

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO COM CO<sub>2</sub> COMPRIMIDO SOBRE A  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PEROXIDASE (POD) E DA  
POLIFENOLOXIDASE (PPO) DO EXTRATO BRUTO DE ERVA-MATE  
(*Ilex paraguariensis* ST. HILL)**

**MARISTELA DOS SANTOS PRIMO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**FEVEREIRO DE 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DO PROCESSAMENTO COM CO<sub>2</sub> COMPRIMIDO SOBRE A  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PEROXIDASE (POD) E DA  
POLIFENOLOXIDASE (PPO) DO EXTRATO BRUTO DE ERVA-MATE  
(*Ilex paraguariensis* ST. HILL)**

MARISTELA DOS SANTOS PRIMO

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Débora de Oliveira, D.Sc.  
(Orientador)

---

Cláudio Dariva, D.Sc.  
(Orientador)

---

Geciane Toniazzo, D. Sc.  
(Membro)

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
(Membro)

Erechim, 24 de Fevereiro de 2006.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*Dedicatória:*

Ao meu esposo, João Ricardo e a minha filha Bruna Luiza, por todo amor, carinho, incentivo, paciência e dedicação que me proporcionaram, de forma que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus familiares, pelo amor e carinho, em especial ao meu PAI, Oswaldo, que mesmo não estando mais presente entre nós fisicamente, espiritualmente sempre me deu forças.

A todos os meus amigos pelo apoio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus orientadores Débora e Dariva, que acreditaram em mim e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela paciência, dedicação e amizade;

Ao Professor Octávio, da UFRJ, que nos auxiliou compartilhando conhecimentos que contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, pelo apoio e preocupação dispendidos na minha formação, em especial aos professores Vladimir e Helen;

À amiga Giovana pelo apoio, dedicação, parceria, carinho e amizade. Você é maravilhosa;

Às amigas Ieda, Adriana, Andresa, Clarissa e Lisandra, que sempre compartilharam comigo dos bons e maus momentos. Vocês são especiais;

Ao amigo Elton, que auxiliou principalmente na montagem e utilização do aparato experimental. A você o meu muito obrigado;

Às amigas Geci, Cacá, pelo apoio e amizade;

À Alini, da UFRJ, pela sua disposição e ajuda;

À bolsista Naiane, pela participação neste trabalho;

Aos demais colegas dos Laboratórios de Biotecnologia e de Termodinâmica, pelo apoio;

A todos os colegas de mestrado pelas horas de estudo e dificuldades que enfrentamos juntos;

Aos meus familiares, pelo amor, incentivo e dedicação, dispensados em todos os momentos;

Aos amigos que me acompanharam ao longo dessa jornada e que, mesmo sem entender nada sobre enzimas e fluido supercrítico, sempre me apoiaram;

Às amigas Cady e Tina, que estiveram comigo nestas idas e vindas de Erechim, todos os dias;

Ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim;

À URI – Campus de Erechim, pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos do programa de mestrado;

À CAPES, através do Programa PROCAD, pela concessão de bolsa;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*... "A vida é como jogar uma bola na parede:  
Se for jogada uma bola azul, ela voltará azul;  
Se for jogada uma bola verde, ela voltará verde;  
Se a bola for jogada fraca, ela voltará fraca;  
Se a bola for jogada com força, ela voltará com força.  
Por isso, nunca "jogue uma bola na vida"  
de forma que você não esteja pronto a recebê-la.  
A vida não dá nem empresta;  
não se comove nem se apieda.  
Tudo quanto ela faz é retribuir e  
transferir aquilo que nós lhe oferecemos".*

**Albert Einstein**

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**EFEITO DO PROCESSAMENTO COM CO<sub>2</sub> COMPRIMIDO SOBRE A  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PEROXIDASE (POD) E DA  
POLIFENOLOXIDASE (PPO) DO EXTRATO BRUTO DE ERVA-MATE  
(*Ilex paraguariensis* ST. HILL)**

Maristela dos Santos Primo

Fevereiro/2006

Orientadores: Cláudio Dariva  
Débora de Oliveira

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) submetido ao CO<sub>2</sub> comprimido. Através de um planejamento experimental semifatorial foram avaliados os efeitos de temperatura, tempo de exposição, densidade, pressão e taxa de despressurização na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase. O extrato bruto enzimático foi submetido à pressão em CO<sub>2</sub> comprimido sendo determinada a atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase antes e após o processamento sob pressão. Em geral, o processamento a alta pressão altera a atividade de ambas as enzimas. De acordo com os resultados obtidos, a condição experimental 1 (temperatura-30°C; pressão-70,5bar; tempo-1h; taxa de despressurização-10 Kg.m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> e densidade 0,60) apresentou um incremento em torno de 25% na atividade da peroxidase e uma perda aproximada de 50% para atividade da polifenoloxidase. A partir desta condição experimental foi determinada a estabilidade do extrato à baixa temperatura (-4 °C) e o efeito de consecutivos ciclos de pressão sobre a atividade das oxidases. Após o período de 100 dias de armazenamento a -4 °C, a peroxidase e a polifenoloxidase perderam em torno de 20% e 30% de atividade, respectivamente, em relação às originais. Ao final de 9 ciclos de

pressurização, os extratos enzimáticos apresentaram uma perda de atividade em torno de 40% para a peroxidase e 95% para a polifenoloxidase em relação às suas atividades originais. O comportamento do extrato bruto enzimático em relação à seletividade foi também avaliado em cada uma das etapas anteriores, através de uma relação entre a atividade peroxidásica e polifenoloxidásica. A análise desta relação em cada uma das etapas (avaliação da atividade enzimática em CO<sub>2</sub> pressurizado, estabilidade do extrato submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado à baixa temperatura e efeito do número de ciclos de pressão sobre a atividade das oxidases) indicou uma mudança na especificidade do extrato bruto enzimático de erva-mate, sugerindo que o processamento em CO<sub>2</sub> comprimido pode ser uma rota promissora no que tange ao aumento da especificidade de extratos enzimáticos obtidos a partir de fontes vegetais.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

## **EFFECTS OF COMPRESSED CO<sub>2</sub> PROCESSING ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF PEROXIDASE (POD) AND POLYPHENOLOXIDASE FROM MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HILL)**

Maristela dos Santos Primo

February/2006

Advisors: Cláudio Dariva  
Débora de Oliveira

The objective of the work was to evaluate the enzymatic activity of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) of the raw extract in mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* St Hill) submitted to compressed CO<sub>2</sub>. Through a semifactorial experimental planning the effects of temperature, exposure time, density, pressure and depressurization rate on the activity of the peroxidase and of the polyphenoloxidase were evaluated. The raw enzymatic extract was submitted to compressed CO<sub>2</sub>, and the activity of the peroxidase and polyphenoloxidase before and after processing under pressure was determined. In general, the high pressure processing affect the activity of both enzymes. According to the results, the experimental condition 1 (temperature-30°C; pressure-70.5bar; exposure time-1h; depressurization rate - 10 Kg.m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> and density 0.60) led to an enhancement of around 25% in the peroxidase activity and a loss of 50% in the polyphenoloxidase activity. Starting from this experimental condition, the thermal stability at low temperature (-4°C) and the effect of consecutive pressure cycles were determined. After a period of 100 days of storage at -4°C, the peroxidase and the polyphenoloxidase lost around 20% and 30%, respectively, of their activities compared to original ones. After 9 pressurization cycles, the enzymatic extracts loss around 40% for peroxidase and 95% for polyphenoloxidase in relation to their original activities. The behavior of the raw enzymatic extract in relation to the selectivity was also evaluated in each step mentioned before, by means a ratio between the peroxidasic and

polypholoxidasic activity. The analysis of this ratio indicated a change on the specificity of the raw enzymatic extract, suggesting that the processing with compressed CO<sub>2</sub> could be a promising route towards the increasing of the specificity of the enzymatic extracts from vegetable sources.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Referências Bibliográficas.....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
2.1. Erva-mate.....	8
2.2. Enzimas.....	9
2.2.1. Peroxidase (POD).....	11
2.2.2. Polifenoloxidase (PPO).....	15
2.3. Fluidos pressurizados.....	18
2.4. Enzimas em fluidos pressurizados.....	20
2.5. Parâmetros que afetam a catálise enzimática em fluidos pressurizados.....	23
2.5.1. Efeito da pressão.....	23
2.5.2. Efeito da água.....	25
2.5.3. Efeito do solvente.....	27
2.5.4. Efeito da temperatura.....	29
2.5.5. Efeito do pH.....	31
2.6. Estabilidade enzimática à baixa temperatura.....	32
2.7. Efeito dos ciclos de pressão sobre a atividade enzimática.....	33
2.8. Considerações finais.....	34
2.9. Referências Bibliográficas.....	36
<b>3. MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1. Obtenção do extrato bruto enzimático.....	47

3.2. Determinação da atividade enzimática.....	48
3.2.1. Determinação da atividade enzimática da peroxidase (POD).....	49
3.2.2. Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO).....	49
3.3. Tratamento do extrato bruto enzimático em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	50
3.3.1. Aparato experimental.....	52
3.3.2. Procedimento experimental.....	53
3.3.3. Estabilidade do extrato bruto enzimático a baixa temperatura.....	54
3.3.4. Efeito dos ciclos de pressão na atividade do extrato bruto enzimático..	55
3.4. Referências Bibliográficas.....	55
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
4.1. Resultados preliminares.....	58
4.1.1. Avaliação da especificidade da PPO do extrato enzimático de erva- mate.....	58
4.1.2. Avaliação do efeito da temperatura na atividade da POD e da PPO do extrato bruto enzimático de erva-mate em CO <sub>2</sub> comprimido.....	59
4.2. Atividade enzimática em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	61
4.2.1. pH dos extratos brutos enzimáticos de erva-mate.....	68
4.3. Estabilidade enzimática à baixa temperatura do extrato bruto enzimático após processamento em CO <sub>2</sub> presssurizado.....	69
4.4. Efeito dos ciclos de pressão.....	75
4.5. Referências Bibliográficas.....	79
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>81</b>
5.1. Conclusões finais.....	81
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Grupo prostético da enzima peroxidase (POD) denominado grupo <i>heme</i> ou grupo ferroprotoporfirina.....	13
Figura 2.2. Ciclo catalítico da heme peroxidase (POD).....	14
Figura 2.3. Reação de oxidação de compostos fenólicos por PPO, (a) atividade cresolase, (b) atividade catecolase.....	16
Figura 2.4. Grupo prostético da polifenoloxidase (PPO).....	17
Figura 2.5. Ciclo catalítico da polifenoloxidase (PPO).....	17
Figura 2.6. Diagrama de fases para o sc-CO <sub>2</sub> .....	19
Figura 3.1. Aparato Experimental.....	52
Figura 3.2. Detalhes do reator utilizado para medida da atividade enzimática de extratos brutos de erva-mate em CO <sub>2</sub> comprimido.....	53
Figura 4.1. Atividade enzimática da peroxidase do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	62
Figura 4.2. Atividade enzimática da polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	65
Figura 4.3. Relação entre a atividade enzimática POD/PPO antes e após submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	67
Figura 4.4. Estabilidade enzimática à baixa temperatura da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	71
Figura 4.5. Atividade enzimática à baixa temperatura da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	72

Figura 4.6. Relação entre a estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) do extrato bruto enzimático de POD/PPO sem ser submetido a nenhum tratamento e o extrato bruto submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	<b>73</b>
Figura 4.7. Relação entre a estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) do extrato bruto enzimático POD/POD e PPO/PPO antes e depois de submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	<b>74</b>
Figura 4.8. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização no processamento em CO <sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate.....	<b>76</b>
Figura 4.9. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização no processamento em CO <sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate.....	<b>77</b>
Figura 4.9. Relação entre a atividade peroxidásica e polifenoloxidásica POD/PPO do extrato bruto enzimático de erva-mate após ser submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Ordem de grandeza de propriedades físico-químicas do CO <sub>2</sub> comprimido .....	19
Tabela 3.1. Reagentes químicos empregados na extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate.....	48
Tabela 3.2. Matriz experimental para o estudo do comportamento da atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase em CO <sub>2</sub> pressurizado.....	51
Tabela 4.1. Atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido a 20 e 25°C.....	60
Tabela 4.2. Atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	62
Tabela 4.3. Resultados da regressão relacionados à atividade enzimática da peroxidase submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	64
Tabela 4.4. Atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	65
Tabela 4.5. Resultados da regressão relacionados à atividade enzimática da polifenoloxidase submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	66
Tabela 4.6. Resultados de pH do extrato bruto enzimático de erva-mate submetido ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	68
Tabela 4.7. Correlação entre o pH e atividade enzimática de POD e PPO após processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	69

Tabela 4.8. Estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	<b>70</b>
Tabela 4.9. Estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO <sub>2</sub> comprimido.....	<b>72</b>
Tabela 4.10. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização do processamento em CO <sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate.....	<b>75</b>
Tabela 4.11 – Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização do processamento em CO <sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate.....	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) é um importante produto natural no contexto sócio-econômico-cultural da região Sul do país. Tendo sua origem na América do Sul, a erva-mate ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai (Maccari e Santos, 2000).

O maior consumo de erva-mate se dá na forma de produtos tradicionais, como o chimarrão. Nos últimos anos têm crescido a entrada de erva-mate da Argentina, resultando em um excesso de oferta desta matéria-prima no mercado nacional, ocasionando redução de valor de mercado. Neste cenário, as indústrias ervateiras têm buscado ampliar o mercado da erva-mate através do desenvolvimento de novos produtos, como o chá mate aromatizado, o “*Mateccino*”, que consiste em um achocolatado de mate, e balas duras (Valduga, 2002). Recentemente, iniciou-se a demanda da matéria-prima para indústrias químicas e farmacêuticas, com interesse na produção de produtos de higiene e beleza (Mosele, 2002).

Na erva-mate podem ser encontradas enzimas oxidativas, que foram identificadas por Senglet em 1928, como sendo a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO). Esta última está associada ao escurecimento enzimático decorrente da ação da mesma que utiliza compostos fenólicos como substratos. A intensidade deste efeito pode ser variável durante o crescimento, desenvolvimento e maturação dos frutos (Silva, 2000). A peroxidase (E.C. 1.11.1.7), por sua vez, tem seu papel no escurecimento enzimático limitado pela disponibilidade de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Geralmente, ela incrementa a degradação de fenóis, quando a PPO está presente, gerando o  $H_2O_2$  para sua ação. Além disso, as quinonas formadas podem se constituir em substratos para a POD (Robards et al., 1999).

A polifenoloxidase se associa a dois tipos de reações seqüenciais. Na primeira, as enzimas, denominadas monofenol mono-oxigenases (E.C. 1.14.18.1), hidroxilam um monofenol para formar um o-difenol (atividade *cresolase*) incolor. A reação seguinte, referida como atividade *catecolase* (E.C. 1.10.3.1), é a oxidação do o-difenol em compostos de cor ligeiramente amarela, as o-quinonas. As quinonas, por sua vez, sofrem reações secundárias, enzimáticas ou não, formando os pigmentos marrons característicos do fenômeno (Murata et al., 1995; Silva, 2000).

Considerando a presença das enzimas peroxidase e polifenoloxidase na erva-mate, vislumbra-se a possibilidade de extração destas enzimas oxidativas que apresentam potencial de aplicação tecnológica. Apesar da procura por fontes alternativas de enzimas ser bem explorada por pesquisas científicas e da importância da erva-mate no contexto sócio-econômico da região, pouco se conhece sobre as enzimas oxidativas presentes na erva-mate. Alguns trabalhos da literatura indicam uma tendência recente da utilização de tecidos e/ou extratos brutos, em substituição às enzimas purificadas, na confecção de biossensores e/ou procedimentos de análise, pois são extremamente econômicos e geralmente possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas (Panek, 1955; Vieira et al., 2003). Apesar deste cenário, ainda são poucos os métodos enzimáticos descritos na literatura que empregam extrato bruto de tecidos vegetais.

Atualmente, a biocatálise (aplicação de enzimas em síntese) representa uma alternativa viável em síntese orgânica para a chamada “química ecologicamente correta” (*green chemistry*), principalmente pelo controle ambiental (Desantis e Jones, 1999). Os métodos enzimáticos convencionais têm sido empregados em meio aquoso principalmente devido à idéia preconcebida de que este é um bom ambiente para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa. Por outro lado, muitas enzimas (ou complexos multienzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais (Borgstrom e Brockman, 1984) com eficiência similar àquela em soluções aquosas ou, em certos casos, até superior. Em sentido estrito, podem ser considerados como ambientes não-aquosos os solventes orgânicos (Laane et al., 1987; Grunwald et al., 1986), os fluidos supercríticos (Kvittingen, 1994), os gases (Kamat et al., 1993) e os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solvente (Lamare e Legoy, 1993).

Em se tratando de reações de biotransformação, acredita-se que as características do solvente podem desempenhar um papel central em termos de rendimento e qualidade dos produtos obtidos, se for levado em conta a atividade da enzima em função das condições operacionais e propriedades físico-químicas dos solventes. Em se tratando de solventes comprimidos, há de se considerar também a perda ou ganho da atividade enzimática devido à pressão de operação (Stradi et al., 1998).

Trabalhos pioneiros como os de Randolph et al. (1985); Hammond et al. (1985) e Nakamura et al. (1985), mostraram a importância de estudar a atividade e a estabilidade de enzimas em meios alternativos. O que motivou a realização destes trabalhos foi o fato de que as enzimas podem reter sua atividade e estabilidade em meios não-aquosos.

Conseqüentemente, elas podem ser usadas para catalisar reações em solventes orgânicos e outros meios não convencionais.

O emprego de gases pressurizados como solvente é bastante recente na área de biotecnologia. A catálise enzimática em CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta interesse particular para indústrias farmacêuticas e de alimentos, pois o CO<sub>2</sub> é um solvente atóxico, não inflamável e de baixo custo. Além disso, sua temperatura crítica (31,4°C) é suficientemente baixa para o processamento de materiais termolábeis e condiz com as temperaturas ótimas típicas para reações enzimáticas (Sivik e Gunnlaugsdottir, 1995). Outras vantagens do uso de enzimas em fluidos pressurizados incluem a facilidade de separação e qualidade do produto final; o aumento das taxas de reação no estado supercrítico devido às propriedades favoráveis de transferência de massa dos solventes nestas condições; a possibilidade do emprego de temperaturas amenas; em geral, a termoestabilidade de biomoléculas em fluidos pressurizados é maior do que na água; existe a facilidade de reciclagem do solvente (Kamat et al., 1995), além, é claro, de aspectos ambientais positivos.

Vários autores tentaram desvendar o mecanismo detalhado do comportamento de enzimas em solventes pressurizados, porém resultados contraditórios são muitas vezes encontrados. Alguns apontam que enzimas perdem sua atividade durante a reação por causa da pressurização, outros alegam que é o passo de despressurização o fator relevante na perda de atividade das enzimas (Oliveira, 1999). Outros trabalhos apontam para o incremento da atividade de enzimas quando submetidas ao processamento com fluidos pressurizados sub ou supercríticos (Fricks et al., 2006; Oliveira et al., 2006).

Considerando o apelo e importância sócio-econômica e cultural da erva-mate para a Região Sul do Brasil e em particular para o Rio Grande do Sul; o pouco conhecimento sobre as enzimas POD e PPO da erva-mate; a atualidade e relevância do estudo de meios enzimáticos em fluidos comprimidos e a lacuna existente no que concerne ao comportamento da atividade e estabilidade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato enzimático bruto de erva-mate frente a um fluido pressurizado, despertou-se interesse em investigar a influência de variáveis operacionais sobre a atividade e estabilidade de tais enzimas da erva-mate quando submetidas ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido. Busca-se, neste trabalho, obter informações que contribuam para aplicação dessas enzimas em diversas áreas, como por exemplo, no tratamento de efluentes para a oxidação de compostos fenólicos, no desenvolvimento de biossensores analíticos e em reações de oxidação empregando fluidos pressurizados como solventes.

Dentro deste contexto, buscando subsídios à utilização destes biocatalisadores na realização de reações de oxidação, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar a atividade e estabilidade das oxidases, peroxidase e polifenoloxidase, do extrato bruto de erva-mate quando submetidas ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido. Como objetivos específicos do trabalho ressalta-se:

- Identificar o tipo de atividade específica que caracteriza a polifenoloxidase da erva-mate;
- Verificar o efeito das variáveis temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de depressurização sobre a atividade e especificidade das oxidases da erva-mate;
- Avaliar a estabilidade à baixa temperatura do complexo enzimático a baixa pressão após seu processamento em dióxido de carbono pressurizado;
- Verificar o efeito causado por ciclos subseqüentes de pressão sobre a atividade das enzimas oxidativas da erva-mate.

Neste sentido, este trabalho foi dividido em capítulos, sendo que no Capítulo 2 do presente trabalho é apresentada uma revisão bibliográfica de forma a oferecer embasamento referente ao tema abordado. O Capítulo 3 é focado na descrição da metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho. No Capítulo 4 são relatados e discutidos os resultados obtidos nos experimentos, enquanto que no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões e algumas sugestões para trabalhos futuros.

## 1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Elsevier. Amsterdam, 1984.

DESANTIS, G.; JONES, J. B. **Towards understanding and tailoring the specificity of synthetically useful enzymes**. *Acc. Chem. Res.*, 32, 99-107, 1999.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide**. *Journal of Supercritical Fluids*, 2006, in press.

GRUNWALD, J.; WIRZ, B.; SCOLLAR, M.; KLIBANOV, A.M. **Asymmetric Oxidoreductions Catalyzed by Alcohol Dehydrogenase in Organic Solvents.** Journal of American Chemical Society 108, 6732-6734, 1986.

HAMMOND, D.A.; KAREL, M.; KLIBANOV, A.M. **Enzymatic reactions in supercritical gases.** Applied Biochemistry Biotechnology, 11, 393, 1985.

KAMAT, S.V.; IWASKEWYCZ, B.; BECKMANN, E. J.; RUSSELL. **Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Supercritical Fluids: Tuning Enzyme Activity by Changing Pressure.** National Academy of Sciences. U.S.A., 90, 2940-2944, 1993.

KAMAT, S.V.; BECKMAN, E.J.; RUSSEL, A.J. **Enzyme activity in supercritical fluids.** Critical Reviews in Biotechnology, 15, 41-71, 1995.

KVITTINGEN, L. **For general discussions on the effect of organic solvents upon enzymatic reactions.** Tetrahedron, 50, 8253-8274, 1994.

LAANE, C.; TRAMPER, J. e LILLY, M.D. **Biocatalysis in Organic Media.** Elsevier. Amsterdam, 1987.

LAMARE, S.; LEGOY, M.D. **Biocatalysis in the gas phase.** Tibtech, 11, 413-418, 1993.

MACCARI, A. J.; SANTOS, A. P. R. **Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate.** MCT/CNPq/PADCT. Curitiba, PR, 2000.

MOSELE, S.H. **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense.** Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 211p. Porto Alegre, 2002.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S.; KANEKO, K. **Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Columbus, 43, 5, 1115-1121, 1995.

