

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

LUCIANA AMADE CAMARGO

GLICEROL-3-FOSFATO OXIDASE EM LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

ARARAQUARA

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA AMADE CAMARGO

GLICEROL-3-FOSFATO OXIDASE EM LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Freitas Sanches Peres

ARARAQUARA

2007

LUCIANA AMADE CAMARGO

GLICEROL-3-FOSFATO OXIDASE EM LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (Área de Concentração: Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara / SP.

Araraquara, 04 de maio de 2007.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás
(orientadora)

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
(titular)

Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizelli
(titular)

Prof. Dr. Rubens Monti
(suplente)

Prof. Dr. Luiz Henrique Souza Guimarães
(suplente)

A Deus, pela existência;

Meus pais Marcos Eduardo e Maria de Fátima,

e meus irmãos Marcelo e Alessandra,

pelo carinho, apoio, suporte e incentivo incondicional;

Meu noivo Jansem,

pela força, carinho e incentivo em todos os momentos;

Aos amigos conquistados ao longo da realização deste programa,

em especial a Juliana, pelo companheirismo e prestatividade.

Agradeço a todos os docentes e técnicos de laboratório do programa,

em especial ao Prof. Dr. Valdir e a técnica Maraíza pela amizade e auxílio;

Ao laboratório de Análises Clínicas UNESP,

pelo auxílio com equipamentos;

As minhas orientadoras, Edwil e Maristela,

pelo apoio, amizade e ensinamentos prestados;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Prece de Cáritas

Deus, nosso pai, Vós que sois todo poder e bondade.
Dai a força àquele que passa pela provação.
Dai a luz àquele que procura à verdade.
Ponde no coração do homem a compaixão e a caridade.

Deus, Dai ao viajor a estrela guia,
ao aflito a consolação,
ao doente o repouso.

Pai, Dai ao culpado o arrependimento,
ao espírito a verdade,
a criança o guia
ao órfão o pai

Senhor, que a Vossa bondade se estenda sobre tudo que Criastes.
Piedade Senhor para aqueles que não Vos conhecem,
Esperança para aqueles que sofrem.
Que a Vossa bondade permita aos espíritos consoladores
derramarem por toda parte a paz, a esperança e a fé.

Deus, um raio, uma faísca do Vosso amor pode abrasar a terra.
Deixai-nos beber nas fontes dessa bondade fecunda e infinita
e todas as lágrimas secarão, todas as dores acalmar-se-ão.
um só coração, um só pensamento subirá até Vós,
como um grito de reconhecimento e de amor.

Como Moisés sobre a montanha
nos Vós esperamos com os braços abertos
Oh, Bondade!
Oh, Beleza!
Oh, Perfeição!
e queremos de alguma sorte alcançar Vossa misericórdia.

Deus, Dai-nos a força de ajudar o progresso a fim de subirmos até Vós.
Dai-nos a caridade pura.
Dai-nos a fé e a razão.
Dai-nos a simplicidade, que fará de nossas almas...
um espelho onde se refletirá a Vossa Santa e Misericordiosa imagem.

* * *

Mme. W. Krill. (Bordeaux, França)
Cáritas.
25 de dezembro de 1873.

RESUMO

A presente dissertação permitiu quantificar a presença de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO, sn-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidorreductase, EC 1.1.3.21) em extratos de levedura seca de panificação por dois métodos: polarográfico e colorimétrico.

A melhor metodologia de purificação da GPO foi obtida por rompimento celular com esferas de vidro, em homogenizador do tipo Bead Beater (Biospec products, USA), por 15 minutos, com 27,6% de eficiência de lise celular. O extrato celular bruto foi tratado com 1% de sulfato de estreptomicina antes da precipitação com igual volume de solução 30% (p/v) de polietilenoglicol 3350, dialisado e a sua atividade otimizada por método colorimétrico.

A determinação das características da GPO foi possível em ensaios contendo: 250 mM de glicerol-3-fosfato em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,1% Triton X-100; 0,0133% de 4-aminoantipirina; 0,0266% de fenol; cerca de 0,40 unidade de peroxidase (PO) e água destilada para completar o volume de ensaio. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de extrato enzimático diluído 10 vezes seguido de uma incubação de 2 horas a 60°C e interrompida pela adição de solução 10% de SDS e a coloração desenvolvida foi medida a 500 nm.

A GPO apresentou alta estabilidade térmica, pH de estabilidade entre 7,0 – 8,0 e a presença de azida de sódio na concentração de 0,05% manteve a atividade da enzima por 21 dias a 40°C. Este método permitiu também quantificar glicerol-3-fosfato, importante metabólito intermediário da biossíntese lipídica e glicolítica, na faixa de 56 – 250 mM.

ABSTRACT

The present dissertation allowed to quantify the presence of glycerol-3-phosphate oxidase (GPO, sn-glycerol-3-phosphate: oxygen 2-oxidoreductase, EC 1.1.3.21) in baker's yeast extract by two methods: polarographic and colorimetric.

The best methodology of purification of GPO was obtained by cell debris with glass beads, in a Bead Beater homogenizator (Biospec products, USA), for 15 minutes, with 27.6% of efficiency of cellular lysis. The crude cellular extract was treated with 1% of streptomycin sulfate before the precipitation, with equal volume of a solution of 30% (w/v) polyethylene glycol 3350, dialysed and its activity was optimized by colorimetric method.

The determination of the characteristics of GPO was possible in assays containing: 250 mM of glycerol-3-phosphate in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.1% Triton X-100; 0.0133% of 4-aminoantipyrine; 0.0266% of phenol; about 0.40 unit of peroxidase (PO) and water distilled to complete the volume. The reaction was started by the addition of 15 μ L of enzymatic extract diluted 10 times, followed by incubation of 2 hours at 60 °C, interrupted by the addition of solution 10% of SDS, and the developed coloration was measured at 500 nm.

GPO presented high thermal stability, pH of stability among 7.0 – 8.0, and the presence of sodium azide in the concentration of 0.05% maintained the activity of the enzyme for 21 days at 40 °C. This method also allowed to quantify glycerol-3-phosphate, important intermediate metabolite of lipid biosynthesis and glycolysis, in the range 56 - 250 mM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação redox catalisada por glicerol-3-fosfato oxidase.	3
Figura 2. Dosagem enzimática de PO extraída de rabanete em função do tempo de reação.	37
Figura 3. Consumo de oxigênio em extrato enzimático bruto de levedura de panificação, purificado com sulfato de amônio (0-60%) e obtido por rompimento com areia.	46
Figura 4. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento com areia sobre o consumo de oxigênio.	47
Figura 5. Atividade de glicerol-3-fosfato oxidase obtida por rompimento com esferas de vidro em função da temperatura no ensaio.	56
Figura 6. Efeito da concentração de solução de substrato (glicerol-3-fosfato) utilizada para ensaio de GPO obtida por rompimento com esferas de vidro.	57
Figura 7. Efeito da diluição de extrato enzimático de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro) para ensaio de GPO.	58
Figura 8. Efeito do volume de extrato enzimático de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro), no ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase.	59
Figura 9. Efeito do pH na atividade de GPO de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro).	60
Figura 10. Atividade da GPO obtida por rompimento com esferas de vidro em função do tempo de reação.	61
Figura 11. Concentração e volume de fenol.	62
Figura 12. Concentração e volume de 4-AAP.	63
Figura 13. Porcentagens de soluções de SDS adicionadas para interromper a ação da GPO obtida por rompimento em esferas no ensaio de atividade.	64
Figura 14. Curva Analítica para dosagem de absorbância de GPO obtida por rompimento com esferas.	68
Figura 15. Curva Analítica para dosagem de concentração de solução de substrato glicerol-3-fosfato.	69
Figura 16. Estabilidade térmica a 60°C da enzima GPO em função do tempo.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo Enzyme Commission (IUBMB).	7
Tabela 2. Fontes de obtenção de GPO.	9
Tabela 3. Fontes de obtenção de PO.	13
Tabela 4. Solventes do substrato o-dianisidina (15 mM) utilizado na dosagem da atividade de peroxidase.	38
Tabela 5. Efeito da metodologia de rompimento celular para a preparação do extrato enzimático sobre a atividade da GPO.	41
Tabela 6. Efeito do tempo do ensaio de rompimento celular sobre a eficácia do rompimento de células de leveduras utilizando esferas de vidro.	42
Tabela 7. Determinação de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase de extratos celulares (precipitação: sulfato de amônio 35-70%) de fermento de panificação fresco e desidratado obtidos por rompimento com esferas de vidro.	43
Tabela 8. Efeito do tempo de adição do extrato de rabanete (fonte de peroxidase) no ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (extrato enzimático obtido por rompimento com esferas).	44
Tabela 9. Atividade da glicerol-3-fosfato oxidase oriunda de extrato enzimático de levedura obtido por rompimento com esferas mediante a atuação de alguns substratos na reação catalisada pela peroxidase.	45
Tabela 10. Velocidade de consumo de oxigênio do extrato bruto e extrato enzimático concentrado (16x) oriundos de rompimento com areia.	47
Tabela 11. Efeito da precipitação do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro com diversos volumes de acetona, seguido de diálise, sobre a atividade da GPO.	51
Tabela 12. Efeito da precipitação do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro soluções de polietilenoglicol, seguido de diálise, sobre a atividade da GPO.	51
Tabela 13. Precipitações enzimáticas do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro com diferentes reagentes, seguidas de diálise, sobre a atividade da GPO.	52
Tabela 14. Efeito da filtração do extrato enzimático de levedura obtido por rompimento celular sobre a atividade da GPO.	53
Tabela 15. Efeito da liofilização sobre a atividade enzimática de glicerol-3-fosfato oxidase oriunda de extrato enzimático obtido por rompimento com esferas de vidro.	53
Tabela 16. Efeito da adição de diferentes metais no ensaio de atividade de GPO oriunda de extrato enzimático de levedura obtido por rompimento com esferas de vidro (precipitação: sulfato de amônio 35-70%).	55
Tabela 17. Efeito de diferentes soluções de diálise contendo metais na atividade de GPO oriunda de extrato de levedura obtido por rompimento com esferas de vidro (precipitação: sulfato de amônio 35-70%).	55
Tabela 18. Comparação de diferentes concentrações de tampão Tris-HCl quando aplicados no ensaio de dosagem enzimática de GPO (rompimento com esferas de vidro).	60
Tabela 19. Comparação do emprego de SDS e fervura para interrupção de reação de GPO de extrato enzimático obtido por rompimento com esferas.	65
Tabela 20. Efeito do volume de peroxidase de extrato de rabanete no ensaio de medida de atividade da glicerol-3-fosfato oxidase de extrato de fermento de panificação obtida por rompimento com esferas de vidro.	66
Tabela 21. Estabilidade térmica de GPO*.	70
Tabela 22. Estabilidade ao pH.	72
Tabela 23. Estabilidade da GPO do extrato enzimático em função do tempo de estocagem e mantida na presença de diversos estabilizantes.	73

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ϵ	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda (nm)
4-AAP	4-aminoantipirina
Ativ.	Atividade
Bicarb.	Bicarbonato
BSA	Albumina de soro bovino
Carb.	Carbonato
Da	Dalton; kDa: quiloDalton
DCPS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxifenilsulfônico
DHAP	Fosfato de diidroxiacetona
DHBS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico sódico
EC	<i>Enzy e Co ission</i> : Comissão de Enzima (IUBMB)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ex.	Exemplo
FAD	Flavina adenina dinucleotídio
FIA	<i>Flow injection analysis</i> : Análise de injeção de fluxo
<i>g</i>	Força Gravitacional (Centrifugação RCF)
G3P	Glicerol-3-fosfato
G3PDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase (sn-glicerol-3-fosfato NAD ⁺ 2-oxidorreductase, EC 1.1.1.8)
GK	Glicerol quinase (ATP: glicerol 3-fosfotransferase, EC 2.7.1.30)
GPO	Glicerol-3-fosfato oxidase (sn-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidorreductase, EC 1.1.3.21)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
M	Molaridade (Mol/L)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídio
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume

PEF	<i>Pulsed electric field</i> : Campo elétrico pulsado
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Peroxidase (doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase, EC 1.11.1.17)
PSA	Ácido fenil-4-sulfônico
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> : Força centrífuga relativa
R ²	Coefficiente de Correlação de Pearson
SDS	Sódio dodecil sulfato
Sol.	Solução
U	Unidade de atividade
uv	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
Introdução	1
Revisão da Literatura	4
1. Considerações gerais	5
2. Glicerol-3-fosfato oxidase	8
2.1. Meio de produção da GPO	9
2.2. Propriedades da GPO	11
3. Peroxidase	13
Objetivos	18
Material e métodos	20
1. Obtenção dos extratos celulares brutos de levedura e de rabanete	21
1.1. Obtenção de peroxidase (PO)	21
1.2. Obtenção de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)	21
1.2.1. Rompimento com esferas de vidro	21
1.2.2. Rompimento com areia	22
2. Determinação da presença de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) no extrato de levedura	23
3. Ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e de peroxidase (PO)	23
3.1. Ensaio de atividade da peroxidase (PO) de rabanete	24
3.2. Ensaio colorimétrico de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)	24
A) O-dianisidina	25
B) 4-aminoantipirina (4-AAP) e fenol	25
C) Sistema de cor	26
3.2.1. Tempo de adição da peroxidase	26
4. Comparação de fermentos	27
5. Concentração do extrato enzimático de levedura	27
5.1. <i>Speed Vacuu</i>	27
5.2. Ultrafiltração	27
5.3. Liofilização	28
6. Determinação protéica	28
7. Ativação por sais de metais	29
A) Soluções	29
B) Diálise	30
8. Definição do melhor método de precipitação do extrato	30
8.1. Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes faixas de sulfato de amônio	30
8.2. Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes volumes de acetona	30
8.3. Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes pesos moleculares de polietilenoglicol (PEG)	31
8.4. Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes reagentes	31
9. Otimização de técnica colorimétrica para dosagem da enzima glicerol-3-fosfato oxidase	31

