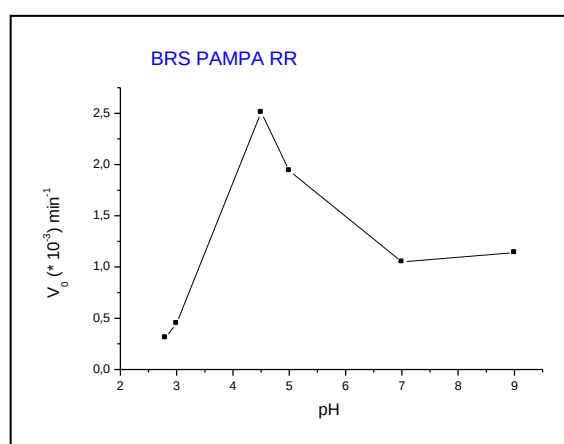


Figura 14. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$.

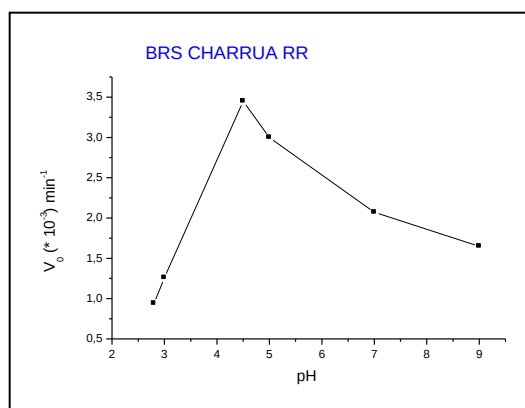


Figura 15. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação a 45 °C, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$.

Em pH 9,0 pode-se observar nas figuras 11 e 13 (páginas 57 e 58) que as cultivares BRS 258 e BRS 262 apesar de apresentar um certa queda na atividade, ainda tem alta atividade enzimática. Já BRS PAMPA RR e BRS CHARRUA RR obtiveram baixo valor de atividade no pH 7,0, apresentando um declínio de atividade enzimática com o aumento de pH. Em relação às demais cultivares, o que é esperado pelo fato da SBP ser uma molécula protéica em que pH pode levar a desnaturação de sua conformação nativa. Assim, a figura 17 mostra de forma comparativa o pH ótimo de SBP para as cultivares estudadas, sendo que a SBP das cultivares BRS 258 e a BRS 262 apresentam maior quantidade de moléculas enzimáticas peroxidase ativas, em seu pH ótimo.

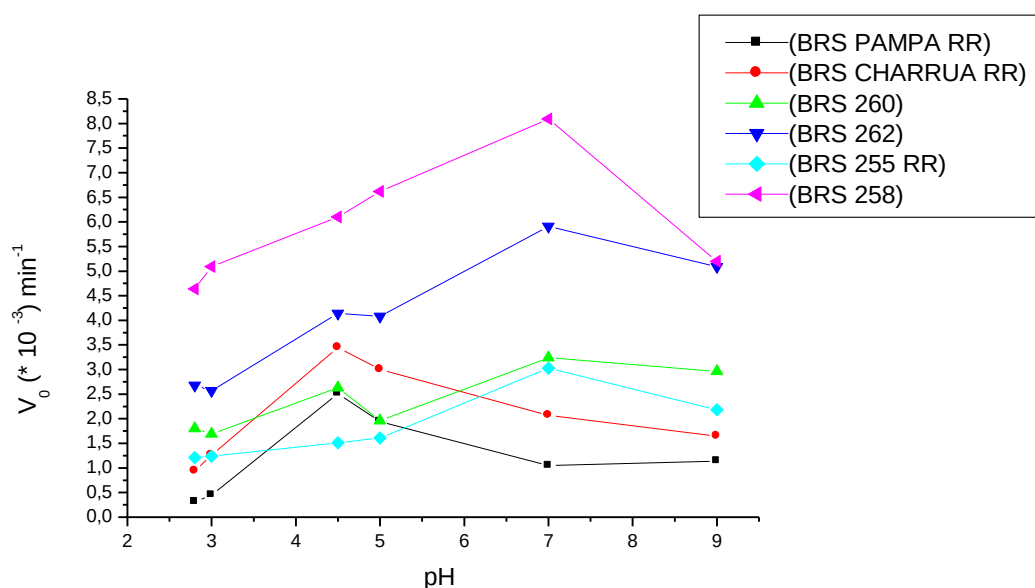


Figura 16. Avaliação do pH ótimo da enzima SBP de cultivares de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida A_{470nm}, tempo de 60 segundos..Cultivares BRS PAMPA RR (T); BRS CHARRUA RR (T); BRS 260; BRS 262; BRS 255 RR (T); E BRS 258.

5.4 Determinação da temperatura ótima com as cultivares de soja da EMBRAPA

As figuras 17 à 22 apresentam o comportamento da SBP, de diferentes cultivares, frente à variação da temperatura durante a reação enzimática. A cultivar BRS 258 (Figura 17) mostra um aumento significativo da velocidade inicial de reação de 45° C para 70°C. Os dados sugerem que ocorreu ativação da molécula protéica com o aumento da temperatura, ou e a enzima pode se encontrar na forma associada com outra molécula biológica, que com o aumento da temperatura ocorre a liberação de SBP ativa. Observou-se uma queda de velocidade a 75 °C.

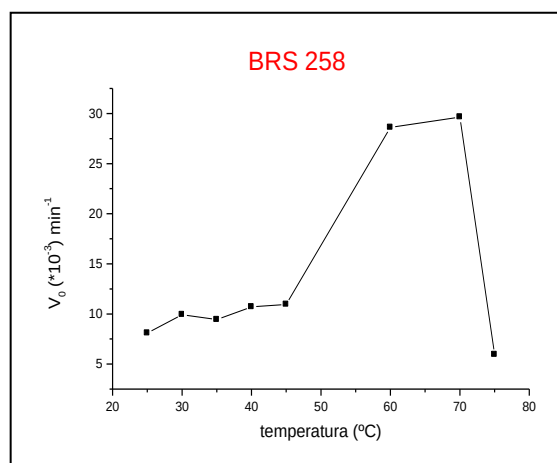


Figura 17. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm}

Maciel et al. (2007) verificaram atividade em temperatura numa faixa de 5°C - 45°C com atividade máxima em 35°C para peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. E, queda da atividade em temperatura acima de 50° C. Para as demais cultivares a temperatura ótima está em torno de 45°C. Liu et al. (1999) obtiveram resultados semelhantes (45° C). Para as cultivares BRS 255 RR e BRS CAHRRUA RR, a atividade máxima foi alcançada em 25°C. A cultivar BRS 260 mostra na figura 18 temperatura ótima a 45° C. As peroxidases de maçã, morango e pêssego mostraram atividade ótima na faixa entre 25°C - 40°C (MOUDING et al., 1987; CIVELLO et al., 1995; LOURENÇO e NEVES, 1997).

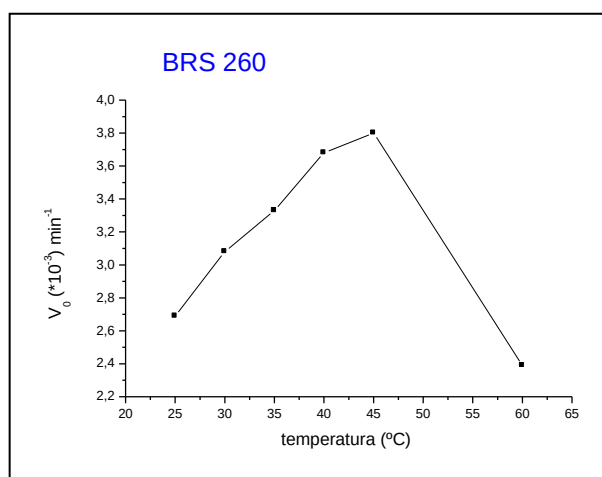


Figura 18. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$ tempo de 60 segundos.

A análise da BRS PAMPA RR (Figura 19) apresenta também temperatura ótima de ensaio à 40° C.

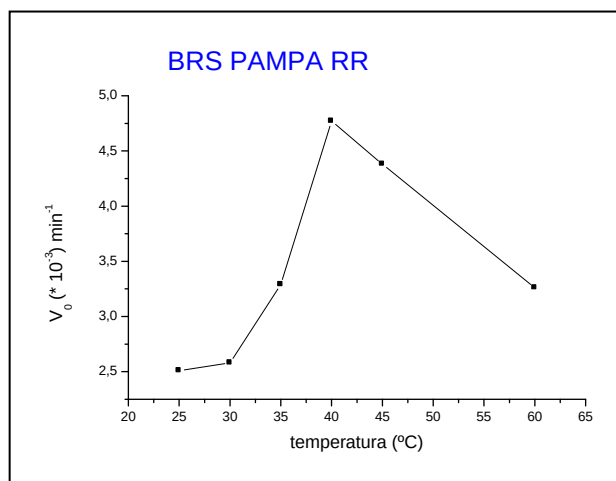


Figura 19. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$, tempo de 60 segundos.

No caso da cultivar BRS CHARRUA RR (figura 20) o gráfico de temperatura ótima apresenta dois picos, sendo o de maior atividade enzimática à 45° C. Isso sugere a presença de isoenzimas.

Em relação à BRS 255 RR (Figura 21), o gráfico de temperatura ótima não mostra queda significativa quando a reação é realizada a 45° C e depois à 70° C, indicando que entre 35° C e 45° C não há diferença significativa da velocidade inicial da reação

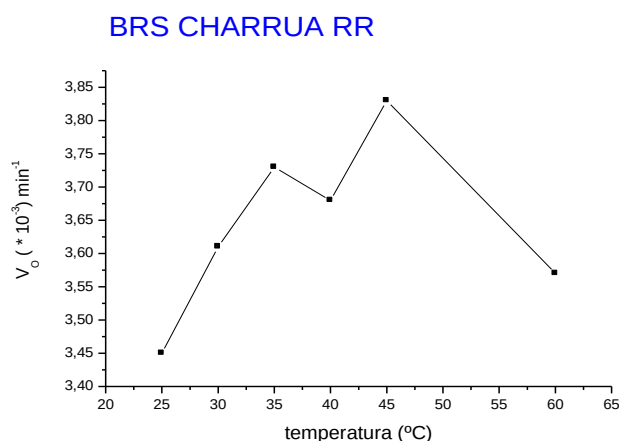


Figura 20. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em $A_{470\text{nm}}$, tempo de 60 segundos.

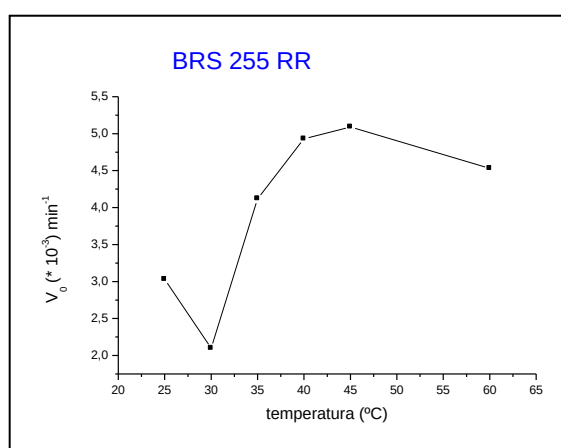


Figura 21. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida $A_{470\text{nm}}$, tempo de 60 segundos.

Interessante que a SBP da cultivar BRS 262 (figura 22) entre 25 °C e 45 °C não apresenta elevação significativa da velocidade, mas cai bastante quando vai para 60 °C.

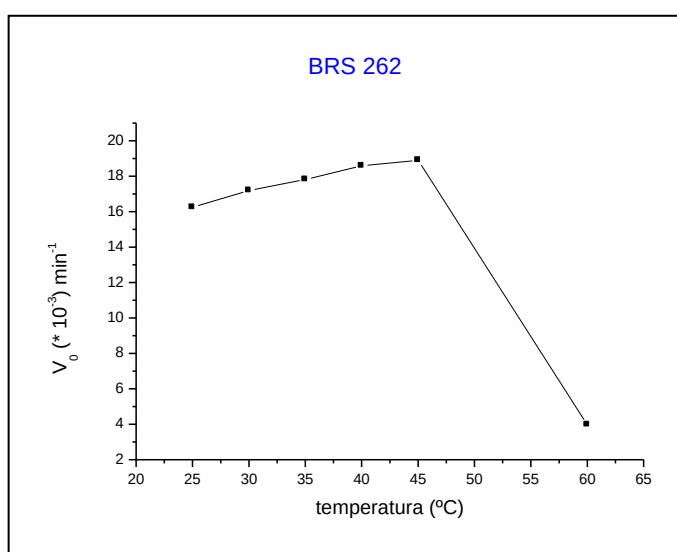


Figura 22. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida $A_{470\text{nm}}$, tempo de 60 segundos.