NAKAMURA, K., CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. **Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide.** Chemical Engineering Community, 45, 207, 1985.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico.** Tese de D. Sc. Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A.G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase.** Journal of Molecular Catalysis Enzymatic, 2006, in press.

PANEK, A.D. **Dosagem da peroxidase nas folhas de mate.** Boletim do Instituto de Química Agrícola, 39, 7-12, 1955.

RANDOLPH, T.W.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, C.R.; WILKE, C.R. **Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid.** Biotechnology Letters, 7, 5, 325-328, 1985.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. **Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.** Food Chemistry, Oxford, 66, 4, 401-436, 1999.

SILVA, E.M. **Mecanismos bioquímicos de fisiopatias importantes de frutas.** In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE TECNOLOGIA POSTCOSECHA Y AGROEXPORTACIONES. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 5-19, 2000.

SIVIK, B.; GUNNLAUGSDOTTIR, H. **Lipase catalysed alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide.** Journal of the American Oil Chemists Society, 72, 399-405, 1995.

STRADI, B.A.; KOHN, J.P.; STADTHERR, M. A.; BRENNECKE, J. F. **Phase Behavior of reactants, products and catalysts involved in the allylic Epoxidation of trans-2-Hexen-1-ol to (2R,3R)-(+)-3-Propyloxiranemethanol in high pressure carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids, 12, 2, 109-122, 1998.

VALDUGA, A. T. **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate).** Tese de Doutorado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos, 216p, 2002.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*)**. Química Nova, 26, 1, 39- 43, 2003.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta uma breve explanação sobre o contexto no qual o trabalho se insere, sendo apresentada, inicialmente, a contextualização da erva-mate no cenário sócio-econômico-cultural nacional. A seguir, especificamente de interesse para o desenvolvimento deste trabalho, será apresentada uma visão geral sobre as enzimas peroxidase e polifenoloxidase, evidenciando suas características. Para finalizar o capítulo, aborda-se o efeito do processamento em fluidos pressurizados sobre a atividade de enzimas e extratos enzimáticos.

### 2.1. ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) pertence à família *Aquifoliaceae*, sendo classificada pelo naturalista francês August de Saint Hillaire e publicada em 1822, nas memórias do Museu de História Natural de Paris (Mazuchowski, 1991).

A ocorrência natural da erva-mate tem sua área restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina. A espécie pode ocorrer em pontos isolados, fora destes limites, como em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul (Andrade, 1999; Mosele, 2002; IBGE). O Rio Grande do Sul possui uma área de 44.910 ha de erva-mate plantada, sendo que, em 2002, a mesoregião noroeste, onde está inserido o município de Erechim, possuía 20% do total nacional (IBGE). Por outro lado, o Rio Grande do Sul é importador de matéria-prima, especialmente erva-mate nativa dos estados de Santa Catarina e Paraná (Mosele, 2002).

A erva-mate, através de sua infusão em cuias de madeira ou porongo (Nietsche et al., 2000), é a sua forma mais difundida de consumo, denominada de chimarrão, sendo considerada uma bebida estimulante que elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental. Por possuir vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral; e com as vitaminas C e E, age como defesa orgânica beneficiando os tecidos do organismo. A presença de sais minerais, juntamente com a cafeína, estimula o trabalho cardíaco ajudando na circulação do sangue e diminuindo a tensão arterial, seu efeito estimulante é mais prolongado do que o do café, porém, não deixando efeitos colaterais ou residuais como irritabilidade e insônia. Em algumas situações,

o uso de mate também pode suprir a sensação de fome (Bassini e Campos, 1997). O mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestivo, facilitando a digestão e favorecendo a evacuação e a micção. Pesquisas do Instituto Pasteur de Paris atribuem também ao mate um papel importante no processo de regeneração celular (Andrade, 1999; Valduga, 1994).

As investigações químicas relativas à erva-mate iniciaram-se por Trommsdorff em 1836, constatando a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante amarela, ácido tânico, etc. A identificação do principal alcalóide, a cafeína, ocorreu em 1843 por Stenhouse. Em 1848 Rochleder, estudando o mate do Paraguai, identificou no mate o ácido café-tânico, já conhecido das sementes do café (Andrade, 1999).

Em 1944 Veronese identificou, como constituintes da erva mate, os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resina aromática (formada por uma mistura de oleína, palmitina, lauro-estearina e um óleo cujas características muito se aproximam da cumarina), legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colessterina e óleo essencial. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos fosfórico, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico (Andrade, 1999; Valduga, 1994).

Senglet, em 1928, encontrou na erva-mate enzimas oxidativas, que foram identificadas como sendo a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO). Estas enzimas estão associadas ao escurecimento enzimático, decorrente da ação das mesmas que utilizam compostos fenólicos como substratos (Robards et al., 1999). A intensidade deste efeito pode ser variável durante o crescimento, desenvolvimento e maturação dos frutos (Silva, 2000).

## **2.2. ENZIMAS**

As enzimas, como proteínas biologicamente ativas, são responsáveis pela catálise de diversas reações. Em uma proteína enzimática, existe um certo domínio chamado de "sítio ativo" que se liga ao substrato - a molécula reagente - e diminui a energia do estado de transição que leva ao produto desejado. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é

extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu "encaixe" com a proteína. Por isso esta relação tem sido chamada de "lock'n'key", ou seja, chave-fechadura. Como catalisadores biológicos, as enzimas estão sujeitas às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a posição final de equilíbrio entre o substrato e o produto (Wiseman, 1991).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas e estas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias ou das formas de vida mais evoluídas, são construídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, unidos covalentemente em seqüências características. Esta seqüência apresenta quatro níveis de estruturas. A estrutura primária, que determina a forma e a função da proteína, é somente uma seqüência dos aminoácidos, sem levar em conta a orientação espacial da molécula, dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. A estrutura secundária é função dos ângulos formados pelas ligações peptídicas que ligam os aminoácidos. A conformação espacial é mantida graças às interações intermoleculares (pontes de hidrogênio) entre os hidrogênios dos grupos amino e os átomos de oxigênio dos outros aminoácidos. Em geral, estas ligações forçam a proteína a assumir uma forma helicoidal, como uma corda enrolada em torno de um tubo imaginário. Esta forma, a mais comum, é chamada de  $\alpha$ -hélices. A estrutura terciária relaciona-se com as dobraduras da cadeia protéica sobre ela mesma. É a conformação espacial da proteína como um todo, e não de determinados segmentos particulares da cadeia protéica. A forma das proteínas está relacionada com sua estrutura terciária. O que determina a estrutura terciária são as cadeias laterais dos aminoácidos; algumas cadeias são tão longas e hidrofóbicas que perturbam a estrutura secundária helicoidal, provocando a dobra da proteína. Muitas vezes, as partes hidrofóbicas da proteína agrupam-se no interior da proteína dobrada, longe da água e dos íons do ambiente onde a proteína se encontra, deixando as partes hidrofílicas expostas na superfície da estrutura da proteína. Regiões como "sítios ativos", "sítios regulatórios" e módulos são propriedades da estrutura terciária. Existe, finalmente, a estrutura quaternária, que se refere à conformação espacial das subunidades. Esta estrutura é mantida pelas mesmas forças que determinam as estruturas secundárias e terciárias (Lehninger et al., 1995).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade

da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (Lima et al., 2001).

Segundo Scriban (1985), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária ou quaternária. Nessas condições, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, modificação do pH, pressão), alterando a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento. Existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operação bem definidas. A variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De fato, na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta, sobretudo, é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico.

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Internacional Union of Biochemistry) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto em condições de ensaio definidas (Lima et al., 2001).

### **2.2.1. Peroxidase (PDO)**

A peroxidase (E.C. 1.11.1.7) é encontrada em tecidos de vegetais e animais. Schönbein, em 1855, usando extratos de plantas com peróxido de hidrogênio e guaiacol observou que um composto de coloração intensa era formado. Linossier, em 1898, isolou esta enzima e a chamou de peroxidase (Campa, 1991; Burnette, 1977). É uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e regulação da alongação de células, entre outras (Kao et al., 1997).

Peroxidasas são enzimas que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de um variado grupo de compostos orgânicos e inorgânicos, como monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis, entre outros (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Estas enzimas têm sido isoladas de diversos organismos e a grande maioria apresenta a protoporfina IX (grupos heme) como grupo prostético (Conesa et al., 2002).

São encontradas em múltiplas isoformas na maioria das espécies de frutas e vegetais, sendo relacionada com alterações no *flavor*, textura e cor durante o armazenamento e decomposição das mesmas (Hamed et al, 1998; Duarte-Vázquez et al., 2000). É conhecida como uma enzima termoestável, uma vez que pode ter sua atividade regenerada após o tratamento térmico (Banci, 1997; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

As peroxidases podem ser classificadas de acordo com a superfamília a que pertencem: a superfamília das peroxidases de mamíferos, que incluem enzimas como as lactoperoxidasas e as mieloperoxidasas; e a superfamília das peroxidases de vegetais. As peroxidases de origem vegetal apresentam uma relação evolutiva e foram divididas em três classes:

- Classe I: peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura (CCP), cloroperoxidase (CPO) e citosol ascorbato peroxidase (CAP);
- Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares, tais como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* e outras peroxidases que degradam ligninas obtidas a partir de basidiomicetos;
- Classe III: peroxidases vegetais extracelulares tais como a peroxidase de raiz forte (HRP–horseradish peroxidase).

As peroxidases das classes II e III contêm sinal peptídico, pontes dissulfeto e cálcio estrutural. Para quase todas as peroxidases vegetais conhecidas, o grupo prostético é o Ferroprotoporfirina IX. Quando o grupo prostético Ferroprotoporfirina IX contém ferro (III), é um exemplo de *hemin*, ao passo que contendo ferro (II), é um *heme*. Contudo, existe ao menos cinco diferentes estados de oxidação do grupo prostético de uma peroxidase, sendo assim é mais simples usar o nome heme, independente do seu estado de oxidação. Como pode ser observado através do grupo prostético apresentado na Figura 2.1, heme peroxidase é caracterizada por um átomo de ferro (III) centralizado e pentacoordenado, ligado por quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos (posições I, II, III e IV), a posição V está localizada na face proximal do heme e é normalmente ocupada por uma cadeia lateral imidazólica de um resíduo de histidina. A posição VI na enzima nativa em repouso

está livre e localizada sobre a face distal do heme, a qual está axial ao ferro e determina um estado de alto spin para o ferro. A cavidade distal é a região na qual muitas reações de peroxidase ocorrem (Dunford, 1999). Possui ainda oito cadeias laterais dos quais quatro são grupos metil (posições 1, 3, 5 e 8), dois grupos vinil (posições 2 e 4) e dois grupos propionato (posições 6 e 7).

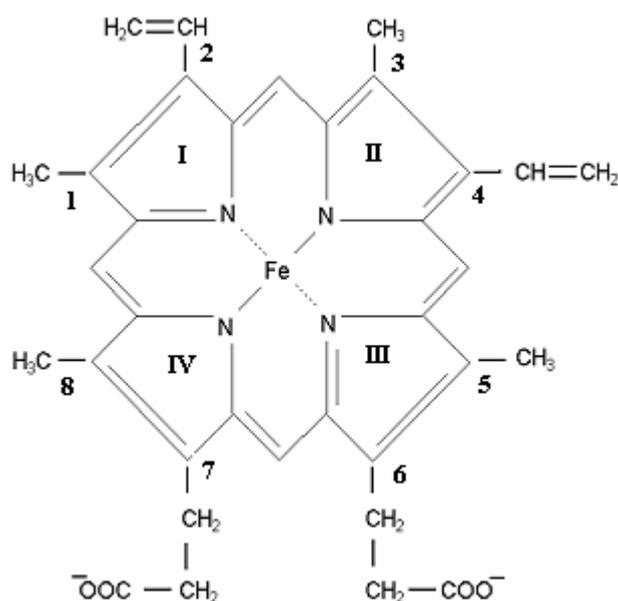


Figura 2.1. Grupo prostético da enzima peroxidase (POD) denominado grupo *heme* ou grupo ferroprotoporfirina.

O sítio catalítico da heme peroxidase (Figura 2.2) possui um átomo de ferro, que no estado fundamental apresenta número de oxidação  $+3$  (1). O ciclo catalítico se inicia com o peróxido se decompondo gerando água (2) e oxidando o  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{4+}$  (3) formando o complexo porfirina-Ferro-OXO ( $\text{Fe}=\text{O}$ ), denominado de composto I, representado por  $[\text{Fe}(\text{IV}^+)=\text{O}]$ , o qual transfere o átomo de oxigênio para o substrato (b). O composto I de peroxidases oxida uma grande variedade de substratos através de duas oxidações seqüenciais “um-elétron”, formando primeiro o intermediário composto II (a) reduzido e, então, o estado férrico fundamental (1) (Du e Loew, 1992). Se a seqüência prosseguir sem oxidar o substrato, então o oxigênio que forma o complexo Fe-oxeno (a) é reduzido gerando o composto II. Nestas condições, uma nova redução é iminente à geração de uma molécula de água, reduzindo o estado de  $\text{Fe}^{4+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  (1) (Velde et al., 2001).

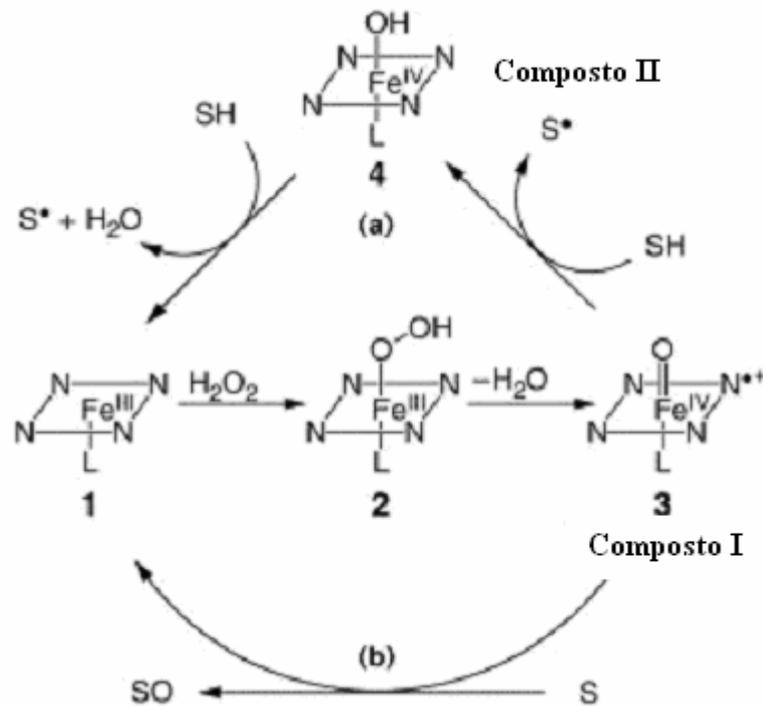


Figura 2.2. Ciclo catalítico da heme peroxidase (POD).

A peroxidase possui habilidade de causar mudanças indesejáveis, como o desenvolvimento de sabor desagradável, alteração da cor e textura e/ou redução do valor nutricional. Em contrapartida, com o desejável escurecimento obtido pela formação de compostos escuros em produtos como chá preto, apresenta também aplicações de interesse na indústria alimentícia (Duarte-Vázquez et al., 2000).

Comercialmente, as peroxidases vêm sendo amplamente utilizadas como um importante componente em processos biotecnológicos (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Vieira et al. (2003) desenvolveram um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinhas para determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos, que apresentou bom desempenho analítico e tempo de vida superior aos biossensores de pasta de carbono usando peroxidase purificada. São utilizadas, também, como enzimas indicadoras em imunoenaios enzimáticos no processamento de alimentos (Liu et al., 1999).

Na indústria de papel e celulose é empregada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em detergentes de lavanderias e inibir a transferência de cor durante a

lavagem. Na oxidação de compostos fenólicos em efluente de refinaria de petróleo apresentou uma eficiência de oxidação de pelo menos 95% dos compostos (Wilberg, 2003).

### 2.2.2. Polifenoloxidase (PPO)

Em 1895, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina. Em 1896 foi atribuído o nome de tirosinase à enzima presente no cogumelo. Atualmente, a enzima é denominada polifenoloxidase, designação mais precisa do substrato sensível à sua ação, sendo também conhecida como tirosinase, cresolase, catecolase, difenolase e fenolase (Chlamtac, 1955; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

Com isso, uma confusão com respeito à nomenclatura surgiu, em grande parte devido à ocorrência de duas atividades catalíticas distintas. A IUBAC redefiniu recentemente as duas atividades catalíticas: (I) E.C. 1.14.18.1 (monofenol mono-oxigenase; também chamada de cresolase ou monofenolase) que catalisa a *o*-hidroxilação de monofenóis para *o*-difenol; (II) E.C. 1.10.3.1 (oxidação do *o*-difenol para *o*-quinona, também chamada de catecolase ou difenolase). Por razões históricas, o termo tirosinase é freqüentemente usado como um termo genérico para polifenoloxidases. A dupla atividade catalítica da tirosinase conduziu à discordância sobre se ambas as reações acontecem no mesmo local ativo (Mayer e Harel, 1979). Porém, estudos estabeleceram que ambas utilizam-se do mesmo substrato para um único local ativo, embora os monofenóis se liguem a um único dos dois íons cobre presentes neste local (Lerch, 1981).

Existem duas diferentes reações catalisadas pela enzima: atividade cresolase (a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis) e atividade catecolase (a oxidação de *o*-difenóis para *o*-quinonas), ambas envolvendo oxigênio molecular, sendo demonstradas na Figura 2.3 (Pérez-Gilabert e Carmona, 2000). O escurecimento enzimático de vegetais e frutas, quando cortados e expostos ao ar, ocorre devido à polimerização das *o*-quinonas, originando as melanoidinas (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

Nos tecidos vegetais, a enzima PPO está localizada nos cloroplastos (Van Gelder *et al.*, 1997) e sua atividade no tecido vegetal depende do local do plantio, período da colheita, espécie e do estado de amadurecimento deste, sendo menor em frutos ou vegetais não-amadurecidos (Dawson e Tarpley, 1951; Dawson e Magee, 1955).

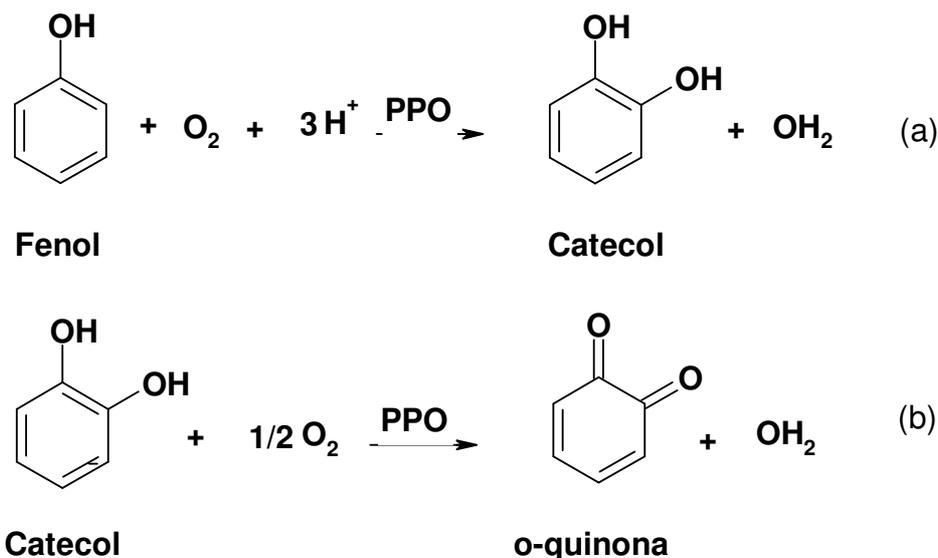


Figura 2.3. Reação de oxidação de compostos fenólicos por PPO, (a) atividade cresolase, (b) atividade catecolase.

A polifenoloxidase é uma enzima que contém dois íons  $Cu^{+2}$  no seu sítio ativo (Figura 2.4). A massa molar das polifenoloxidases varia de 57 a 62 kDa, com exceção da PPO do cogumelo que apresenta 128 kDa, possuindo duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada onde estão os sítios ativos, e duas menores com 13 kDa cada (Araújo, 1995).

Não há uma elucidação completa da estrutura para as polifenoloxidases. As dificuldades inerentes à purificação e à multiplicidade que elas exibem contribuem para a falta de progresso em definir a estrutura dessa proteína. Na ausência de cristais suficientemente puros para análise cristalográfica (Raio-X), a estrutura sólida das proteínas permanece indefinida (Burton, 1994).

Intensas investigações foram realizadas no sentido de identificar o local do cobre binuclear presente nas proteínas do grupo das oxidases, da qual fazem parte as polifenoloxidases. Estas proteínas são caracterizadas por dois íons cobre, acoplados anti-ferromagneticamente situados próximo ao sítio ativo, capazes de se ligar ao dioxigênio para formar um complexo dioxigênio-dicobre (II). Um mecanismo proposto para explicar a atividade da tirosinase (Solomon e Lowery, 1993) baseado nestas considerações, é mostrado na Figura 2.5. O substrato fenólico coordenaria inicialmente a partir da posição axial e a densidade do elétron é doada do substrato no orbital molecular não ocupado da unidade 5 do oxi-dicobre, que são ligadas às ligações oxigênio-oxigênio e cobre-oxigênio (1). Esta etapa inicia a transferência de oxigênio à posição orto do anel fenil, resultando na

formação do catecol ligado 6 (2). A transferência do elétron do catecol aos átomos de cobre gera o sítio deoxi e libera a o-quinona (3).

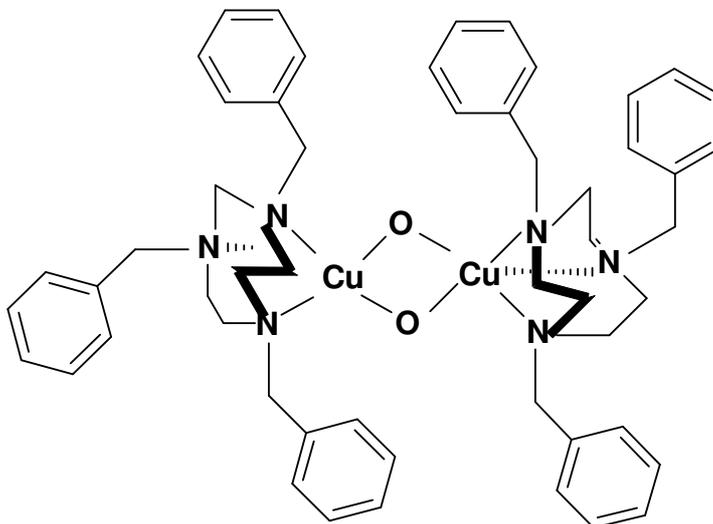


Figura 2.4. Grupo prostético da polifenoloxidase (PPO).