9.1. Curva de temperatura	32
9.2. Concentração de substrato: glicerol-3-fosfato	32
9.3. Extrato enzimático: volume de ensaio e diluição	32
9.4. pH	32
9.5. Tempo de reação	33
9.6. Concentração e volume de fenol	33
9.7. Concentração e volume de 4-AAP	33
9.8. Concentração de SDS	33
9.9. Volume de PO	34
9.10. Curva analítica	34
9.10.1. Dosagem da enzima	34
9.10.2. Substrato	34
10. Estabilização enzimática	34
10.1. Estabilidade térmica	34
10.2. Estabilidade ao pH	35
10.3. Emprego de estabilizantes	35
11. Análise estatística	35
Resultados e Discussões	36
I. Otimização do ensaio para dosagem da enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)	37
1. Obtenção da peroxidase (PO) de rabanete	37
2. Preparo do extrato bruto de células de levedura	38
3. Escolha do fermento	42
4. Tempo de adição da PO na reação	43
5. Sistemas de dosagens de glicerol-3-fosfato oxidase	44
Medida do oxigênio na reação com extrato bruto de levedura de panificação e glicerol-3-fosfato	45
II. Purificação de GPO	48
1. Outras técnicas de concentração da enzima no extrato celular	52
1.1. Métodos de concentração por ultrafiltração	52
1.2. Métodos de concentração por liofilização	53
III. Caracterização de GPO: estudos sobre o ensaio de glicerol-3-fosfato oxidase de fermento de panificação	54
1. Efeito da adição de metais na atividade de GPO	54
2. Temperatura de reação	55
3. Concentração de substrato	56
4. Diluição de extrato	57
5. Valor do pH de reação	59
6. Tempo de reação	61
7. Concentração e volume de fenol	62
8. Concentração e volume de 4-AAP	62
9. Interrupção da reação	63
10. Volume de peroxidase no ensaio	65
IV. Dosagens nas condições otimizadas	67
V. Estudos sobre a estabilização enzimática	70
Conclusões	74
Bibliografia e sites	76
Apêndice	84
Preparo das soluções	85

Glicerol-3-fosfato oxidase (sn-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidoreductase, EC 1.1.3.21, GPO), é uma enzima pertencente à classe das oxidoreductases (oxidase), também conhecida através das seguintes sinônimas: alfa-glicerofosfato oxidase, glicerol fosfato oxidase, glicerol-1-fosfato oxidase, glicerol-3-fosfato oxidase, L-alfa-glicerol-3-fosfato oxidase e L-alfa glicerofosfato oxidase (BRENDA, 2007).

Trata-se de uma flavoproteína, isto é, enzima que contém flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como grupo prostético e que realiza transporte de hidrogênio para o oxigênio (STRITTMATTER, 1959), encontrada em diferentes microrganismos, classificados como bactérias ácidas lácticas; por exemplo: *Aerococcus* (ŠŮCHOVÁ et al., 1992, MACKOVÁ et al., 2000, STREINTENBERGER et al., 2001) *Enterococcus* (PARSONAGE et al., 1998) *Lactococcus Lactobacillus* (STRITTMATTER, 1959) *Leuconostoc* (EMI et al., 1984) *Pediococcus* (ŠŮCHOVÁ et al., 1992, KRÄMER e STECKHAN, 1997, MACKOVÁ et al., 2000) *Propionibacterium* (INCE et al. 1987), *Streptococcus* (JACOBS e VANDEMARK, 1960, KODITSCHKEK e UMBREIT, 1969, ESDERS e MICHIRINA, 1979, CLAIBORNE, 1986). Não há registros de sua ocorrência em humanos (KIRANAS et al., 1998).

As glicerofosfato oxidases são comumente contrastadas a nucleotídeo-dependentes L- α - glicerofosfato desidrogenases, bastante difundidas na natureza. Oxidases de animais e leveduras têm origem mitocondrial e catalisam a transferência de elétrons do L- α -glicerofosfato via cadeia respiratória. Em relação a bactérias, a L- α -glicerofosfato oxidase aeróbica isolada de *E. coli* apresenta-se ligada (pelo menos parcialmente) a membrana e não utiliza o oxigênio molecular como aceptor de elétrons, diferentemente do que ocorre nestas enzimas quando isoladas de bactérias ácidas lácticas - são intracelulares, solúveis, e utilizam o oxigênio molecular (ESDERS e MICHIRINA, 1979; CLAIBORNE, 1986; STREINTENBERGER et al., 2001).

Deste modo, a GPO é uma oxidase responsável pela reação de oxidação do glicerol-3-fosfato (G3P) a fosfato de diidroxiacetona (DHAP), mediante a redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio (**Figura 1**). (BRENDA, 2007; IUBMB, 1992; ESDERS e MICHIRINA, 1979; KODITSCHKEK e UMBREIT, 1969; CLAIBORNE, 1986; JACOBS e VANDEMARK, 1960).

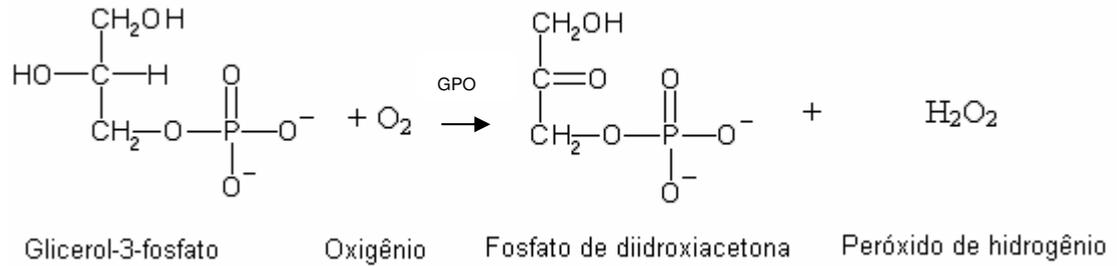


Figura 1. Reação redox catalisada por glicerol-3-fosfato oxidase.

A GPO tem extraordinário papel no metabolismo dos microrganismos em que atua, uma vez que seu principal produto, glicerol-3-fosfato, é um importante metabólito na interligação entre rotas metabólicas: biossíntese lipídica (precursor do ácido fosfatídico, composto chave intermediário na síntese de todos os glicerolipídios) e, glicólise (síntese enzimática de monossacarídeos via fosfato de diidroxiacetona) (NGUYEN et al., 2004). Assim sendo, ela apresenta aplicações práticas principalmente em sistemas acoplados para determinação diagnóstica e / ou quantitativa de magnésio (WIMMER et al., 1986), glicerol-3-fosfato (KIRANAS et al., 1998), triacilglicerol (FOSSATI e PRENCIPE, 1982; MCGOWAN et al., 1983; SULLIVAN et al., 1985; VELDHOVEN et al., 1997), glicerol (MERCHIE et al., 1992; MURPHY e GALLEY, 1994), ácido fosfatídico (KISHIMOTO et al., 2003) e outros fosfolipídios em soro sanguíneo e outros materiais biológicos; pode ser utilizada para medir atividades enzimáticas de glicerol quinase (HUANG et al., 1997) e enzimas similares, acopladas ou não a outras enzimas ou sistemas cromógenos (ŠŮCHOVÁ et al., 1992; MACKOVÁ et al., 2000; STREINTENBERGER et al., 2001).

_____ *Revisão da Literatura*

1. Considerações gerais

Enzima, termo derivado do grego (*en* dentro + *zye* levedura) que pode ser definido como tipo de proteína de natureza complexa (heteroproteína ou proteína derivada) responsável pelo controle de diversas funções vitais, inclusive processos metabólicos de conversão de nutrientes em energia e novos materiais para as células, atuando como catalisador em reações bioquímicas. Embora o homem utilize o poder catalítico das enzimas a milhares de anos, conhecimentos científicos sobre estas proteínas tiveram origem no século XIX, sendo, seu estudo e utilização incrementados desde então (VOET et al., 2000; TORRES, 2001; NELSON e COX, 2006).

As enzimas são compostos de potencial aplicação industrial e podem ser de origem animal (pepsina, lípases e esterases), vegetal (α e β -amilases, papaína, bromelina) ou microbiana (catalase, pectinase) (MACEDO et al., 2003). Comercialmente, são produzidas em grande escala por síntese microbiana, podendo ser facilmente desnaturadas pelo calor; por agitação intensa; ondas ultravioletas e ultra-sonoras e por substâncias como: cianeto e fluoreto de sódio, traços de metais pesados, ácidos ou bases (TORRES, 2001).

Como toda proteína, as enzimas são constituídas por longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e arranjadas tridimensionalmente; podendo ser de natureza intracelular (endoenzima) ou de natureza extracelular (exoenzima), sendo capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis como amido, celulose e proteínas (PARK, 1992; SANT'ANNA JR., 2001; TORRES, 2001).

Alguns autores consideram as enzimas de origem microbiana, especialmente as extracelulares fúngicas, as quais são responsáveis pela execução de alterações nos nutrientes possibilitando o transporte destes elementos para o meio endógeno, como as principais enzimas de aplicação industrial. Tal fato se deve a facilidade de produção, purificação e recuperação destas enzimas. Contudo, vários estudos vêm sendo realizados, a fim de permitir, cada vez mais, a diminuição dos custos destas produções enzimáticas, destacando-se dentre eles a utilização de resíduos agroindustriais no meio de cultivo (PELCZAR et al, 1997; MACEDO et al., 2003; SPENCER-MARTINS e SÁ-NOGUEIRA, 2003).

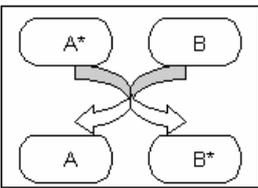
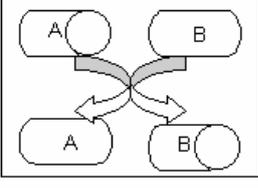
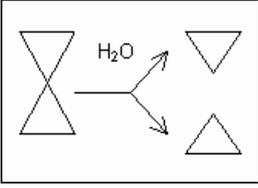
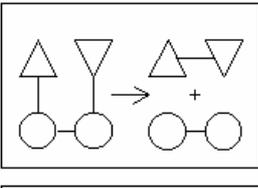
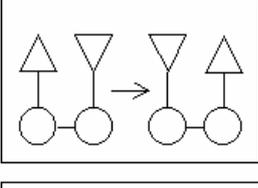
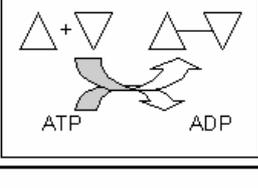
-----*Revisão da Literatura*

Estruturalmente, as enzimas são holoenzimas, cataliticamente ativas, que apresentam um centro ativo (porção protéica, apoenzima) e, em alguns casos, um cofator (coenzima ou íon metálico ativo) que as auxiliam em suas atividades catalíticas (VOET et al., 2000; TORRES, 2001; NELSON e COX, 2006).

A especificidade com que cada enzima se liga a seu substrato se denomina “atividade biológica”, dependente do sítio de ligação substrato-enzima, isto é, do arranjo tridimensional dos aminoácidos de uma determin

estabelecidas 6 classes (IUBMB, 1992; SANT`ANNA JR, 2001; TORRES, 2001; BRENDA, 2007), conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo Enzyme Comission (IUBMB).

<p>1. Oxidorredutases (Reações de óxido-redução: Transferência de elétrons).</p>	
<p>2. Transferases (Transferência de grupos funcionais entre compostos).</p>	
<p>3. Hidrolases (Reações de hidrólise: Transformam polímeros em monômeros).</p>	
<p>4. Liases (Quebra de ligações covalentes por eliminação mantendo ligações duplas ou anéis e adicionando grupos a duplas ligações).</p>	
<p>5. Isomerases (Reações de isomerização: Rearranjo intramolecular produzindo isômeros ópticos e geométricos).</p>	
<p>6. Ligases (Condensação de 2 moléculas, associadas à hidrólise de uma ligação de alta energia, em geral, do ATP).</p>	

Dentre as classes enzimáticas consideradas pela IUBMB, as oxidoreductases são uma categoria de enzimas de potencial interesse a diversos processos químicos, como os empregados na indústria farmacêutica e de alimentos. São responsáveis pela catálise de reações de oxidação e/ou redução de substratos, ou seja, reações em que há transferência de elétrons entre espécies químicas. O

substrato oxidado (agente redutor) é considerado doador de hidrogênio ou elétron, enquanto aquele que foi reduzido (agente oxidante) é denominado receptor (IUBMB, 1992; DEVAUX-BASSÉGUY et al., 1997; BRITO et al., 2004).

A nomenclatura adotada para as oxidorreduções baseia-se na estrutura: *doador receptor oxidorredução* (nome sistemático). As oxidorreduções são subdivididas em 4 tipos principais (DIXON e WEBB, 1979; IUBMB, 1992):

- Desidrogenases: catalisam a transferência de hidrogênio do substrato ao cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺);
- Oxidases: catalisam a transferência de hidrogênio do substrato para o oxigênio molecular (espécie receptora) produzindo peróxido de hidrogênio como subproduto;
- Peroxidases: catalisam a oxidação do substrato pelo peróxido de hidrogênio;
- Oxigenases: catalisam a oxidação do substrato pelo oxigênio molecular, produzindo água como produto reduzido.