Em resumo, as figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22 mostram que: i) BRS 255 RR têm uma queda na sua ação catalítica acima de 25° C; ii) BRS CHARRUA RR e BRS PAMPA RR apresentam comportamento similar entre 25° C e 40° C, mas à 45° C BRS PAMPA RR têm um aumento na velocidade de sua ação enquanto que em BRS CHARRUA RR a ação diminui e iii) BRS 258 apresenta aumento de atividade entre 45 °C – 70 °C.

Souza (2001) verificou condições ótimas de atividade na faixa de 30 °C – 55 °C para peroxidase de casca de soja.

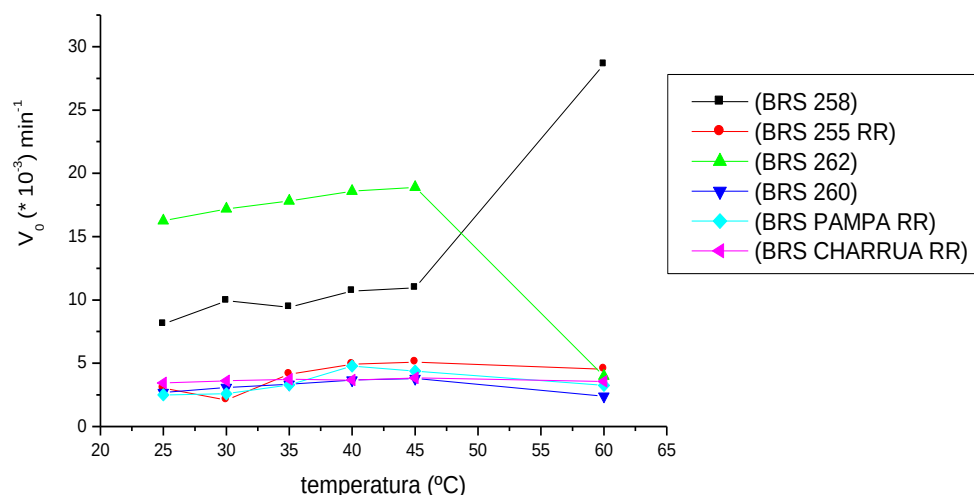


Figura 23. Avaliação da temperatura ótima da enzima SBP de cultivares de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) ou fosfato/ citrato (pH 4,5) 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida à A_{470nm} , tempo de 60 segundos. Cultivares BRS PAMPA RR (T, pH 4,5); BRS CHARRUA RR (T, pH 4,5); BRS 260 (pH 7,0); BRS 262 (pH 7,0), BRS 255 RR (T, pH 7,0); E BRS 258 (pH 7,0).

Com os dados colocados de forma comparativa (Figura 23) verifica-se que a cultivar BRS 258 e a BRS 262, apresentam alta atividade enzimática em relação às demais cultivares, o que foi observado também no efeito do pH. (Figura 16). Entretanto, no caso da cultivar BRS 258 ocorre significativo aumento da atividade com o aumento da temperatura de 45°C para 60°C. Poderia ser liberação de moléculas enzimáticas ativas com o aumento da temperatura. As demais cultivares mostram nessa figura 23 aparente pouca influencia do aumento da temperatura sobre sua ação catalítica. Pode-se explicar isso devido a escala comparativa, pois as cultivares BRS 258 e BRS 262 tem valores bem mais alto da velocidade inicial de reação.

5.5 Determinação da estabilidade da SBP das cultivares de soja da EMBRAPA frente ao armazenamento

Em relação ao estudo de estabilidade ao armazenamento, a tabela 9 apresenta os resultados obtidos. Pode-se observar que algumas cultivares não apresentaram variação na atividade enzimática no período de armazenamento de 84 dias, mostrando-se estáveis (BRS CHARRUA RR e BRS PAMPA RR). No entanto, a cultivar BRS 258 apresentou aumento significativo da atividade enzimática após 30 dias de armazenamento (cerca de 4 vezes). Assim, neste caso, pode-se armazenar os extratos de SBP de cascas de soja das variedades estudadas por 30 dias sem perda de atividade enzimática, sendo até recomendável a manutenção da SBP sob armazenagem antes de seu uso, conforme visualizado para a cultivar BRS 258.

Tabela 9- Estabilidade a estocagem, no freezer (- 10°C) de SBP de cascas de soja

AMOSTRAS	Concentração de Proteína (mg/mL)	Atividade (UA)	Atividade Específica (UA/mg)
BRS 255 RR			
t=zero dias	0,173	5,92	34,21
9 dias	0,01	2,96	296,1
30 dias	0,058	1,86	32,15
84 dias	0,0237	1	42,27
118 dias	0,012	0,4328	36,06
160 dias	0,1031	16,17	156,83
256 dias	0,042	0,56	13,57
1 ano	0,094	2,5	26,59
BRS 258			
t=zero dias	0,163	4,55	27,87
9 dias	0,034	4,32	126,92
30 dias	0,025	3,18	123,6
84 dias	0,0315	0,728	23,08
118 dias	0,082	1,09	13,29
160 dias	3,24 E-08	0,364	11,37
256 dias	0,594	1,11	1,87
1 ano	0,066	3,41	51,66

continuação: Tabela 9- Estabilidade a estocagem, no freezer (- 10°C) de SBP de cascas de soja

BRS CHARRUA RR			
t=zero dias	nr	nr	nr
6 dias	0,733	1,32	1,8
9 dias	0,709	1,34	1,89
30 dias	0,689	1,32	1,91
84 dias	0,654	0,888	1,35
118 dias	0,478	0,728	1,52
160 dias	0,6	0,592	0,99
256 dias	0,653	0,68	1,04
1 ano	0,5	1,57	3,14
BRS PAMPA RR			
t=zero dias	nr	nr	nr
9 dias	0,705	1	1,42
30 dias	0,607	1,04	1,72
84 dias	0,6077	0,683	1,12
118 dias	0,9852	0,637	0,65
160 dias	0,6724	0,5467	0,81
256 dias	0,661	0,45	0,68
1 ano	0,546	0,348	0,637
BRS 260			
t=zero dias	nr	nr	nr
27/5/2009	0,0166	0,637	38,37
5 dias	0,00857	0,537	62,66
90 dias	0,0181	0,82	45,3
1 ano	0,047	1,93	41,06
BRS 262			
t=zero dias	nr	nr	nr
27/5/2009	0,02	4,328	216,4
5 dias	0,076	1,207	15,79
90 dias	0,01	0,41	41
1 ano	0,022	3,94	179,09

nr não realizado

A estabilidade de peroxidase foi investigada com o objetivo de verificar sua resistência em condições de processos industriais, como aponta Sousa (2001). A autora verificou a estabilidade após armazenamento por 7 dias e observou que a peroxidase de casca de soja não apresentou redução significativa na atividade enzimática.

5.6 Termoestabilidade da SBP das cultivares de soja estudadas

Amostras da SBP permaneceram em determinadas temperaturas: 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C por 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos e foram realizadas as análises cinéticas para verificação da atividade residual. Os dados obtidos com o estudo de termoestabilidade mostraram que SBP de tegumento de soja, das cultivares cedidas pela EMBRAPA, tem uma certa estabilidade a tratamento térmico, exceto para temperatura de 80°C, a enzima é termoestável, dependendo da fonte.

Analisando individualmente, a BRS 258 mostrou ser bem estável no tratamento realizado (Figura 24). Inclusive a 80°C, em 20 minutos de tratamento ocorreu um aumento significativo da velocidade de reação. Isso sugere que ela é ativada pela temperatura em relação alteração conformacional, cuja interação se desfaz com o tratamento térmico.

Tal resultado de elevação da atividade foi observado no estudo do armazenamento da amostra (SBP de BRS 258) por até 30 dias (Tabela 9). As peroxidases em geral tem essa propriedade de estabilidade, visto que muitas delas são glicoproteínas (tem uma parte de carboidrato associado em sua molécula).

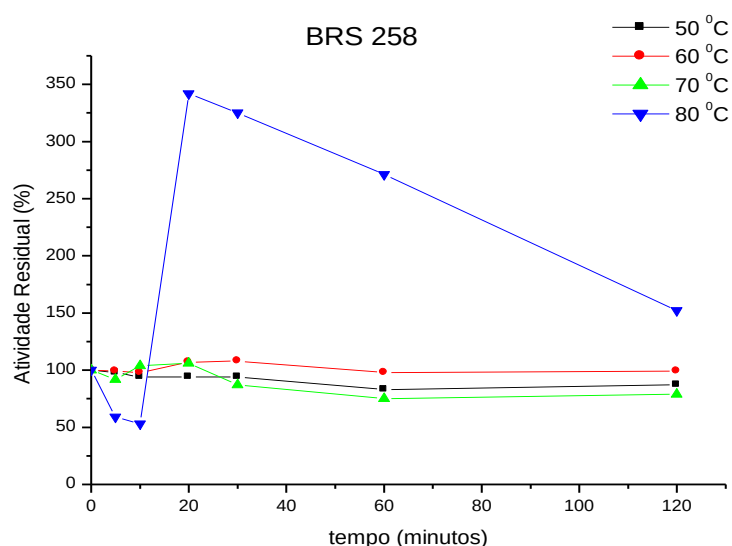


Figura 24. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 258, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 µL de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm}, tempo de 60 segundos.

No caso da BRS PAMPA RR, figura 25, observa-se estabilidade na faixa estudada. Entretanto nas temperaturas 70°C e 80°C onde pode-se observar significativa ativação da ação catalítica.

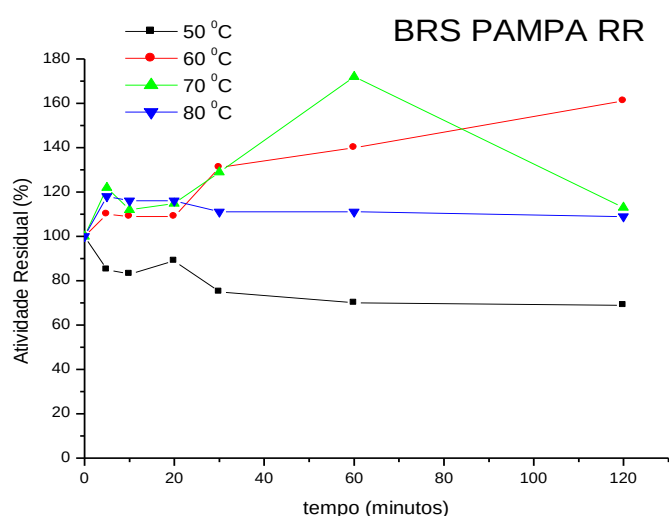


Figura 25. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS PAMPA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm} , tempo de 60 segundos.

A SBP da BRS 262 (Figura 26) de casca de soja convencional mostra também estabilidade ao tratamento térmico, só que neste caso em temperaturas mais baixas, inclusive ativação da ação catalítica. Pode ser observado também para cultivar BRS 260 (fig 29, pág. 73).

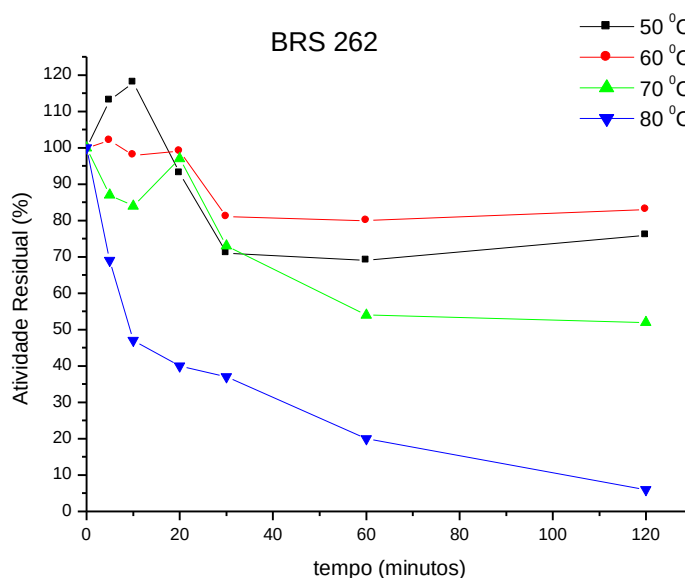


Figura 26. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 262, cultivar convencional da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm} , tempo de 60 segundos.

A HRP tem em sua constituição 18% de carboidratos, e isso confere a sua molécula termoestabilidade. No caso da SBP da cultivar BRS 255 RR (Figura 27) o resultado é muito interessante, pois observa-se significativo aumento da velocidade inicial da reação quando amostra da enzima é tratada a 50 °C por 60 minutos.