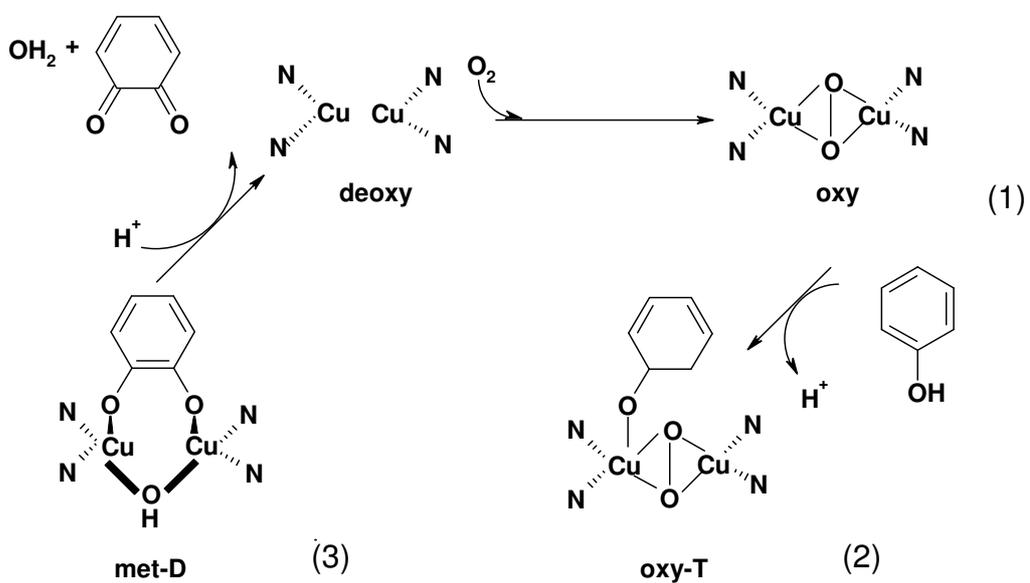


Figura 2.5. Ciclo catalítico da polifenoloxidase (PPO).

Quanto às aplicações das polifenoloxidasas, muitas pesquisas têm sido realizadas com a sua utilização em biossensores para quantificação de compostos fenólicos (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Lupetti et al. (2003) desenvolveram um sistema para determinação de dopamina em amostras farmacêuticas, utilizando extrato bruto de polifenoloxidase de abacate. Os resultados obtidos com o sistema são semelhantes, com 95% de confiança, aos resultados obtidos com o método padrão determinado pela Farmacopéia Brasileira, apresentando boa repetibilidade.

### 2.3. FLUIDOS PRESSURIZADOS

A concepção de fluido supercrítico faz referência a um estado da matéria em que o composto se comporta como um fluido, pois apresenta propriedades intermediárias entre a de um gás e de um líquido e também se refere ao fato de uma substância se encontrar em uma condição de temperatura e pressão acima dos valores críticos. No ponto crítico, as fases gasosa e líquida tornam-se idênticas, isto é, só uma fase existe (Almeida Filho, 2003).

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor, característica do estado supercrítico, ocorre de uma forma extremamente vantajosa para a utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. Os FSC possuem densidades próximas a dos líquidos, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC meios bastante interessantes para reações químicas (Oliveira, 1999).

A aplicação de solvente pressurizados em condições supercríticas é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam, de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHugh e Krukoni, 1994). Cabe ressaltar que o processamento com fluidos pressurizados em geral implica no uso de altas pressões. Quando o fluido empregado para gerar ou transmitir pressão é a água (temperatura crítica de 374 °C e pressão crítica de 220 bar), a literatura normalmente trata tal abordagem como pressão hidrostática e, para este caso, pressões compreendidas entre 1000 e 10000 bar são corriqueiramente empregadas (Daoudi, 2004). Recentemente, fluidos alternativos como o propano e n-butano vêm sendo

utilizados em processamentos a alta pressão (Lanza et al., 2004; Oliveira et al., 2006a; Oliveira et al., 2006b).

Dentre os vários fluidos pressurizados empregados no estado sub ou supercrítico, o dióxido de carbono é o mais utilizado em reações enzimáticas devido à adequação de seus parâmetros críticos para a faixa de operação ótima de enzimas (Tabela 2.1) e o seu baixo impacto ambiental. A catálise enzimática em CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta interesse particular para indústrias farmacêuticas e de alimentos, pois o CO<sub>2</sub> é um solvente atóxico, não inflamável, relativamente inerte, abundante, de baixo custo e elimina a possibilidade de deixar resíduos tóxicos de solventes orgânicos. Além disso, sua temperatura crítica (Figura 2.6) é suficientemente baixa para o processamento de materiais termolábeis e condiz com as temperaturas ótimas típicas para reações enzimáticas (Beckman, 2003).

Tabela 2.1. Ordem de grandeza de propriedades físico-químicas do CO<sub>2</sub> comprimido.

Estado	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)	Difusividade (cm <sup>2</sup> /s)
Gás	$2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$
FSC	0,5	$0,2-1,2 \times 10^{-1}$	$10^{-4}$
Líquido	1,0	1,0	$10^{-6}$

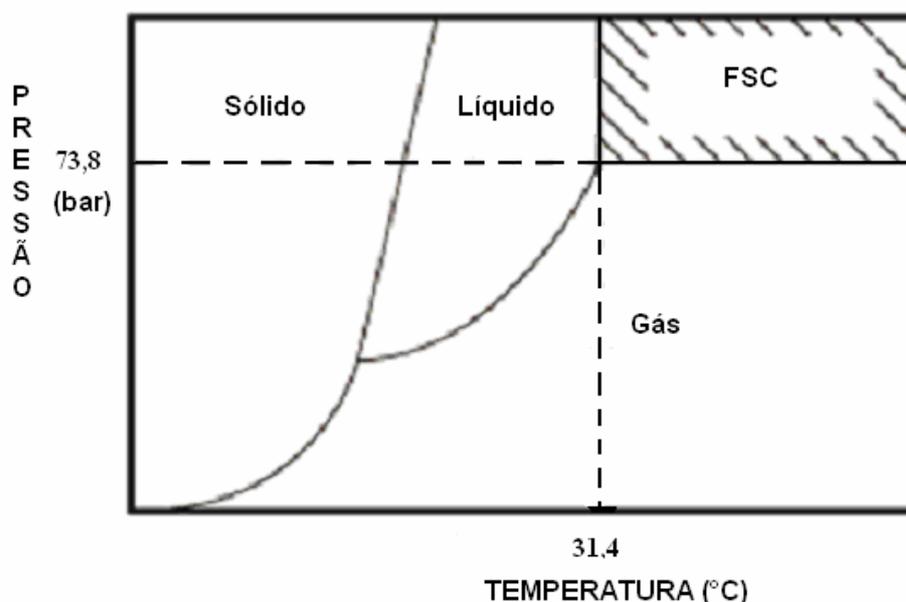


Figura 2.6. Diagrama de fases para o SC-CO<sub>2</sub>.

Outras vantagens do uso de enzimas em fluidos pressurizados incluem: a facilidade de separação e qualidade do produto; o aumento das taxas de reação no estado supercrítico devido à combinação de propriedades como a difusão e a viscosidade e a termoestabilidade de biomoléculas em fluidos pressurizados é maior que na água; existe a possibilidade de reciclagem do solvente (Kamat et al., 1995), além de aspectos ambientais positivos.

#### **2.4. ENZIMAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS**

Trabalhos pioneiros como os de Randolph et al. (1985); Hammond et al. (1985) e Nakamura et al. (1985), mostraram a relevância de estudar a atividade e a estabilidade de enzimas em meios alternativos. O que motivou a realização destes trabalhos foi o fato de que as enzimas podem reter sua atividade e estabilidade em meios não aquosos. Conseqüentemente, elas podem ser usadas para catalisar reações em solventes orgânicos e outros meios não convencionais.

Assim, como no processo de extração, os principais atrativos do uso de fluidos supercríticos como meios para reações enzimáticas incluem sua maior difusividade (Russel e Beckman, 1991) e menor viscosidade que a dos solventes líquidos, redução do impacto ambiental, suas propriedades de solvente dependentes da pressão e temperatura próximas do ponto crítico e a simplificação potencial das etapas de separação e recuperação. O uso de fluidos supercríticos como solventes em reações enzimáticas, além das vantagens já citadas, permite, também, o controle das variáveis que conduzem a reação, regeneração do catalisador, controle da taxa de reação e controle da distribuição do produto (Oliveira, 1999).

O uso de solventes não aquosos para reações enzimáticas é atrativo por várias razões. Uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima, similares àquelas de seu meio nativo e, então, mostrar atividade maior quando comparada à água. Os substratos podem, também, ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente. Os fluidos supercríticos começaram, então, a ser considerados como meio potencial para a catálise enzimática (Oliveira, 1999).

Em estudos de processamento hidrostático, o trabalho realizado por Seyderhelm et al. (1996) observaram o efeito da alta pressão sobre algumas enzimas em tampão fosfato, sendo que a sensibilidade à pressão em ordem ascendente foi: lipoxigenase,

lactoperoxidase, pectinesterase, lipase, fosfatase, catalase, polifenoloxidase e peroxidase. Os autores observaram também que o aumento da temperatura induziu a uma maior inativação dessas enzimas.

Em se tratando de pressão hidrostática, muitos estudos foram realizados em relação às oxidases, em especial a peroxidase e a polifenoloxidase. A peroxidase (POD) é uma das enzimas de origem vegetal, mais resistentes ao processamento térmico e tem se mostrado bastante resistente à pressão. Para vagens, um tratamento de 9000 bar por 10min à temperatura ambiente foi necessário para causar uma redução de 88% na atividade da POD (Hendrickx et al., 1998). À temperatura ambiente, a atividade da POD de laranja diminui continuamente até 4000 bar (tempo de processo de 15min); a maior taxa de inativação (50%) foi obtida a 32°C. Processamentos sob pressão inferiores 3000 bar e temperaturas em torno de 32°C aumentaram a atividade de POD no suco de laranja, enquanto que pressões superiores e temperaturas relativamente elevadas (>60°C) inativaram a POD (Cano et al., 1997). Anese et al. (1995) observaram que a peroxidase é muito resistente a pressões menores de 9000 bar aplicados durante 1 min, e mostra uma ativação durante o processamento entre 3000 e 5000 bar.

A polifenoloxidase (PPO) de cogumelo e de batata tem se mostrado altamente estável à pressão, sendo necessários tratamentos entre 8000 e 9000 bar para a redução da atividade (Gomes e Ledward, 1996). Por outro lado, as PPO de damasco, morango e uva parecem ser mais sensíveis à pressão, podendo ser inativadas por pressões próximas a 1000, 4000 e 6000 bar, respectivamente (Amati et al., 1996). A inativação da PPO de banana, uva, abacate e pera à temperatura ambiente foi intensa a 6000, 7000, 8000 e 9000 bar, respectivamente. Já a atividade da PPO da cebola mostrou um aumento de 30% depois do tratamento a 6000 bar durante 10 min à temperatura ambiente (Butz et al., 1994). A PPO do suco de uva branca foi parcialmente inativada por tratamento a pressões entre 3000 e 6000 bar (Castellari et al., 1997). Estudos mostram que a PPO é uma enzima difícil de inativar por completo à temperatura ambiente. Segundo Eshtiaghi et al. (1994) só um tratamento de 9000 bar a 45°C por 30 min poderia inativar por completo a PPO de batata em tampão fosfato pH 7,0.

O efeito da pressão hidrostática em três importantes enzimas a  $\beta$ -glucosidase, a peroxidase e a polifenoloxidase, de framboesa vermelha e morango foram estudadas por Garcia-Palazon et al. (2004). Amostras das frutas foram pressurizadas entre 4000, 6000 e 8000 bar por 5, 10 e 15 min a uma temperatura controlada entre 18 e 22°C. A  $\beta$ -glucosidase

de framboesa vermelha apresentou uma perda de 10% na atividade após submetida a uma pressão de 6000 e 8000 bar por 15 min, uma perda de 5% quando a pressão era de 4000 bar entre 10 e 15 min e um aumento de 2% na atividade quando submetida à pressão de 4000 bar por 5 min. Já a  $\beta$ -glucosidase de morango apresentou um aumento de 76% na atividade quando submetida à pressão de 4000 bar por 15 min. Para as pressões de 6000 e 8000 bar, houve uma redução na atividade de 49 e 61%, respectivamente, após 15 min.

Para enzima peroxidase em morango, os resultados apresentados são similares aos da  $\beta$ -glucosidase, um aumento de 13% na atividade na pressão de 4000 bar por 5 min e uma perda de 11-35% na condição de 6000 bar por 15 min. Nenhuma atividade foi detectada em framboesa vermelha após o tratamento com pressão. Diferentemente da peroxidase, a polifenoloxidase de framboesa vermelha houve um aumento de 15% na atividade após submetida a pressão de 4000 bar por 5 min e 54% a pressão de 6000 bar por 5 min, porém decorridos 15 min a atividade perdeu 99% da atividade. No caso do morango, a inativação completa da PPO ocorreu a 6000 bar por 15 min ou 8000 bar por 10 min.

Em relação a enzimas em outros fluidos pressurizados, pode-se destacar o uso do dióxido de carbono (71,5-276,4 bar), propano (30-250 bar) e n-butano (10-250 bar) sobre a atividade de lipases (Lipozyme IM, Novozym 435 e *Yarrowia lipolytica*). No processamento com CO<sub>2</sub>, as três lipases perderam atividade em todas as condições experimentais. Para o processamento com propano, as lipases Lipozyme IM e *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda na atividade, enquanto que a Novozym 435 apresentou um aumento na atividade em todas as condições experimentais estudadas. O processamento com n-butano apresentou os mesmos resultados apontados no processamento com propano (Oliveira et al., 2006 a,b).

Giebauf e Gamse (2000) estudaram o efeito do tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico em extrato bruto de lipase de pâncreas de porco. O processamento por 1h a 65°C e 150 bar não apresentou perda/ganho significativos na atividade da lipase, porém um incremento expressivo de 243% na atividade foi observado na temperatura de 75°C e, quando o tempo de exposição foi de 4h, aumentos de até 860% foram constatados.

O processamento com dióxido de carbono também é relatado para as oxidases, peroxidase e polifenoloxidase. Chen et al. (1992) submeteu a PPO do extrato purificado de camarão, lagosta e batata ao processamento com CO<sub>2</sub> a 58 bar com temperatura de 43°C por 1 min, o que provocou uma perda na atividade enzimática em relação à original de 98, 78 e 55% respectivamente. Ao estudar a peroxidase contida em extrato de rabanete, Fricks

et al. (2006), observaram um incremento de 112% na atividade da POD após processamento com CO<sub>2</sub> a uma pressão de 70,5 bar a 30°C por 1h. O mesmo extrato, porém agora liofilizado por 12 e 24h foi submetido às mesmas condições de processamento anteriores, mantendo um incremento na atividade, embora menor, de 61 e 35%, respectivamente.

## **2.5. PARÂMETROS QUE AFETAM A CATÁLISE ENZIMÁTICA**

Proteínas são estruturas delicadas, mantidas por interações entre a cadeia protéica (determinada pela seqüência de aminoácidos) e pelas interações com o solvente ao redor. Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares e entre solvente-proteína, e podem, conseqüentemente, levar ao desdobramento e/ou desnaturação da cadeia de peptídeos (Hendrickx et al., 1998).

Como salientado anteriormente, as enzimas são classes especiais de proteínas na qual a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, mantido pela conformação tridimensional da molécula. Pequenas mudanças no sítio ativo podem levar a uma perda da atividade da enzima. Como a desnaturação protéica é associada com mudanças conformacionais nas estruturas terciárias ou quaternárias, estas podem mudar a funcionalidade da enzima (por exemplo, aumento ou perda da atividade catalítica, mudanças na especificidade do substrato) (Hendrickx et al., 1998). Neste sentido, nesta seção será apresentada uma visão geral sobre os parâmetros que afetam a catálise enzimática. Cada parâmetro será abordado individualmente, mas é importante salientar que o efeito desses parâmetros sobre a atividade e estabilidade enzimática, freqüentemente ocorre de forma combinada.

### **2.5.1. Efeito da pressão**

Uma pequena mudança na pressão é acompanhada por uma mudança dramática na densidade nas proximidades do ponto crítico de uma substância, alterando assim as propriedades físico-químicas de um fluido supercrítico. Desde que as propriedades do solvente podem modular as propriedades da enzima suspensas neste, o efeito da pressão

em reações de catálise enzimática em fluidos supercríticos é uma área importante de investigação.

Ao contrário dos tratamentos térmicos, onde tanto ligações covalentes como não covalentes são afetadas, no processamento à alta pressão em temperatura ambiente as ligações covalentes são pouco afetadas e, conseqüentemente, a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento sob pressão (Cheftel, 1995), apenas ligações químicas relativamente fracas (pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou mesmo algumas ligações iônicas) podem ser rompidas (Hendrickx et al., 1998). Isso significa que tanto a estrutura secundária como a terciária podem ser afetadas pela pressão, uma vez que as pontes de hidrogênio são responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal (secundária) e as interações iônicas e hidrofóbicas são responsáveis principais pela manutenção da estrutura terciária das proteínas. Proteínas multiméricas (de estrutura quaternária) mantidas juntas por ligações não covalentes podem ser dissociadas por pressões comparativamente baixas (Hendrickx et al., 1998).

Em geral, pressões acima de 3000 bar à temperatura ambiente causam desnaturação protéica irreversível, enquanto pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína (Cheftel, 1995).

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões relativamente baixas (>1000 bar) têm mostrado ativação de algumas enzimas (Asaka et al., 1994; Anese et al., 1995; Cano et al., 1997; Giebauf e Gamse, 2000; Fricks et al., 2006). Pressões muito maiores (<1000 bar), geralmente induzem à inativação enzimática (Weemaes et al., 1998), porém há também casos de aumento da atividade (Garcia-Palazon et al., 2004).

Kamat et al. (1995) observou que em sistemas aquosos, pressões abaixo de 1000 bar não apresentam efeito significativo na atividade enzimática. Os grupos de Blanch e Chark (Randolph et al., 1988), usando espectroscopia de ressonância magnética a alta pressão, não observaram qualquer mudança significativa na estrutura da colesterol oxidase em misturas de CO<sub>2</sub>-co-solvente a 35°C entre 1 e 113 bar. Affleck et al. (1994) mostraram não haver mudança conformacional considerável na subtilisina a 700 bar em n-hexano. Já outros estudos usando espectroscopia de fluorescência mostraram que a tripsina sofreu uma mudança conformacional em CO<sub>2</sub> supercrítico durante a despressurização. Contudo,

nenhum dado de atividade foi reportado para determinar os efeitos de tais mudanças estruturais.

Tanaguchi et al. (1987) examinaram o efeito do CO<sub>2</sub> supercrítico em 9 enzimas comerciais à 35°C e 203 bar. Após 1 hora de exposição, os autores não observaram perda na atividade das enzimas. Em contrapartida, Kasche et al. (1988) mostraram que a atividade de algumas enzimas foi adversamente afetada pela despressurização.

### 2.5.2. Efeito da água

A hipótese mais aceita com relação à perda de atividade enzimática em meio supercrítico sugere que a taxa de despressurização do CO<sub>2</sub> supercrítico e o conteúdo de água do solvente têm um efeito direto na taxa de desnaturação e que enzimas que contêm pontes de dissulfeto são menos propensas à desnaturação. Enzimas são inativas na completa ausência de água, porém a quantidade de água necessária para uma enzima ser cataliticamente ativa é surpreendentemente baixa. Em sistemas não aquosos, o teor de água necessária para manter uma enzima na forma cataliticamente ativa é geralmente equivalente a uma monocamada por molécula de enzima. Estas moléculas essenciais de água são ligadas por interações não-covalentes que mantêm a estrutura nativa da proteína. Se as moléculas de água em volta da enzima são perturbadas, a enzima geralmente perde sua atividade. O meio não aquoso pode retirar a água associada à molécula da enzima e esta tendência depende do tipo de solvente (Zaks e Klibanov, 1985).

Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial para a molécula da enzima. Este princípio pode também ser aplicado a sistemas envolvendo fluidos supercríticos. Geralmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento do conteúdo de água adicionado ao fluido supercrítico, até que a mesma atinja um máximo. Além disso, acima do conteúdo ótimo de água, as suspensões de enzimas formam agregados, resultando em uma redução do contato entre a enzima e o solvente, reduzindo assim, a eficiência da enzima. Pode-se, com base nas informações da literatura, concluir que o tipo de reação e o meio reacional são também importantes na determinação da dependência da atividade enzimática com o conteúdo de água (Oliveira e Oliveira, 2000; 2001).

Neste sentido, existem duas maneiras de manter a hidratação da enzima em meio não-aquoso. Água pode ser adicionada diretamente ao sistema reacional ou, alternativamente, sais hidratados podem ser adicionados como uma fonte indireta. De acordo com Halling (1990), em meio não-aquoso, a concentração de água é um dos parâmetros chave a ser considerado. A adição de água a preparações enzimáticas sólidas pode aumentar a atividade enzimática através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima. No entanto, excesso de água facilita a agregação da enzima e pode provocar um decréscimo de sua atividade (Yang e Russel, 1996).

As propriedades físico-químicas exibidas por uma enzima estão relacionadas direta ou indiretamente ao papel da água nas interações não covalentes (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas), as quais ajudam a manter a conformação cataliticamente ativa da enzima (Illanes, 1994). A hidratação dos grupos carregados e polares das moléculas da enzima parece ser um pré-requisito para a catálise enzimática. É possível que, na ausência de água, esses grupos interajam produzindo uma conformação estrutural inativa. A função da água na manutenção da atividade enzimática em meio não aquoso parece estar relacionada com a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com esses grupos funcionais protegendo, portanto, dielectricamente as interações eletrostáticas entre os grupos ionizados e neutralizando as interações dipolo-dipolo entre unidades peptídicas e grupos vizinhos polares da proteína (Langone, 1998).

A remoção da água ligada à proteína aumenta a força das ligações de hidrogênio intramoleculares e das pontes salinas, que estabilizam as proteínas nas suas conformações originais, conferindo-lhes rigidez estrutural. A desnaturação das enzimas através do calor requer ampla mobilidade conformacional, o que envolve água livre. Além disso, a eliminação da água do sistema dificulta a ocorrência de um número de reações químicas indesejáveis, as quais são promovidas através do aumento da temperatura, tais como, reações de hidrólise, de oxidação, de isomerização, entre outras, que promovem a inativação da proteína em soluções aquosas (Yang e Russel, 1996).

Randolph et al. (1988), examinando o efeito da água na atividade de colesterol oxidase em dióxido de carbono supercrítico, verificou que a enzima era 10 vezes menos ativa em sc-CO<sub>2</sub> sem a presença de água do que em um sistema no qual a água também estava presente. Constatou-se também que a atividade reduzida na ausência de água foi completamente recuperada no momento em que 1% (v/v) de água foi adicionada.