Este trabalho identificou e caracterizou parcialmente a glicerol-3-fosfato oxidase em fermento de panificação. A quantificação da atividade desta enzima foi realizada diretamente através da metodologia que utiliza a peroxidase de rabanete e um sistema cromogênico para identificação da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado.

Assim, entre as oxidorreduções, destacaram-se, neste trabalho, duas enzimas: glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase. A primeira foi descoberta recentemente (meados dos anos 70) e tem sido usada principalmente na quantificação de metabólitos e enzimas em diferentes materiais. Já, a segunda é amplamente encontrada na natureza e possui diversas funções e aplicações tecnológicas.

2. Glicerol-3-fosfato oxidase

A glicerol-3-fosfato oxidase (EC 1.1.3.21; *sn*-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidorredução; GPO) é uma flavoproteína (cofator: flavina adenina dinucleotídeo - FAD) pertencente ao grupo das oxidorreduções e que catalisa especificamente a

oxidação do glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona concomitante à redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio, conforme a seguinte reação (ŠŮCHOVÁ et al., 1992; KIRANAS et al., 1998; MACKOVÁ et al., 2000):



Trata-se de uma enzima encontrada em diversas fontes de microorganismos, podendo ser somente isolada a partir de bactérias ácidas lácticas (**Tabela 2**), não havendo, contudo, registro de sua ocorrência na espécie humana (ESDERS e MICHIRINA, 1979; KIRANAS et al., 1998; MACKOVÁ et al., 2000).

Tabela 2. Fontes de obtenção de GPO.

Organismo	Referências
<i>Aerococcus viridans</i>	ŠŮCHOVÁ et al., 1992; Macková et al., 2000; Streitenberger et al., 2001.
<i>Lactobacillus acillus</i>	Strittmatter, 1959.
<i>Propionibacteriu</i>	Ince et al., 1987.
<i>Streptococcus faecalis</i>	Jacobs e Vandermark, 1960.
<i>Streptococcus faeciu</i>	Koditschek e Umbreit, 1969; Esders e Michrina, 1979; Claiborne, 1986.
Outros	ŠŮCHOVÁ et al., 1992.

2.1. Meio de produção da GPO

Microorganismos são capazes de utilizar e sintetizar glicerol, podendo, inclusive utilizá-lo como única fonte de carbono e energia durante seu crescimento. O glicerol pode ser metabolizado por procariotos através da fosforilação do glicerol-3-fosfato e posterior desidrogenação para originar fosfato de diidroxiacetona e vice-versa. A reação de transformação do glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona pode ocorrer de 2 maneiras: 1) catálise por glicerol-3-fosfato desidrogenase (sn-glicerol-3-fosfato: NAD⁺ 2-oxidorreductase, EC 1.1.1.8, G3PDH),

enzima que utiliza NAD como acceptor de elétrons; ou, 2) catálise por glicerol-3-fosfato oxidase, que utiliza o oxigênio molecular como acceptor primário de

A produção da enzima glicerol-3-fosfato oxidase está bem colocada na literatura, quanto à origem bacteriana, porém, poucas evidências denotam sua existência em leveduras. Gancedo et al. (1986) relatam a presença da enzima glicerofosfato oxidase em levedura, no entanto, esclarecem, em seu próprio texto, se tratar de uma desidrogenase (glicerol-3-fosfato desidrogenase, EC 1.1.99.5) não ligada ao nucleotídeo, proveniente de *Candida utilis*, e que foi assim nomeada para evitar confusão com glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente (EC 1.1.1.8) que atua fisiologicamente de forma oposta.

2.2. Propriedades da GPO

Segundo Macková et al. (2000), as proteínas têm propriedades ligeiramente diferentes, pH ótimo, temperatura ótima, constante de Michaelis e, quase sempre, estabilidade muito baixa. Assim, muitos estudos são feitos a fim de evidenciar, verificar e até melhorar as características das enzimas.

Em relação a GPO purificada oriunda de *Streptococcus faeciu* ATCC 12755, as propriedades físico-químicas foram estudadas, em 1979, por Esders e Michrina. Trata-se de uma enzima de estrutura dimérica, de massa molecular de 131 kDa, subdivididos em duas subunidades de 72 kDa cada; apresentando 2 mols FAD ligados a cada mol de enzima e especificidade para L-glicerol-3-fosfato (G3P) como substrato e oxigênio como melhor aceptor de elétrons.

Embora a GPO seja específica para L-glicerol-3-fosfato, a mistura racêmica também pode ser utilizada, uma vez que o enantiômero D não é convertido ao produto e também não interfere nos passos seguintes (SCHOEVAART et al., 2000).

Para GPO proveniente de *Propionibacteriu freudenreichii* DSM 20270, Ince et al. (1987) relataram ter tal enzima uma purificação bastante difícil. Mas, apesar disso, as características encontradas por seus estudos foram similares àquelas descritas na literatura para bactérias ácidas lácticas em termos de pH ótimo e de estabilidade, especificidade de substrato e tamanho de subunidade, porém apresentava diferenças quanto ao tamanho da enzima nativa, 365 kDa quando comparado a 74 kDa da enzima de *Aerococcus viridans* e menor K_m para o substrato L-glicerol-3-fosfato que, segundo os autores, seria um importante atributo

para a constituição de kits clínicos colorimétricos empregados na determinação dos níveis de triglicérides.

Comercialmente, uma das GPO disponíveis no mercado, é uma enzima quimicamente modificada, expressa por uma *Escherichia coli* recombinante e de propriedade da *Roche Applied Science*. Esta enzima tem como características massa molecular aproximada de 75 kDa, ponto isoelétrico 4,2 e *K* variável em função de pH e da concentração do tampão utilizado. A mesma apresenta também estrutura protéica monomérica e como cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Os inibidores da atividade enzimática são sais de mercúrio e de prata bem como sódio dodecil sulfato (SDS). A reação desta enzima mostrou ser altamente específica para glicerol-3-fosfato, ter pH ótimo em tampão Tris-HCl entre 8,0 e 8,5 e pH de estabilidade em tampão fosfato entre 6,5 e 8,5, possuindo maior estabilidade térmica quando sujeita a baixas temperaturas (10 - 30°C / 24horas) (ROCHE, 2003/2004).

A enzima isolada por Macková et al. (2000) a partir de *Aerococcus viridans* mutante demonstrou ser extremamente instável. Assim, estudos de temperatura ótima de reação contendo GPO demonstraram melhores resultados à 37°C, enquanto, durante a estocagem, o aumento da temperatura influenciou negativamente promovendo uma queda da atividade enzimática em menor período de tempo (-20°C por 40 dias; 40°C por 80 minutos). Estudos de pH mostraram melhores condições de estabilidade enzimática, em período equivalente a três semanas, em pH 9,0, porém o melhor valor de pH para atividade da enzima foi 7,5.

Sabe-se que, principalmente em casos de enzima instável, não existe necessariamente uma correspondência entre as propriedades empregadas durante a realização da reação enzimática e aquelas utilizadas para sua estabilidade (MACKOVÁ et al., 2000). Portanto, os diferentes resultados encontrados de pH e temperatura, de reação e de estocagem, possibilitou aos autores afirmar que a estabilidade da GPO desta espécie mutante é realmente muito baixa (MACKOVÁ et al., 2000). Deste modo, os autores realizaram vários ensaios para tentar maximizar e / ou estabilizar tal atividade. Os melhores desempenhos foram alcançados pela presença de triton X-100 1% (v/v) ou glicerol 50% (v/v) no extrato de GPO purificado. Os ensaios de estocagem mostraram manutenção de 60-75% de atividade enzimática, em extratos contendo ditiotreitol 0,2% (v/v), mercaptoetanol 0,2% (v/v), glicerol 50% (v/v) ou EDTA 0,1M. A liofilização do extrato enzimático contendo

trealose, sacarose, inositol ou dextrina II, em concentração de 2%, estabilizaram 50-75% da atividade original da enzima (MACKOVÁ et al., 2000).

3. Peroxidase

A peroxidase é uma enzima (EC 1.11.1.7; doador: peróxido de hidrogênio oxidorreductase; PO) pertencente ao grupo das oxidorreductases, amplamente encontrada nos organismos vivos (**Tabela 3**) e de múltiplos papéis fisiológicos. Trata-se de uma hemeproteína (grupo prostético: ferriprotoporfirina III) capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (principal substrato; receptor) em presença de um doador de hidrogênio (composto redutor), conforme a seguinte reação (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981):



Tabela 3. Fontes de obtenção de PO.

Organismo	Referências
<i>Aroracia rusticana</i> (Rabanete- raiz)	Kenten e Mann, 1954; Azevedo et al., 2003; Sakuyama et al., 2003; Zhong et al., 2005; Sariri et al., 2006.
<i>Carica papaya</i> (Mamão papaia)	Silva et al., 1990.
<i>Daucus carota</i> (Cenoura Chantenay)	Soysal e Söylemez, 2005.
<i>Dioscorea rotundata</i> (Inhame)	Chilaka et al., 2002.
<i>Ipomoea batatas</i> (Batata doce)	Neves e Lourenço, 1985.
<i>Mallus communis</i> (Maçã - casca/ polpa)	Valderrama et al., 2001.
<i>Roystonea regia</i> (Palmeira real - folhas)	Sakharov et al., 2001.

Os doadores de hidrogênio podem ser: fenóis (ex. p-cresol, guaiacol, resorcinol), aminas (ex. anilina, benzidina, o-dianisidina) ou outros compostos orgânicos; substratos que, em sua maioria, apresentam natureza carcinogênica, mutagênica e / ou alta toxicidade e, de acordo com sua identidade, podem influenciar nos produtos resultantes desta oxidação, sendo, desta forma,

preferencialmente utilizados para uma dada proposta como, por exemplo, o guaiacol em processos que envolvem tratamento térmico (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ESKIN, 1990; VOJINOVIĆ et al., 2004; SOYSAL e SÖYLEMEZ, 2005)

A peroxidase tem sido extensamente utilizada e investigada para fins analíticos e, com o desenvolvimento da bioengenharia e biotecnologia, tem-se aumentado o interesse na obtenção de métodos rápidos e seguros para monitoração da concentração de substratos, metabólitos e inibidores da peroxidase em meio de cultura, bem como para o controle de bioreatores. Assim, encontram-se disponíveis na literatura diversos trabalhos que a utilizam (colorimetria, quimioluminescência, fluorescência, espectrofotometria e medidas amperométricas) (VOJINOVIĆ et al., 2004).

Deste modo, a peroxidase tem sido aplicada em estudos relacionados ao branqueamento de frutas e vegetais, em que é freqüentemente usada como indicador de efetividade deste tratamento devido à característica de ser uma enzima altamente termoestável e cuja perda de atividade de indica uma correspondente perda de atividade de outras enzimas deteriorativas. Devido a difícil inativação desta enzima, níveis de atividade residual podem ser tolerados em diferentes vegetais, sem a promoção de efeitos adversos na qualidade do produto, minimizando-se, porém, os efeitos de branqueamento (ESKIN, 1990).

A inativação da peroxidase tem sido abordada por diversos autores a partir de diferentes tratamentos térmicos aplicados a produtos alimentícios como: maçãs (VALDERRAMA et al., 2001); palmeira real (SAKHAROV et al., 2001); aveia (WEBER et al., 2002) e cenouras (SOYSAL e SÖYLEMEZ, 2005); ou, ainda, pelo emprego de outras alternativas tecnológicas mais promissoras como pelo emprego de campo elétrico pulsado (PEF), técnica esta que também auxilia na manutenção do aspecto nutricional e de melhores características organolépticas (principalmente nos atributos sabor e cor) dos alimentos (ZHONG et al., 2005).

A peroxidase tem servido como parâmetro da atividade metabólica durante o crescimento vegetal por participar de grande número de reações oxidativas e de biodegradação, as quais adjuntas ao ambiente, irrigação e composição do solo e, sobretudo a cuidados durante e pós-colheita, podem provocar uma resposta adversa do consumidor decorrente de alterações organoléptica e visual das propriedades do produto, associadas à degradação da qualidade no que se refere ao sabor, cor,

textura e qualidade nutricional de alimentos. Assim sendo, o controle de atividade da peroxidase faz-se de suma importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que esta é uma das enzimas (junto principalmente a polifenoloxidase, PPO) responsáveis pelo escurecimento em frutas e vegetais e de seus produtos processados (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981; SAKHAROV et al., 2001; TOMÁS-BARBERÁN e ESPÍN, 2001; VALDERRAMA et al., 2001; CHILAKA et al., 2002; ANTONIOLLI et al., 2003).

No entanto, a condução da produção de polímeros escuros (melaninas) também evidenciado pela presença da peroxidase em alimentos não é de tudo prejudicial, uma vez que a degradação oxidativa de compostos fenólicos em alguns produtos tais como chá, passas, ameixa seca e palmeira é um acontecimento bem-vindo para a intensificação da coloração marrom-preta, característica destes tipos de produtos (TOMÁS-BARBERÁN e ESPÍN, 2001) e permitiu a Mello e colaboradores (2003 e 2005) avaliarem de maneira fácil e rápida o potencial antioxidante de chás, no que se refere a seus constituintes fenólicos, mediante o desenvolvimento de um biosensor contendo peroxidase imobilizada em sílica de titânio, sem a necessidade de qualquer pré-tratamento da amostra.