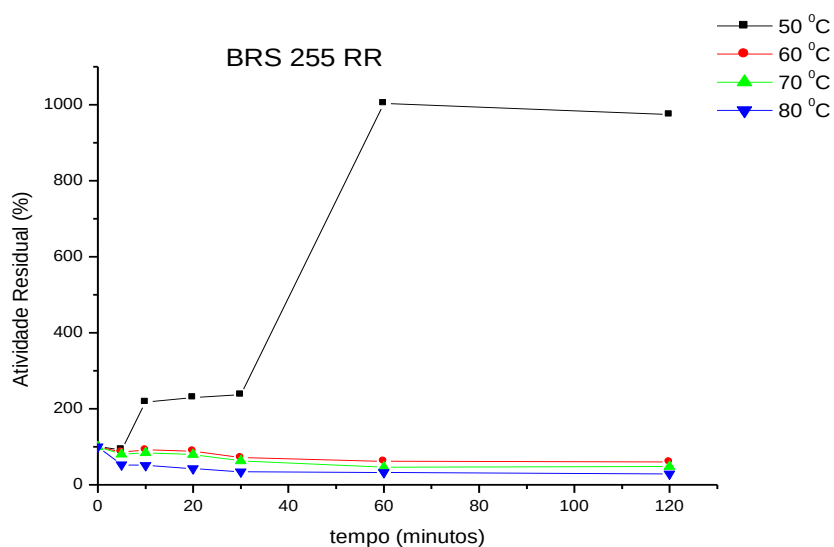


Figura 27. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 255 RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm} , tempo de 60 segundos.

Neste caso da SBP da cultivar CHARRUA RR observa-se uma certa estabilidade e resistência a perda da ação catalítica com o tratamento. Neste caso não é observado ativação significativa como visto nas outras cultivares (Figura 28).

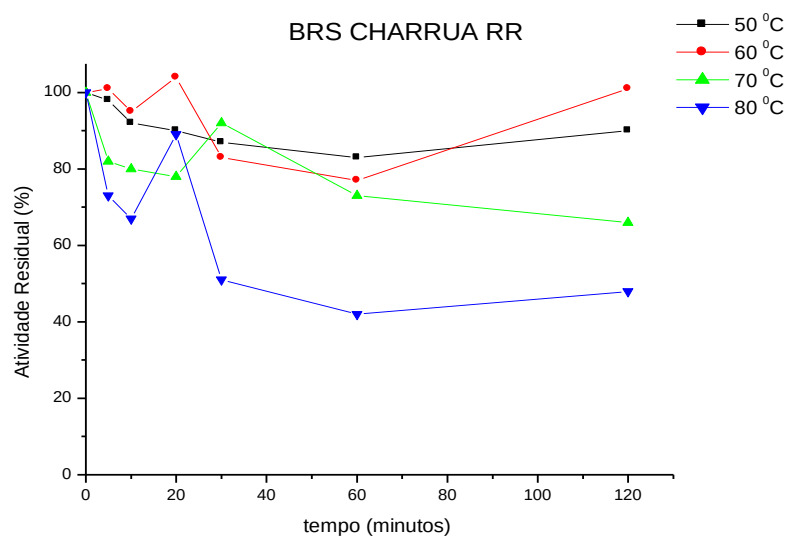


Figura 28. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS CHARRUA RR, cultivar transgênica da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato/ citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm} , tempo de 60 segundos.

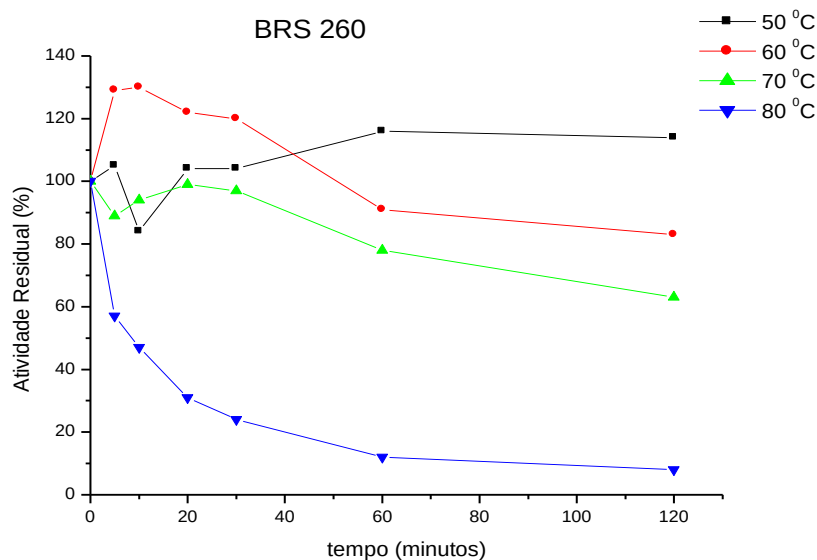


Figura 29. Avaliação da estabilidade térmica da enzima SBP, cultivar de soja brasileira BRS 260, cultivar convencional EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μ L de enzima (extrato concentrado); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato/ citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em A_{470nm} , tempo de 60 segundos.

5.7 Purificação parcial de SBP de cultivares de tegumento de soja

Após eluição de pó cetônico das cultivares de tegumento de soja cedidos pela EMBRAPA em coluna Sephadex G-25, as cultivares selecionada pelo *spot test*, deu-se seguimento a purificação parcial da SBP.

A solução enzimática das quatro cultivares de soja, após dessanilização, foram submetidas a cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (40 x 1,2 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio, 50mM, pH 7,0. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, coletando-se automaticamente frações de 2mL por tubo de ensaio. Os eluatos foram monitorados através de leitura da absorbância em 280 nm, para detecção de proteínas. Os tubos contendo proteínas foram analisados quanto a atividade de SBP. O perfil de eluição (Figura 30) revelou atividade da SBP de BRS 262 em vários picos. Escolheu-se, em vista da maior atividade enzimática apresentada, as frações 14 a 17 e 19 a 26, para dar prosseguimento aos estudos cinéticos.

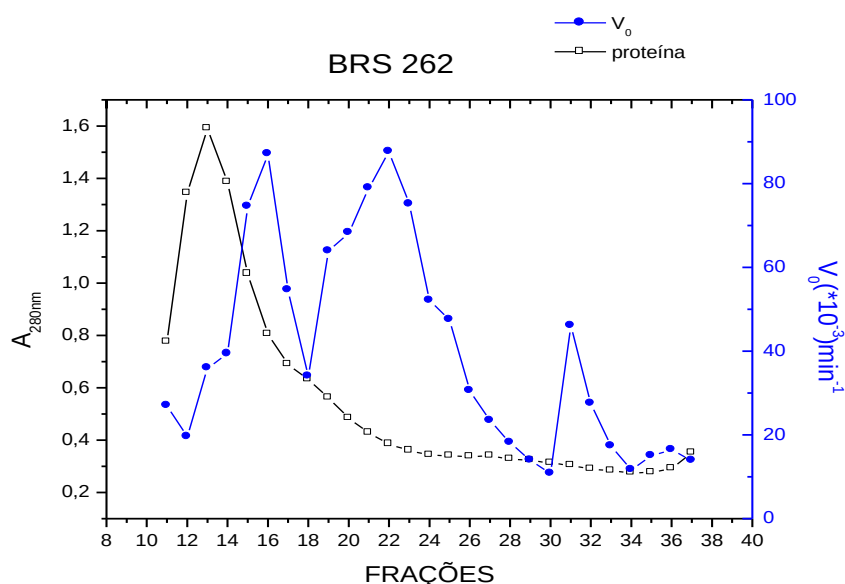


Figura 30 Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 da cultivar de soja BRS 262

Em BRS 260, revelou vinte e oito picos contendo atividade (Figura 31). Foram escolhidas as frações que apresentaram maior atividade de enzima, definindo-se “pools” (frações 25 a 27; 19 a 23 /12 e 13), para posterior estudos.

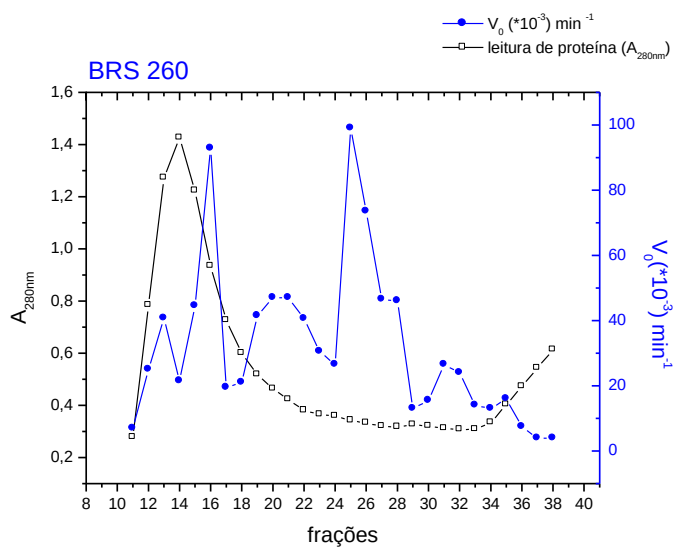


Figura 31 Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 da cultivar BRS 260 .

No caso da BRS 258, a figura 32 mostra o perfil de eluição em coluna Sephadex G-100, foram escolhidas as frações 12 a 20 e 24 a 27, com maior atividade enzimática, estabelecendo-se os “pools” para estudos posteriores.

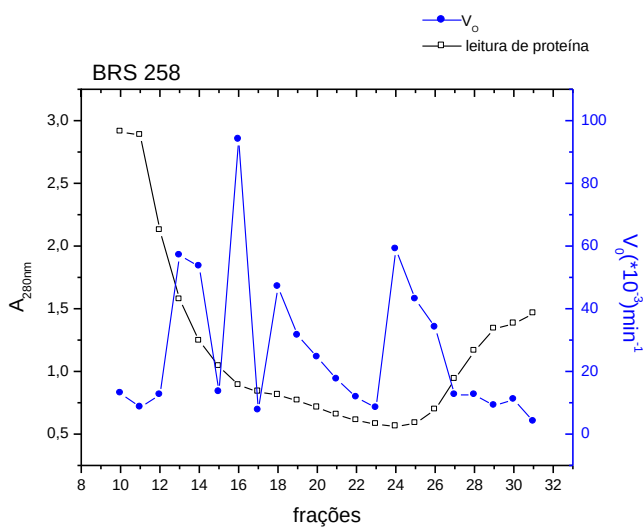


Figura 32 Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 258

No caso da cultivar BRS 255 RR (Figura 33) tem-se um perfil de eluição com alguns picos de atividade, onde selecionou-se as frações 16 a 18, e 27 a 28, formando “pool” para posterior estudos.

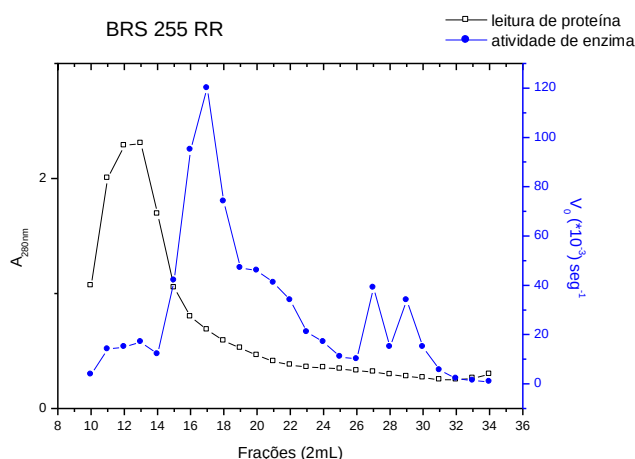


Figura 33 Perfil de eluição em coluna Sephadex G-100 de cultivar BRS 255 RR

5.8 Determinação da massa molecular de SBP

Após dessanilização em coluna Sephadex G-25, a massa molecular das proteínas foi determinada através de eluição em coluna Sephadex G-100, previamente calibrada com padrões protéicos soroalbumina bovina (PM: 67000), quimiotripsinogênio A (PM: 25000) e ribonuclease A (PM: 13000). As figuras 34 e 35 ilustram a relação entre o volume de eluição e a massa molecular das proteínas padrões, sendo que BRS 262 e BRS 258 (Figura 35) foram eluídas na coluna 1, enquanto que BRS 260 e BRS 255 RR foram eluídas na coluna 2 (Figura 36).