Oliveira et al. (2006a) submeteu as lipases Lipozyme IM, Novozym 435 e *Yarrowia lipolytica* ao processamento com dióxido de carbono (71,5-276,4 bar), propano (30-250 bar) e n-butano (10-250 bar). No processamento com CO<sub>2</sub>, as três lipases perderam atividade em todas as condições experimentais avaliadas. Para o processamento com propano, as lipases Lipozyme IM e *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda menos pronunciada na atividade, enquanto que a Novozym 435 apresentou um aumento na atividade em todas as condições experimentais investigadas. O processamento com n-butano apresentou os mesmos resultados apontados no processamento com propano. Supõe-se que estes resultados estejam relacionados ao fato do n-butano ser mais hidrofóbico do que o CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, não possuir a capacidade de retirar água da enzima, evitando a inativação. O n-butano, por apresentar uma baixa constante dielétrica, preserva a conformação da enzima sob altas pressões, diminuindo os possíveis efeitos da desnaturação que levam a uma diminuição da atividade enzimática. Em trabalhos realizados por Knez e Habulin (2001) e Knez et al. (1998), a lipase imobilizada de *R. miehei* não apresentou perda na atividade quando exposta a n-butano a 100 bar, 35°C por 24h.

No estudo realizado por Fricks et al. (2006), onde a peroxidase apresentou um incremento de 112% na atividade da POD de extrato purificado de rabanete após processamento com CO<sub>2</sub> a uma pressão de 70,5 bar a 30°C por 1h, o efeito da água pode ser observado quando o mesmo extrato, porém agora liofilizado por 12 e 24h foi submetido às mesmas condições de processamento anteriores. Embora mantendo um incremento na atividade de 61 e 35%, respectivamente, observou-se que quanto o menor o conteúdo de água, menor o incremento observado. O efeito da água fica ainda mais pronunciado quando o extrato de rabanete purificado foi liofilizado antes do processamento com CO<sub>2</sub> sob as mesmas condições: os resultados indicaram uma perda de 58,5% de atividade quando a liofilização foi conduzida por 12h e de 85,1% quando o extrato foi liofilizado por 24h.

### 2.5.3. Efeito do solvente

A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, do produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações hidrogênio, iônica e hidrofóbica. A partição do substrato entre o sítio ativo e o solvente depende da

hidrofobicidade do solvente e da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (Knez e Habulin, 2001).

Um dos mais importantes indicadores de hidrofobicidade é a constante dielétrica (Illanes, 1994). A constante dielétrica do solvente é responsável pelas interações específicas entre a enzima e o solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada (Monot, 1994).

Para a ativação da enzima é necessária a presença de pelo menos uma pequena monocamada de água. Em reações enzimáticas sob condições supercríticas a água divide-se entre a enzima e a mistura reacional. Em um sistema essencialmente não aquoso a água divide-se preferencialmente entre o solvente com o aumento da hidrofobicidade. Outra maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial em torno da molécula de enzima. Solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação. Reciprocamente, os solventes hidrofóbicos, por serem menos capazes de arrastar "para fora" ou deformar a camada de hidratação, podem apenas afetar parcialmente a atividade catalítica. Em meios não-aquosos, as enzimas são heterogêneas com respeito ao solvente. Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de investigar a importância dos solventes pressurizados na estabilidade das enzimas (Catoni et al., 1996; Cernia et al., 1998).

#### 2.5.4. Efeito da temperatura

A maioria das enzimas possui atividade bastante específica, capazes de catalisar só uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (Cox, 1987).

Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40°C, sendo que acima de 45°C pode ocorrer início da desnaturação (Fennema, 1993). Enquanto algumas enzimas perdem sua atividade catalítica a baixas temperaturas, outras suportam, ao menos durante um curto período de tempo, um intenso tratamento térmico (Belitz e Grosch, 1997).

Os efeitos da elevação da temperatura sobre as enzimas são muito complexos. Por exemplo, as temperaturas elevadas podem afetar os estados de dissociação dos grupos funcionais envolvidos na reação enzimática, a afinidade da enzima por ativadores e outras questões secundárias, como a solubilidade do oxigênio, que pode ser um dos substratos para a reação (Fennema, 1993).

Com o aumento da temperatura pode ocorrer, também, a desnaturação da proteína enzimática, que consiste na perda irreversível da conformação nativa, modificando a estrutura terciária e quaternária da proteína globular. Desta forma, a enzima passa de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. As enzimas possuem uma temperatura de resistência máxima à desnaturação. Entretanto, na desnaturação das enzimas pelo calor a relação tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico é de fundamental importância. Os efeitos que se observam nas enzimas apresentam papel relevante, uma pequena modificação da conformação do centro ativo pode conduzir à perda da atividade catalítica (Scriban, 1985; Belitz e Crosch, 1997).

Vários estudos foram realizados em relação à estabilidade térmica das oxidases peroxidase e polifenoloxidase. A peroxidase é conhecida como uma enzima termoestável, que pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Em contraste ao fato da atividade da maioria das demais enzimas ser insignificante após tratamento a 80°C, as peroxidases toleram temperaturas de até 130°C durante vários minutos (Cox, 1987).

Entretanto, Fujita et al. (1995) observaram que somente cerca de 50% da atividade de peroxidase purificada de repolho permanece ativa após tratamento térmico de 70°C por 10 min. Em 1997, Fujita et al., investigando a atividade das isoenzimas, F-IA, F-IB e F-II, da

peroxidase purificada de repolho, observaram que após tratamento a 69, 57 e 53°C, por 10 min, respectivamente, a atividade das enzimas manteve-se em 50% da atividade inicial.

A polifenoloxidase não pertence ao grupo de enzimas estáveis a altas temperaturas. Mesmo curtas exposições em temperaturas entre 70 e 90°C podem ser suficientes para reduzir apreciavelmente a atividade desta enzima (Yemeniciog e Cemerog, 2003). Gomes e Ledward (1996) observaram que para polifenoloxidases de extratos de cogumelos e batatas e de tirosinase de cogumelos (Sigma), a exposição em temperatura de 60°C por 30 min é suficiente para total inativação.

Fujita et al. (1995), investigando a estabilidade da polifenoloxidase de repolho exposta por 10 min em temperaturas de 20 a 100°C, observaram que cerca de 40% da atividade se mantém após tratamento a 100°C. Em 1997, Fujita et al. constataram que a atividade de três isoenzimas da polifenoloxidase purificada de repolho, denominadas F-IA, F-IB e F-II, mantiveram 50% da atividade após tratamento térmico de 83, 62 e 65°C por 10 minutos, respectivamente.

Ceni (2005), em estudo realizado com as enzimas peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate, observou que a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase se mantém quando expostas a tratamento térmico de 20°C; o aumento do tempo de exposição, em temperaturas de 40 e 60°C, provoca a diminuição da atividade da polifenoloxidase; a inativação da polifenoloxidase ocorre somente após tratamento térmico de 80°C, enquanto que a peroxidase, apesar de ter sua atividade diminuída, não é inativada em 80°C.

Em certos casos verifica-se que o efeito da temperatura fica mais intenso quando associado à outro parâmetro, como por exemplo, a pressão. A estabilidade de enzimas em fluidos supercríticos tem sido estudada no intervalo de 35 a 60°C. A maioria dos trabalhos foi realizada em CO<sub>2</sub> supercrítico nas proximidades do ponto crítico ( $1,2 < T_c < 2$ ), onde o fluido é altamente compressível. Embora as enzimas sejam estáveis a altas temperaturas em CO<sub>2</sub>, elas perdem atividade dependendo da taxa de despressurização (Kashe et al., 1988) e do conteúdo de água no sistema. Quanto maior o conteúdo de água, mais significativa a perda de atividade.

Chen et al. (1992) realizaram experimentos com PPO de extrato purificado de camarão, lagosta e batata. Um primeiro experimento foi realizado submetendo os extratos ao tratamento térmico de 43°C por 30min, o que provocou perdas inferiores a 5% na

atividade enzimática das PPO. Um novo experimento foi realizado a temperatura de 43°C, porém a uma pressão de 58 bar em CO<sub>2</sub> por 1 min, provocando uma perda de 98, 78 e 55% na atividade enzimática das PPO respectivamente.

Fricks et al. (2006) avaliaram o comportamento da atividade enzimática de peroxidase extrato purificado de rabanete processado com CO<sub>2</sub> (70,5-254,4 bar) em temperaturas de 30-50°C. Os menores ganhos e, em algumas situações perda de atividade, ocorreram nos experimentos em que a temperatura foi de 50°C.

Ao contrário do que aconteceu com as oxidases quando submetidas à combinação temperatura/pressão, onde a perda ou um ganho inferior na atividade ocorreram com o aumento da temperatura, no caso da lipase imobilizada Novozym 435 submetida à pressão em propano e n-butano, os maiores incrementos na atividade ocorreram nas condições experimentais de maior temperatura, 75°C (Oliveira et al., 2006, a,b).

Uma das principais propriedades das enzimas suspensas em sistemas não aquosos é o aumento da estabilidade térmica da enzima relativamente ao meio aquoso. A água possui um papel importante na inativação enzimática à alta temperatura. Acredita-se que à altas temperaturas, a água aumente a mobilidade das moléculas de proteína e isto aumente a taxa de desnaturação (Zaks e Klibanov,1986). Desta forma, é natural que a enzima exiba maior termoestabilidade em meio não aquoso.

### 2.5.5. Efeito do pH

A atividade enzimática é sensível ao pH e em soluções aquosas a dependência da atividade com o pH reflete a ionização de vários resíduos de aminoácidos que têm um papel importante na catálise. Na literatura é demonstrado que enzimas de fontes vegetais diferentes apresentam diferenciação de pH para a medida de atividade. Em estudos com couve de bruxelas, Nagai e Suzuki (2003) constataram o pH 9,0 como ótimo para atividade e estabilidade da polifenoloxidase. Pérez-Gilabert e García-Carmona (2000) investigaram o efeito da variação de pH na atividade cresolase e catecolase de polifenoloxidase purificada de beringela e constataram que atividade catecolase foi maior em pH de 5,0 a 7,5 e, quando a medida de atividade foi realizada em tampão borato pH 9,0, a atividade foi inferior às demais. Segundo Fujita et al. (1995) a atividade cresolase de repolho foi maior em pH 7,5, e para a medida de atividade de polifenoloxidase purificada, o pH ótimo ficou em 7,6.

Gazaryan e Lagrimini (1996) isolaram uma peroxidase aniônica de tabaco que apresentou atividade máxima em pH 4,55. Segundo Fujita et al. (1995) o pH ótimo para peroxidase de repolho é 6,4. Ceni (2005) determinou o pH 9,0 como ótimo para atividade e estabilidade da polifenoloxidase do extrato bruto da erva-mate, da mesma forma que o pH 4,0 foi reportado como ótimo para atividade e estabilidade da peroxidase do mesmo extrato.

Em meio não aquoso, enzimas mudam sua atividade se o pH do meio micro-aquoso em volta dela for alterado. Presume-se que o CO<sub>2</sub> se dissolve na camada de hidratação associada com a enzima, podendo mudar o pH local e afetar a atividade enzimática. Chen et al. (1992) estudaram o comportamento do pH quando realizaram estudos sobre o efeito da pressão (sc-CO<sub>2</sub>) na atividade enzimática da polifenoloxidase purificada de camarão, lagosta e batata. O tratamento dessas PPOs sob pressão (sc-CO<sub>2</sub>) (58 atm) a 43°C por 1 min provocou uma perda de 98% na atividade enzimática original da PPO da lagosta, 78% para o camarão e 55% para a batata, provocando uma redução no pH de 9,1 para 5,4, 6,5 para 4,8 e de 6,1 para 4,2, respectivamente.

Resultado similar foi apresentando anteriormente por Chen et al. (1999), quando o extrato enzimático de PPO de lagosta foi submetido a aquecimento a 43°C por 30min à pressão atmosférica, tratamento que provocou uma perda na atividade enzimática original da PPO de 65% e resultou num pH de 5,3. Os autores deste estudo consideram que a redução no pH tenha sido provocada pela facilidade com que a arginina (aminoácido presente nas proteínas) interage com o CO<sub>2</sub>, formando um complexo bicarbonato (Weder et al., 1992).

## 2.6. ESTABILIDADE ENZIMÁTICA À BAIXA TEMPERATURA

Quando se pretende utilizar extratos enzimáticos brutos, um aspecto de fundamental importância é o estabelecimento das condições de armazenamento dos mesmos. A condição mais indicada é a que permite que a atividade enzimática seja mantida com o passar do tempo. As enzimas continuam ativas durante o processo de congelamento, porém permanecem inativadas durante a conservação em temperaturas da ordem de -18°C, reassumindo sua atividade quando ocorre o descongelamento (Cox, 1987).

Quando congeladas em temperaturas muito baixas, a atividade enzimática cessa, porém só uma quantidade muito pequena de enzimas sofre dano irreversível por

congelamento. Por outro lado, enzimas presentes em fontes vegetais, como a peroxidase, mesmo quando inativadas por branqueamento podem ter a atividade enzimática regenerada durante o armazenamento (Belitz e Crosch, 1997).

Nagai e Suzuki (2003) purificaram polifenoloxidase de couve de bruxela e analisaram o comportamento da enzima estocada à 4°C. A atividade manteve-se no 1º dia de armazenagem e foi ativada no 2º e 4º dias. Porém, no 8º dia de estocagem ocorreu um decréscimo na atividade, sendo que no 14º dia somente cerca de 20% da atividade inicial foi observada.

Vieira et al. (2003) avaliaram a estabilidade de extratos brutos de abobrinha, rabanete, batata doce e nabo, com adição de PVP, armazenados em refrigerador à 4°C. Constataram que, com 80 dias de armazenamento, a atividade de peroxidase de todos os extratos não foi inferior a 80% da atividade inicial.

Geni (2005) avaliou a atividade da enzima polifenoloxidase e peroxidase do extrato bruto enzimático de erva-mate em três condições de armazenamento (4, -4 e -80°C). Quando armazenadas à 4°C, a polifenoloxidase e a peroxidase apresentaram uma diminuição contínua da atividade. A atividade da peroxidase armazenada em -4° e -80°C diminuiu nos primeiros 9 dias de armazenamento. Após o 14º dia a enzima recuperou gradativamente sua atividade, alcançando, após 99 dias de armazenamento, cerca de 78% de atividade residual. Já a polifenoloxidase no armazenamento a -4 e -80°C, a enzima apresentou comportamento bastante similar, sendo que os extratos mantiveram a atividade após 99 e 149 dias de armazenamento, respectivamente. Para ambas as enzimas, o armazenamento em temperaturas de -4 e -80°C, além de semelhantes se mostraram adequados, diferentemente do armazenamento à 4°C.

## **2.7. EFEITO DOS CICLOS DE PRESSÃO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Alguns autores sugerem que a inativação enzimática a alta pressão pode ser incrementada mediante aplicação de ciclos de pressão. Trata-se da aplicação sucessiva de pressão, produzindo uma maior inativação enzimática e uma menor atividade residual que a obtida após a aplicação de um processo sob pressão contínuo durante um mesmo tempo total de tratamento (Hendrickx et al., 1998; Basak e Ramaswamy, 1996).

Steinberger et al. (1999) relataram que após 15 passos de despressurização a atividade da esterase (EP10) e da lipase (*Aspergillus niger*) a 35°C e 150 bar em CO<sub>2</sub>, manteve-se praticamente inalterada. Habulin et al. (2005) submeteram a proteinase de *Carica papaya* por 1h a 300 bar e 50°C e, após 30 passos de despressurização, demonstraram ter ocorrido perda de até 50% na atividade enzimática.

Oliveira et al. (2006, a,b) relataram que a atividade da lipase imobilizada Novozym 435 apresentou perda de 10% na atividade quando submetida a CO<sub>2</sub> pressurizado após 5 ciclos de pressão/despressurização e manteve-se inalterada no caso do emprego dos solventes propano e n-butano pressurizados.

## 2.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura aponta que a quase totalidade da erva-mate produzida no Brasil é destinada à fabricação do produto chimarrão. Aliado a este fato, o excesso da matéria-prima no mercado nacional resultante da entrada de erva-mate a partir da Argentina, com preços competitivos, tem motivado a busca por novas aplicações para a erva-mate. Esta importante matéria-prima no contexto sócio-econômico e cultural para a Região Sul do Brasil e em particular para o Rio Grande do Sul apresenta em sua composição enzimas oxidativas: a peroxidase e a polifenoloxidase. A literatura aponta também que existe uma carência muito grande a respeito de estudos que foquem tais enzimas. Na verdade, exceto pelo trabalho de Ceni (2005) que avaliou condições ótimas de extração e estabilidade de tais complexos enzimáticos da erva-mate, a literatura é muito restrita neste tópico.

Por outro lado, a literatura indica que o emprego de fluidos pressurizados sub ou supercríticos na área da biotecnologia, mais especificamente em tecnologia enzimática, é assunto de intensa exploração científica durante a última década. Tais estudos têm distintos objetivos: muitos deles buscam o emprego de fluidos pressurizados, principalmente aqueles no estado supercrítico, como meio reacional alternativo para reações enzimáticas, explorando propriedades singulares de tais fluidos. Outros trabalhos objetivam o emprego de fluidos pressurizados para a inativação de complexos enzimáticos que causam danos a alimentos e fármacos, principalmente durante a etapa de armazenamento. Em anos recentes, busca-se também o incremento da atividade e estabilidade de complexos enzimáticos pelo processamento com fluidos pressurizados.

A revisão bibliográfica revelou que boa parte dos estudos refere-se à aplicação de pressão hidrostática sobre complexos enzimáticos. Via de regra a pressão aplicada em tais estudos é bastante elevada, chegando à ordem de 10000bar. Quando se trata da compressão de gases em condições ambientes, a literatura aponta que lipases são as enzimas mais investigadas, onde a grande parte dos estudos foca o emprego de enzimas comerciais imobilizadas ou não. Recentemente, alguns estudos estão disponíveis com lipases não comerciais de origem animal, vegetal e microbiana. No que tange ao estudo de enzimas oxidativas o quadro é bastante diverso. Alguns poucos trabalhos foram conduzidos sobre a influência do processamento com dióxido de carbono empregando peroxidases e polifenoloxidasas purificadas. Os resultados são bastante distintos dependendo da origem das enzimas (animal ou vegetal). Em se tratando de extratos enzimáticos brutos de peroxidases e/ou polifenoloxidasas, apenas o trabalho de Fricks et al. (2006) reporta um estudo com um extrato de pré-purificado de rabanete. Em tal estudo, os resultados em relação à peroxidase são bastante animadores no que tange ao incremento da atividade do complexo enzimático.

Há de se ressaltar também que a literatura é bastante escassa no que se refere à investigação de três aspectos do processamento de complexos enzimáticos com fluidos pressurizados (gases em condições ambientes): o primeiro deles diz respeito ao estudo da especificidade do complexo enzimático após o tratamento a alta pressão, fato este que pode abrir novas portas em catálise enzimática. O segundo aspecto está relacionado ao efeito de repetidas submissões do complexo enzimático ao fluido pressurizado, fato este de fundamental relevância quando se vislumbra a aplicação de tais complexos em processos contínuos. O terceiro aspecto diz respeito à estabilidade do complexo enzimático após o processamento com o fluido comprimido, fato este importante quando se vislumbra o armazenamento/estocagem do complexo para posterior utilização.

Assim sendo, quando se considera a necessidade de novos estudos referentes à erva-mate, o pouco conhecimento sobre as enzimas POD e PPO da erva-mate, a atualidade e relevância do estudo de meios enzimáticos em fluidos comprimidos e a lacuna existente no que concerne ao comportamento da atividade e estabilidade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato enzimático bruto de erva-mate frente a um fluido pressurizado, justifica-se a realização do presente trabalho. Busca-se com este estudo contribuir para o espectro da literatura específica da área, investigando a influência de variáveis operacionais sobre a atividade e estabilidade de tais enzimas da erva-mate quando submetidas ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

## 2.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AFFLECK, R.A.; CLARK, D. S.; KAMAT, S.V.; RUSSEL, A.J. **High pressure EPR studies of protein mobility in reversed micelles**. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 342, 1994.

ALMEIDA FILHO, C. **Estudo Experimental e Teórico de Coeficientes de Difusão Binários Envolvendo Componentes de Óleos Essenciais em Dióxido de Carbono Supercrítico**. Tese de Doutorado., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil, 124p., 2003.

AMATI, A.; CASTELLARI, M.; MATRICARDI, L.; ARFELLI, G.; CARPI, G. **Modificazioni indotte in mosti d'uva da trattamenti con alte pressioni idrostatiche**. *Industrie delle Bevande*, 25, 144, 324-328, 1996.

ANDRADE, F. M. **Diagnóstico da Cadeia Produtiva da *Ilex Paraguariensis* St. Hill Erva-Mate**. São Mateus do Sul-PR, 1999 Disponível em <http://www.unicamp.br/nipe/rbma/ervmenub.htm>, Acesso em 05 de nov 2004.

ANESE, M.; NICOLI, M. C.; DALL'AGLIO, G; LERICI, C. **Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities**. *J. Food Biochem.* 18, 285-293, 1995.

ARAÚJO, M. A. **Química de alimentos. Teoria e prática**. Imprensa Universitária de Universidade Federal de Viçosa, 247p, 1995.

ASAKA, M.; AOYAMA, Y.; NAKANISHI, R.; HAYASHI, R. **Purification of a Latent Form of Polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its Pressure-activation**. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1486-1489, 1994.

BANCI, L. **Structural properties of peroxidases**. *Journal of Biotechnology*, 53, 253-263, 1997.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. **Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase.** Food Research International, 29, 601-607, 1996.

BASSINI, V.L.; CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos e nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill; aquifoliácea (erva-mate) visando à exploração do potencial vegetal como fonte de produtos.** Anais de 1º Congresso Sul-americano de erva-mate. EMBRAPA, Curitiba, PR. 69-83, 1997.

BECKMAN, E.J. **Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing,** Journal of Supercritical Fluids, 1-77, 2003.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos,** 2º ed. Zaragoza : Acribia, 1087p., 1997.

BURNETTE, F.S. **Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: A review.** J. Food Science. 42, 1-6, 1977.

BURTON S.G. **Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review.** Catalysis Today, 22, 459-487, 1994.

BUTZ, P., Koller; W.D., Tauscher, B. & Wolf, S. **Ultra-high pressure processing of onions: chemical and sensory changes.** *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 27: 463-467, 1994.

CAMPA, A. **Biological Roles of Plant Peroxidases: Know and Potential Function.** In *Peroxidase in Chemistry and Biology*, Everse, K.; Grisham, M.B.; Eds.; CRC Press; New York, VII, 25, 1991.

CANO, M.P.; HERMANDEZ, A.; ANCOS, B. **High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products.** Journal of Food Science, 62, . 85-88, 1997.

CASTELLARI, M.; MATRICARDI, L.; ARFELLI, G.; ROVERE, P.; AMATI, A. **Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts.** Food Chemistry, 60, 4, 647-649, 1997.

CATONI, E.; CERNIA, E.; PALOCCI, C. **Different aspects of “solvent engineering” in lipase biocatalysed esterifications.** Journal of Molecular Catalysis, 105, 79-86, 1996.