A peroxidase de rabanete foi também apontada como removedora de fenóis e aminas aromáticas de soluções aquosas bem como meio para descolorir fenóis de efluentes, uma vez que esta enzima oxida inúmeros fenóis na presença de peróxido de hidrogênio, gerando os radicais fenoxi correspondentes, e formando substâncias muito menos solúveis em água que os substratos originais e que, após precipitação, podem ser separados da solução por filtração ou floculação. Thong et al. (1998), estudaram os parâmetros cinéticos que envolvem a remoção de fenóis e clorofenóis da água residual catalisada por peroxidase, verificando também os efeitos da concentração de peróxido de hidrogênio e o tipo de substrato (fenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol) para a remoção de poluentes.

Muitos trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de consolidar a substituição de métodos mais trabalhosos, caros, complexos e demorados, por outros mais vantajosos, principalmente em relação à fácil manipulação, à correlação de resultados entre métodos químicos padronizados e com a possibilidade de uso para determinações analíticas de determinados metabólitos em laboratórios

bioanalíticos ou durante sua produção biotecnológica industrial (MERCHIE et al., 1992; KIRANAS et al., 1998; VOJINOVIĆ et al., 2004).

Em 2004, Vojinović et al. propuseram a otimização de um sistema acoplado – PSA (ácido fenil-4-sulfônico) / 4-AAP (4-aminoantipirina) / PO (peroxidase), e sua possível acoplação à injeção de fluxo para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e com enzimas do tipo oxidases para monitoração do consumo de nutrientes (glicose, galactose, lactato e outros) e metabólitos (etanol) formados durante o processo fermentativo.

O acoplamento de reações catalisadas pela glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e peroxidase (PO) tem sido usado em diversas propostas analíticas.

Fossati e Prencipe (1982) descreveram uma reação enzimático-colorimétrica, que possibilita a dosagem (15 minutos a temperatura ambiente) de triglicérides no soro humano, utilizando a hidrólise do triglicerídio sangüíneo pela lipase (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3), constituindo glicerol, que ao ser catalisado pela glicerol quinase (ATP: glicerol 3-fosfotransferase, EC 2.7.1.30, GK) e glicerol-3-fosfato oxidase, gera peróxido de hidrogênio, a ser monitorado a 510nm, mediante presença de peroxidase e agente cromogênico (ácido 3,5-dicloro-2-hidrobenzenosulfônico/ 4-aminofenazona). A adoção de tal procedimento permitiu a obtenção de dados sensíveis, precisos e confiáveis.

Método semelhante foi empregado por McGowan et al. (1983), porém consistia na substituição do sistema cromogênico por 4-aminoantipirina e sódio 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenosulfonato, constituindo um composto quinonimina vermelho acobreado que permite leitura de absorbância a 510nm, sem necessidade de diluição prévia da amostra sangüínea.

Em 1998, Kiranas et al. imobilizaram GPO em esferas de vidro não-porosa, as quais foram colocadas em um tubo de Teflon para fabricar um reator que ligado ao sistema FIA (injeção de fluxo) permitiria a determinação de glicerol-3-fosfato em amostras, seguindo a otimização de seus parâmetros. O método baseava-se na oxidação enzimática de glicerol-3-fosfato e a determinação de H₂O₂ formada pelo reagente de Trinder (4-AAP: 4-aminoantipirina + DCPS: ácido 3,5-dicloro-2-hidroxifenilsulfônico) e medido a absorbância a 510nm. A estabilidade do reator também foi investigada, bem como, a montagem de um sistema FIA com uso de GPO solúvel. O procedimento proposto ofereceu muitas vantagens significativas:

rapidez, simplicidade, sensibilidade e precisão, além de permitir o uso desta técnica para determinações analíticas deste metabólito em laboratórios bionalíticos ou durante sua produção biotecnológica industrial.

Determinações de ácido lisofosfatídico (LPA) em plasma também foram obtidas por Kishimoto et al. (2003). O método mostrou ser simples, altamente sensível e permitiu sua utilização com analisadores automáticos; o LPA de uma amostra era hidrolisado pela lisofosfolipase (2-lisofosfatidilcolina acilhidrolase, EC 3.1.1.5) a glicerol-3-fosfato, seguido de um ciclo enzimático que utiliza glicerol-3-fosfato oxidase e glicerol-3-fosfato desidrogenase. Concentrações de peróxido de hidrogênio, composto resultante do ciclo, foram colorimetricamente mensuradas após reação deste reagente com peroxidase.

O glicerol é um triálcool requerido em muitos campos, tais como em análises clínica, farmacêutica e alimentícia e na monitoração de processos biotecnológicos. Existem diversas metodologias descritas em literatura para se determinar o glicerol. Uma das mais recentes publicações apresenta um biosensor amperométrico enzimático GK/GPO/PO que permite realizar estimativas do conteúdo deste composto em fluidos biológicos complexos, utilizando sistemas automatizados e com boa correlação de resultados e estabilidade suficiente para monitoramento e controle durante o processo fermentativo (KATRLÍK et al., 2006).

A quantidade de magnésio em sangue pode ser também mensurada através de procedimento colorimétrico, no qual a glicerol quinase, enzima magnésio-dependente, fosforila glicerol a glicerol-3-fosfato, sendo este oxidado a fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio pela glicerol-3-fosfato oxidase. Este peróxido formado é depois reduzido pela ação da peroxidase, produzindo um composto vermelho com absorção máxima a 510nm. A produção de coloração é proporcional a concentração do complexo Mg-ATP, o qual é, por sua vez, proporcional a concentração de magnésio no sangue. Este método mostrou ser rápido e preciso, sem necessidade do uso de equipamentos caros, facilmente automatizado (WIMMER et al., 1986).

Ensaio de atividade enzimática para lipase (FOSSATI et al., 1992), glicerol quinase (GK; HUANG et al., 1997) e nucleosídeo difosfato quinase (LASCU et al., 1993) podem ser realizados pelo emprego de reações acopladas a partir de combinação de reações catalisadas pela glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase.

_____ *Objetivos*

Os objetivos deste trabalho foram:

- Evidenciar a presença de glicerol-3-fosfato oxidase em extrato de levedura seca de panificação;
- Otimizar a metodologia para obtenção e purificação de glicerol-3-fosfato oxidase proveniente de extrato celular bruto de levedura seca de panificação;
- Estudar alguns parâmetros cinéticos e de estabilidade de glicerol-3-fosfato oxidase.

_____ *Material e métodos*

1. Obtenção dos extratos celulares brutos de levedura e de rabanete

Utilizou-se como fonte de enzimas fermento biológico seco instantâneo - massa salgada procedência Mauri[®] (Mauri Brasil Indústria, Comércio e Importação Ltda.) para obtenção de glicerol-3-fosfato oxidase e, rabanete orgânico, adquirido no comércio, para a peroxidase.

1.1. Obtenção de peroxidase (PO)

O extrato bruto foi obtido através de metodologia descrita por Neves e Lourenço (1985), modificada como segue: trituração de rabanete descascado (500g) e homogeneizado em liquidificador com adição de porções de solução tampão acetato 0,1 M pH 5,0 (total: 20 mL). O homogenato foi filtrado em gaze e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm (1296 x g) em centrífuga refrigerada, sendo o sobrenadante congelado e utilizado como fonte de peroxidase.

1.2. Obtenção de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)

1.2.1. Rompimento com esferas de vidro

O extrato celular bruto foi obtido através de metodologia descrita por Tininis (2001), modificada em laboratório, como segue: 10,00 g de fermento biológico seco instantâneo Mauri[®] (massa salgada) (Balança Adam AFA-120 LC), 100 mL de tampão (solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 6,2 contendo β - mercaptoetanol 2 mM) e 100,0 g de esferas de vidro (425-600 micras, Sigma). O rompimento foi realizado em um homogeneizador tipo "Bead Beater" (Biospec Products Incorporation, modelo 1107900) por 15 minutos em banho de gelo. O extrato celular (sobrenadante) foi separado em centrífuga Sorvall (Legend RT) refrigerada a 6000 rpm (2917 x g) por 10 minutos.

Em seguida, adicionou-se ao extrato celular bruto obtido acima, 1% de sulfato de estreptomicina (Sigma) em banho de gelo e agitação, mantendo-o por 60 minutos

em geladeira. Centrifugou-se, em seguida, em temperatura de refrigeração por 20 minutos a 12000 rpm (11671 x *g*). A este sobrenadante, procedeu-se à precipitação, em banho de gelo e agitação, com solução 30%, igual volume, de PEG 3350 (Sigma).

Após repouso em geladeira por aproximadamente 12 horas, fez-se centrifugação por 20 minutos a 12000 rpm (11671 x *g*), suspendendo o precipitado em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,2, levando-o à diálise por 24 horas em tampão (solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 6,2 contendo sulfato de manganês 10 mM e β-mercaptoetanol 2 mM) em geladeira, sob agitação; e, ao final do procedimento, o extrato clarificado foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm (8105 x *g*), sendo denominado extrato enzimático obtido por rompimento com esferas.

1.2.2. Rompimento com areia

O extrato celular bruto foi obtido através de combinação de metodologias descritas por Lin et al. (1996) e Esders e Michrina (1979), modificada em laboratório, como segue: 10,00 g de células de levedura seca de panificação foram trituradas em gral, mediante a adição de 5,00 g de areia tratada (solução sulfocrômica) e porções de solução tampão acetato 0,1 M pH 6,5 contendo 0,1% Triton X-100 (volume total: 50 mL) por aproximadamente 30 minutos. O extrato celular (sobrenadante) foi separado por centrifugação refrigerada a 7000 rpm (3971 x *g*) por 40 minutos; após o qual se fez um fracionamento salino com sulfato de amônio (0-60%), mantendo-o em repouso em geladeira por 12 horas. Fez-se a centrifugação por 60 minutos a 7000 rpm (3971 x *g*), suspendendo o precipitado em tampão acetato 0,1 M pH 6,5, seguido de diálise por 24 horas com solução citrato de sódio 2 mM pH 5,5 contendo sulfato de manganês (10 mM) e β-mercaptoetanol 2mM em geladeira, sob agitação; e, ao final do procedimento, o extrato clarificado foi centrifugado por 15 minutos a 7000 rpm (3971 x *g*), sendo denominado extrato enzimático obtido por rompimento com areia.

A metodologia de rompimento celular com areia, por ser uma técnica de maior dificuldade de execução para obtenção de extratos homogêneos, foi utilizada apenas para alguns ensaios iniciais, detalhados ao longo da dissertação.

2. Determinação da presença de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) no extrato de levedura

Baseia-se na determinação qualitativa do consumo de oxigênio da reação de oxidação de glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona pela enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) feita polarograficamente em Oxígrafo YSI 5300A (eletrodo de oxigênio do tipo Clark), com adaptações de técnicas descritas por Lin et al. (1996) e Esders e Michrina (1979).

O sensor de oxigênio foi inserido em uma pequena cubeta (volume total: 4mL total) contendo 2,5 mL de solução 60mM glicerol-3-fosfato, 0,5 mL de solução tampão acetato 0,1M pH 6,0 e provido com agitador magnético. Inserções em seringa foram feitas pela rolha para adição de reagente (1mL de extrato enzimático de levedura contendo GPO obtido com rompimento com areia tratada). Durante todo o ensaio, a temperatura foi mantida a 37°C em banho-maria e a sensibilidade do eletrodo verificada e ajustada. A captação de oxigênio foi registrada automaticamente em papel milimetrado e representou uma diminuição da pressão parcial de oxigênio dissolvido na fase líquida (porcentagem de consumo de oxigênio) com o passar do tempo.

3. Ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e de peroxidase (PO)

A dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade (cálculo abaixo) (TORRES, 2001).

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbância} \times \text{Volume total da reação (mL)}}{\text{Caminho ótico (cm)} \times \text{Tempo (min)} \times \epsilon \times \text{Volume de amostra}} \times \text{diluição}$$

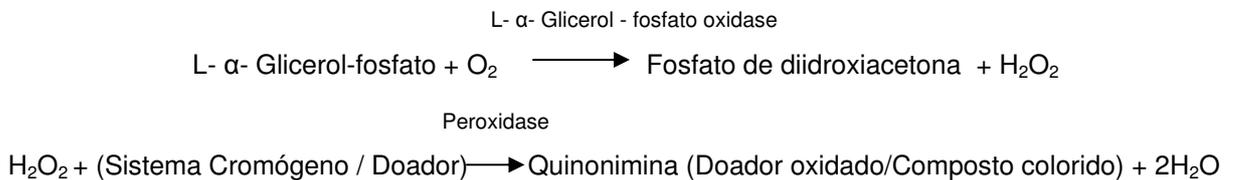
A atividade específica é uma medida habitualmente utilizada como parâmetro de comparação entre diferentes preparações e etapas do processo de obtenção enzimática, sendo expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (TORRES, 2001).

3.1. Ensaio de atividade da peroxidase (PO) de rabanete

A atividade da peroxidase (PO), enzima que catalisa a oxidação de um doador de elétrons pelo peróxido de hidrogênio, foi realizada baseada em Neves e Lourenço (1985) modificado, utilizando-se a seguinte mistura: 0,2 mL o-dianisidina 15 mM (em etanol); 0,2 mL peróxido de hidrogênio 30 mM; 5 µL extrato de rabanete e 2,595 mL solução tampão citrato-fosfato 0,08 M pH 5,5, completando 3,0 mL de ensaio em cubeta. Acompanhou-se, em espectrofotômetro (Amersham Biosciences – Ultrospec 2100pro) a variação de absorbância a 460 nm no primeiro minuto. O ensaio branco continha todos os reagentes, exceto a peroxidase (ϵ o-dianisidina: $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como a unidade de absorbância gerada por minuto nas condições de ensaio.