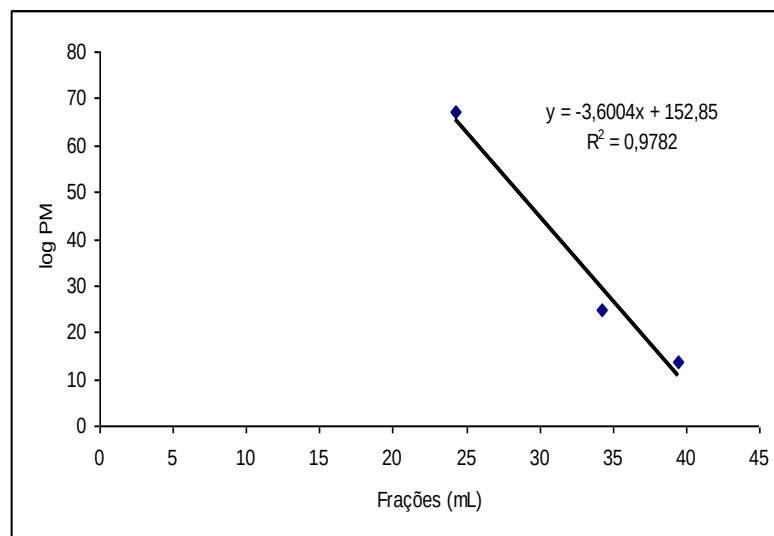


Figura 34 Coluna 1 Curva analítica de massa molecular, padrões protéicos eluídos em coluna de cromatografia Sephadex G-100

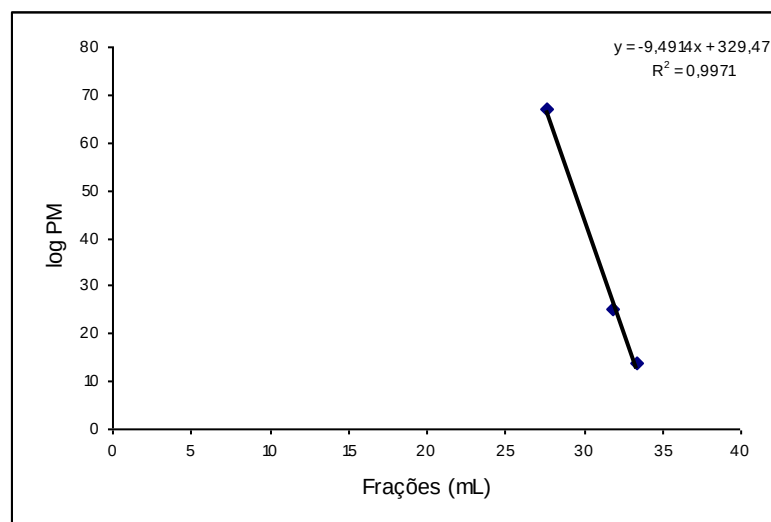


Figura 35 Coluna 2: Curva analítica de massa molecular, padrões protéicos eluídos em coluna de cromatografia de gel filtração Sephadex G-100

Através da curva analítica, em cromatografia Sephadex G-100, calculou-se a massa molecular das amostras protéicas. A seguir estão apresentados os perfis de eluição e a massa molecular das proteínas das quatro cultivares de soja selecionadas. Os picos contendo proteína foram analisados quanto á atividade da SBP.

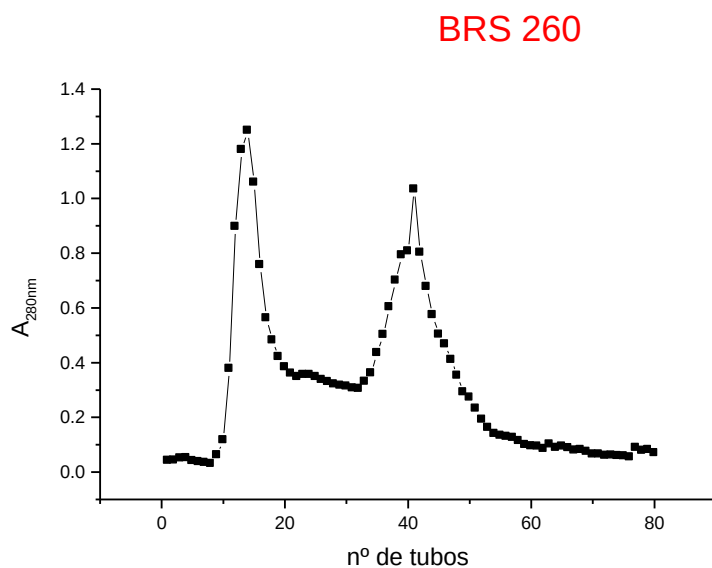


Figura 36 Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 260 (coluna 2)

As massas moleculares dos picos 1 e 2 (Figura 36) foram estimadas em 118,76 e 297,91 kDa. A atividade de SBP foi detectada no pico 1.

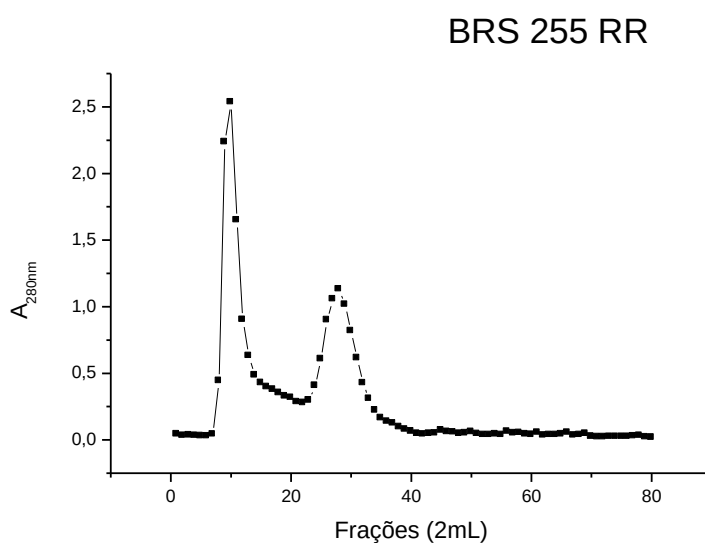


Figura 37 - Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 255 RR (coluna 2)

As massas moleculares dos picos 1 e 2 (Figura 37) foram estimadas em 182,35 e 128 kDa. A atividade de SBP foi detectada no pico 1.

Estes resultados estão de acordo com os resultados de estudo sobre peroxidase de vagens secas de baunilha (MARQUEZ et al., 2008) que encontraram peso molecular aproximadamente 186 kDa.

DEEPA & ARUMUGHAN (2002) encontraram massa molecular de peroxidase de folha de palmeira aproximadamente de 200 kDa.

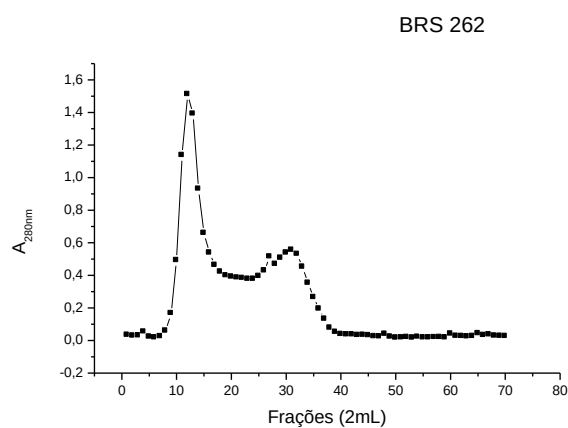


Figura 38 Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 262 (coluna 1)

As massas moleculares dos picos 1 e 2 (Figura 38) foram estimadas em 79,04 kDa e 72,17 kDa. A atividade de SBP foi detectada no pico 1.

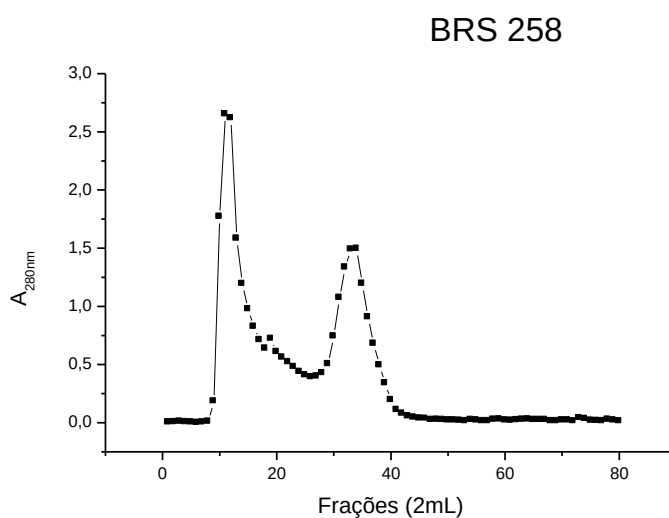


Figura 39 Cromatografia em coluna Sephadex G- 100 do extrato de BRS 258 (coluna 1)

As massas moleculares dos picos 1 e 2 (Figura 39) foram estimadas em 78,32 kDa e 63,53 kDa. A atividade de SBP foi detectada no pico1.

GILLIKIN e GRAHAM (1991) estudando a peroxidase de tegumento de soja (*Glycine max* var Williams 82) encontraram massa molecular de 37 kDa.

5.9 Efeito do pH sobre amostras eluídas na coluna Sephadex G-100

BRS 260

Após que as variedades de soja foram eluídas na coluna Sephadex G-100, escolheu-se as frações de cada variedade de soja selecionada, que apresentaram maiores atividades enzimáticas para os estudos de pH e temperatura. No caso da BRS 260 (frações 12 e 13; 19 a 23; 15 e 16; 25 a 27 e 30 e 31) a figura 40 apresenta o perfil do pH ótimo, respectivo a cada “pool”. As frações (12 e 13 e 25 a 27) apresentaram maior atividade no pH 5,0. Enquanto nas frações 15 e 16 e 19 a 23 na faixa de pH 4,5 a 5,0. As frações (30 e 31) possuem maior atividade enzimática em valores de pH 7,0 e 9,0.

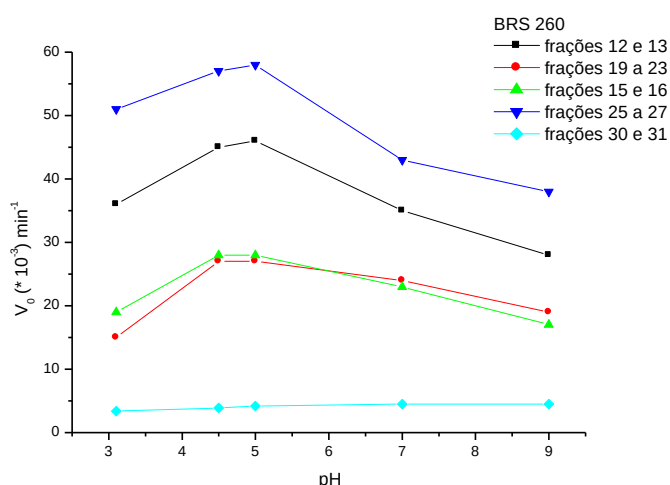


Figura 40 - Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 260 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

BRS 262

Para essa amostra foram selecionadas as frações 14 a 17 e 19 a 26, a figura 41 apresenta o perfil de efeito do pH na ação catalítica da SBP nesses “pools”, apresentando pH ótimo em pH 5,0.

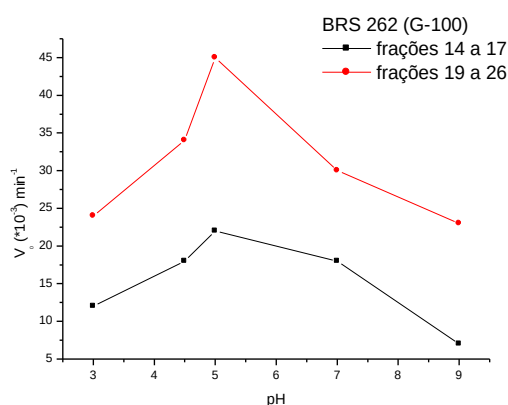


Figura 41 - Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 262 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 μL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

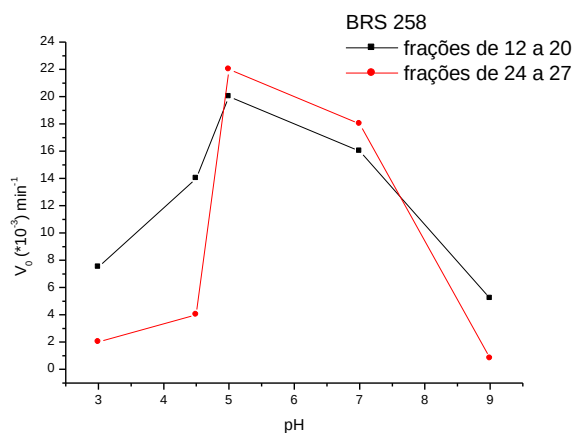
BRS 258

Figura 42 - Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 258 de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 μL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida à 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

BRS 255 RR

As frações 19 a 22 de BRS 255 RR possuem alto valor de atividade nos pHs 5,0 e 7,0 (fig 43).