CERNIA, E.; PALLOCI, C.; SORO, S. **The role of the reaction medium in lipase-catalysed esterifications and transesterifications.** Chemistry and Physics of Lipids, 93, 157-168, 1998.

CENI, G.C. **Determinação, Estabilidade e Influência da Exposição ao Microondas sobre Oxidases de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill).** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim. Erechim, RS, 2005.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation** Food Science and Technology International, 1, 75-90, 1995.

CHEN, J.S.; ROLLE, R.S.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R. **Comparasion of phenoloxidase activity from Florida spiny lobster and Western Australian lobster.** J. Food Sci. 56, 154-160, 1999a.

CHEN, J.S.; BALABAN, M.O.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R.; HSU, W.Y. **Inactivation of Polyphenol Oxidase by High-Pressure Carbon Dioxide.** J. Agric. Food Chem. 40, 2345-2349, 1992.

CHLAMTAC, E.B. **Enzimas no mate: polifenoloxidase.** Boletim do Instituto de Química Agrícola, 39, 7-12, 1955.

CONESA, A.; PUNT, P.J.; van den HONDEL, C.A.M.J.J. **Fungal peroxidases: molecular aspects and applications.** Journal of Biotechnology, 93, 143-148, 2002.

COX, P.M. **Ultracongelacion de alimentos: Guía de la teoría y práctica.** Zaragoza : Acribia, 459 p, 1987.

DAOUDI, Lamy. **Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y sumo de uva.** Departament de Ciència Animal e dels Aliments, Bellaterra, Catalunya, 2004.

DAWSON, C.R.; TARPLEY, W.B. **Copper Oxidases.** In *The Enzymes Chemistry and Mechanism of Action*, Sumner, J. B.; Myrback, K.; Eds.; Academic Press; New York, VII, v455-491, 1951.

DAWSON, C.R.; MAGEE, R.J.; **Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase).** In *Methods in Enzymology*; Colowick, S. P.; Kaplan, N. O.; Eds.; Academic Press; New York, VII, 817-826, 1955.

DU, P.; LOEW G.H., **Role of axial ligand in the electronic structure of model compound I complex.** International Journal of Quantum Chemistry, 44, 251-261, 1992.

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 of Agricultural and Food Chemistry, 48, 1574-1579, 2000.

DUNFORD, H.B., **Heme peroxidases.** In: John Wiley and Sons, 1<sup>o</sup> ed., New York, 18-25, 1999.

ESTHIAGHI, M.N.; STUTE, R.; KNORR, D. **High pressure and freezing pretreatment effects on drying rehydration texture and color of green beans, carrots and potatoes.** J. Food Sci. 59, 1168-1170, 1994.

FATIBELLO-FILHO, O.; CRUZ VIEIRA, I., **Uso Analítico de Tecidos e Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática.** Química Nova, 25, 455-464, 2002.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**, Zaragoza : Acribia, 1095 p., 1993.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P B.; OESTREICHER, E G.; ANTUNES, O A C.; GIRARDI, J S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase**

**activity after high-pressure treatment with carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids. Elsevier, 2006, in press.

FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. **Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1138-1142, 1995.

FUJITA, S.; SAARI, N.B.; MAEGAWA, M.; SAMURA, N.; HAYASHI, N.; TONO, T. **Isolation and characterization of two phloroglucinol oxidases from cabbage (*Brassica oleracea* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 59-63, 1997.

GARCIA-PALAZON, A.; SUTHANTHANGJAI, W.; KADJA, P.; ZABETAKIS, I. **The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry and strawberry.** Food Chemistry. 2004.

GAZARYAN, I.G.; LAGRIMINI, L.M. **Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase.** Phytochemistry. 41, 1029-1034 1996.

GIEBAUF, A.; GAMSE, T. **A simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide treatment.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 9, 57-64, 2000.

GOMES, M.R.A.; LEDWARD, D.A. **Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases** Food Chemistry, 56, 1-5, 1996.

HABULIN, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ, Z. **Stability of proteinase from *Carica papaya* latex in dense gases.** Journal Supercritical Fluids. 33(1): 27-34, 2005.

HALLING, P.J. **Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position.** Biotechnology and Bioengineering, 35, 691-701, 1990.

HAMED, R.R., MAHAREM, T.M., FATA, H., MOHAMED, M.A.; ATAYA, F. **Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots.** Phytochemistry, 48, 1291-1294, 1998.

HAMMOND, D.A.; KAREL, M.; KLIBANOV, A.M. **Enzymatic reactions in supercritical gases.** Applied Biochemistry Biotechnology, 11, 393, 1985.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN den BROECK, I; WEEMAES, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review)** Trends in Food Science & Technology, 9, 97-203, 1998.

IBGE – Banco de Dados – **Sistema IBGE de Recuperação Automática.** Disponível em <http://www.sidra.gov.br> Acesso em 20 nov 2004.

ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas.** Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

KAMAT, S.V.; BECKMAN, E.J.; RUSSEL, A.J. **Enzyme activity in supercritical fluids.** Critical Reviews in Biotechnology, 15, 41-71, 1995.

KASCHE, V.; SCHOLOTHAUES, R; BRUNNER, G. **Enzyme denaturation in supercritical CO<sub>2</sub>: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step.** Biotechnolony Letters, 10, 8, 569, 1988.

KAO, F.J.; EKHORUTOMWEN, A.S.; SAWAN, S.P. **Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO<sub>2</sub>, and supercritical SF<sub>6</sub>.** Biotechnology Techniques, 11, 849-852, 1997.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMEJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases. Journal of Supercritical Fluids.** 14 (1), 17-19, 1998.

KNEZ, Z.; HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, 23, 29-42, 2001.

LANGONE, M.A.P. **Síntese de triglicérides catalisada por lipase.** Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

LANZA, M.; PRIAMO, W.L.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA C.; OLIVEIRA D. **The effect of temperature, pressure, exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO<sub>2</sub>**. Appl. Biochem. Biotechnol. 113,181, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo. Editora Sarvier, 1995.

LERCH, K. **Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine-b-monoxygenase**. In: *Metal Ions in Biological Systems, vol.13, Copper Proteins*, (Eds. H. Sigel), 143-186. Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A. 1981.

LIMA, E.D.P.A.; PASTORE, G.M.; LIMA, C.A. **Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21, 1,98-104, 2001.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3, 1<sup>a</sup> ed, São Paulo : Edgard Blücher Ltda, 594p., 2001.

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

LUPETTI, K.O. RAMOS, L.A.; FATIBELLO-FILHO, O. **Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*)**. Química Nova, 26, 2, 197-201, 2003.

MAYER, A.M.; HAREL, E. **Polyphenol oxidases in plants**. *Phytochemistry* 18, 193-215. 1979.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. Empresa paranaense de assistência técnica e extensão rural. Curitiba: EMATER, 104p., 1991.

McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT; A. **The use of high pressure to modify the functionality of food proteins**. Trends in Food Science & Technology, 8, 4, 107-112, 1997.

MONOT, F. “**La catalize enzymatique in milieo organique.**” Revue de L' institut Français de Pétrole. V 49, n. 2, pp. 187-208, 1984.

MOSELE, S.H. **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 211p., 2002.

NAGAI, T.; SUZUKI, N. **Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.)**. Journal of Food Science, 68, 1, 16-20, 2003.

NAKAMURA, K., CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. **Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide**. Chemical Enginnering Community, 45, 207, 1985.

NIETSCHKE, K.; CANÇADO, R. A.; KOHLER, R. G.; WASZCYNKYJ, N. **Análise sensorial de chimarrão pelo método de estimativa de magnitude**. Anais 2º Congresso Sul-americano da Erva Mate, 169-170, 2000.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA J.V. e OLIVEIRA D. **Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in SC-CO<sub>2</sub>**. Ind. Eng. Chem. Res. 39, 4450, 2000.

OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J.V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SC-CO<sub>2</sub>**. J. Supercrit. Fluids 19, 141, 2001.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A.G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase.** Journal of Molecular Catalysis B, 2006a, *in press*.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assesment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids, 2006, *in press*.

PÉREZ-GILABERT, M.; CARMONA, F.G. **Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemical, 48, 695-700, 2000.

RANDOLPH, T.W.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, C.R.; WILKE, C.R. **Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluids.** Biotechnology Letters, 7, 5, 325-328, 1985.

RANDOLPH, T.W.; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M. **Cholesterol aggregation and interaction with cholesterol oxidase in supercritical carbon dioxide,** In: Proceedings of National Academy Science, USA, 85, 2979, 1988.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. **Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.** Food Chemistry, Oxford, 66, 4, 401-436, 1999),

RUSSEL, A.J.; BECKMAN, E.J. **Should the high diffusivity of a supercritical fluid increase the rate of an enzyme-catalysed reaction.** Enzyme Microbiology and Technology, 13, 1007, 1991.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia.** Editora Malone: São Paulo. 498p., 1985.

SEYDERHELM, I.; BOGUSLOVSKI, S.; MICHAELIS, G.; KNORR, D. **Pressure induced inactivation of selected food enzymes.** Journal of Food Science. 61, 308-310, 1996.

SILVA, E.M. **Mecanismos bioquímicos de fisiopatias importantes de frutas.** In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE TECNOLOGIA POSTCOSECHA Y AGROEXPORTACIONES, Memorias. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 5-19, 2000.

SOLOMON, E.I.; LOWERY, M.D. **Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry.** Science, 259, 1575, 1993.

STEINBERGER, D.J.; GAMSE, T.; MARR, R. **Enzyme Inactivation and Prepurification Effects of Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO<sub>2</sub>).** CISF 99, fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications. 1999.

TANAGUCHI, M.; KAMIHIRA, M.; KOBAYASHI, T. **Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity,** Agricultural Biological Chemistry, 51, 2, 593-596, 1987.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. **Processamento de erva-mate.** Erechim : Edifapes, 182p, 2003.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate.** Dissertação de Mestrado (Mestre em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 119p., 1994.

Van GELDER, C.W.G.; FLURKEY, W.H.; WICHERS, H.J. **Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases.** Journal of Agricultural and Food Chemical, 41, 532-536, 1997.

VELDE, Van de, F.; RANTWINJK, F.; SHELDON, A., **Improving the catalytic performance of peroxidase in organic synthesis.** Trends in Biotechnology, 19, 2, 73-80, 2001.

VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*).** Química Nova, 26, 1, 39-43, 2003.

WEDER, J.K.P.; BOKOR, M.V.; HEGARTY, M.P. **Effects of supercritical carbon dioxide on arginine.** Food Chem. 44, 287-290, 1992.

WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I; VAN DEN & HENDRICKX, M. **High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases** Journal of Food Science, 63, 5, 873-877, 1998.

WILBERG, K.Q. **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais.** Tese de Doutorado – Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 156p., 2003.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas.** Zaragoza : Editorial Acribia, 444p., 1991.

YANG, Z.; RUSSEL, A.J. **Fundamentals of non-aqueous enzymology.** In: Koskinen, A. M. D. e Klibanov, A. M. (eds), Enzymatic Reactions in Organic Media, 1ª ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996.

YEMENICIOG, A.; CEMEROG, B. **Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots.** Journal of Agricultural and Food Chemical, 51, 2371-2379, 2003.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. **Enzyme catalyzed processes in organic solvents.** Proceedings of National Academy Science, 82, 3192, 1985.

ZAKS, A; KLIBANOV, A.M. **Why does ribonuclease irreversibly inactive at high temperatures?** Biochemistry, 5432, 1986.

### 3. MATERIAL E METODOS

Neste capítulo serão descritas as metodologias empregadas na obtenção do extrato bruto enzimático de erva-mate, medida de atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, a avaliação da atividade e especificidade enzimática das referidas enzimas, estabilidade à baixa temperatura e influência do número de ciclos de pressão no extrato bruto enzimático após submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado.

#### 3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

A literatura é abundante no que tange à obtenção de extratos enzimáticos brutos. Para oxidases, Fatibello-Filho e Vieira (2002) sugerem um método simples, rápido e eficiente, e que, segundo os autores, mantém a atividade enzimática no extrato por longos períodos para a enzima peroxidase. O princípio do método é utilizado por vários autores para a extração de peroxidase e polifenoloxidase de fontes vegetais (Ohya et al., 1997; Broothaerts et al., 2000; Duarte-Vázquez et al., 2000; Pérez-Gilabert e Carmona, 2000; Sojo et al., 2000; Gomes et al., 2001; Martínez-Parra e Muñoz, 2001).

Como descrito na literatura (Andersen e Sowers, 1968; Loomis e Battaile, 1966), a tendência de escurecimento dos tecidos vegetais está relacionada à presença de polifenoloxidase ou peroxidase, juntamente com os substratos naturais presentes nesses tecidos. Este processo e mais a oxidação promovida pelo oxigênio do ar são os responsáveis pelo decréscimo da atividade enzimática nos extratos brutos. Com o objetivo de minimizar esses efeitos e contribuir para a estabilidade das enzimas de erva-mate em extrato bruto emprega-se, no processo de obtenção do extrato bruto, a polivinilpirrolidona (PVP) (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

As folhas de erva-mate utilizadas como matéria-prima para a obtenção do extrato bruto enzimático de PPO e PDO (*Ilex paraguariensis* St Hill) foram obtidas na granja experimental da URI – Campus de Erechim. Foram selecionadas amostras de plantas expostas ao sol, sem nenhum tipo de adubação. A coleta das folhas foi conduzida a partir de diferentes locais de plantas – terço superior, médio e inferior – sendo realizadas em dias sem chuva.

Na Tabela 3.1 são apresentados os reagentes químicos utilizados para a extração e medida da atividade das enzimas, sendo indicadas algumas características dos produtos e suas procedências.

Tabela 3.1. Reagentes químicos empregados na extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate.

Reagente químico	Característica	Procedência
Fosfato de sódio dibásico heptaidratado	-	Synth
Polivinilpirrolidona – K90 (PVP-K90)	Massa molecular 360.000	Fluka
Tween 80	n° de hidroxilas 65–80	Vetec
Guaiacol	Pureza 98%	Reagen
Peróxido de hidrogênio	Solução a 30% p/p	Reagen
Pirocatecol	Pureza 99%	Fluka
4-metil fenol ( $p$ -cresol)	Pureza 99%	Merck
Álcool etílico PA	Pureza 99%	Merck

Os principais equipamentos utilizados na extração de oxidases obtidas de erva-mate foram liquidificador doméstico (Walita), centrífuga (Nova Técnica NT815), congelador doméstico com temperaturas de  $-4^{\circ}\text{C}$  (Freezer Frost Free 270 - Brastemp).

Para a extração das oxidases, as folhas *in natura* de erva-mate foram homogeneizadas em um liquidificador com 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M, onde foram previamente adicionados 3% (p/p) de PVP. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 11000xg (8400 rpm), em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . A solução sobrenadante foi utilizada nas determinações de atividade de peroxidase e polifenoxidase. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante todo o processo e posteriormente armazenadas em freezer à  $-4^{\circ}\text{C}$  (Ceni, 2005).

### 3.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As medidas de atividade enzimática foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível (Agilent Technologies 8453).

### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática da peroxidase (POD)

A atividade peroxidásica do extrato bruto de erva mate (obtido como descrito anteriormente) foi determinada espectrofotometricamente em absorbância de 470 nm na reação do tetraguaiacol. Para cada reação foram utilizados 50, 75 e 100 µL do extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de guaiacol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1%, 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 0,02 M e tampão fosfato de sódio 0,05M pH 4,0 para completar volume de 3 mL. Uma unidade (U) de POD foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de tetraguaiacol a partir de guaiacol, na condição padrão (Ceni, 2005).

### 3.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO)

Atividade catecolase: a determinação da atividade catecolase do extrato bruto da erva mate (obtido como descrito anteriormente) foi realizada espectrofotometricamente em absorbância de 420 nm na reação de oxidação do pirocatecol. A atividade foi determinada em uma mistura reacional contendo 50, 75 e 100 µL de extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de pirocatecol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1% e tampão fosfato de sódio 0,05M pH 9,0 para completar volume de 3 mL. Uma unidade (U) de catecolase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de o-quinona a partir de pirocatecol, na condição padrão (Ceni, 2005).

Atividade cresolase: a determinação da atividade cresolase do extrato bruto da erva mate (obtido como descrito anteriormente) foi realizada espectrofotometricamente em absorbância de 400 nm na reação de oxidação do p-fenol. A atividade foi determinada em uma mistura reacional contendo 50, 75 e 100 µL de extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de p-cresol 0,1 M preparada em álcool e tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 para completar volume de 3 mL. Uma unidade (U) de cresolase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de catecol a partir de p-fenol, na condição padrão (Sharma et al., 2001).

### 3.3. TRATAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EM CO<sub>2</sub> PRESSURIZADO

Para verificar o efeito do tratamento com dióxido de carbono pressurizado (CO<sub>2</sub>) sobre a atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, foram avaliados os efeitos da temperatura, tempo de exposição, pressão e taxa de despressurização em CO<sub>2</sub> pressurizado. O intervalo de estudo para cada variável investigada foi determinado com base em trabalhos da literatura (Fricks et al., 2006).

Para verificar o efeito da temperatura, experimentos preliminares indicaram que temperaturas em torno de 30°C conduziam a melhores resultados. Desta forma, buscou-se avaliar este efeito em temperaturas próximas ao ponto crítico do dióxido de carbono, considerando a faixa de temperatura de atividade das enzimas. O efeito da densidade foi avaliado em torno da densidade crítica do CO<sub>2</sub>. A pressão resultante desta faixa de densidade é a faixa de pressão comumente empregada em processos que empregam dióxido de carbono como solvente (70 a 250 bar). Em relação ao tempo de reação, trabalhos da literatura investigando a cinética de reações enzimáticas em meio supercrítico indicaram que o máximo de conversão é altamente variante, dependendo do sistema sob investigação (Oliveira, 1999), mas que, em geral, encontra-se entre 1 e 6 horas, intervalo de estudo então avaliado neste trabalho. O efeito da taxa de despressurização foi avaliado em dois níveis, com despressurização rápida e lenta. Para tal foi tomado como base os trabalhos de Lanza et al. (2004) e Fricks et al. (2006). Com o intuito de estabelecer a taxa de despressurização, a pressão do sistema foi calculada em função da densidade e temperatura com auxílio da equação de Angus et al. (1976). Desta forma, para cada taxa de despressurização foi estabelecida a pressão do sistema em tempos pré-determinados durante a despressurização do sistema.

As condições experimentais foram determinadas através de um planejamento experimental semifatorial, onde as variáveis independentes foram normalizadas no intervalo de -1 a +1. A Tabela 3.2 apresenta a matriz experimental (contemplando as variáveis reais e codificadas) utilizada para o estudo do comportamento da atividade enzimática da PDO e PPO em dióxido de carbono pressurizado.

Tabela 3.2. Matriz experimental para o estudo do comportamento da atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase em CO<sub>2</sub> pressurizado.

Condição experimental	Pressão (P) [bar]	Temperatura (T) [°C]	Tempo de Exposição (t) [h]	Densidade Reduzida (DR) [g/cm <sup>3</sup> ]	Taxa de Despressurização (TD) [Kg/m <sup>-3</sup> /min <sup>-1</sup> ]
1	70,5	30(-1)	1(-1)	0,60(-1)	10(-1)
2	142,3	30(-1)	1(-1)	1,80(1)	200(1)
3	142,3	30(-1)	6(1)	1,80(1)	10(-1)
4	70,5	30(-1)	6(1)	0,60(-1)	200(1)
5	254,4	50(1)	1(-1)	1,80(1)	10(-1)
6	89,2	50(1)	1(-1)	0,60(-1)	200(1)
7	89,2	50(1)	6(1)	0,60(-1)	10(-1)
8	254,3	50(1)	6(1)	1,80(1)	200(1)
9	93,4	40(0)	3,5(0)	1,20(0)	105(0)

Para verificar o efeito das variáveis nas faixas investigadas foi efetuada a medida da atividade enzimática (U/mL) do concentrado protéico antes e após o processamento sob pressão, quantificando-se ao final a perda ou ganho na atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase e a atividade residual de cada enzima, calculadas através das expressões abaixo:

$$\text{Perda ou ganho (\%)} = 100 \frac{\text{Atividade}_{\text{após pressurização}} - \text{Atividade}_{\text{antes da pressurização}}}{\text{Atividade}_{\text{antes da pressurização}}} \quad (3.1)$$

$$\text{Atividade residual (\%)} = 100 \frac{\text{Atividade}_{\text{após pressurização}}}{\text{Atividade}_{\text{antes da pressurização}}} \quad (3.2)$$

### 3.3.1 Aparato experimental

O extrato bruto enzimático foi submetido ao processamento com  $\text{CO}_2$  comprimido em uma unidade experimental montada no Laboratório de Termodinâmica da URI – Campus de Erechim-RS. A unidade consiste basicamente de um cilindro de  $\text{CO}_2$ , dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 260D), um reator em aço inoxidável (volume total de aproximadamente 75mL) e um transdutor de pressão (Smar LD301) equipado com um indicador (Smar HT201), conforme esquematizado na Figura 3.1. A Figura 3.2 apresenta uma vista geral e detalhes da unidade experimental utilizada nos experimentos.

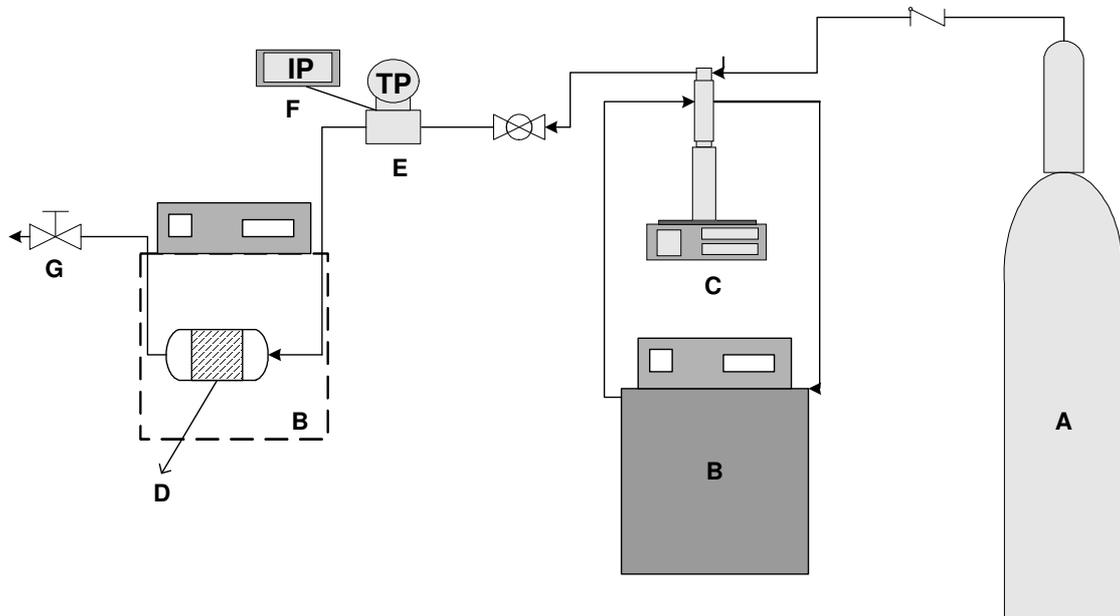


Figura 3.1. Aparato Experimental - A unidade experimental consiste de: cilindro de  $\text{CO}_2$  (A), banhos termostáticos (B), bomba seringa de alta pressão (C), reator (D), transdutor de pressão (E), indicador de pressão (F), válvula micrométrica para despressurização (G).