3.2. Ensaio colorimétrico de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)

Algumas metodologias foram utilizadas para tentar padronizar (modelo abaixo) o ensaio colorimétrico para dosagem de atividade da GPO.



Em todos os ensaios, uma unidade de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase corresponde à quantidade de enzima que produz, nas condições de ensaio, 1µmol de peróxido de hidrogênio por minuto.

A) O-dianisidina

A atividade de glicerol-3-fosfato oxidase foi determinada em banho-maria a 37°C, acoplando a reação catalisada pela GPO (oxidação do glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona concomitante à redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio) à reação de peroxidase (decomposição do peróxido de hidrogênio em presença de um doador de hidrogênio), sendo feita a partir da seguinte mistura: 2,5 mL glicerol-3-fosfato 60 mM; 1,08 mL solução tampão acetato 0,1 M pH 6,0 contendo 1% Triton X-100; 400 µL o-dianisidina 15 mM (em etanol); cerca de 0,20 unidade de peroxidase (extrato de rabanete) e 10 µL extrato enzimático de levedura (fonte de GPO), completando 3,0 mL de ensaio. Aguardou-se a formação de composto colorido (alaranjado – 2 horas), interrompeu-se a reação submetendo-a por 5 minutos a fervura e fez-se leitura em espectrofotômetro (Amersham Biosciences – Ultrospec 2100pro) a 460 nm utilizando como valor do coeficiente de extinção molar (ϵ) para o-dianisidina: $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os ensaios brancos foram realizados em ausência de substrato glicerol-3-fosfato, cujo volume foi compensado pela adição de solução tamponante e pela ausência da enzima GPO, compensada pela adição de água destilada.

B) 4-aminoantipirina (4-AAP) e fenol

Neste ensaio, a atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (enzima que catalisa a oxidação do glicerol-3-fosfato para fosfato de diidroxiacetona, mediante redução do oxigênio para peróxido de hidrogênio) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Šůcková et al. (1992), modificada e adaptada em nosso laboratório, como segue (60°C): 750 µL glicerol-3-fosfato 0,45 M dissolvido em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,1% Triton X-100; 150 µL de 4-AAP 0,1%; 300 µL de fenol 0,1%; água destilada; cerca de 0,40 unidades de peroxidase (extrato de rabanete) e 15 µL extrato enzimático de levedura (fonte de GPO) diluído 10 vezes, completando 1,33 mL de ensaio. Aguardou-se a formação de composto colorido (vermelho – 2 horas), interrompeu-se a reação com 300 µL sódio dodecil sulfato

(SDS) 10% e fez-se a leitura em espectrofotômetro (Amersham Biosciences – Ultrospec 2100pro) a 500 nm utilizando ϵ 4-AAP: $6,65 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ao valor obtido na reação foi subtraído 3 ensaios branco: ausência de substrato glicerol-3-fosfato (1), cujo volume foi compensado pela adição de solução tamponante; ausência da enzima GPO (2) e outro com ausência de GPO e PO (3), compensadas pela adição de água destilada.

C) Sistema de cor

Do mesmo modo realizado para as demais metodologias, a determinação de atividade de GPO neste ensaio, foi realizada por via colorimétrica, acoplando a reação característica de GPO à reação da PO, nas mesmas condições descritas no item acima (item B). Foram testados 5 reagentes de cor: o-dianisidina 7,2 mM (em etanol), o-tolidina 0,76 mM (em etanol), guaiacol 72,4 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico sódico (DHBS) 0,1% e 4-aminoantipirina 0,1%, fenol 0,1% e 4-aminoantipirina 0,1%, sendo lidas em espectrofotômetro a, respectivamente, 460 nm (ϵ o-dianisidina: $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; SOYSAL e SÖYLEMEZ, 2005), 438 nm (ϵ o-tolidina: $5,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; AFAR e DEMIRATA, 1993), 470 nm (ϵ guaiacol: $26600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; SOYSAL e SÖYLEMEZ, 2005), 520 nm (ϵ 4-AAP: $6,65 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; FOSSATI e PRENCIPE, 1982) e 500nm (ϵ 4-AAP: $6,65 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ŠŮCHOVÁ et al., 1992).

3.2.1. Tempo de adição da peroxidase

O tempo de adição do extrato de rabanete (fonte de peroxidase) nos ensaios de dosagem da atividade de glicerol-3-fosfato oxidase foram feitos utilizando dois tipos de ensaio:

- Reações concomitantes, em que todos os reagentes eram colocados na reação e após estabilização a 60°C por 5 minutos, adicionava-se o extrato de levedura (fonte de GPO).

- Reações consecutivas, em que se aguardava a ação da GPO sobre o substrato glicerol-3-fosfato por 15 minutos a temperatura de 60°C e após este período adicionavam-se os demais regentes da reação.

Ambas as reações aconteceram em um período de 2 horas, sendo interrompidas com a adição de solução de SDS 10% as mesmas e seguidas de leitura em espectrofotômetro a 500 nm (método 4-AAP e fenol).

4. Comparação de fermentos

Foram feitos rompimentos com esferas utilizando como fonte de enzimas o fermento biológico seco instantâneo massa salgada Mauri[®] (Mauri Brasil Indústria, Comércio e Importação Ltda.) – fermento desidratado, e fermento fresco Fleischmann[®] (Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal S/A.) – fermento fresco, adquiridos no comércio, precipitando-os com sulfato de amônio (35-70%) e com dosagem feita por método colorimétrico 4-AAP e fenol.

5. Concentração do extrato enzimático de levedura

5.1. *Speed Vacuum*

Alguns extratos enzimáticos brutos obtidos por rompimento com areia tratada foram concentrados por evaporação em *Speed Vacuum* (Concentrator Eppendorf 5301) a 30°C para verificação do efeito da concentração (16 vezes) da amostra. O consumo de oxigênio foi monitorado polarograficamente em Oxígrafo YSI 5300A com eletrodo de oxigênio do tipo Clarck, utilizando 2,5 mL glicerol-3-fosfato 60 mM; 1,45 mL tampão acetato pH 6,0 0,1 M e 50 µL extrato enzimático.

5.2. Ultrafiltração

Após a obtenção do extrato enzimático através de rompimento com esferas ou com areia tratada, 1 mL de cada fração foi submetida à centrifugação 7000 rpm (3971 x g) por 40 minutos em um sistema Kwik Spin[™] 100.000MWCO (Pierce). Após este procedimento, fez-se a dosagem enzimática da atividade de GPO

utilizando o-dianisidina 15 mM (λ : 460 nm, 2 horas) no sobrenadante filtrado e no sobrenadante não filtrado (retido pela membrana).

5.3. Liofilização

Após obtenção do extrato enzimático (rompimento com esferas), submeteu-se o mesmo à liofilização (Liofilizador Labconco freezezone 6).

Inicialmente, limpou-se o balão de fundo redondo com solução sulfocrômica (retirada de resíduos) seguida de diversas lavagens com água destilada, deixando-o secar a temperatura ambiente. Com esta vidraria seca, introduziu-se um volume conhecido de amostra (9 mL) e com o auxílio de uma bagueta adaptada à rosca para vedação do balão, girava-se rapidamente o mesmo em uma bacia contendo gelo e sal grosso a fim de congelar as amostras nas paredes deste frasco. Logo, manteve-se a amostra no congelador por 20 minutos e em seguida vedou-se a boca do balão com silicone e levou-o até o liofilizador, onde permaneceu por 12 horas aproximadamente.

Para a ressuspensão do material liofilizado, limpou-se a boca do frasco retirando qualquer resquício de silicone, virou-se todo o pó que estava solto para um béquer e para liberar o material que ainda estava preso às paredes, colocou-se, em pequenas porções, quantidade conhecida de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, descartando todo o material liquefeito no béquer anterior. Neste, adicionamos novas porções de tampão até a completa dissolução do liofilizado, até que a mistura se tornasse homogênea (Volume total: 3 mL; Concentração da amostra: 3 vezes). A seguir, submeteu-se tal material liofilizado e ressuspensão e uma amostra não liofilizada a dosagem enzimática de GPO com 4-AAP e fenol.

6. Determinação protéica

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura ou de rabanete foi determinado através do método de Lowry modificado por Layne (1957), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Deste modo, prepararam-se 3 soluções:

Solução A: carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1 M

Solução B: sulfato de cobre 0,5% em tartarato de sódio e potássio 1%

Solução C: 50 mL Solução A: 1 mL Solução B; preparada no momento de uso.

O ensaio foi realizado em triplicata a temperatura ambiente colocando-se, em 1 mL de amostra diluída, 5 mL de solução C. Aguardou-se 10 minutos, acrescentou-se 0,5 mL de reagente Folin Ciocalteau (Imbralab) (diluído em água destilada em proporção 1:2 , preparado no momento de uso) e após 30 minutos fez leitura em espectrofotômetro (Amersham Biosciences – Ultrospec 2100pro) a 600 nm. Para fins de cálculo (descrito abaixo), utilizou-se como fator de correção: 0,18, valor este obtido pela multiplicação da concentração da proteína padrão ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) pelo volume empregado em sua diluição (0,3 mL) ($0,6 \text{ mg mL}^{-1} \times 0,3 \text{ mL} = 0,18$).

$$\text{Conteúdo protéico (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}}{\text{Absorbância padrão} - \text{Absorbância branco}} \times \text{diluição} \times \text{fator}$$

7. Ativação por sais de metais

Foram feitas duas tentativas de adição de sais de metais para a ativação enzimática de GPO.

A) Soluções

Após obtenção do extrato enzimático obtido por rompimento com esferas (precipitação sulfato de amônio 35-70% e diálise), adicionou-se ao ensaio de dosagem da atividade enzimática de GPO (sistema 4-AAP e fenol) determinada concentração de sais de metais: magnésio (sulfato de magnésio heptaidratado – 10 mM), cálcio (cloreto de cálcio diidratado – 10 mM), cobalto (cloreto de cobalto hexaidratado – 10 mM) e manganês (sulfato de manganês hidratado – 10 mM), a fim de verificar a ocorrência ou não de ativação enzimática.

B) Diálise

Após precipitação com sulfato de amônio 35-70% do extrato enzimático obtido por rompimento com esferas, submeteu-se o mesmo à diálise em solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 5,5 contendo uma das seguintes condições: cloreto de cobalto 10 mM, sulfato de manganês 10mM ou ausência de metais. Adicionaram-se as soluções, no momento de uso, 2 mM de β -mercaptoetanol e fez-se 3 trocas da solução de diálise, mantendo-as sempre em geladeira (período de 24 horas). Após centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm (8105 x g), fez-se à dosagem da atividade de GPO pelo sistema 4-AAP e fenol.

8. Definição do melhor método de precipitação do extrato

8.1.Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes faixas de sulfato de amônio

Após obtenção do extrato celular bruto oriundo de rompimento com esferas de vidro e a precipitação deste com sulfato de estreptomicina, submeteu-se o sobrenadante resultante ao fracionamento salino com sulfato de amônio (DAWSON et al., 1969) em diferentes pontos (35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%), seguida de diálise. A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

8.2.Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes volumes de acetona

Após obtenção do extrato celular bruto oriundo de rompimento com esferas de vidro e a precipitação deste com sulfato de estreptomicina, dividiu-se o sobrenadante resultante em 3 porções de igual volume e submeteram-se, cada uma delas, respectivamente, à precipitação com acetona em diferentes volumes: 1, 2 e 3 volumes em relação ao do extrato mensurado, seguida de diálise. A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

8.3.Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes pesos moleculares de polietilenoglicol (PEG)

Após obtenção do extrato celular bruto oriundo de rompimento com esferas de vidro e a precipitação deste com sulfato de estreptomicina, dividiu-se o sobrenadante resultante em 4 porções de igual volume e submeteram-se, cada uma delas, respectivamente, à precipitação com igual volume de solução 30% (p/v) de polietilenoglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares: 3350, 6000, 10000, 20000, seguida de diálise. A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

8.4.Comparativo de precipitações enzimáticas com diferentes reagentes

Após obtenção do extrato celular bruto oriundo de rompimento com esferas de vidro e a precipitação deste com sulfato de estreptomicina, dividiu-se o sobrenadante resultante em 3 porções de igual volume e submeteram-se, cada uma delas, respectivamente, a diferentes reagentes: acetona (1 volume), sulfato de amônio (35-70%) e igual volume de solução 30% (p/v) de PEG 3350, seguidas de diálise. A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

9. Otimização de técnica colorimétrica para dosagem da enzima glicerol-3-fosfato oxidase

A técnica colorimétrica baseou-se, em fase de adaptação, em metodologia descrita por Šůcková et al. (1992), baseada em método espectrofotométrico de reações enzimáticas (GPO e PO) acopladas. Todo este processo foi realizado com extrato enzimático obtido por rompimento com esferas (fonte de GPO), pelo período de 2 horas, e a cada etapa, o melhor resultado alcançado foi incorporado a tal metodologia para só então se realizar a etapa seguinte.

9.1. Curva de temperatura

A temperatura ótima de ensaio para a atividade de GPO foi determinada pelo ensaio de tal atividade enzimática a diferentes temperaturas (25, 30, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70°C).