As frações (12 a 20 e 24 a 27) de BRS 258 apresentam maior atividade enzimática no pH 5,0 (fig 42, pág. 83).

As frações (15 a 18, 27 e 28) apresentam maior atividade de SBP no pH 5,0 e 4,5 (fig 43).

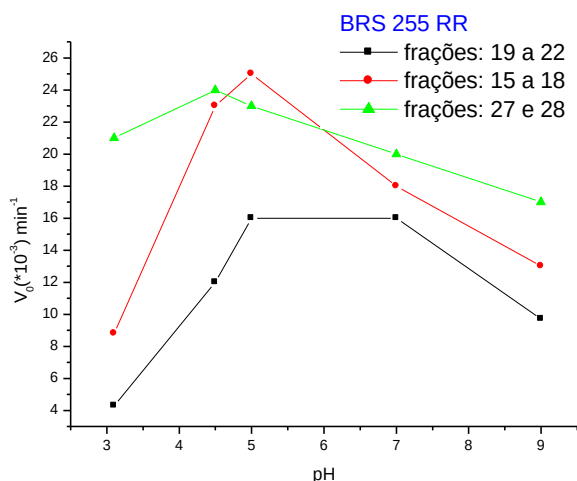


Figura 43 - Avaliação do pH ótimo da enzima SBP das frações de cultivar BRS 255 RR de soja brasileira. Cinética de reação a 45 °C, 330 µL de enzima (extrato eluído na G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

Todas as frações de BRS 255 RR (fig 43) possuem baixa atividade no pH 9,0. Enquanto as frações 15 a 18, 27 e 28 apresentam baixo valor de atividade enzimática no pH 7,0.

5.10 Efeito da temperatura na atividade da SBP das variedades de soja eluídas na coluna Sephadex G-100

A influência da temperatura na cinética de reação de SBP das cultivares de soja eluídas na coluna Sephadex G-100 foi verificada á 35°C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 85 °C.

BRS 255 RR

A avaliação do efeito da temperatura na cinética catalítica da SBP, cultivar BRS 255 RR nas amostras da eluição em Sephadex G-100, são mostradas nas figuras 44 e 45. As frações 15 a 18 apresenta dois pontos de temperatura ótima 50

°C e 70 °C, o que novamente sugere a presença de isoenzimas (Figura 44). Enquanto que nas frações 27 e 28 (Figura 45) observa-se temperatura ótima em 70 °C.

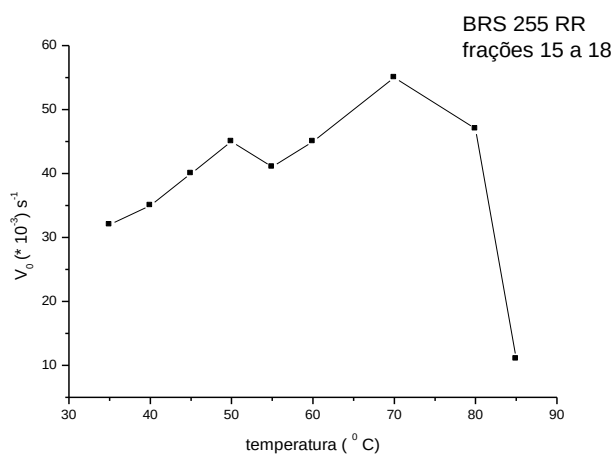


Figura 44 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 15 a 18, cultivar de soja BRS 255 RR (transgênica) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

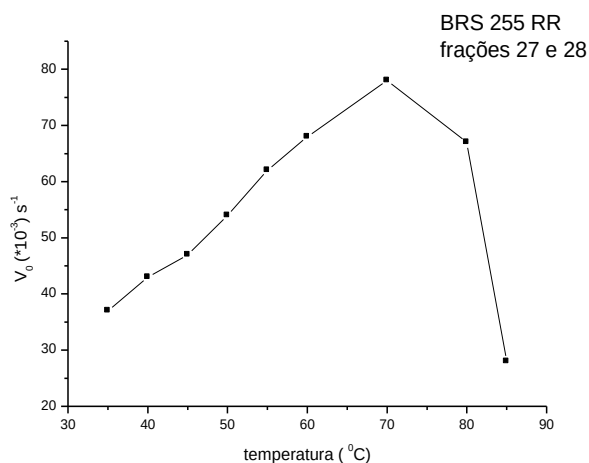


Figura 45 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 27 e 28, cultivar de soja BRS 255 RR (transgênica) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

No caso da SBP de BRS 258 (frações 12 a 20 e 24 a 27, figuras 46 e 47, respectivamente) os dados mostram máximo de atividade a 70 °C.

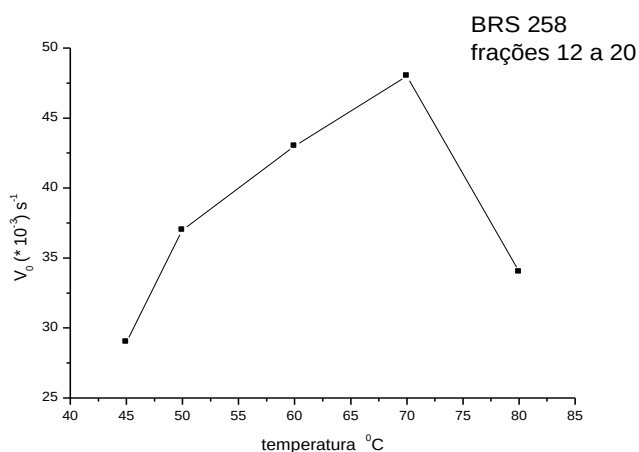


Figura 46 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 12 a 20, cultivar de soja BRS 258 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

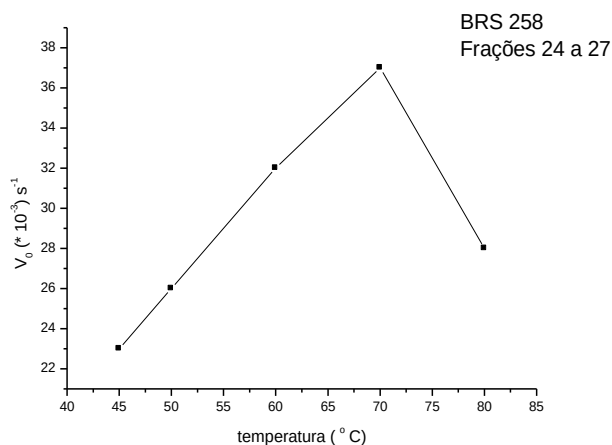


Figura 47 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 24 a 27, cultivar de soja BRS 258 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, com NaCl 0,1M, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

Nas frações (15 e 16) e (19 e 23), da cultivar BRS 260 (Figuras 48 e 49) obteve-se temperatura ótima de atividade a 70 °C, com queda da atividade em temperatura de 85 °C.

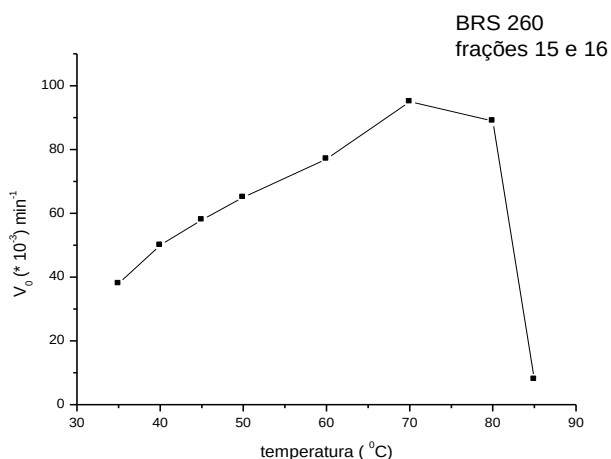


Figura 48 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 15 e 16, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 4,5, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

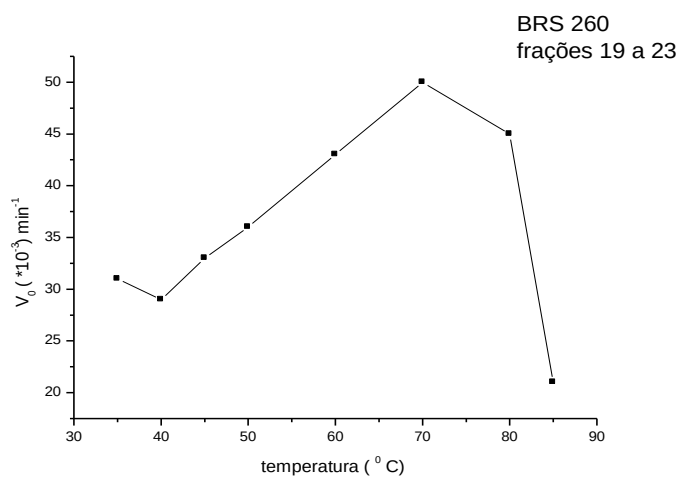


Figura 49 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 19 e 23, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μ L de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H₂O₂ 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

Em relação aos “pools” de frações (12 e 13), (25 a 27) e (30 e 31), apresentaram, respectivamente, temperatura ótima a 80°C (Figura 50), 70°C (Figura 51) e 60°C (Figura 52).

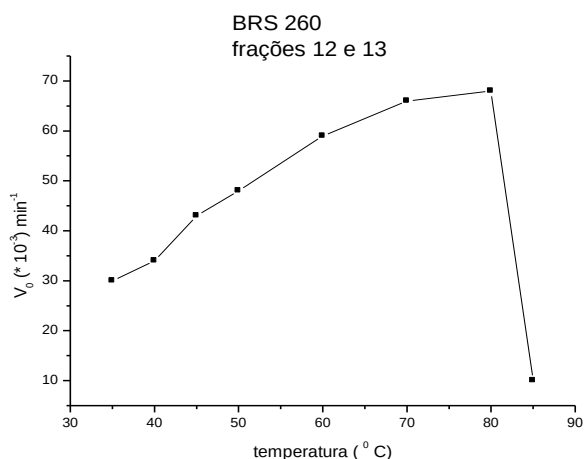


Figura 50 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 12 e 13, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

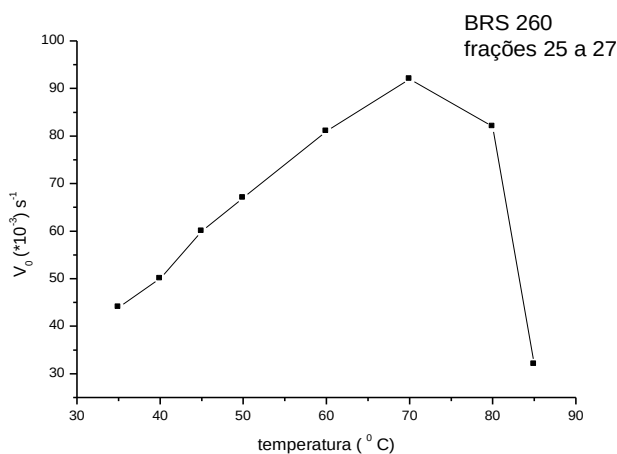


Figura 51 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 25 a 27, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato/citrato 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

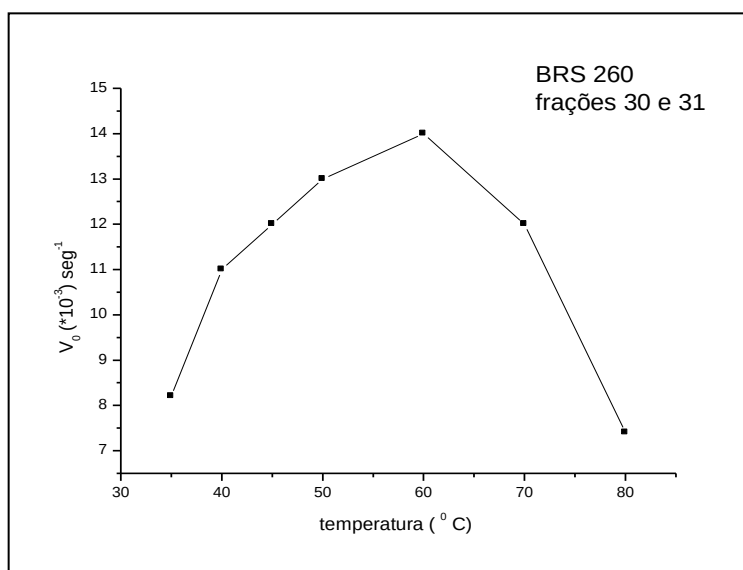


Figura 52 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 30 e 31, cultivar de soja BRS 260 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

No caso de BRS 262, foram analisados 3 “pool” de frações: 14 a 17, 19 a 26 e 32 a 34. O “pool” das frações 14 a 17 apresenta temperatura ótima a 70°C (Figura 53).