Figura 3.2. Unidade experimental para processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado do extrato bruto enzimático de erva-mate.

### 3.3.2. Procedimento experimental

Para cada corrida experimental carregava-se o reator com aproximadamente 5mL do concentrado protéico com auxílio de uma seringa. Em seguida, conectava-se o reator à unidade. Durante este período o banho de aquecimento do reator era ligado para estabilizar a temperatura no valor desejado em cada condição experimental. Uma vez atingida a temperatura, o reator era mergulhado no banho e, com auxílio da bomba de seringa, pressurizava-se o sistema com dióxido de carbono até a condição experimental selecionada. É importante salientar que a entrada do reator era conectada à linha (transdutor de pressão + bomba de seringa) por uma tubulação de 1/16” e que parte desta tubulação era também inserida no banho termostatizado. Desta forma, estima-se que o dióxido de carbono ao entrar no reator estava bem próximo da temperatura de operação. O tempo necessário para o alcance da pressão de operação e estabilização do fluxo na bomba de seringa para todas as condições experimentais girava em torno de 5 minutos. Uma vez estabilizado o sistema, era iniciada a contagem do tempo de exposição ao fluido pressurizado.

Depois de decorrido o tempo estabelecido no planejamento experimental para a condição sob análise, prosseguia-se com a despressurização. A despressurização do sistema era realizada em duas etapas: da pressão de operação até cerca de 70 bar, o decréscimo da pressão era realizado com auxílio da bomba de seringa (onde rampas de decréscimo da pressão eram programadas de acordo com a taxa desejada). Uma vez que a

pressão alcançava 70bar, o funcionamento da bomba era interrompido e a despressurização era efetuada através da abertura da válvula micrométrica que era envolvida por uma fita de aquecimento (Fisaton) a fim de evitar o resfriamento excessivo. Feito isto, o extrato era removido do reator e a atividade enzimática era determinada com o concentrado protéico resultante. Na saída do reator era inserido um filtro de nylon para evitar a remoção do extrato proteico. Testes preliminares indicaram que a diferença entre o volume do concentrado protéico antes e depois do processamento com dióxido de carbono era desprezível. Dependendo da condição experimental, os experimentos eram relativamente rápidos (cerca de 5 horas entre a obtenção do extrato, pressurização, experimento propriamente dito, despressurização e medida da atividade) ou em outras situações bem lentas (cerca de 12 horas para contemplar todas as etapas). Todas as condições experimentais foram realizadas em duplicata.

A influência das variáveis de processamento sobre a atividade enzimática da PDO e PPO foi analisada empregando modelos estatísticos. Para tal, os parâmetros relativos às variáveis principais e algumas interações binárias foram estimados minimizando uma função objetivo de mínimos quadrados, ponderando cada ponto por seu erro experimental. Os parâmetros não significativos de acordo com o teste t de Student empregando 95% de confiança foram descartados. A análise dos efeitos das variáveis foi conduzida com auxílio do software Statistica® 5.0.

### **3.3.3. Estabilidade do extrato bruto enzimático à baixa temperatura**

Quando se pretende utilizar extratos enzimáticos brutos, um ponto de fundamental importância é a sua atividade enzimática frente ao tempo de armazenamento. Segundo Ceni (2005), o armazenamento das oxidases em temperaturas de  $-4$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  não diferem entre si e apresentam diferença significativa quando comparados ao armazenamento à  $4^{\circ}\text{C}$ . Neste sentido, esta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento frente ao armazenamento do extrato enzimático de erva-mate processado com dióxido de carbono comprimido, investigando a atividade enzimática do extrato bruto armazenado à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Para tal foi utilizado o extrato enzimático em uma condição experimental que forneceu os resultados mais promissores no que tange ao ganho e/ou perda da atividade das enzimas.

Para o acompanhamento da atividade das enzimas submetidas ao CO<sub>2</sub> comprimido, primeiramente foi obtido o extrato bruto enzimático de erva-mate, conforme descrito no item 3.1 deste Capítulo. Após submetido ao processamento com CO<sub>2</sub>, o extrato bruto enzimático foi dividido em 10 frações e armazenadas em freezer à -4°C. A atividade foi determinada durante 100 dias de armazenamento, após 1, 3, 7, 15, 21, 30, 45, 60 e 100 dias do processamento.

### 3.3.4. Efeito dos ciclos de pressão na atividade do extrato bruto enzimático

Da mesma forma que é importante conhecer a estabilidade enzimática dos extratos brutos, é também de fundamental importância saber qual o comportamento da atividade enzimática frente à utilização do extrato enzimático por vários ciclos de pressão. Da mesma forma que para o estudo da estabilidade ao armazenamento, foi utilizado o extrato enzimático de uma condição experimental que forneceu os resultados mais promissores no que tange ao ganho e/ou perda da atividade das enzimas.

Neste sentido, o objetivo desta etapa foi verificar o comportamento da atividade enzimática do extrato bruto após ter sido submetido a nove ciclos subseqüentes de pressão. O extrato bruto enzimático de erva-mate foi obtido conforme descrito no item 3.1 deste Capítulo e submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado. Após cada etapa de pressão/despressurização, retirava-se uma amostra do extrato bruto do interior da célula e realizava-se a medida de atividade enzimática conforme descrito no item 3.2 deste Capítulo. O procedimento de pressurização/despressurização foi repetido sucessivamente até completar nove ciclos.

## 3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.A.; SOWERS, J.A. **Optimum conditions for binding OF plant phenols TO insoluble polyvinylpyrrolidone.** *Phytochemistry*, 7, 293-301, 1968.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K.M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State**, 1976.

BROOHAERTS, W.; MCPHERSON, J.; LI, B.; RANDALL, E.; LANE, W.D.; WIERSMA, P.A. **Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants.** *Journal of Agricultural and Food Chemical*, 48, 5924-5928, 2000.

CENI, G.C. **Determinação, Estabilidade e Influência da Exposição ao Microondas sobre Oxidases de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim. Erechim, RS, 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 of Agricultural and Food Chemical, 48, 5, 1574-1579, 2000.

FATIBELLO-FILHO, O.; CRUZ VIEIRA, I., **Uso Analítico de Tecidos e Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática**. Química Nova, 25, 3, 455-464, 2002.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide**. Journal of Supercritical Fluids. Elsevier, 2006.

GOMES, M.R.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARNEIRO, G.E.S.; BARROS, E.G; MOREIRA, M.A. **Propriedades físico-químicas da polifenoloxidase de feijão (*Phaseols vulgaris* L.)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 21, 1, 69-72, 2001.

LANZA, M.; PRIAMO, W.L.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA C.; OLIVEIRA D. **The effect of temperature, pressure, exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO<sub>2</sub>**. Appl. Biochem. Biotechnol. 113,181, 2004.

LOOMIS, W.D.; BATTAILE, J. **Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes**. Phytochemistry. 5, 423, 1966.

MARTÍNEZ-PARRA, J.; MUÑOZ, R. **Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. Roots**. Journal of Agricultural and Food Chemical, 49, 4064-4068, 2001.

OHYA, T; MORIMURA, H.S; MIHARA, T; IKAWA, T. **Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish**. Plant Science, 25, 137-145, 1997.

OLIVEIRA, D. **“Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico”**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

PÉREZ-GILABERT, M.; CARMONA, F.G. **Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemical, 48, 695- 00, 2000.

SHARMA, A.A.; GOSWANI, A.M.; SINGH, C.N.; CHHONKAR, O.P.; SINGH, G. **Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation.** Scientia Horticulturae. 87, 147-151, 2001.

SOJO, M.M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F. **Oxidation of salsolinol by banana pulp polyphenol oxidase and its kinetic synergism with dopamine.** Journal of Agricultural and Food Chemical, 48, 5543-5547, 2000.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas etapas desenvolvidas no trabalho, envolvendo a avaliação da atividade e estabilidade da peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate, quando o mesmo foi submetido ao processamento com CO<sub>2</sub> pressurizado. No final do capítulo um estudo a respeito da submissão do extrato a repetidos ciclos de pressão é também apresentado. Primeiramente serão expostos alguns testes preliminares realizados que permitiram definir os parâmetros a serem avaliados nas etapas citadas anteriormente.

### 4.1. RESULTADOS PRELIMINARES

#### 4.1.1. Avaliação da especificidade da polifenoloxidase do extrato enzimático de erva-mate

Como apresentado no capítulo anterior, as condições de extração e medida de atividade para as enzimas peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto enzimático de erva-mate utilizada na execução deste trabalho foram aquelas determinadas por Ceni (2005). Naquele trabalho, a medida de atividade enzimática da polifenoloxidase foi determinada em relação à atividade catecolase. Como evidenciado na revisão da literatura, a polifenoloxidase é um complexo protéico bifuncional que catalisa duas diferentes reações: atividade cresolase (hidroxilação de monofenol para o-difenol) e atividade catecolase (oxidação de o-difenol para o-quinona). Buscando investigar o tipo de atividade da polifenoloxidase predominante no extrato da erva-mate, bem como uma possível mudança na especificidade da polifenoloxidase com o processamento com CO<sub>2</sub> comprimido, ensaios preliminares foram realizados a fim de investigar a atividade cresolase da polifenoloxidase do extrato bruto enzimático de erva-mate.

De acordo com o procedimento descrito no item 3.2 do Capítulo 3, foi realizada a medida da atividade cresolase no extrato bruto enzimático de erva-mate, antes e depois de submetido à pressão em CO<sub>2</sub> comprimido e, para ambos os casos, o extrato não apresentou atividade cresolase. Como o protocolo de medida de atividade catecolase aplicado neste estudo foi determinado para manga (Sharma, 2001), foram realizados experimentos alterando o pH de medida de 7,0 para 9,0, que foi o pH ótimo para determinação da catecolase (Ceni, 2005), bem como uma varredura no comprimento de onda de medida da

atividade, porém o extrato bruto enzimático de erva-mate continuou não apresentando atividade cresolase. Perez-Gilabert e Carmona (2000) descrevem a atividade cresolase e catecolase de beringela parcialmente purificada. Haghbeen e Wue Tan (2003) estudaram a atividade cresolase e catecolase de cogumelo em diferentes substratos sintéticos e naturais e Sharma et al. (2001) estudaram a atividade cresolase e catecolase em extratos de manga. Em geral, tais estudos relataram uma baixa atividade e estabilidade da cresolase. Trabalhando com extratos enzimáticos de uva, alguns autores atribuem esta baixa atividade da cresolase ao seu período lag, onde a maior instabilidade e perda rápida da fase de atividade ocorrem na extração (Wisseman e Lee, 1980; Nakamura et al., 1983 e Sharma et al., 1994). Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a atividade cresolase do extrato enzimático bruto de erva-mate é desprezível. Como ressaltado, o extrato bruto de erva-mate processado com dióxido carbono comprimido também não apresentou atividade cresolase e, desta forma, definiu-se, para o estudo da atividade polifenoloxidase do extrato em CO<sub>2</sub> pressurizado, avaliar somente a atividade catecolase.

#### **4.1.2. Avaliação do efeito da temperatura na atividade da POD e PPO do extrato bruto enzimático de erva-mate em CO<sub>2</sub> comprimido**

Os resultados reportados por Fricks et al. (2006) para o estudo no que diz respeito ao incremento na atividade da peroxidase de rabanete, indicaram que a temperatura de 30°C era a mais favorável dentro da faixa investigada (30-50°C). Ensaio preliminares foram conduzidos no sentido de avaliar temperaturas abaixo do limite inferior estudado por Fricks e colaboradores. Para cada uma das condições experimentais foram obtidos aproximadamente 40,0mL de extrato bruto enzimático, conforme metodologia descrita no item 3.1 do Capítulo 3. Para a realização dos experimentos o extrato bruto enzimático foi descongelado, submetido ao processamento com pressão em CO<sub>2</sub> comprimido, conforme item 3.3 do Capítulo 3, e a atividade enzimática antes e após o tratamento sob pressão foi medida conforme item 3.2 do Capítulo 3.

A Tabela 4.1 apresenta os resultados referentes ao efeito do processamento sob pressão em CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate em temperaturas de 20 e 25°C. Os valores apresentados são referentes à atividade inicial (antes do processamento sob pressão), atividade final (após processamento sob pressão), que representa a média das alíquotas medidas (50, 75 e 100µL); a perda ou ganho na atividade da peroxidase do extrato bruto de erva-mate

submetido à pressão em CO<sub>2</sub> comprimido; juntamente com a incerteza neste valor avaliado pelo desvio padrão das duas duplicatas autênticas.

Conforme demonstrado na Tabela 4.1, as condições experimentais de temperatura e pressão estudadas estão abaixo do ponto crítico do CO<sub>2</sub>, condições estas que permitem que o CO<sub>2</sub> comprimido se apresente em duas fases, gás e líquido, o que dificulta sobremaneira o controle da pressão/densidade do fluido durante a despressurização. Observa-se que quanto menor a temperatura, maior é a perda da atividade para ambas as enzimas. Por outro lado, quanto mais distante do ponto crítico do dióxido de carbono mais ampla é a faixa na região de líquido-vapor do solvente durante a despressurização. Desta forma, pode ser especulado que durante a despressurização em temperaturas menores do que T<sub>c</sub>, algum outro tipo de mecanismo pode estar agindo, onde um borbulhamento do CO<sub>2</sub> líquido para vapor dentro do reator pode estar inferindo diretamente na atividade das enzimas. Na temperatura de 30°C, o sistema atravessa muito rapidamente a região de duas fases durante a despressurização e, neste sentido, o efeito acima seria minimizado. Assim sendo, o intervalo de estudo da variável temperatura foi definido entre 30-50°C, intervalo aplicado nos estudos posteriores.

Tabela 4.1. Atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido a 20 e 25°C.

Exp.	Pressão (P) [bar]	Temperatura (T) [°C]	Tempo (t) [h]	$\rho_R$ (DR) [g/cm <sup>3</sup> ]	Taxa (TD) [Kg/m <sup>-3</sup> /min <sup>-1</sup> ]	Ai (U/mL)	Af (U/mL)	Perda/ganho (%)
POD	60,5	20	1	0,60	10	8,9 5,2	6,7 4,1	-22,9±1,8
POD	65,8	25	1	0,60	10	6,9 7,3	5,7 6,4	-15,0±2,4
PPO	60,5	20	1	0,60	10	302,1 220,0	102,9 56,8	-70,1±4,2
PPO	65,8	25	1	0,60	10	135,0 115,7	70,7 51,4	-51,6±4,0

## 4.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CO<sub>2</sub> PRESSURIZADO

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos para a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase submetidas ao processamento com CO<sub>2</sub> comprimido. Para cada uma das nove condições experimentais foram obtidos aproximadamente 40,0mL de extrato bruto enzimático, conforme metodologia descrita no item 3.1 do Capítulo 3, ressaltando que todos os experimentos foram realizados em duplicata, seguindo o procedimento descrito no Capítulo 3.

Na Tabela 4.2 são apresentados os valores referentes à atividade inicial (antes do processamento sob pressão), atividade final (após processamento sob pressão), que representa a média das alíquotas medidas (50, 75 e 100µL); a perda ou ganho na atividade da peroxidase do extrato bruto de erva-mate submetido à pressão em CO<sub>2</sub> comprimido; juntamente com a incerteza neste valor avaliado pelo desvio padrão das duas duplicatas autênticas.

As diferenças entre as atividades iniciais das duplicatas, observadas nesta tabela são, de certa forma, comuns em se tratando de extratos brutos. Como citado anteriormente, para cada uma das condições experimentais foi obtido um extrato bruto para ser avaliado em CO<sub>2</sub> comprimido. Estas extrações seguiram um critério de coleta em relação à exposição das plantas ao sol, sem nenhum tipo de adubação, as folhas coletadas a partir de diferentes locais de plantas e realizadas em dias sem chuva. Porém, a seleção das folhas não é completamente homogênea, o que pode induzir a esta variação na atividade inicial para cada extrato.

Para melhor visualização dos resultados, a Figura 4.1 expõe os dados referentes à Tabela 4.2. Valores negativos referem-se à perda de atividade da enzima em relação àquela apresentada pelo extrato bruto antes de ser submetido ao processamento com dióxido de carbono comprimido, enquanto que valores positivos referem-se ao incremento na atividade da enzima, de acordo com a expressão apresentada na equação 3.1.

Tabela 4.2. Atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Exp	Pressão (P) [bar]	Temperatura (T) [°C]	Tempo (t) [h]	$\rho_R$ (DR) [g/cm <sup>3</sup> ]	Taxa (TD) [Kg/m <sup>3</sup> /min <sup>-1</sup> ]	Ai (U/mL)	Af (U/mL)	Perda/ganho (%)
1A 1B	70,5	30(-1)	1(-1)	0,60(-1)	10(-1)	3,5 6,1	4,4 7,6	25,2±0,6
2A 2B	142,3	30(-1)	1(-1)	1,80(1)	200(1)	5,8 5,8	6,4 6,6	12,0±1,8
3A 3B	142,3	30(-1)	6(1)	1,80(1)	10(-1)	5,3 4,9	5,2 4,8	-1,6±0,4
4A 4B	70,5	30(-1)	6(1)	0,60(-1)	200(1)	7,1 4,8	7,3 4,9	1,0±1,8
5A 5B	254,4	50(1)	1(-1)	1,80(1)	10(-1)	5,2 5,5	1,7 1,9	-66,3±1,1
6A 6B	89,2	50(1)	1(-1)	0,60(-1)	200(1)	5,6 5,5	2,7 2,4	-54,1±2,3
7A 7B	89,2	50(1)	6(-1)	0,60(1)	10(-1)	6,1 3,8	0,0 0,0	-100
8A 8B	254,4	50(1)	6(1)	1,80(1)	200(1)	4,0 4,8	0,0 0,0	-100
9A 9B	93,4	40(0)	3,5(0)	1,20(0)	105(0)	5,5 3,5	5,1 3,3	6,5±0,8

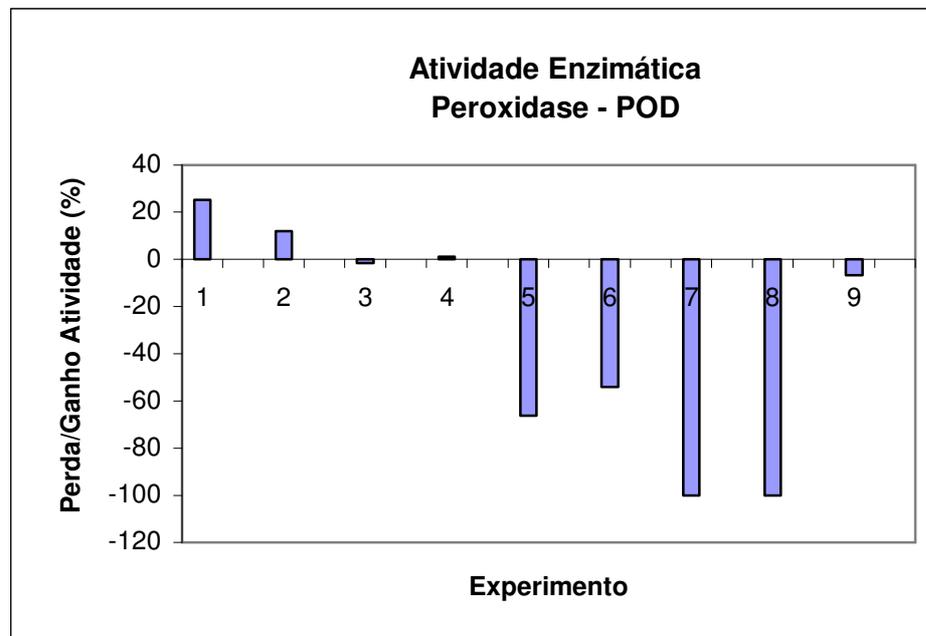


Figura 4.1. Atividade enzimática da peroxidase do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Através dos resultados apresentados, pode-se observar que, na maioria das condições experimentais, houve perda de atividade enzimática da peroxidase quando a enzima foi submetida ao CO<sub>2</sub> pressurizado. As maiores perdas (100%) ocorreram nos experimentos 7 e 8, sendo a condição experimental 8 a que representa as condições de maiores temperaturas (50°C), densidade reduzida (1,80), tempo de exposição (6h), taxa de despressurização (200 kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>) e pressão (254,4 bar). Porém, em três das condições experimentais (1, 2 e 4), verificou-se um incremento na atividade. No experimento 1, que representa as condições inferiores de temperatura (30°C), densidade reduzida (0,60), tempo de exposição (1h), taxa de despressurização (10 kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>) e pressão (70,5 bar), ocorreu um incremento de 25,2% na atividade da peroxidase.

Resultados similares foram relatados por Fricks et al. (2006), que observaram um incremento de 115% na atividade da peroxidase do extrato precipitado de rabanete (*Raphanus sativus* L.) após tratamento em CO<sub>2</sub> comprimido a 30°C por 1h com 70,5 bar de pressão e taxa de despressurização de 10 kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>. Em outra condição experimental houve uma perda na atividade de 89,5% a 50°C por 6h com 254,4 bar de pressão e taxa de despressurização de 200 kgm<sup>-3</sup>min<sup>-1</sup>. Em comparação com este trabalho, ambas peroxidases apresentaram comportamento similar frente ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido; porém, cabe ainda ressaltar que tratam-se de extratos diferentes: um complexo enzimático constituído pelas enzimas peroxidase e polifenoloxidase proveniente de um extrato bruto de erva-mate, enquanto o outro é um extrato pré-purificado de rabanete constituído apenas de peroxidase.

Para avaliar o efeito das variáveis investigadas sobre a alteração da atividade da peroxidase do extrato de erva-mate, foi empregado um modelo empírico com auxílio do software Statistica 5.0. Os parâmetros do modelo foram estimados minimizando uma função objetivo baseada no método dos mínimos quadrados. A significância dos parâmetros foi avaliada adotando-se um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 4.3.

Através da análise dos efeitos apresentados na Tabela 4.3, verifica-se que em média, dentro da faixa investigada, as principais variáveis significativas apresentaram efeito negativo na atividade da peroxidase. Também, os resultados indicaram que efeitos de interação estão presentes no processo. Dentre as variáveis investigadas, a temperatura apresentou efeito mais pronunciado.