9.2. Concentração de substrato: glicerol-3-fosfato

A concentração ideal de substrato para a atividade de GPO foi determinada pelo ensaio de tal atividade mediante emprego de diferentes soluções de glicerol-3-fosfato (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,45; 0,6 e 0,8 M - concentração no ensaio: 28 - 448 mM), cujas massas pesadas eram diluídas em solução tampão Tris-HCl 0,125 M pH 8,0 contendo 0,125% Triton X-100.

9.3. Extrato enzimático: volume de ensaio e diluição

A diluição e volume ideais do extrato enzimático de levedura para a atividade de GPO foram determinados pela submissão, a medida de tal atividade, de diferentes volumes (10, 15, 30, 50 µL) de extrato e, em novos ensaios, a testes de diluição do extrato (1, 5, 10, 12, 15, 20, 30, 50, 100 vezes) em solução tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,2.

9.4. pH

O pH ótimo para a atividade de GPO foi determinado pelo emprego de diferentes níveis de pH, entre 5,0 e 10,0 ao ensaio de tal atividade enzimática. Os seguintes sistemas tamponantes foram utilizados: tampão acetato 0,1 M para pH 5,0; tampão fosfato 0,1 M para pH 6,0-7,0; tampão Tris-HCl 0,1 M para pH 7,5-8,4; tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M para pH 10,0. Todas as soluções continham 0,1% de Triton X-100 e o melhor resultado obtido foi comparado ao "controle": solução tampão Tris-HCl 0,125 M contendo 0,125% de Triton X-100.

9.5. Tempo de reação

O tempo ideal de reação da atividade de GPO foi obtido através de ensaios de atividade em que a determinados períodos de tempo (30, 60, 90, 120, 180, 240 minutos) retirava-se uma alíquota, que após interrupção da reação, era submetida à leitura espectrofotométrica.

9.6. Concentração e volume de fenol

A concentração e volume ideais de fenol para a determinação da atividade de GPO foram obtidos através de ensaios de atividade enzimática utilizando diferentes soluções (0,1% e 0,5%) e volumes (0,1 mL; 0,3 mL; 0,4 mL) deste reagente.

9.7. Concentração e volume de 4-AAP

A concentração e volume ideais de 4-AAP para a determinação da atividade de GPO foram obtidos através de ensaios de atividade enzimática utilizando diferentes soluções (0,1% e 0,4%) e volumes (0,1 mL; 0,15 mL; 0,25 mL) deste reagente.

9.8. Concentração de SDS

A concentração ideal de SDS a ser empregada na interrupção da reação enzimática para a determinação da atividade de GPO foi obtida através da submissão de ensaios a diferentes soluções (0,9% , 2%, 4% e 10%) de SDS (sódio dodecil sulfato). Foram testadas também a possibilidade de interrupção da reação por fervura (95°C, aproximadamente) e a estabilidade do resultado encontrado através de leituras espectrofotométricas no momento e após 10 minutos de interrupção.

9.9. Volume de PO

O volume ideal de extrato enzimático de rabanete (fonte de PO) a ser adicionado à reação para a determinação da atividade de GPO foi obtido mediante a realização de ensaios com diferentes volumes de extrato (15, 30, 60, 90, 115 μ L).

9.10. Curva analítica

9.10.1. Dosagem da enzima

A partir da curva de diluição de extrato enzimático de levedura feita anteriormente, fez-se nova curva para determinação da sensibilidade do método e verificação da melhor diluição do extrato para a determinação da atividade de GPO, utilizando-se para tanto as diluições: 1, 5, 10, 15, 20 e 50 vezes.

9.10.2. Substrato

A partir da curva de concentração de substrato obtida anteriormente, fez-se nova curva para determinação da sensibilidade do método e verificação da melhor concentração de glicerol-3-fosfato para a determinação da atividade de GPO, utilizando-se para tanto as soluções 0,1; 0,2; 0,4; 0,45; 0,6 e 0,8 M (Concentração no ensaio: 56 - 448 mM).

10. Estabilização enzimática

10.1. Estabilidade térmica

Após rompimento das células de levedura (fermento de panificação) pelo método de esferas de vidro, distribuiu-se certa quantidade de extrato celular (alíquotas de igual volume: 0,200 mL) em tubos Eppendorf e submeteu-se cada uma destas amostras a diferentes temperaturas (0, 30, 50, 60, 70, 80°C). Após fim deste período de tempo (1 hora), procedeu-se normalmente com a dosagem enzimática de GPO utilizando 4-AAP e fenol como sistema cromogênico.

10.2. Estabilidade ao pH

Após rompimento das células de levedura (fermento de panificação) pelo método de esferas de vidro, fez-se diluições (10 vezes) do extrato enzimático em soluções tamponantes de acordo com o pH: pH 5,0 – solução tampão acetato 0,1 M; pH 6,0-7,0 – solução tampão fosfato 0,1 M; pH 8,0–9,0 – solução tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 9,5-10,0 - solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M. Inicialmente, fez-se uma dosagem enzimática da GPO pelo método 4-AAP e fenol (tempo zero), não sendo necessária uma nova diluição da amostra devido a esta já estar previamente diluída. Em seguida, incubaram-se as amostras em B.O.D. (Câmara de incubação B. O. D. Fanem 347CD) regulada a 40°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$) e em determinados intervalos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias), fez-se novamente a dosagem de atividade.

10.3. Emprego de estabilizantes

Após rompimento das células de levedura (fermento de panificação) pelo método de esferas de vidro, pesou-se a quantidade necessária dos estabilizantes a serem testados (azida de sódio 0,05%; sacarose 5%; cloreto de cobalto 6,7 mM), solubilizando, cada um deles, em 1 mL do extrato enzimático. Armazenaram-se as amostras em B.O.D. (Câmara de incubação B. O. D. Fanem 347CD) regulada para temperatura de 40°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$), bem como uma amostra controle contendo apenas o extrato enzimático e fez-se a dosagem enzimática da GPO, após diluição da amostra (10 vezes), pelo método 4-AAP e fenol, no momento inicial (tempo zero) e em determinados intervalos de tempo (1, 3, 7, 14 e 21 dias).

11. Análise estatística

Todos os dados considerados nesta dissertação apresentaram desvios de até 5%, sendo os gráficos plotados em software OriginPro[®] 7.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA).

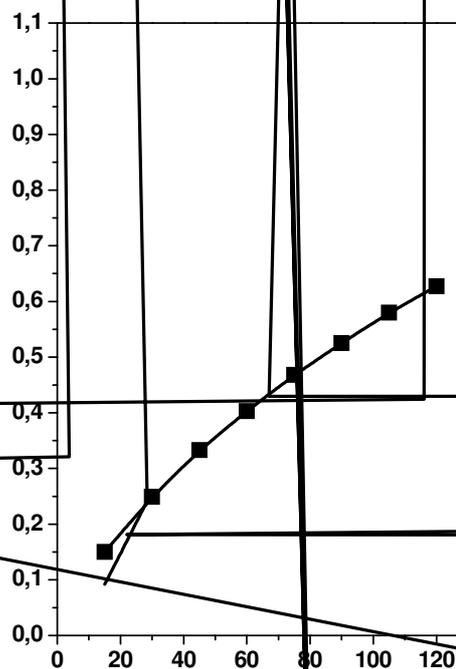
Resultados e Discussões

I. Otimização do ensaio para dosagem da enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)

1. Obtenção da peroxidase (PO) de rabanete

As peroxidases de origem vegetal e frutos têm sido citadas na literatura, principalmente em estudos de purificação e cinética, bem como de suas diferentes propriedades decorrentes conforme a fonte enzimática (Neves e Lourenço, 1985; Valderrama et al., 2001). Neste trabalho, utilizou-se como fonte de peroxidase extrato de rabanete, obtido conforme Materiais e Métodos item 1.1.

Os substratos mais utilizados para os ensaios das peroxidases são: compostos fenólicos, como p-cresol, guaiacol, resorcinol, etc., ou aminas aromáticas, com anilina, o-dianisidina, o-fenilediamina, etc. A o-dianisidina foi o substrato utilizado neste trabalho para medidas de atividade da peroxidase, sendo os resultados de absorbância obtidos a 460 nm em função do tempo de reação demonstrados na **Figura 2**.



Foram realizados ensaios para escolha do melhor solvente a ser utilizado na preparação do substrato (**Tabela 4**) a ser empregado na dosagem de atividade da peroxidase e apesar de os dados evidenciarem ser o etanol comercial, Candura[®], o melhor solvente para a o-dianisidina, devido à proibição de venda de álcool comercial a 96^oGL no Brasil e a dificuldade em garantir a compra de estoque suficiente da marca Candura[®] para todas as determinações, adotou-se como solvente o etanol absoluto (Mallinckrodt).

Tabela 4. Solventes do substrato o-dianisidina (15 mM) utilizado na dosagem da atividade de peroxidase.

Solventes	Etanol comercial (Candura[®] 96^oGL)	Metanol	Etanol absoluto
Atividade PO* (U/mL)	21,345 (R ² : 0,9951)	20,071 (R ² : 0,9936)	20,708 (R ² : 0,9929)

*Média de 2 ensaios.

2. Preparo do extrato bruto de células de levedura

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, as enzimas são proteínas e estão universalmente presentes em organismos vivos; são responsáveis pela manutenção do sistema biológico celular. A atividade destas enzimas fora das células somente é mantida mediante presença de condições favoráveis. Isolamento de enzimas intracelulares (endoenzima) envolvem a separação de uma mistura biológica complexa, enquanto enzimas extracelulares (exoenzima) são secretadas das células para o meio junto a outros componentes (KULA, 1987; GERHARTZ, 1990; NELSON e COX, 2006; PRICE, 1998).

Microorganismos são fonte significativa de enzimas. Maioria das enzimas usadas comercialmente são extracelulares, e a primeira etapa no seu isolamento é a separação das células da solução. Para enzimas intracelulares, o primeiro passo envolve a ruptura das células, liberando suas proteínas em uma solução denominada extrato bruto (GERHARTZ, 1990).

_____ *Resultados e Discussões*

Inúmeras técnicas são usadas para extrair enzimas de células e têm como principal objetivo obter a enzima de interesse na maior quantidade possível, consistente com a retenção máxima de sua atividade catalítica. Deste modo, é aconselhável usar o método mais suave possível, consistente com extração da enzima de interesse, de modo a evitar danos à enzima ou liberação de enzimas degradativas de organelas subcelulares como vacúolos e lisossomos (PRICE, 1998).

Células microbianas podem ser rompidas, por exemplo, por trituração com areia ou homogeneização com esferas de vidro, a qual envolve a agitação de uma suspensão de células com pequenas esferas de vidro. Este último é provavelmente o mais comumente utilizado para a obtenção de extratos de levedura, podendo romper até 95% das células, como demonstrado em contrastes de microscopia. Após o procedimento, as esferas de vidro são removidas por filtração em várias camadas de gaze ou, após decantação do sobrenadante, por centrifugação (WHITAKER, 1972; PRICE, 1998, DEUTSSCHER, 1990).

A escolha do líquido (solução tampão) para a extração enzimática depende da particularidade da enzima, se é solúvel ou ligada à membrana e do tipo de tecido em que este processo irá ocorrer, além da compatibilidade a metodologia utilizada para a lise celular e os passos de purificação subseqüentes para a manutenção da estabilidade enzimática. Os métodos usados para extrair diferentes proteínas das membranas dependem do modo e força de interação envolvidos. Algumas enzimas são parte de um sistema e têm suas atividades vinculadas a integridade deste. Tal fato pode ser alcançado pela inclusão de detergentes (ex. Triton X-100, detergente não iônico que promove a lise de esferoplastos) ao isolamento. Após este processo, o excesso de detergente deve ser removido pela possibilidade deste reagente interferir nas demais etapas de obtenção da fração enzimática. O emprego de sulfato de amônio para esta finalidade requer atenção uma vez que promove a separação do detergente constituindo uma espécie de camada sobre a fase aquosa, podendo conter certa quantidade da proteína de interesse (WHITAKER, 1972; PRICE, 1998, DEUTSSCHER, 1990).

Grupamentos tiol originários de cisteínas das cadeias das proteínas podem ser lesados durante a extração, uma vez que, com a ruptura da célula e exposição ao oxigênio, há uma tendência das cadeias em formar pontes dissulfeto ou oxidar espécies. Um método para evitar tal dano oxidativo, consiste em incluir um reagente

que contenha um grupo tiol, como é o caso do β -mercaptoetanol. Trata-se de um líquido denso, de odor desagradável e bastante tóxico, adicionado, para este fim, em concentração final 10-20mM. Além disto, a presença de um reagente sulfidrilante aumenta bastante a lise, quando usados em concentrações de 10 a 140 mM (PRICE, 1998, DEUTSSCHER, 1990).

Geralmente, a concentração de enzima no extrato inicial é muito baixa, necessitando que tal material seja processado a fim de remover quantidades substanciais de material desperdiçante, o qual pode interferir, por exemplo, na separação protéica. Assim, após a extração enzimática, fragmentos celulares são removidos por centrifugação (temperatura de refrigeração) e ácidos nucleicos retirados pelo emprego de sulfato de estreptomicina, reagente que promove a precipitação das proteínas ribonucleares e a clarificação do extrato (WHITAKER, 1972; GERHARTZ, 1990; SCOPES, 1993).