Para as frações 19 a 26 de BRS 262 (Figura 54) e frações 32 a 34 (Figura 55), os dados obtidos mostram temperatura ótima em 80 °C e 60 °C.

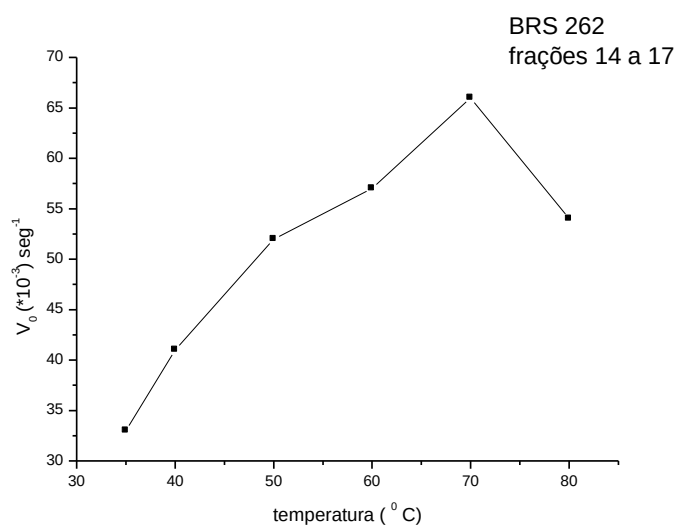


Figura 53 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 14 a 17, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão citrato/fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

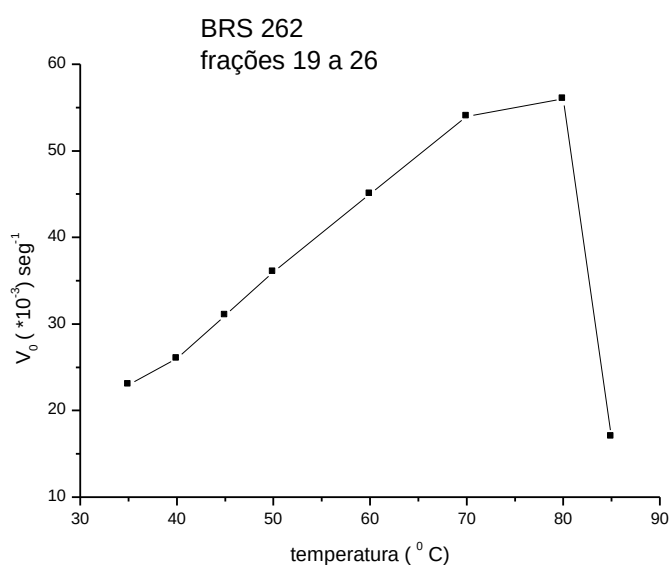


Figura 54 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 19 a 26, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 5,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão citrato/fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida em 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

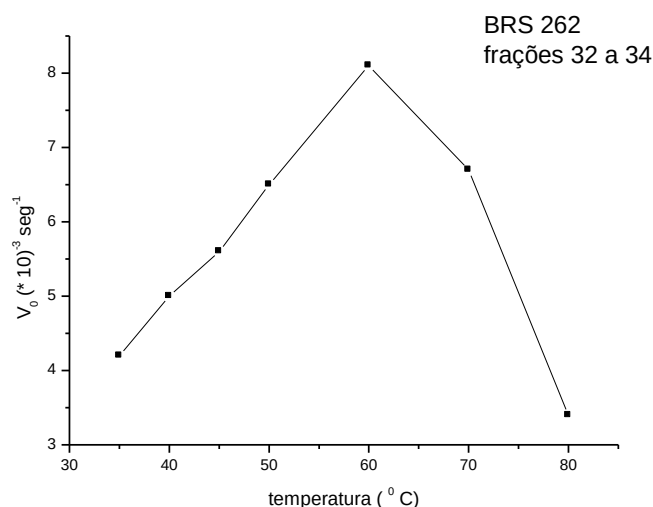


Figura 55 Avaliação da temperatura ótima da SBP, frações 32 a 34, cultivar de soja BRS 262 (convencional) da EMBRAPA. Cinética de reação em pH 7,0, 330 μL de enzima (eluída na coluna Sephadex G-100); guaiacol 30 mM, H_2O_2 46 mM, tampão fosfato de sódio 50 mM, celas de 1 cm de caminho ótico. Reação seguida à 470_{nm}, tempo de 60 segundos.

Analisando as amostras das cultivares eluídas em coluna Sephadex G-100, todas apresentam queda da atividade em temperatura de 80 °C e 85°C.

5.11 DETERMINAÇÃO DE K_M E V_{MAX} DAS FRAÇÕES SELECIONADAS DE CADA CULTIVAR DE SOJA

Avaliou-se a variação da concentração de substrato (substrato) com relação a atividade enzimática. Através do gráfico duplo recíproco (figura 56, como exemplo) de Lineweaver-Burk, foram determinadas as constantes cinéticas k_M e v_{max} das frações das cultivares de soja (Tabela 10).

Tabela 10- Valores de k_M e v_{max} das frações selecionadas

Cultivares de soja	k_M (mM)	v_{max} (micromoles/min)
BRS 260 frações 19 a 23 e 12 e 13	1,51	0,038
BRS 255 RR frações 19 a 22	224	0,186
BRS 258 frações 12 a 20/24 a 27	1,91	0,042
BRS 260 frações 25 a 27	1,26	0,067
BRS 262 frações 19 a 26	3,0	0,043
BRS 262 frações 14 a 17	1,61	0,045

Márquez et al. (2008) estudando peroxidase de vagens secas de baunilha, encontraram um K_m de 3,8 mmol/L. Chen e Asada. (1989) encontraram k_M de 1.66 mmol/L para peroxidase de espinafre. Enquanto que os autores encontraram k_M de peroxidase de pera (0.04 mmol/L) (Mittler e Zilinskas, 1991) e de folhas de chá (0,08 mmol/L) (Mamuka, Winkel, Thorneley, 1997).

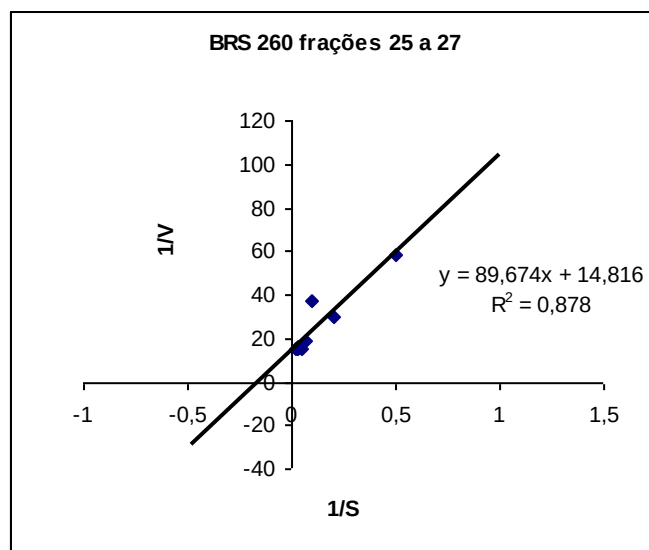


Figura 56 Exemplo do gráfico duplo recíproco, onde determina-se as constantes cinéticas.

5.12 Efeito de sais mono e divalentes na cinética de reação da SBP de diferentes cultivares.

BRS 260

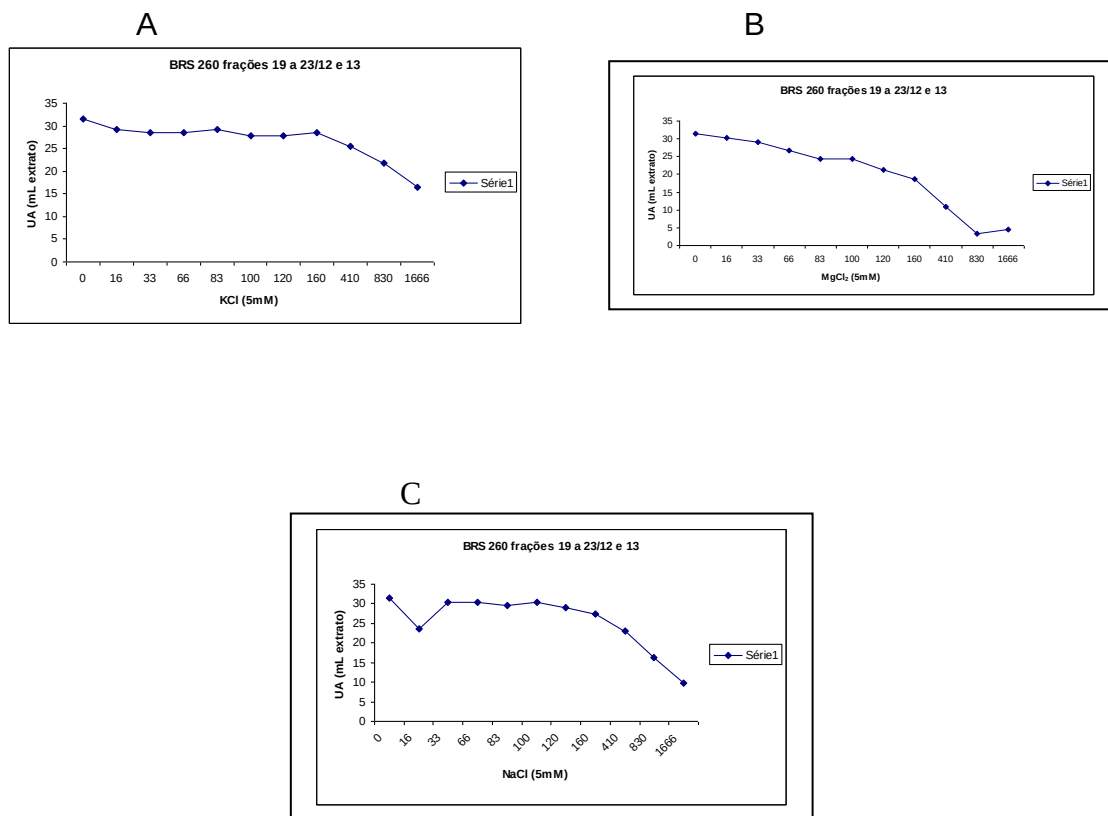
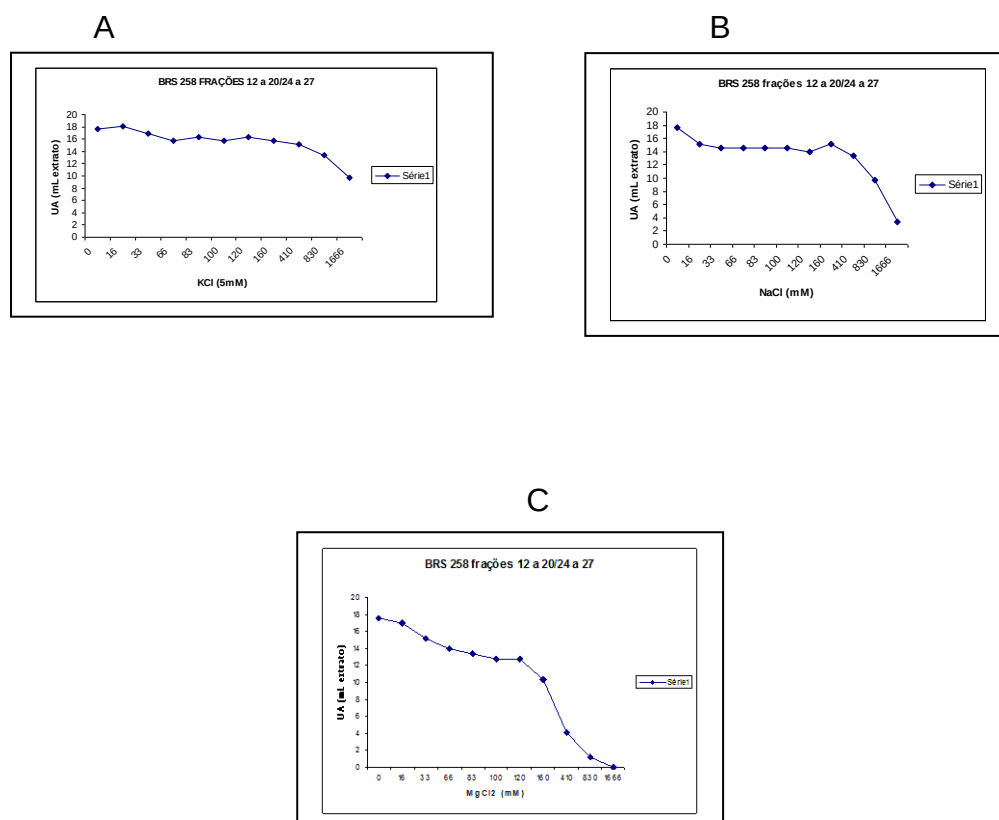


Figura 57 Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 260. A [KCl]; B [MgCl₂] e C [NaCl].