Tabela 4.3. Resultados da regressão relacionados à atividade enzimática da peroxidase submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Modelo = a0 + a1\*T + a2\*t + a3\*DR + a4\*TD\*DR + a5\*t\*DR + a6\*(termo quadrático)

R = 0,999

	Parâmetros						
	a0	a1	a2	a3	a4	a5	a6
Estimativa	-6,70	-44,62	-14,67	-3,50	-5,22	2,85	-28,78
Erro	0,98	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	1,04
P	0,02	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01

Uma possível explicação para a estabilização da POD à pressão contra a inativação por calor está na habilidade dos grupos funcionais da proteína em interagir com a água. Rupley et al. (1983) descrevem a importância da água na estrutura, função e estabilidade da proteína. Na presença de água, as ligações não covalentes são fortalecidas pela pressão e desfavorecidas pela alta temperatura. Este aspecto pode explicar o incremento da atividade da peroxidase à alta pressão em temperaturas baixas. Para melhor descrever a importância da água contida nas enzimas, Fricks et al. (2006) relatam o comportamento da peroxidase de rabanete purificada quando liofilizada antes de submetida ao tratamento em CO<sub>2</sub> comprimido. A própria liofilização já provoca uma redução na atividade inicial da peroxidase e após processamento sob pressão a 30°C por 1h com 70,5 bar de pressão, o extrato que foi previamente liofilizado por 12 h perde 58,4% da atividade e 85,1% quando liofilizado por 24h, ao contrário do que ocorreu com a atividade do extrato original, onde a atividade apresentou um incremento de 112%. Também é importante ressaltar que como o dióxido de carbono é um solvente que não apresenta alta afinidade com a água, é provável que o fluido não forme uma fase única com o concentrado protéico.

O mesmo tratamento dado à peroxidase foi aplicado à polifenoloxidase, de forma que na Tabela 4.4 são apresentados os valores referentes à atividade inicial (antes do processamento sob pressão), atividade final (após processamento sob pressão), que representam a média das alíquotas medidas (50, 75 e 100µL); a perda ou ganho na atividade enzimática da polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate submetido à pressão em CO<sub>2</sub> comprimido; juntamente com a incerteza neste valor avaliado pelo desvio padrão das duas duplicatas autênticas. Para melhor visualização dos resultados, apresenta-se a Figura 4.2. A

exemplo da análise da peroxidase, na Figura 4.2 e Tabela 4.4, valores negativos referem-se à perda de atividade da enzima em valores percentuais.

Tabela 4.4 – Atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Exp	Pressão (P) [bar]	Temperatura (T) [°C]	Tempo (t) [h]	$\rho_R$ (DR) [g/cm <sup>3</sup> ]	Taxa (TD) [Kg/m <sup>-3</sup> /min <sup>-1</sup> ]	Ai (U/mL)	Af (U/mL)	Perda/ganho (%)
1A	70,5	30(-1)	1(-1)	0,60(-1)	10(-1)	427,8	187,1	-44,7±1,0
1B						682,1	370,0	
2A	142,3	30(-1)	1(-1)	1,80(1)	200(1)	681,4	424,3	-40,5±2,8
2B						420,0	237,9	
3A	142,3	30(-1)	6(1)	1,80(1)	10(-1)	700,0	310,0	-56,7±0,9
3B						545,7	231,4	
4A	70,5	30(-1)	6(1)	0,60(-1)	200(1)	871,4	320,0	-66,3±3,0
4B						525,7	161,4	
5A	254,4	50(1)	1(-1)	1,80(1)	10(-1)	640,0	154,3	-72,6±3,3
5B						490,0	151,4	
6A	89,2	50(1)	1(-1)	0,60(-1)	200(1)	810,0	257,1	-70,7±2,3
6B						285,7	77,14	
7A	89,2	50(1)	6(1)	0,60(-1)	10(-1)	843,1	372,9	-52,9±2,9
7B						518,6	259,9	
8A	254,4	50(1)	6(1)	1,80(1)	200(1)	679,3	212,1	-66,4±2,4
8B						408,6	147,1	
9A	93,4	40(0)	3,5(0)	1,20(0)	105(0)	840,7	527,1	-35,6±1,7
9B						392,1	259,3	

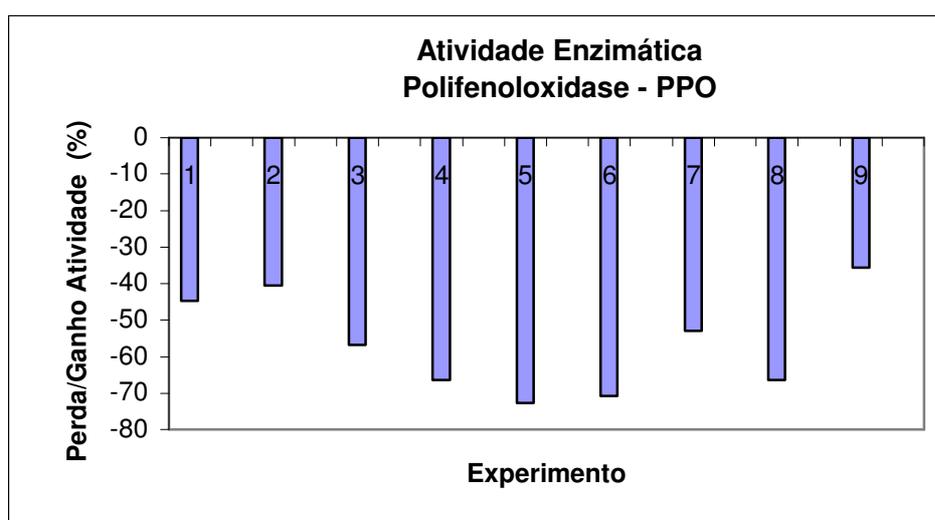


Figura 4.2. Atividade enzimática da polifenoloxidase do extrato bruto de erva-mate submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Diferentemente da peroxidase, observa-se que a atividade enzimática da polifenoloxidase submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido, em todas as condições experimentais apresentou perda em relação ao seu valor original, sendo que as maiores perdas ocorreram nos experimentos 5 e 6 (72,6% e 70,7%, respectivamente). As menores perdas de atividade ocorreram nos experimentos 1, 2 e 9, que apresentaram perdas de 44,7%, 40,5% e 35,6%, respectivamente.

Resultados similares foram relatados por Chen et al. (1992), onde a PPO do extrato purificado de camarão, lagosta e batata foi submetido ao processamento com CO<sub>2</sub> a 58 bar com temperatura de 43°C por 1 min, o que provocou uma perda na atividade enzimática em relação à original de 98, 78 e 55%, respectivamente. Todas as PPOs apresentaram perdas ao serem processadas em CO<sub>2</sub> comprimido. Porém, cabe também ressaltar que os extratos empregados são de origens diferentes (animal e vegetal), o de erva-mate é extrato bruto de um complexo enzimático constituído pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase e os demais são extratos purificados.

Para avaliar o efeito das variáveis investigadas sobre a alteração da atividade da polifenoloxidase do extrato de erva-mate, foi empregado um modelo empírico com auxílio do software Statistica 5.0. Os parâmetros do modelo foram estimados minimizando uma função objetivo baseada no método dos mínimos quadrados. A significância dos parâmetros foi avaliada adotando-se um nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Resultados da regressão relacionados à atividade enzimática da polifenoloxidase submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

$$\text{Modelo} = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot t + a_3 \cdot TD + a_4 \cdot T \cdot DR + a_5 \cdot T \cdot t + a_6 \cdot (\text{quadrático})$$

$$R = 0,998$$

	Parâmetros						
	a0	a1	a2	a3	a4	a5	a6
Estimativa	-35,61	-6,80	-1,72	-2,12	-3,65	7,72	-23,24
Erro	1,06	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	1,70
P	<0,01	<0,01	0,09	0,06	0,02	<0,01	<0,01

Dentro da faixa investigada, as principais variáveis apresentaram efeito negativo sobre a atividade da polifenoloxidase, porém sem que haja preponderância de alguma delas.

Destaca-se o elevado valor do termo independente indicando que o processamento a alta pressão leva a perdas acentuadas na atividade da polifenoloxidase do extrato bruto da erva-mate. Buscando avaliar o comportamento em relação à seletividade do complexo enzimático bruto, foi determinada uma relação entre a atividade peroxidásica e polifenoloxidásica (POD/PPO) no extrato bruto antes e depois de submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Tal relação foi obtida com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.4 e é demonstrada na Figura 4.3.

A análise desta figura sugere uma mudança na especificidade do extrato bruto enzimático de erva-mate. Mudança essa que se torna mais acentuada em determinadas condições experimentais. Uma análise da Figura 4.3 indica que nos experimentos 7 e 8 o extrato bruto da erva-mate após processado em CO<sub>2</sub> comprimido apresenta somente atividade em relação à polifenoloxidase, uma vez que a enzima peroxidase é inativada nestas condições de processamento. Este resultado pode ser altamente relevante quando se busca um extrato enzimático com alta especificidade.

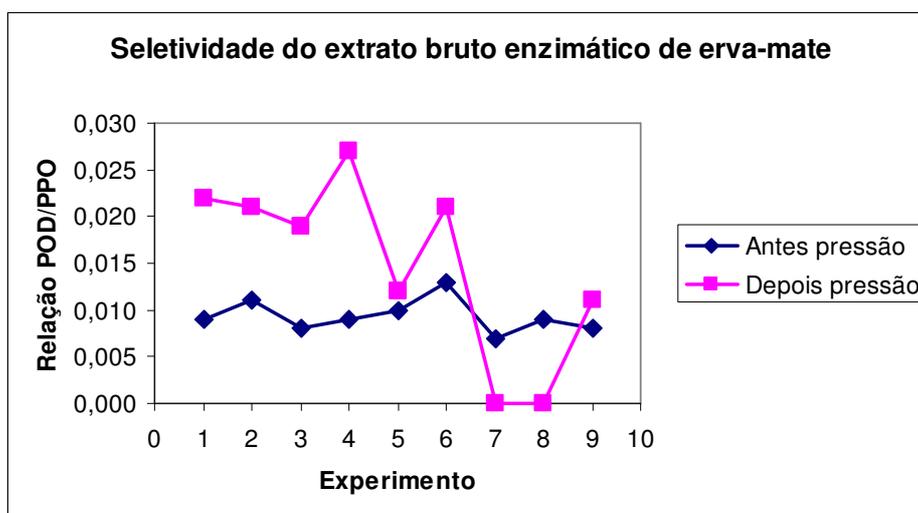


Figura 4.3.– Relação entre a atividade enzimática POD/PPO antes e após submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

#### 4.2.1. pH dos extratos brutos enzimáticos de erva-mate

Concomitantemente, estudos foram realizados de modo a investigar o comportamento do pH do extrato bruto enzimático de erva-mate submetido ao processamento com CO<sub>2</sub> comprimido. A medida do pH foi realizada no extrato bruto enzimático antes e depois de

submetido à pressão em cada uma das nove condições experimentais e os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Resultados de pH do extrato bruto enzimático de erva-mate submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Experimento	pH inicial	pH final	% Redução
1A	6,87	6,21	9,4±0,2
1B	6,85	6,22	
2A	6,81	6,11	10,5±0,2
2B	6,90	6,16	
3A	6,80	6,19	8,1±0,8
3B	6,85	6,35	
4A	6,80	6,15	8,8±0,7
4B	6,80	6,25	
5A	6,85	6,26	7,9±0,7
5B	6,84	6,35	
6A	6,86	6,16	8,7±1,5
6B	6,82	6,33	
7A	6,81	6,21	9,1±0,3
7B	6,83	6,19	
8A	6,85	6,29	8,1±0,1
8B	6,80	6,26	
9A	6,92	6,33	8,7±0,1
9B	6,90	6,29	

De acordo com os resultados de pH apresentados na Tabela 4.6, verifica-se que o extrato bruto enzimático sofreu reduções da ordem de 8% no pH em todos os experimentos após submetidos ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido. Chen et al. (1992) estudaram o comportamento do pH quando realizaram estudos sobre o efeito da pressão (sc-CO<sub>2</sub>) na atividade enzimática da polifenoloxidase purificada de camarão, lagosta e batata. O tratamento dessas PPOs sob pressão (sc-CO<sub>2</sub>) (58 atm) a 43°C por 1 min provocou uma redução no pH de 9,1 para 5,4; 6,5 para 4,8 e de 6,1 para 4,2, respectivamente. Cabe ressaltar as diferentes origens dos extratos (animal e vegetal) e o fato de ter sido utilizado neste trabalho um extrato bruto de erva-mate e os extratos avaliados por Chen et al. (1992) terem sido purificados.

Em meio não aquoso, enzimas mudam sua atividade se o pH do meio micro-aquoso em volta dela for alterado. Presume-se que o CO<sub>2</sub> se dissolve na camada de hidratação associada com a enzima, podendo mudar o pH local e afetar a atividade enzimática. Weder et al. (1992) consideram que a redução no pH pode ser provocada pela facilidade com que a arginina (aminoácido presente nas proteínas) interage com o CO<sub>2</sub>, formando um complexo bicarbonato. De posse dos dados apresentados na Tabela 4.6, buscou-se correlacionar o pH final e a variação de pH em cada experimento com as respectivas atividades da POD e PPO após processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado. A Tabela 4.7 apresenta os dados referentes a esta avaliação.

Tabela 4.7. Coeficientes de correlação entre o pH e atividade enzimática de POD e PPO após processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

$\Delta$ pH - %POD	$\Delta$ pH - %PPO	pH final - %POD	pH final - %PPO
0,48	0,66	-0,25	-0,28

$$\Delta\text{pH} = \text{pH final} - \text{pH inicial}$$

Inicialmente levantou-se a hipótese de que a redução do pH poderia estar relacionada aos resultados obtidos para a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato bruto enzimático após submetido a pressão em CO<sub>2</sub> comprimido, uma vez que o pH ótimo de medida de atividade da peroxidase é 4,0, enquanto que o da polifenoloxidase é 9,0 para o extrato bruto de erva-mate (Ceni, 2005). Como reduções no pH ocorrem em todas as condições experimentais, essa redução poderia estar relacionada a um distanciamento do pH ótimo de medida de atividade da polifenoloxidase podendo, então, provocar a sua perda de atividade. Porém, analisando os resultados apresentados na Tabela 4.7, é possível inferir que o nem a redução do pH ou o pH final apresentaram correlação com a atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase.

### 4.3. ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO À BAIXA TEMPERATURA APÓS PROCESSAMENTO EM CO<sub>2</sub> PRESSURIZADO

Baseado nos resultados obtidos a partir da atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, buscou-se o estudo da estabilidade enzimática do extrato bruto após o processamento com dióxido de carbono comprimido. A condição escolhida para este estudo

foi a condição experimental 1 (Tabelas 4.2 e 4.4), pois esta condição levou ao maior aumento da atividade enzimática para a POD e uma das menores perdas de atividade enzimática para a PPO. Aproximadamente 40,0 mL do extrato bruto enzimático foi obtido conforme item 3.1 do Capítulo 3 e então submetido à condição experimental 1, conforme item 3.3 do Capítulo 3. Após a realização do experimento o extrato foi fracionado em 10 alíquotas e as mesmas foram armazenadas em freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$ , durante o período de armazenamento de 100 dias. As atividades enzimáticas foram avaliadas durante os seguintes dias de estocagem: 1, 3, 7, 15, 21, 30, 45, 60 e 100 dias.

Os resultados obtidos para a estabilidade enzimática da peroxidase submetida ao processamento em  $\text{CO}_2$  comprimido são apresentados na Tabela 4.8. Para melhor visualização dos resultados, apresenta-se a Figura 4.4. Para fins de comparação, esta figura também apresenta os resultados obtidos por Ceni (2005), que avaliou a estabilidade do extrato bruto enzimático de erva-mate, sem processamento em  $\text{CO}_2$  pressurizado.

Tabela 4.8. Estabilidade enzimática à baixa temperatura ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida processamento em  $\text{CO}_2$  comprimido.

Dias armazenamento	Atividade POD (U/mL)	Perda/Ganho (%)
Atividade inicial - A	4,57	
Atividade inicial - B	6,22	
1A	5,49	19,9±0,3
1B	7,44	
3A	5,59	19,7±2,6
3B	7,28	
7A	5,12	10,8±1,2
7B	6,82	
15A	5,00	7,3±2,1
15B	6,54	
21A	4,75	3,0±0,9
21B	6,35	
30A	4,52	-2,2±1,1
30B	6,01	
45A	4,22	-7,1±0,5
45B	5,81	
60A	4,07	-11,0±0,1
60B	5,53	
100A	3,63	-19,4±1,1
100B	5,08	

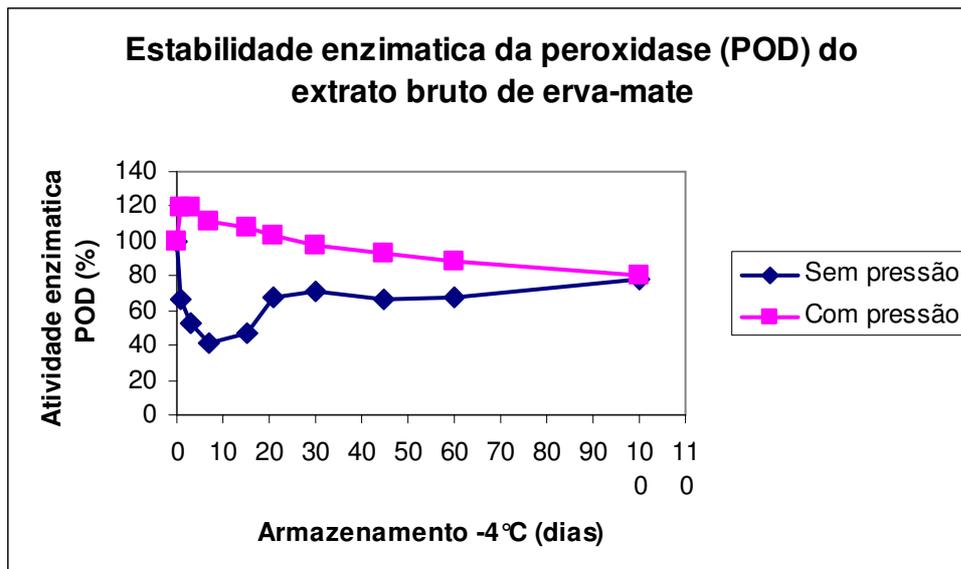


Figura 4.4. Estabilidade enzimática à baixa temperatura da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Através dos resultados apresentados pode-se observar que, após o incremento inicial na atividade da peroxidase, a mesma vai sofrendo um decréscimo no decorrer do período de armazenamento apresentando, após 100 dias de armazenamento, uma atividade 19,4% inferior àquela do extrato bruto do dia zero. A literatura dispõe de poucas informações pertinentes à estabilidade das enzimas à baixas temperaturas. Ceni (2005) estudou o comportamento das enzimas peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto enzimático de erva-mate armazenadas por um período de 149 dias. A atividade enzimática da peroxidase diminuiu após 9 dias de armazenamento. Após 14 dias, a enzima recuperou a atividade gradativamente, alcançando, após 99 dias de armazenamento, cerca de 78% da sua atividade inicial. Esses resultados revelam que o processamento sob pressão apresenta vantagem nos primeiros 21 dias de armazenamento quando comparado ao mesmo período sem processamento.

Os resultados obtidos para a atividade enzimática da polifenoloxidase submetida ao processamento com CO<sub>2</sub> comprimido são apresentados na Tabela 4.9. Para melhor visualização, os resultados serão apresentados na Figura 4.5. Na Figura 4.5 e Tabela 4.9, valores negativos referem-se à perda de atividade da enzima, em valores percentuais.

Tabela 4.9 – Estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Dias armazenamento	Atividade PPO (U/mL)	Perda/Ganho (%)
Atividade inicial – A	403,9	
Atividade inicial – B	415,7	
1A	205,7	-50,1±1,1
1B	202,9	
3A	192,9	-53,6±1,4
3B	187,1	
7A	282,9	-31,6±1,6
7B	277,5	
15A	257,1	-37,2±0,9
15B	257,4	
21A	347,1	-12,7±1,4
21B	368,6	
30A	322,9	-18,9±1,1
30B	341,7	
45A	314,3	-20,7±1,5
45B	335,7	
60A	302,9	-25,4±0,4
60B	308,6	
100A	286,9	-29,7±0,7
100B	289,2	

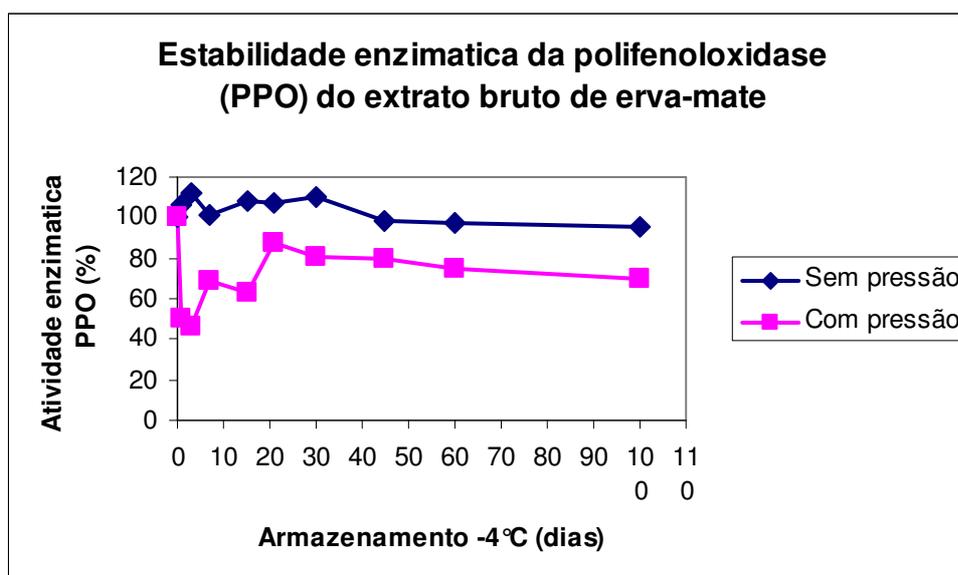


Figura 4.5 - Atividade enzimática a baixa temperatura (-4°C) da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Através dos resultados apresentados pode-se observar que, após a perda inicial na atividade da polifenoloxidase, a mesma sofre um decréscimo significativo após os 3 dias de armazenamento e tem parte de sua atividade regenerada durante o decorrer do período de armazenamento apresentando, após 100 dias de armazenamento, uma atividade 29,7% inferior à inicial. Ceni (2005) estudou o comportamento da enzima polifenoloxidase do extrato bruto enzimático de erva-mate armazenada por um período de 149 dias. A atividade enzimática da polifenoloxidase apresentou um pequeno incremento na sua atividade nos primeiros dias de armazenamento. Após 39 dias a enzima retoma a sua atividade original mantendo cerca de 95% de sua atividade inicial após 99 dias de armazenamento. Ao contrário do resultado apresentado pela peroxidase, para a polifenoloxidase, o processamento sob pressão, passa a ser vantajoso após os 21 dias de armazenamento, onde os resultados apresentam-se similares a aqueles sem processamento.

Buscando avaliar o comportamento em relação à seletividade do complexo enzimático bruto, foi determinada uma relação entre a estabilidade à baixa temperatura da peroxidase e da polifenoloxidase (POD/PPO) no extrato bruto sem ter sido submetido à nenhum tratamento e o extrato bruto submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Tal relação foi obtida com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 e é demonstrada na Figura 4.6.