A glicerol-3-fosfato oxidase obtida a partir de fermento de panificação foi utilizada neste trabalho. Esta enzima é freqüentemente descrita na literatura como sendo oriunda de bactérias ácidas lácticas. Algumas padronizações de ensaio de obtenção da GPO a partir de leveduras foram realizadas neste trabalho, bem como estudos de otimização das condições de extração, como metodologia de rompimento, escolha do fermento, especificidade do substrato, tempo de adição da peroxidase na reação, etc. Duas metodologias de rompimento celular para extração da GPO foram utilizadas:

1. Rompimento através de trituração com areia
2. Rompimento através de trituração com esferas de vidro

A **Tabela 5** mostra os resultados de atividade da GPO de extrato celular bruto de células de leveduras obtido por rompimento com areia e com esferas de vidro.

Tabela 5. Efeito da metodologia de rompimento celular para a preparação do extrato enzimático sobre a atividade da GPO.

Tratamento*	Volume	Atividade ** (U)	Proteína (mg)	Atividade específica
Areia	4,7	0,136	31,68	0,0043
Esferas de Vidro	2,1	0,069	13,08	0,0053

* O extrato enzimático utilizado em ambos os tratamentos foi precipitado com sulfato de amônio 0-60% e submetido à diálise.

** A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de o-dianisidina após 210 minutos de ensaio. Média de 3 ensaios.

Resultados de atividades específicas obtidas para as metodologias de rompimento celular mostraram não haver grandes diferenças no emprego de um ou outro tratamento. No entanto, o uso de metodologia de rompimento celular com areia demonstrou ser uma técnica de maior dificuldade de execução para a obtenção de extratos homogêneos e remoção adequada do detergente utilizado, sendo assim, adotou-se o rompimento celular com esferas de vidro como procedimento padrão.

O rompimento das células de levedura através de metodologia que utiliza esferas de vidro foi acompanhado através de contagem das células integras em microscópio utilizando-se Câmara de Neubauer. A **Tabela 6** mostra os resultados do rompimento celular com esferas de vidro em função do tempo de rompimento, através de contagem das células inteiras e rompidas em cada ensaio. Essa metodologia de rompimento celular foi realizada em ambiente frio e em banho de gelo na tentativa de minimizar o aquecimento da amostra durante a operação, ocasionado principalmente pela agitação vigorosa da mistura promovida pela rotação do disco preso a base do aparelho utilizado (Bead beater). Considerando este aspecto, aliado a dosagens de atividade realizadas (dados não mostrados), foi padronizado o tempo de 15 minutos para a operação de rompimento a partir de metodologia que utiliza esferas de vidro com rompimento celular de 27,6%.

Tabela 6. Efeito do tempo do ensaio de rompimento celular sobre a eficácia do rompimento de células de leveduras utilizando esferas de vidro.

Tempo de Ensaio (min)	Rompimento celular com esferas de vidro*		
	Células inteiras	Células rompidas	% de Eficácia (rompidas/total)
2	269	21	7,24
5	223	35	13,5
10	163	51	23,8
15	136	43	27,6
20	110	72	39,5

* Média de 3 ensaios.

3. Escolha do fermento

Com o objetivo de se obter amostra enzimática com quantidade suficiente para realização de ensaios com resultados confiáveis de dosagens, foi experimentado a purificação da enzima. A partir do extrato bruto de células de levedura (fonte de GPO) rompidas com esferas de vidro, iniciou-se a concentração da amostra pela precipitação (fracionamento salino: sulfato de amônio 35-70%), seguido de diálise. A **Tabela 7** mostra os resultados da comparação das dosagens de atividade da GPO obtida pelo emprego de extrato purificado de fermento de panificação fresco e na forma desidratada. Nenhuma diferença significativa foi observada com relação à atividade da GPO nas duas amostras de fermento comparadas. Por questão de praticidade e melhor forma de estocagem da levedura, optou-se por trabalhar utilizando o fermento seco. O fermento biológico fresco utilizado era de procedência Fleischmann[®] (Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal S/A.) enquanto o seco instantâneo era oriundo da Mauri[®] (Mauri Brasil Indústria, Comércio e Importação Ltda.).

Tabela 7. Determinação de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase de extratos celulares (precipitação: sulfato de amônio 35-70%) de fermento de panificação fresco e desidratado obtidos por rompimento com esferas de vidro.

Fermento	Volume (mL)	Atividade total* (U)	Proteína total (mg)	Atividade Específica (U/mg)
Fresco	7,3	0,540	85,92	0,0063
Desidratado	7,2	0,533	63,72	0,0084

*A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

4. Tempo de adição da PO na reação

A leitura de atividade da glicerol-3-fosfato oxidase foi realizada num sistema de dupla reação enzimática, envolvendo, além desta enzima, a peroxidase. Estes tipos de reações acopladas podem sofrer interferências associadas a fatores como concentração destas enzimas na reação, inibição da(s) enzima(s) pelos reagentes de coloração, parâmetros ambientais, como temperatura e pH na reação, etc. Na tentativa de conhecer o efeito do tempo de adição da PO na reação, dois ensaios foram programados:

1. No primeiro, todos os reagentes foram adicionados aos frascos Eppendorf de uma vez, exceto pelo extrato de levedura (fonte de GPO) adicionado após estabilização da reação a 60°C por 5 minutos (Reações concomitantes);

2. No segundo, esperou-se a ação da glicerol-3-fosfato oxidase sobre o glicerol-3-fosfato, para em seguida, adicionar ao ensaio, o sistema de reação da segunda enzima (Reações consecutivas).

Ambas as reações aconteceram em um período de 2 horas, sendo interrompidas com a adição de SDS 10%. Não foi verificada nenhuma variação expressiva nos resultados encontrados (**Tabela 8**) e, optou-se por trabalhar com o sistema de reação tipo 1.

Tabela 8. Efeito do tempo de adição do extrato de rabanete (fonte de peroxidase) no ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (extrato enzimático obtido por rompimento com esferas).

Sistema de Reação*	Atividade** (U/mL)
Tipo 1: Reações concomitantes	0,170
Tipo 2: Reações consecutivas	0,173

* O sistema de reação compreendia reações concomitantes em que ocorria a ação da GPO e da PO sobre os demais reagentes do ensaio e reações consecutivas em que se promovia inicialmente a atuação da GPO e posteriormente da PO.

**A atividade de GPO no extrato enzimático obtido por rompimento com esferas de vidro foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

5. Sistemas de dosagens de glicerol-3-fosfato oxidase

Esters e Michrina (1979) experimentaram alguns compostos (substâncias fosforiladas derivadas de glicerol e açúcar) para medir a especificidade da GPO em reação e concluíram ser o glicerol-3-fosfato o substrato específico para esta enzima, fato este também comprovado em laboratório frente ao emprego de glicerol no ensaio de dosagem da atividade de GPO oriunda de extrato enzimático de levedura (dados não mostrados).

Assim, sendo a leitura de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) realizada num sistema de dupla reação enzimática, envolvendo, além desta enzima, a peroxidase (PO), testaram-se, então, as atuações de alguns substratos desta última enzima neste ensaio, uma vez que eles eram responsáveis pelo composto colorido constituído ao final deste processo, que foi mensurado espectrofotometricamente e cuja intensidade de cor é proporcional à atividade de GPO no ensaio, que por sua vez, é proporcional a concentração de GPO no extrato enzimático de levedura. Maior afinidade aconteceu na presença de 4-aminoantipirina (4-AAP) e fenol, seguido pelo guaiacol. A enzima não teve afinidade pela o-dianisidina, sistema 4-AAP e ácido 3,5- dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico sódico (DHBS) e pela o-tolidina nas condições estudadas. A **Tabela 9** mostra os resultados de leitura de absorbância e atividade de glicerol-3-fosfato oxidase na presença destes diferentes substratos.

Tabela 9. Atividade da glicerol-3-fosfato oxidase oriunda de extrato enzimático de levedura obtido por rompimento com esferas mediante a atuação de alguns substratos na reação catalisada pela peroxidase.

Reagentes*	Absorbância	Atividade (U/mL) **
O-dianisidina 7,2 mM	0,000	0,000
O-tolidina 0,76 mM	0,000	0,000
Guaiacol 72,4mM	0,071	0,024
4-AAP 0,1% + DHBS 0,1%	0,000	0,000
4-AAP 0,1% + fenol 0,1%	0,110	0,149

*4-AAP: 4-aminoantipirina, DHBS: ácido 3,5- dicloro-2-hidroxi-benzenosulfônico sódico.

** A atividade de GPO foi mensurada após reação a 60°C por 2 horas, interrompida por solução SDS e com leituras espectrofotométricas em comprimento de onda estabelecido pelo reagente empregado em cada ensaio.

Medida do oxigênio na reação com extrato bruto de levedura de panificação e glicerol-3-fosfato

Através da obtenção de extratos de levedura provenientes de rompimento com areia, determinou-se qualitativamente, por meio de oxígrafo (modelo YSI 5300A), a quantidade (%) de oxigênio da reação de oxidação de glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona pela enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) em comparação a um branco. No ensaio branco houve a substituição do glicerol-3-fosfato por água destilada.

A **Figura 3** mostra a porcentagem de oxigênio em função do tempo de reação nas frações do sobrenadante e precipitado de amostra de levedura de panificação, após rompimento celular com areia e centrifugação frente a uma amostra branco. A porcentagem de oxigênio consumido medido é praticamente igual, na fração do sobrenadante e na fração do precipitado e podendo ser considerada nula na reação branco. A maior porcentagem de oxigênio ocorreu no intervalo de tempo compreendido entre 100 e 300 segundos de reação. A determinação da quantidade (%) de oxigênio consumido numa reação que contém glicerol-3-fosfato como substrato, indica a presença de glicerol-3-fosfato oxidase no extrato bruto de levedura de panificação. Faz-se importante ressaltar que não foi encontrada, no decorrer do levantamento bibliográfico, para a redação e realização deste trabalho,

nenhuma citação similar que utiliza levedura (fermento de panificação) como fonte desta enzima.

A concentração do extrato celular bruto por evaporação em 16 vezes realizada pela da passagem da amostra em aparelho tipo *Speed Vacuu* , resultou na diminuição, da ordem de 32 %, quando comparado ao extrato celular não concentrado, na quantidade de oxigênio presente na reação, mensurado em oxígrafo e como pode ser verificado na **Figura 4**. No ensaio que utiliza o extrato celular concentrado, o tempo máximo para se atingir a porcentagem máxima de oxigênio medido é cerca de 100 segundos, sendo duas vezes maior que o tempo necessário para mesma medida em reação contendo extrato celular bruto (não concentrado). A diminuição do tempo de máximo de oxigênio presente na reação e o aumento do consumo do oxigênio na reação pela amostra de extrato concentrado, tornam a evidenciar a presença da GPO no extrato de levedura de panificação (**Tabela 10**).

Figura 3. Consumo de oxigênio em extrato enzimático bruto de levedura de

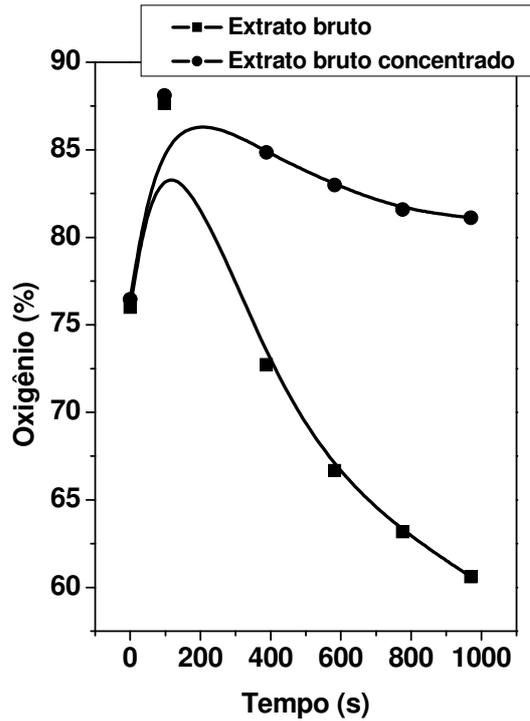


Figura 4. Efeito da concentração do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento com areia sobre o consumo de oxigênio.

Tabela 10. Velocidade de consumo de oxigênio do extrato bruto e extrato enzimático concentrado (16x) oriundos de rompimento com areia.

Amostra	Volume	Velocidade de consumo de O ₂ (% / s)	Queda de O ₂ (100%: 0,2mm O ₂)
Extrato bruto	50 µL	0,009	0,165 mm O ₂
Extrato bruto concentrado	50 µL	0,029	0,133 mm O ₂
Extrato purificado* (precipitado)	1mL	0,023	0,166 mm O ₂
Extrato purificado* (sobrenadante)	1mL	0,022	0,178 mm O ₂

*Extrato purificado: extrato enzimático bruto em que se procedeu ao fracionamento salino com sulfato de amônio 0-60% e centrifugação.

II. Purificação de GPO

Após as etapas preliminares, a preparação enzimática, de modo geral, é ainda relativamente impura. Comumente, o extrato é submetido a tratamentos que separam as proteínas em diferentes frações baseadas em uma de suas propriedades tais como tamanho ou carga. Etapas iniciais desta separação em uma purificação se baseiam em diferenças na solubilidade das proteínas, função complexa decorrente de pH, temperatura, concentração salina e outros fatores (WHITAKER, 1972; NELSON e COX, 2006).