Os dados mostram cátions monovalentes apresentam uma faixa de concentração que são importantes para a ação catalítica da SBP. No caso de divalente ocorreu inibição.

BRS 258



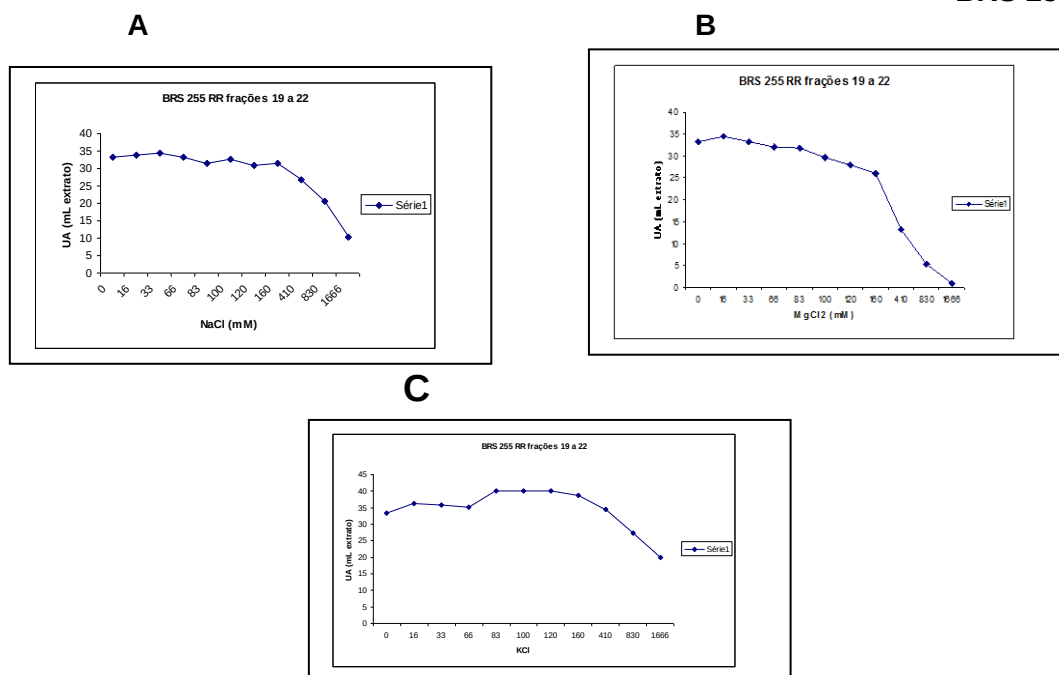
BRS 255 RR

Figura 59 Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 255 RR. A [NaCl]; B [MgCl₂] e C [KCl]

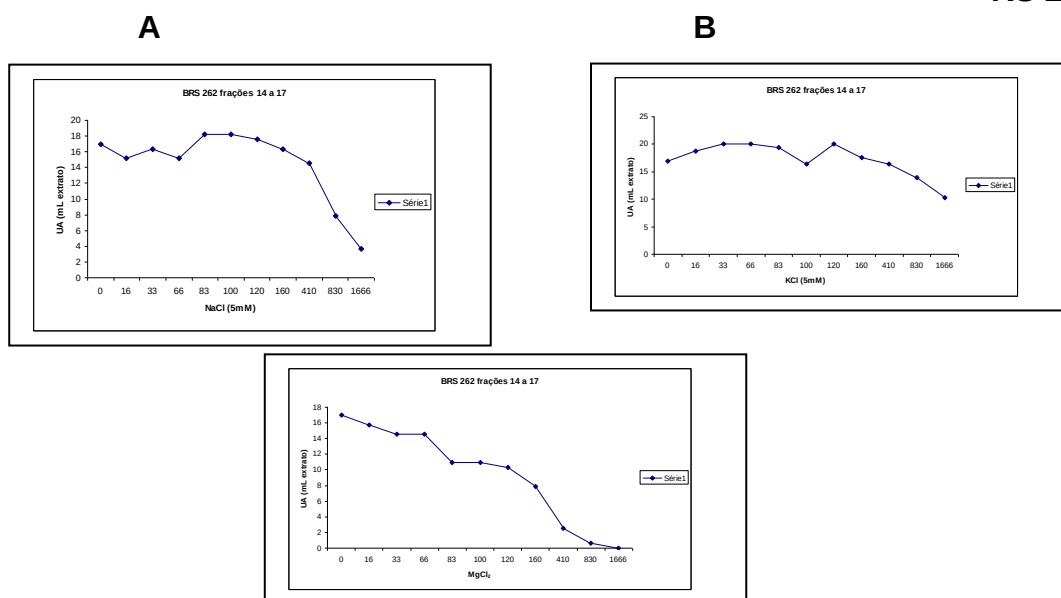
RS 262

Figura 60 Efeito de cátions mono e divalente na cinética de reação da cultivar BRS 262 A [NaCl; B [KCl] e C [MgCl₂].

6 RESUMO DOS RESULTADOS

- ✓ PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL para SBP/Guaiacol/H₂O₂:
 - ✓ pH 3,3
 - ✓ Volume da amostra (enzima) entre 330 µL e 340 µL;
 - ✓ Peróxido de hidrogênio: 150 µL;
 - ✓ Tempo: 20 segundos;
 - ✓ Temperatura: 50° C;
 - ✓ Guaiacol: 300 µL e
 - ✓ 0,1 M de NaCl.

CULTIVARES DE SOJA E PARAMETROS CINÉTICOS DA SBP CONCENTRADA:

pH ótimo, BRS 255 RR, BRS 262, BRS 260 e BRS 258 a atividade foi máxima no pH 7,0.

BRS Pampa RR e BRS Charrua RR a atividade enzimática foi máxima no pH 4,5.

Temperatura ótima, BRS 255 RR, BRS 262, BRS Pampa RR, BRS Charrua RR e BRS 260 a atividade foi máxima em 45°C, enquanto que para BRS 258 a atividade foi máxima em 70 °C.

Cultivares de soja e estabilidade da SBP concentrada: armazenamento e termoestabilidade.

As cultivares apresentaram termoestabilidade variável, o que pode indicar presença de isoenzimas. Já em relação ao armazenamento, a SBP da cultivar BRS 255 RR (transgênica) apresentou um aumento na atividade após 160 dias de armazenamento.

Os dados das frações (eluatoss) das cultivares de soja selecionadas:

- pH ótimo 4,5 e 5,0
- temperatura ótima, BRS 260 e BRS 262 800C, BRS 255 RR isoenzimas com 500C e 700C, BRS 258 700C;
- constante K_M , BRS 260 1,51 e 1,26 mmol/L, BRS 255 RR 224,0 mmol/L, BRS 258 1,91, BRS 262 3,0 e 1,61mmol/L;
- constante v_{max} , BRS 260 0,038 e 0,067 μ mol/min; BRS 255 RR 0,186 μ mol/min; BRS 258 0,042 μ mol/min; BRS 262 0,043 e 0,045 μ mol/min
- massa molecular, BRS 260 118,76 e 297,91kDa; BRS 255 RR 182,35 e 128 kDa; BRS 262 79,04 e 72,17 kDa; BRS 258 78,32 e 63,53 kDa.

7 CONCLUSÃO

Esta tese evidenciou e acrescentou novas informações a respeito da utilidade da casca de soja como um subproduto da indústria agropecuária brasileira. Neste trabalho, procurou-se verificar o uso de subproduto de variedades de soja brasileira, naturais e transgênicas. O escopo foi a enzima SBP. As variedades trabalhadas nesta pesquisa evidenciaram níveis ótimos de atividade enzimática de SBP em temperaturas entre 60 e 80° C e pH na faixa 4,0 e 5,0. A purificação desta enzima, embora parcial, colaborou para um melhor perfil de atividade em relação aos extratos brutos.

Esta pesquisa deixa aberta perspectivas para o uso do sistema SBP/IAA em células tumorais, como a literatura tem evidenciado recentemente. Como o Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, o país mostra-se bastante competitivo para atuar nesta área.

REFERÊNCIAS

- AJILA, C. M.; RAO, U. J. S. P. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44, 2009.
- AKISUE, O. F. G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 412 p.
- ALVIM, K. C.; CLEMENTE, E. Estudo da termoestabilidade de peroxidases extraídas da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*). **Acta Scientiarum**, v. 20, p. 201-205, 1998.
- AMORIM, G. L.; BATISTA, A. M. V.; CARVALHO, F. F. R.; GUIM, A.; CABRAL, A. M. D.; MORAES, A. C. A. Substituição do milho por casca de soja: consumo, rendimento e características de carcaça e rendimento da buchada de caprinos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n. 1, p. 41-49, 2008.
- ASSIS, S. A.; MARTINS, A. B. G.; GUAGLIANONI, D. G.; FARIA OLIVEIRA, O. M. M. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 4103-4107, 2002.
- BENDER, R. J. Colheita e armazenamento. In: _____. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1986. p. 521-550.
- BERTILSON, L.; OALMER, L. Índole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identification and quantification by mass spectrography. **Science**, v. 117, p. 74-76, 1976.
- BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; HENDERSON, W. D.; NICELL, J. A. Recent advances in treatment of selected hazardous wastes. **Water Quality Journal of Canada**, v. 30, p. 115-125, 1995.
- BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 562-567, 2002.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1977. p. 1-6.

BRANDURSKI, R. S.; COHEN, J. D.; SLOVIN, J. P.; REINECKE, D. M. Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIS, P. J. **Plant hormones**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 39-65.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Alice Web**. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 12 jul. 2005.

BRASIL, CNPSO-EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Soja-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1999. Soja: área, produção e produtividade. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em 10 out. 2007.

BROWN, L. R.; RENNER, M.; HALWEIL, B. **Food trends**: vital signs - the environmental trends that are shaping our future. Washington: Worldwatch Institute 1999. 197 p.

BRUEMMER, J. H.; BONGWOO, R.; BOWEN, E. R. Peroxidase reactions and orange juice quality. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 186-189, 1976.

BRUNETTI, I. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC: 1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: a review. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1-6, 1977.

BUTTERY, R. R.; BUZZELL, R. I. Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. **Crop Science**, v. 8, p. 722-725, 1968.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. In: EVERSE, K.; GRISHAM, M. B. (Ed.). **Peroxidase in chemistry and biology**. New York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 1-122.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CLEMENTE, E.; LEITE, I. P. Relationship between phenolic compounds, peroxidase and polyphenoloxidase activities and physiological deterioration on cassava. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 2, p. 89-96, 1985.

CATALÁ, C.; CROZIER, A.; CHAMARRO, J. Decarboxylative metabolism of {1'-C-14}-indole-3-acetic acid by tomato pericarp disks during ripening-Effects of wounding and ethylene. **Planta**, v. 193, p. 508-513, 1994.

CATALÁ, C.; OSTIN, A.; CHAMARRO, J.; SANDBERG, G.; GROZIER, A. Metabolism of indole-3-acetic acid by pericarp disks from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, v. 100, p. 1457-1463, 1992.

CAZA, N.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K. E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. **Water Research**, v. 33, p. 3012-3018, 1999.

CESAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. A.; BARBOSA, T. A. F.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 616-625, 2007.

CHEN, G.; ASADA, K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. **Plant Cells Physiology**, v. 30, p. 1987-1998, 1989.

CIVELLO, P. M.; MARTINEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; AÑÓN, M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): partial purification and determination of some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2596-2601, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Soja**. Disponível em: <www.conab.com.br>. Acesso em: 15 set. 2005.

CLEMENTE, E. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase from orange. **Unimar**, v. 3, p. 401-408, 1995.

CLEMENTE, E.; ROBINSON, D. S. The thermostability of purified oranges isoperoxidases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 38, p. 1109-1118, 1995.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 167-171, 1998.

DAWSON, J. H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. **Science**, v. 240, p. 433-439, 1988.

DE CORDT, S.; VANHOOF, K.; HU, J.; MAESMANS, G.; HENDRICKX, M.; DE BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Características da atividade da peroxidase de abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) da cultivar IAC Gomo-de-mel e do clone IAC- 1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 244-249, 2005.

DEC, J.; BOLLAG, J. M. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Archaeology*. **Environmental Contaminant Toxicology**, v. 19, p. 543-550, 1990.

DEEPA, S. S.; ARUMUGHAN, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**, v. 61, p. 503-511, 2002.

DIXON, M. Enzyme kinetic. In: DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1979. p. 47.

DOG, T. L. Menopause: a review of botanical dietary supplements. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 98-108, 2005.

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. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 48, p. 1574-1579, 2000.