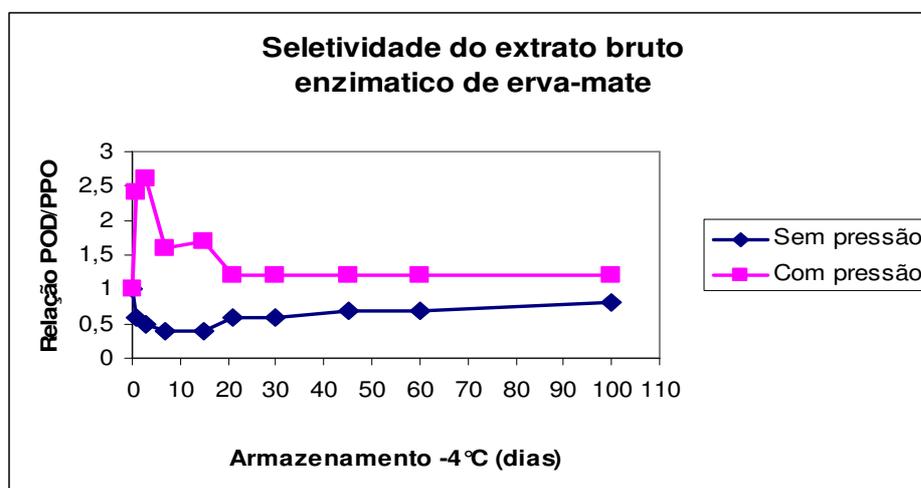


Figura 4.6. Relação entre a estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) do extrato bruto enzimático de POD/PPO sem ser submetido a nenhum tratamento e o extrato bruto submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

A análise individual da estabilidade enzimática do extrato bruto de peroxidase e da polifenoloxidase reflete uma perda significativa na estabilidade da polifenoloxidase, em

virtude da perda de atividade causada pelo tratamento sob pressão. Porém, analisando a estabilidade enzimática do extrato bruto pela relação entre as duas enzimas, o que se constata é uma mudança acentuada na especificidade do extrato bruto enzimático de erva-mate, principalmente nos dias iniciais de armazenamento. Isso sugere que, mesmo ocorrendo perdas na atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, pode ser tirado proveito do processamento em CO<sub>2</sub> comprimido do complexo enzimático do extrato bruto de erva-mate.

Da mesma forma, o comportamento em relação à seletividade do complexo enzimático bruto foi determinada uma relação entre a estabilidade à baixa temperatura da peroxidase (POD/POD) e da polifenoloxidase (PPO/PPO) no extrato bruto sem ter sido submetido a nenhum tratamento e o extrato bruto submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado. Tal relação foi obtida com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 e é demonstrada na Figura 4.7.

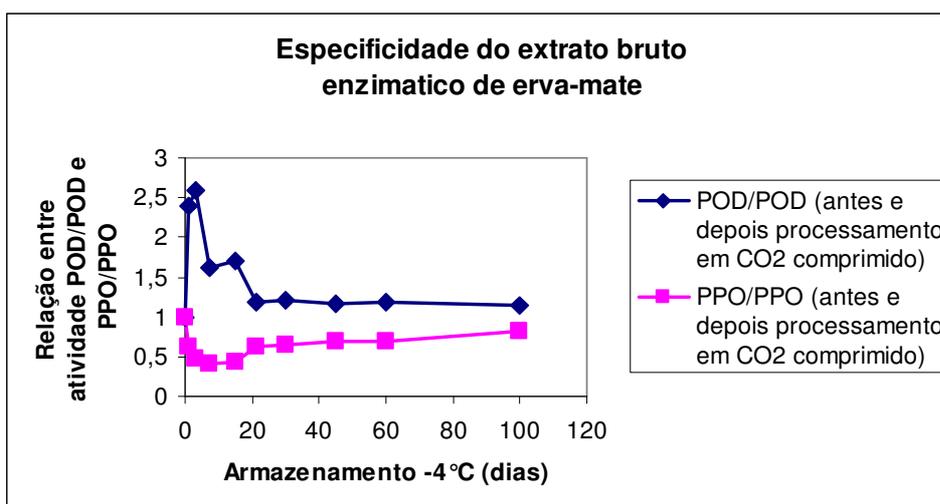


Figura 4.7. Relação entre a estabilidade enzimática à baixa temperatura (-4°C) do extrato bruto enzimático de POD/POD e PPO/PPO antes e depois de submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

Analisando a Figura 4.7 pode-se observar uma mudança acentuada na estabilidade da peroxidase à baixa temperatura (-4°C) até os primeiros 21 dias de armazenamento. Após esse período, a peroxidase apresenta comportamentos similares tanto antes como depois de processada em CO<sub>2</sub> comprimido. Para o caso da polifenoloxidase, verifica-se um comportamento similar com relação a sua estabilidade à baixa temperatura (-4°C) tanto antes como depois de submetida ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

#### 4.4. EFEITO DOS CICLOS DE PRESSÃO

Após os estudos da atividade e estabilidade enzimática da POD e PPO submetidas ao processamento com CO<sub>2</sub> pressurizado, realizou-se experimentos a fim de determinar a influência de ciclos sucessivos de pressão sobre a atividade das enzimas. Pelo mesmo motivo citado anteriormente, para o estudo da estabilidade enzimática, a condição escolhida para os experimentos foi a condição experimental 1 (conforme Tabelas 4.2 e 4.4). Aproximadamente 40,0mL do extrato bruto enzimático foi obtido conforme item 3.1 do Capítulo 3 e, então, submetido à condição experimental 1, conforme item 3.3 do Capítulo 3. Após cada etapa de pressurização/despressurização foi retirada uma alíquota do extrato do reator e a medida de atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2 do Capítulo 3. Os resultados obtidos no estudo do efeito dos ciclos de pressão sobre a atividade enzimática da peroxidase são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Efeito de ciclos de pressurização/despressurização com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate.

N° Ciclos	Atividade POD (U/mL)	Perda/Ganho (%)
Atividade inicial – A	4,07	
Atividade inicial – B	5,96	
1A	4,91	19,6±0,1
1B	7,07	
2A	4,84	17,2±1,6
2B	6,88	
3A	4,68	12,9±2,0
3B	6,61	
4A	4,38	6,9±0,7
4B	6,33	
5A	4,13	0,6±0,9
5B	5,94	
6A	3,96	-3,2±0,5
6B	5,74	
7A	2,98	-25,4±1,3
7B	4,52	
8A	2,91	-28,9±0,5
8B	4,21	
9A	2,34	-41,4±1,1
9B	3,56	

Para melhor visualização dos resultados, apresenta-se a Figura 4.8, onde valores negativos referem-se à perda de atividade da enzima e valores positivos referem-se ao incremento na atividade da enzima, ambos em valores percentuais.

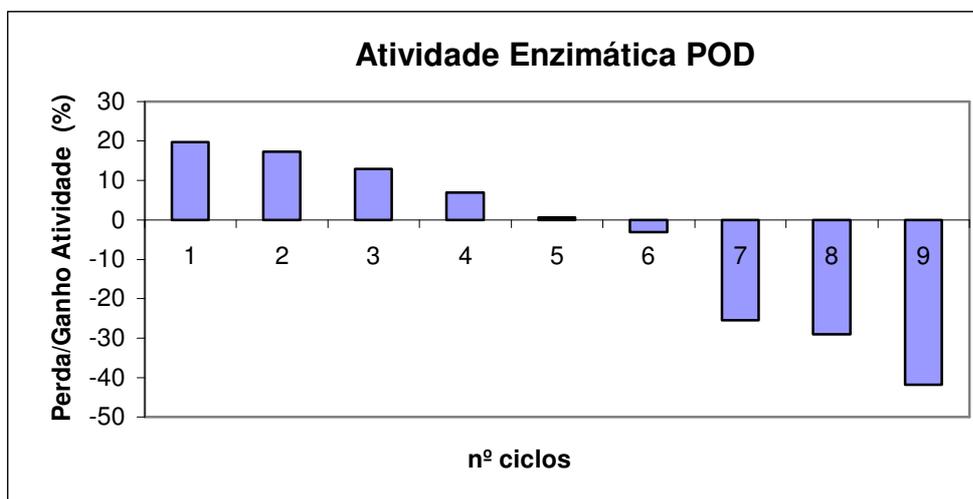


Figura 4.8. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) do extrato bruto de erva-mate.

Através dos resultados apresentados pode-se observar que após o incremento inicial na atividade da peroxidase a mesma sofre um decréscimo no decorrer da aplicação dos ciclos de pressão/despressurização, apresentando, ao final de 9 ciclos, uma atividade 41,1% inferior à original. Na Figura 4.9 e Tabela 4.11 são apresentados os resultados referentes ao estudo do efeito do número de ciclos na atividade da polifenoloxidase. Valores negativos referem-se à perda de atividade da enzima, em valores percentuais.

Através dos resultados apresentados pode-se observar que a perda na atividade da polifenoloxidase ocorre gradativamente no decorrer dos ciclos de pressurização/despressurização, alcançando cerca de 95% de redução da sua atividade inicial ao final de 9 ciclos. A literatura apresenta diferentes resultados sobre os efeitos de ciclos sucessivos de pressurização/despressurização sobre a atividade enzimática, resultados estes que dependem do tipo de enzima, solvente, temperatura, pressão e tempo de exposição investigados. Steinberger et al. (1999) relataram que após 15 passos de depressurização a atividade da esterase (EP10) e da lipase (*Aspergillus niger*) a 35°C e 150 bar em CO<sub>2</sub>, manteve-se quase inalterada. Habulin et al. (2005) submeteram a

proteínase de *Carica papaya* por 1h a 300 bar e 50°C e, após 30 passos de depressurização, demonstraram ter ocorrido perda de até 50% na atividade enzimática.

Tabela 4.11. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização no processamento em CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate.

N° Ciclos	Atividade PPO (U/mL)	Perda/Ganho (%)
Atividade inicial – A	525,1	
Atividade inicial – B	498,8	
1A	250,8	-51,4±0,8
1B	246,3	
2A	251,1	-53,6±1,4
2B	224,0	
3A	234,2	-55,0±0,4
3B	226,4	
4A	211,6	-60,8±1,1
4B	190,5	
5A	117,1	-79,3±2,2
5B	92,8	
6A	50,4	-89,8±0,6
6B	53,9	
7A	33,6	-94,1±0,5
7B	26,9	
8A	32,0	-94,5±0,5
8B	24,9	
9A	26,2	-95,4±0,3
9B	20,9	

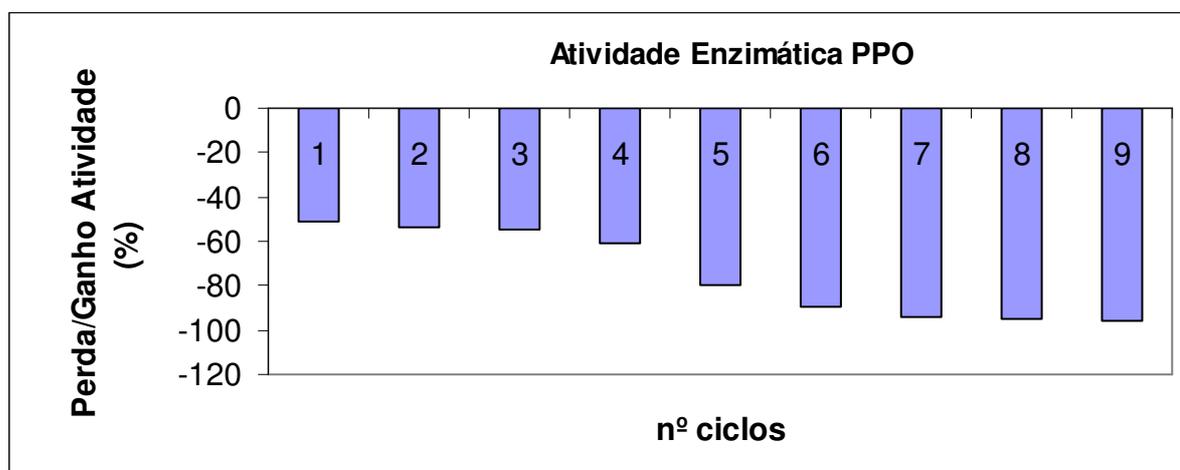


Figura 4.9. Efeito dos ciclos de pressurização/despressurização com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate.

Oliveira et al. (2006) relataram que a atividade da lipase imobilizada Novozym 435 apresentou perda de 10% na atividade quando submetida a CO<sub>2</sub> pressurizado após 5 ciclos de pressão/despressurização e manteve-se inalterada no caso do emprego dos solventes propano e n-butano pressurizados.

De forma a avaliar o comportamento em relação à seletividade do complexo enzimático bruto, foi determinada uma relação entre a atividade peroxidásica e a polifenoloxidásica (POD/PPO) no extrato bruto após ter sido submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado. Tal relação foi obtida com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.10 e 4.11 e é demonstrada na Figura 4.10.

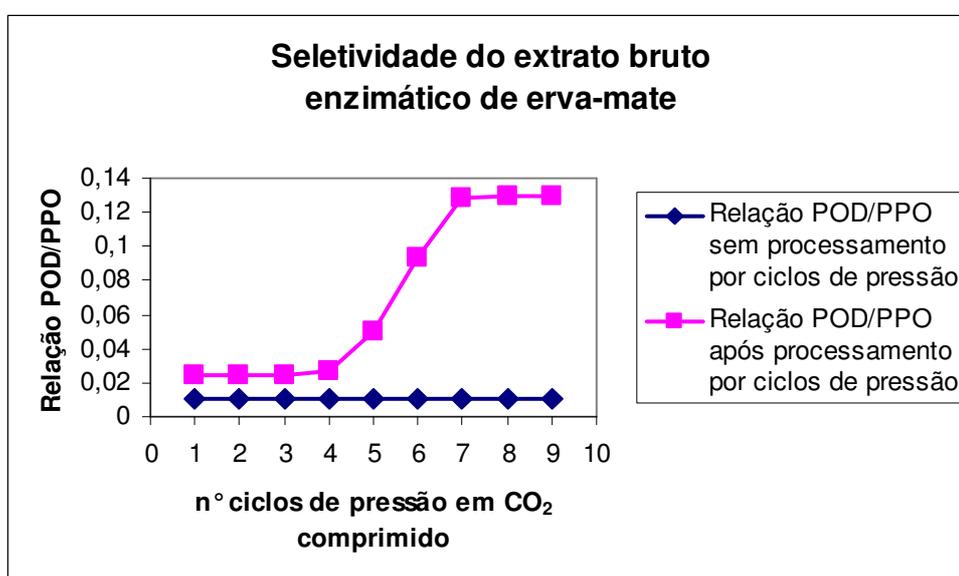


Figura 4.10. Relação entre a atividade peroxidásica e polifenoloxidásica POD/PPO do extrato bruto enzimático de erva-mate após ser submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido.

De acordo com a Figura 4.10 pode-se observar que, embora ocorra uma pequena mudança na especificidade o comportamento do extrato bruto enzimático é similar até o quarto ciclo de pressão em relação ao mesmo extrato sem tratamento em fluido pressurizado. A partir do quinto ciclo de pressão é que ocorre uma mudança acentuada em relação à especificidade do extrato antes e depois de submetido ao processamento em CO<sub>2</sub> comprimido, onde ao final dos 9 ciclos observa-se um aumento pronunciado na especificidade do extrato enzimático em direção a atividade peroxidásica.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CENI, G.C. Determinação, Estabilidade e Influência da Exposição ao Microondas sobre Oxidases de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill). Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim. Erechim, RS, 2005.

CHEN, J.S.; BALABAN, M.O.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R.; HSU, W.Y. **Inactivation of Polyphenol Oxidase by High-Pressure Carbon Dioxide**. J. Agric. Food Chem. 40, 2345-2349, 1992.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D. e DARIVA, C. **Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide**. Journal os Supercritical Fluids, 2006, in press.

HABULIN, M.; PRIMOZIC, M; KNEZ, Z. Stability of proteinase from Carica papaya latex in dense gases. J. Supercritical Fluids. 33(1), 27-34, 2005.

HAGHBEEN, k; WUE TAN, E. **Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates**. Analytical Biochemistry 312, 23-32, 2003.

NAKAMURA, K.; AMANO, Y.; KAGAMI, M. **Purification and some properties of a polyphenoloxidase from Kosku grapes**. Am. J. Enol. Vitic. 34, 122-127, 1983.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA; C.; OLIVEIRA, J. V. **Assesment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, 2006, *in press*.

PEREZ-GILABERT, M.; CARMONA, G. **Characterization of Catechols activities of Eggplant Polyphenol Oxidase**. J. Agric. Food Chem. 48, 695-700, 2000.

RUPLEY, J.A.; GRATTON, E.; CARERI, G. **Water and Globular-proteins.** Biochemical Sciences: Review. 8, 18-22, 1983.

SHARMA, R.R.; SHARMA, H.C.; GOSWANI, A.M. **Polyphenol oxidase activity and phenolic content pattern during shoot development of grape (*Vitis vinifera* L.) in different growing seasons.** J. Plant Biochem. Biotechnol. 3, 145-147, 1994.

SHARMA, R.R.; GOSWANI, A.M.; SINGH, C.N.; CHHONKAR, O.P.; SINGH, G. **Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation.** Scientia Horticulturae. 87, 147-151, 2001.

STATISTICA FOR WINDOWS, versão 5.5; Statsoft, 2000.

STEINBERGER, D.; GAMSE, T.; MARR, R. **Enzyme Inactivation and Purification Effects of Supercritical Carbon Dioxide.** In: Proceedings of Fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications, 339-346, Itália, 1999.

WEDER, J.K.P.; BOKOR, M V.; HEGARTY, M P. **Effect of supercritical carbon dioxide on arginine.** Food Chemistry 44, 287-290, 1992.

WISSEMAN, K.W.; LEE, C.Y. **Polyphenol oxidase activity during grape maturation and wine production.** Am. J. Enol. Viticult. 31, 201-211, 1980.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho foram conduzidos estudos sobre o efeito do processamento com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase e peroxidase do extrato bruto de erva-mate, avaliando também a estabilidade térmica a baixa temperatura das enzimas e investigando a influência de vários ciclos subseqüentes de pressão na atividade das mesmas.

O desenvolvimento deste trabalho permitiu determinar através da utilização de um planejamento experimental semifatorial o efeito das variáveis do processamento com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase e peroxidase do extrato bruto erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill). Os resultados indicaram que é possível aumentar cerca de 25% ou mesmo inativar completamente a atividade peroxidásica do extrato em função da condição de processamento. Já para a polifenoloxidase todas as condições experimentais levaram a decréscimos em sua atividade no extrato bruto de erva-mate.

Os estudos relativos a influência do pH do extrato bruto enzimático de erva-mate antes e depois de submetido ao processamento com CO<sub>2</sub> comprimido indicaram reduções no pH da ordem de 8% em todas as condições experimentais. A correlação entre o pH final e a variação de pH em cada condição experimental com as respectivas atividades da POD e PPO após processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado sugeriu que a redução do pH não apresenta correlação com a alteração na atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato bruto da erva-mate.

Em relação à seletividade do complexo enzimático bruto, a análise da relação entre a atividade peroxidásica e polifenoloxidásica (POD/PPO) no extrato bruto antes e depois de submetido ao CO<sub>2</sub> pressurizado sugere uma mudança na especificidade do extrato enzimático de erva-mate, mudança essa que torna-se mais acentuada em determinadas condições experimentais. Esses resultados demonstram que o processamento do extrato bruto enzimático de erva-mate sob pressão em CO<sub>2</sub> comprimido pode ser uma rota promissora para o incremento na atividade enzimática da peroxidase. Porém, em determinadas condições de processamento é possível inativar completamente a atividade

peroxidásica do extrato, tornando o mesmo específico em relação a atividade polifenoloxidásica.

Para determinação da estabilidade do extrato bruto enzimático de erva-mate submetido à condição experimental 1, o mesmo foi submetido ao armazenamento em temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  por 100 dias. Após o incremento inicial na atividade da peroxidase, a sofreu um decréscimo no decorrer do período de armazenamento, apresentando, após 100 dias, uma atividade 19,4% inferior à original. No caso da polifenoloxidase, após um decréscimo significativo após os 3 dias de armazenamento e tem parte de sua atividade regenerada durante o decorrer do período de armazenamento apresentando, após 100 dias, uma atividade 29,7% inferior à original. A relação entre as atividades das enzimas no decorrer do tempo de armazenamento sugere uma mudança na especificidade do extrato bruto enzimático de erva-mate, reforçando que o processamento do extrato enzimático de erva-mate em  $\text{CO}_2$  comprimido pode ser uma rota promissora para o incremento na atividade enzimática da peroxidase.

Com relação aos ciclos de pressão, as enzimas polifenoloxidase e peroxidase foram submetidas a 9 ciclos subseqüentes de pressão na condição experimental 1, sendo que ambas as enzimas perderam atividade no decorrer dos experimentos. A peroxidase apresentou uma perda de 41,7% na atividade enzimática em relação à atividade inicial e para a polifenoloxidase a perda chegou a 95,44%. Ao final dos 9 ciclos observa-se um aumento pronunciado na especificidade do extrato enzimático em direção a atividade peroxidásica.

## 5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tomando como base os resultados obtidos e dadas às observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se apontar algumas sugestões para trabalhos futuros:

\_ **Purificação do extrato bruto enzimático de erva-mate.** Por se tratar de um complexo enzimático a sua purificação contribui para minimizar a interferência das impurezas e permitir uma análise estrutural das oxidases, peroxidase e polifenoloxidase, presentes no referido extrato;

\_ **Análise estrutural da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato enzimático de erva-mate (purificado) após processamento em CO<sub>2</sub> pressurizado.** Desta forma, pode-se verificar de que maneira as mudanças sugeridas na especificidade do extrato ocorrem;

\_ **Avaliação do comportamento da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase do extrato enzimático de erva-mate, frente ao processamento em outros fluidos pressurizados.** Estudos relatam a influência da hidrofobicidade do solvente e da quantidade de água sobre a atividade enzimática das enzimas. Por isso, é importante correlacionar o efeito de outros fluidos sobre a atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase;

\_ **Melhorias no equipamento usado no processamento sob pressão.** Para estudar o efeito de faixas de temperatura inferiores a 30 °C, onde o CO<sub>2</sub> se apresenta em duas fases, é necessário alterações no equipamento como, por exemplo, uso de um reator com volume variável que permita inclusive visualizar o comportamento dessas duas fases sobre o extrato. Um reator com volume maior que permita processar maiores quantidades de extrato possibilitando a realização de um número maior de análises;

\_ **Uso das oxidases na oxidação de compostos fenólicos.** Por exemplo, na oxidação de compostos fenólicos em efluente provenientes de indústrias de papel, celulose e refinaria de petróleo e na indústria têxtil, para melhorar o branqueamento em detergentes de lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem. Ou ainda, na oxidação de compostos como safrol e isosafrol, para obtenção de produtos de alto valor agregado.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)