DUARTE-VAZQUEZ, M. A.; ORTEGA-TOVAR, M. A.; GARCIA-ALMENDAREZ, B. E.; REGALADO, C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L Var purple top white globe) peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 42-47, 2003.

DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: EVERSE, K.; GRISHAM, M. B. (Ed.). **Peroxidase in chemistry and biology**. New York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 1.

DUNFORD, H. B.; STILLMAN, J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisas de Soja. **Soja**: área, produção e produtividade, 1999. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em 10 out. 2007.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43-52, 2001.

FOLKES, L. K.; CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P. Toward targeted “oxidation therapy” of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 42, n. 4, p. 917-920, 1998.

FOLKES, L. K.; GRECO, O.; DACHS, G. U.; STRATFORD, M. R. L.; WARDMAN, P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 265-272, 2002.

FONG, W. Y.; CRUESS, W. V. The effect of pH value on the inactivation temperature of fruit oxidase. **Plant Physiology**, v. 4, p. 537-541, 1929.

FORSYTH, J. L.; ROBINSON, D. S. Purification of brussels sprout isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 63, p. 221-234, 1998.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye waste waters: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 251-262, 2001.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 172-177, 2008.

GALDINO, N. O.; CLEMENTE, E. Palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) composição mineral e cinética de enzimas oxidativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 540-544, 2008.

GANTHAVORN, C.; NAGEL, C. W.; POWERS, J. R. Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 47-49, 1991.

GAZARIAN, I. G.; LAGRIMINI, L. Purification and unusual kinetic properties of tobacco anionic peroxidase. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1029-34, 1996.

GENG, Z.; RAO, K. J.; BASSI, A. S.; GIJZEN, M.; KRISHNAMOORTHY, N. Investigation of biocatalytic properties of soybean seed hull peroxidase. **Catalysis Today**, v. 64, p. 233-238, 2001.

GERSHENSON, A.; SCHAUERTE, J. A.; GIVER, L.; ARNOLD, F. H. Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases. **Biochemistry**, v. 39, p. 4658-4665, 2000.

GIJZEN, M. A. Deletion mutation at the *ep* locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. **The Plant Journal**, v. 12, p. 991-998, 1997.

GILLIKIN, J. W.; GRAHAM, J. S. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of Glycine max. **Plant Physiology**, v. 96, p. 214-220, 1991.

GONÇALVES, E. M.; PINHEIRO, J.; ABREU, M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Carrot (*Daucus carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 574-581, 2010.

GORDON, S. A.; BARR, S.; FRY, R. J. M. Origin of urinary auxin in germfree and convetional mouse. **American Journal of Physiology**, v. 222, p. 339-403, 1972.

GRAY, J. S. S.; MONTGOMERY, R. The *N*-glycosylation sites of soybean seed coat peroxidase. **Glycobiology**, v. 7, p. 679-685, 1997.

GRAY, J. S. S.; YANG, B. Y.; HULL, S. R.; VENZKE, D. P.; MONTGOMERY, R. The glycans of soybean peroxidase. **Glycobiology**, v. 6, p. 23-32, 1996.

GRECO, O.; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P.; TOZER, G. M.; DACHS, G. U. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indol-3-acetic acid. **Cancer Gene Therapy**, v. 7, p. 1414-1420, 2000.

GRECO, O.; ROSSITER, S.; KANTHOU, C.; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P.; TOZER, G. M.; DACHS, G. U. Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 151-160, 2001.

HADLEY, H. H.; HYMOWITZ, T. Sepeciation and cytogenetics. In: CALDWELL, B. E. **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison: American Society of Agronomy, 1973. p. 97-116.

HAMID, M.; REHMAN, K. U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HENRIKSEN, A.; MIRZA, O.; INDIANI, C.; TEILUM, K.; SMULEVICH, G.; WELINDER, K. G.; GAJHEDE, M. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions **Protein Science**, v. 10, p. 108-115, 2001.

HUTTERMAN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 387-394, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JIA, J.; WONG, B.; WU, A.; CHENG, G.; LI, Z.; DONG, S. A. Method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2217-2223, 2002.

KAGAWA, A. **Standard table of food composition in Japan**. Tokyo: University of Nutrition for Women, 1995. p. 104-105.

KAHN, V.; GOLDSCHMIDT, S.; AMIR, J.; GRANIT, R. Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 756-764, 1981.

KAMAL, A.; TEKUMALLA, V.; RAJU, P.; NAIDU, V. G. M.; DIWAN, P. V.; SISTLA, R. Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-b-glucuronide prodrugs with a potential for selective therapy of solid tumors by PMT and ADEPT strategies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3769-3773, 2008.

KARAM, J.; NICELL, J. A. J. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 69, p.141-153, 1997.

KENNEDY, K.; ALEMANY, K.; WARITH, M. Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol. **Water Research**, v. 28, p. 149-158, 2002.

KINSLEY, C.; NICELL, J. A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.

KHALIL, N. M. **Interação de peroxidase-mieloperoxidase e nicotina no burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares**. 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

KIM, Y. H.; AN, E. S.; SONG, B. K.; KIM, D. S.; CHELIKANI, R. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potencial application as anti-biofilm coating material. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1521-1524, 2003.

KINSLEY, C.; NICELL, J. A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.

KOGL, R.; HAGEN-SMITH, A. J.; ERXLEBEN, H. Vegetable growth substances, a phytohormones of cell extension. Purification of auxin from human urine. **Journal of Physical Chemistry**, v. 214, p. 241-246, 1933.

KLIBANOV, A. M.; TU, T. M.; SCOTT, K. P. Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259-261, 1983.

KRAJEWSKA, B. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 22-40, 2009.

KRELL, H. W. Peroxidase: an important enzyme for diagnostic test kits. In: LOBURZEWSKI, J.; GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (Ed.). **Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases Lublind, Poland and Geneva, Switzerland**. Geneva: University of Maria Curie, 1991. p. 469-478.

LEITE, K. M. S. C. **Caracterização cinético-enzimática e estudos de inibidores da pectinametilesterase de Goiaba, Cultivar Paluma**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LEMOS, M. A.; OLIVEIRA, J. C.; SARAIVA, J. A. Influence of pH on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase in aqueous solution. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 33, p. 362-368, 2000.

LIU, W.; FANG, J.; ZHU, W.; GAO, P. Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var. HH₂. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 779-785, 1999.

LÓPEZ, P.; BURGOS, J. Peroxidase stability and reactivation after heat treatment and manothermosonication. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 451-455, 1995.

LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. Peroxidase solúvel de pêssgo: purificação parcial e propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 42-48, 1997.

LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A.; SILVA, M. A. da. Heat inactivation of soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Boletim Informativo Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 155-158, 1995.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 221-225, 2007.

McELDOON, J. P.; DORDICK, J. S. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. **Biotechnology Progress**, v. 2, n. 4, p. 555-558, 1996.

MAKINEN, K. K.; TENOVUO, J. Observations on the use of guaiacol and 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 100-108, 1982.

MAMUKA, K.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1237-1245, 1997.

MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K. N.; OLIART, R. M.; PARDIO, V. T. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1372-1379, 2008.

MARTINEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUNOL, C.; TUSELL, J. M.; GELPI, E. Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-Hydroxyindole-3-acetic acid in Human Plasma. **Clinical Chemistry**, v. 29, p. 1354-1357, 1983.

MENEZES, S. M.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VILLELA, F. A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, p. 150-155, 2004.

MILL, M. H.; FINLAY, D. C.; HADDAD, P. R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interact chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 564, p. 93-102, 1991.

MIRANDA, A. C.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2007.

MIRANDA, M. V.; MAGRI, M. L.; NAVARRO DEL CAÑIZO, A. A.; CASCONI, O. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 537-543, 2002.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. **Plant Physiology**, v. 97, p. 962-968, 1991.

MIZOBUTSI, G. P.; FINGER, F. L.; RIBEIRO, R. A.; PUSCHMANN, R.; NEVES, L. L. M.; MOTA, W. F. Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. **Science Agricultural**, v. 67, p. 213-217, 2010.

MORAES, R. M. A.; JOSÉ, I. C.; RAMOS, F. G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 725-729, 2006.

MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **Journal of Food Science and Technology**, v. 22, p. 291-397, 1987.

MUNIR, L. Z.; DORDICK, J. S. Enzyme soybean peroxidase as an effective bromination catalyst. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 337-341, 2000.

NEVES, V. A. Ionically bound peroxidase from peach fruit. **Brazilian Archive Biology Technology**, v. 45, n. 1, p. 7-16, 2002.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Peroxidase from peach fruit: thermal stability. **Brazilian Archive Biology Technology**, v. 41, n. 2, p. 179-186, 1998.

NICELL, J. A.; BEWTRA, J. K.; BISWAR, N.; TAYLOR, E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, v. 27, p. 1629-1639, 1993.

O'BRIEN, P. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.

OLEMPSKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144-158, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Química)- Departamento de Química , Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PRABHA, T. N.; PATWARDHAN, M.V. Polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) enzyme activities and their isoenzyme patterns in ripening fruits. **Acta Alimentaria**, v. 15, p. 199-207, 1986.

PEREIRA, D. H. **Efeito citotóxico do sistema HRP/indóis em células McCoy in vitro**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

RAITMAN, A. O.; KATZ, E.; BUCKMANN, A. F.; WILLNER, I. Integration of polyaniline/poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports: an *in situ* electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 6487-6496, 2002.

REGALADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 243-256, 2004.

ROBINSON, D. S. Peroxidase and catalases in food. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Oxidative enzymes in food**. New York: Elsevier, 1991. p.1.

RUDRA, S. G.; SHIVHARE, U. S.; BASU, S.; SARKAR, B. C. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in coriander leaves. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 187-195, 2008.

RUZGAS, R.; CSOREGI, E.; KATAKIS, I.; KENANSIS, G.; GORTON, L. Preliminary investigations of an amperometric oligosaccharide dehydrogenase-based electrode for the detection of glucose and some other low molecular weight saccharides. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 480-484, 1996.

SESSA, D. J.; ANDERSON, R. L. Soybean peroxidases: purification and some properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 29, p. 960-965, 1981.

SILVA, E.; LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. Soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1051-1056, 1990.

SOUSA, K. A. **Extração e purificação de peroxidase de soja (*Glycine max*) por adsorção de afinidade a metal imobilizado**. 2001. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y.; KIM, S-JU. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry**, v. 67, p. 219-224, 2006.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-2401, 1992.

SHIN, K. S.; KIM, C. J. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 569-572, 1998.

TATSUMI, K.; WADA, S.; ICHIKAWA, H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 126-130, 1996.

TIJSKENS, L. M. M.; RODIS, P. S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; PROXENIA, N.; VAN DIJK, C. Activity of pectin methyl esterase during blanching of peaches. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 167-177, 1999.

TOBBACK, P. Thermostability of soluble and immobilized α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 396-402, 1992.

TORASKAR, M. V.; MODI, V. V. Peroxidase and chilling injury in banana fruit. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 32, p. 1352-1354, 1984.

TSUTSUMI, C. Y. Saúde em soja. **Sapiência**: Informativo Científico da Fapepi, 2005. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br>>. Acesso em: 23 jul. 2010.

TUSELL, J. M.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; MARTÍNEZ, E.; GELPÍ, E. Comparison of high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the

analysis of indole-3-acetic acid in brain tissue. **Journal of Chromatography B: iomedical Sciences and Applications**, v. 306, p. 338-344, 1984.

VÁMOS-VIGYÁZO, L. Polifenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VIERLING, R. A.; WILCOX, J. R. Microplate assay for soybean seed coat peroxidase activity. **Seed Science & Technology**, v. 24, p. 485-494, 1996.

WANG, B.; LI, B.; WANG, Z.; XU, G.; WANG, Q.; DONG, S. J. Sol-Gel thin-film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 1935-1939, 1999.

WEISSABACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A.; UNDEFRIED, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a methods for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. **Journal of Biology Chemistry**, v. 234, p. 81-86, 1959.

WELINDER, K. G.; LARSEN, Y. B. Covalent structure of soybean seed coat peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1698, p. 121-126, 2004.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 592.

WONG, D. W. S. **Food enzyme: structure and mechanism**. New York: Chapman and Hall, 1995. p. 327-332.

WORD WIDE FUND. **Programa Agricultura e Meio Ambiente**. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.wwf.org.br>> Acesso em: 05 fevereiro 2010.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet N° 297**. 2006. Disponível em: <www.who.int/mediacenter/factsheets/fs297/en/index.html>. Acesso em: 03 out. 2007.

WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 69-79 1999.

YANG, Q.; YANG, M.; PRITSCH, K.; YEDILER, A.; HAGN, A.; ACHLOTTER, M.; KETTRUP, A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 709-713, 2003.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T. da; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C. da; SILVA, K. T. da; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 937-943, 2001.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 705-708, 2006.

9 ANEXO I