De acordo com dados da literatura, a precipitação pode ser promovida por (GERHARTZ, 1990):

- Sais: Altas concentrações de sais atuam sobre as moléculas de água (água de hidratação) ao redor da proteína, removendo-as e alterando a força eletrostática responsável pela solubilidade, que é, então diminuída (*salting out*). A adição de um sal, na quantidade correta, pode seletivamente precipitar algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. O fracionamento salino de enzimas ocorre, a uma faixa limitada, pelo uso de diferentes concentrações de sais, em que baixas concentrações precipitam algumas proteínas não desejadas, que são descartadas, e a adição e altas concentrações precipitam a proteína desejada. Ex.: sulfato de amônio.

- Solventes orgânicos: Influenciam na solubilidade de enzimas pela redução da constante dielétrica do meio, alternado o efeito de solvatação das moléculas de água ao redor da enzima (água de hidratação); aumentando a interação entre as moléculas protéicas; e, por conseguinte, promovendo a aglomeração e precipitação das mesmas. Resultados satisfatórios são obtidos apenas se a concentração de solvente e a temperatura for cuidadosamente controlada, pois enzimas podem ser facilmente inativadas neste processo. Ex.: acetona.

- Polímeros: Apresentam mecanismo de atuação similar ao dos solventes orgânicos resultante de alteração no efeito de solvatação das moléculas de água ao redor das proteínas (água de hidratação). A maioria das enzimas é precipitada em concentrações de polímeros entre 15 – 20 %. Ex.: polietilenoglicol de diferentes massas moleculares.

_____Resultados e Discussões

▪ Ponto isoelétrico: Proteínas apresentam como característica o caráter anfótero, carregando em sua estrutura grupamentos ácidos e básicos. Neste caso, a solubilidade da proteína é fortemente influenciada pelo pH e é mínima no ponto isoelétrico em que sua carga é zero.

No entanto, apenas a purificação não é um procedimento suficiente para a retirada de todo e qualquer interferente existente no extrato. Por exemplo, através da diálise, pode-se separar as proteínas dos solventes, através do beneficiamento do tamanho maior das proteínas. Neste caso, o extrato parcialmente purificado é colocado em um saco que apresenta uma membrana semipermeável, que ao ser suspensa em volume de água muito maior de solução tampão de força iônica apropriada, permite troca (difusão) de solutos de baixo peso molecular e tampão, mas não das proteínas (retidas no interior do saco), permitindo que a concentração destes solutos na preparação da proteína se altere até que se atinja o equilíbrio com a solução fora da membrana (NELSON e COX, 2006).

Encontram-se disponíveis em literatura, dados referentes às condições de extração, características e métodos de purificação de glicerol-3-fosfato oxidase oriunda de diferentes microorganismos. Nestes artigos, a purificação desta enzima foi principalmente realizada através de fracionamento salino com sulfato de amônio. Por exemplo, a enzima procedente de *Streptococcus faeciu* foi purificada 2 vezes após concentração com sulfato de amônio até saturação de 45% em que apresentou aumento de atividade específica de 1,2 unidades/mg de proteína total (CLAIBORNE, 1986). Já, Streitenberger et al. (2001), ao pesquisarem glicerol-3-fosfato oxidase de *Aerococcus viridans*, conseguiram recuperação de 73% da atividade da enzima e fator de purificação de 7 vezes, após concentração da amostra de extrato bruto pela adição de sulfato de amônio na faixa de 35-75%. No entanto, precipitações realizadas por Ince et al. (1987) em glicerol-3-fosfato oxidase de *Propionibacteriu freudenreichii* resultaram em grande perda de atividade e não purificação da enzima quando do fracionamento com sulfato de amônio; pequeno aumento de atividade específica (1,5 vezes) com o uso de etanol e purificação de 1,4 vezes com o emprego de PEG 8000.

Tentativas de purificação de glicerol-3-fosfato oxidase, a partir de extrato celular bruto de levedura de panificação (fermento seco), foram realizadas primeiramente com precipitação com sulfato de amônio, sobre os dois tipos de

-----*Resultados e Discussões*

extratos brutos: obtido por rompimento celular utilizando areia e utilizando esferas de vidro. Resultados obtidos em ambos os tratamentos demonstraram dificuldade de separação da fração enzimática no extrato através de fracionamento salino promovido por sulfato de amônio. Além disso, a o-dianisidina demonstrou ser um reagente não muito eficiente para dosagem de GPO, uma vez que valores de

emprego de 4-AAP e fenol. A análise dos dados permitiu evidenciar atividade relativa de 21,2 % quando do emprego de diálise e precipitação do extrato com igual volume de solução 30% de PEG 3.350.

Tabela 11. Efeito da precipitação do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro com diversos volumes de acetona, seguido de diálise, sobre a atividade da GPO.

Etapa*	Volume (mL)	Atividade** (U)	Proteína (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Ativ. relativa
Extrato bruto	34,0	0,476	923,44	0,0005	1,0
Sulfato de Estreptomicina	30,0	0,480	831,00	0,0006	1,2
Precipitado Acetona 1 volume dialisado	1,8	0,140	54,56	0,0026	5,2
Precipitado Acetona 2 volumes dialisado	1,7	0,112	50,30	0,0022	4,4
Precipitado Acetona 3 volumes dialisado	2,3	0,099	60,79	0,0016	3,2

* Após rompimento celular com esferas de vidro e precipitação com sulfato de estreptomicina, o sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas de igual volume, sendo, cada uma delas, submetida à precipitação com determinado volume de acetona, sendo, em seguida, dialisada.

** A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

Tabela 12. Efeito da precipitação do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro soluções de polietilenoglicol, seguido de diálise, sobre a atividade da GPO.

Etapa*	Volume (mL)	Atividade** (U)	Proteína (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Ativ. Relativa
Extrato Bruto	42,0	0,168	627,48	0,00027	1,0
Sulfato de estreptomicina	40,0	0,160	885,60	0,00018	0,6
Precipitado PEG 3350 dialisado	1,8	0,151	29,09	0,00519	19,2
Precipitado PEG 6000 dialisado	1,6	0,101	25,02	0,00404	15,0
Precipitado PEG 10000 dialisado	1,8	0,112	31,61	0,00354	13,1
Precipitado PEG 20000 dialisado	2,7	0,127	43,28	0,00293	10,9

* Após rompimento celular com esferas de vidro e precipitação com sulfato de estreptomicina, o sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas de igual volume, sendo, cada uma delas, submetida a um tratamento de precipitação com igual volume de solução 30% (p/v) com PEG de diferentes massas moleculares e, depois, dialisada.

** A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

Tabela 13. Precipitações enzimáticas do extrato enzimático bruto oriundo de rompimento por esferas de vidro com diferentes reagentes, seguidas de diálise, sobre a atividade da GPO.

Etapa*	Volume (mL)	Atividade** (U)	Proteína (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Ativ. Relativa
Extrato bruto	34,0	0,476	923,44	0,0005	1,0
Sulfato de Estreptomicina	30,0	0,480	831,00	0,0006	1,2
Precipitado Acetona 1 volume dialisado	1,8	0,166	54,56	0,0030	6,0
Precipitado Sol. 30% (p/v) PEG 3350 dialisado	2,2	0,425	40,24	0,0106	21,2
Precipitado Sulfato de amônio 35-70% dialisado	2,6	0,250	56,03	0,0045	9,0

* Após rompimento celular com esferas de vidro e precipitação com sulfato de estreptomicina, o sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas de igual volume, sendo, em seguida, cada uma delas, submetida a um tratamento (sulfato de amônio 35-70%, acetona 1 volume ou PEG 3350) e depois dialisada.

** A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

1. Outras técnicas de concentração da enzima no extrato celular

1.1. Métodos de concentração por ultrafiltração

A ultrafiltração é uma metodologia em que se permite a separação, por pressão osmótica, de moléculas do solvente das grandes moléculas de enzimas por meio de membrana semipermeável (GERHARTZ, 1990). Neste ensaio, submeteram-se frações dos extratos celulares obtidos por rompimento com esferas de vidro ou com areia, à centrifugação (7000 rpm ou 3971 x g por 40 minutos) em um sistema Kwik Spin™ 100.000MWCO; realizando após este procedimento, a dosagem enzimática da atividade de GPO utilizando o-dianisidina (λ : 460nm, 2h) nas porções de sobrenadantes filtrados ou não filtrados (retidos pela membrana). Os resultados são apresentados na **Tabela 14** e evidenciam a não concentração enzimática pelo emprego desta técnica nas condições estudadas.

Tabela 14. Efeito da filtração do extrato enzimático de levedura obtido por rompimento celular sobre a atividade da GPO.

Frações	Rompimento com Esferas		Rompimento com Areia	
	Volume (mL)	Atividade* (U)	Volume (mL)	Atividade* (U)
Sobrenadante (NH ₄) ₂ SO ₄ 35-60%	1,0	0,023	1,0	0,022
Sobrenadante não filtrado (retido pela membrana)	0,5	0,012	0,5	0,007
Sobrenadante filtrado	0,5	0,008	0,5	0,009

* A atividade de GPO nos extratos foi quantificada pelo emprego de o-dianisidina.

1.2. Métodos de concentração por liofilização

A liofilização (*freeze drying*, em inglês) é um processo de secagem, por sublimação da água congelada de um material, realizado em temperatura baixa e sob pressão reduzida; usualmente usado com técnica suporte para a estabilização de proteínas, uma vez que com o índice de água extremamente reduzido promove-se a inibição da ação dos microorganismos e de enzimas (KULA, 1987; MACKOVÁ et al., 2000). Neste ensaio, após a obtenção do extrato celular por rompimento com esferas de vidro, submeteu-se tal extrato ao congelamento e, em seguida, a liofilização. Depois de liofilizado, suspendeu-se o material em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2, e realizou-se a reação para dosagem da atividade de GPO com 4-AAP e fenol, para fins de quantificação de atividade residual. Na **Tabela 15** têm-se os resultados da atividade da GPO e proteína presentes no extrato bruto, evidenciando ser a liofilização uma técnica não eficaz neste extrato enzimático, nas condições estudadas.

Tabela 15. Efeito da liofilização sobre a atividade enzimática de glicerol-3-fosfato oxidase oriunda de extrato enzimático obtido por rompimento com esferas de vidro.

Amostra	Diluição (vezes)	Volume (mL)	Atividade* (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)
Liofilizada	10	3,0	0,234	221,97	0,0011
Não liofilizada	10	9,0	0,612	264,60	0,0023

*A atividade de GPO foi quantificada pelo emprego de 4-AAP e fenol.

III. Caracterização de GPO: estudos sobre o ensaio de glicerol-3-fosfato oxidase de fermento de panificação

Estudos das condições do ensaio de dosagem de glicerol-3-fosfato oxidase foram realizados com o intuito de otimizar tal dosagem enzimática e foram baseados em adaptações de técnica colorimétrica descrita por Šůcková et al. (1992). Deste modo, as condições de ensaio iniciais foram: glicerol-3-fosfato 113 mM em tampão Tris-HCl pH 8,0 0,125M contendo 0,125% Triton X-100; 4-aminoantipirina 0,0113%; fenol 0,0226%; peroxidase e extrato enzimático contendo glicerol-3-fosfato oxidase. A reação foi realizada em banho-maria a 37°C pelo período de 2 horas, sendo interrompida por solução 0,9% SDS e com dosagem espectrofotométrica a 500nm.

1. Efeito da adição de metais na atividade de GPO

Segundo Mildvan (1974) e Banham e Pethica (1960), cátions divalentes podem aumentar a atividade de algumas enzimas presumivelmente através de interação com o substrato e a enzimas, além de estabilizar membranas de lipídios, minimizando a repulsão de grupos polares da cabeça de fosfolipídios.

Assim, estudos preliminares sobre adição de metais no ensaio e na etapa de diálise do extrato enzimático contendo glicerol-3-fosfato oxidase foram realizados e seus resultados estão expostos nas **Tabelas 16** e **17**, respectivamente. A ocorrência de formação de precipitados com a adição dos metais, na concentração ensaiada, durante a dosagem enzimática (GPO) indicam que estudos mais aprofundados desta natureza precisam ser realizados. No entanto, tal efeito já não foi visualizado pela adição dos metais que obtiveram os melhores resultados de atividade de GPO no ensaio, à solução tampão utilizada durante a diálise. Neste último estudo, o sulfato de manganês demonstrou melhor atividade de GPO, mediante dosagem com o-dianisidina.

Tabela 16. Efeito da adição de diferentes metais no ensaio de atividade de GPO oriunda de extrato enzimático de levedura obtido por rompimento com esferas de vidro (precipitação: sulfato de amônio 35-70%).

Metais (10mM)	Atividade (U/mL) *
Manganês (sulfato)	0,002
Cobalto (cloreto)	0,006
Magnésio (sulfato)	0,000
Cálcio (cloreto)	0,000

*Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 37°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e centrifugada por 5 min a 12000 rpm (11671 x g), para proceder-se leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

Tabela 17. Efeito de diferentes soluções de diálise contendo metais na atividade de GPO oriunda de extrato de levedura obtido por rompimento com esferas de vidro (precipitação: sulfato de amônio 35-70%).

Metais (10mM)	Atividade (U/mL)
Sem metais	0,000
Manganês (sulfato)	0,012
Cobalto (cloreto)	0,002

Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 37°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e procedeu-se leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

2. Temperatura de reação

As velocidades das reações enzimáticas aumentam com a elevação da temperatura até velocidade máxima. Com a elevação acentuada da temperatura ocorre a desnaturação protéica da enzima e conseqüente perda na atividade. Kiranas et al. (1998) mostraram que 30°C é o valor ótimo de temperatura para o ensaio de glicerol-3-fosfato oxidase, obtida de *Aerococcus viridans*, em análises que utilizam sistema automatizado de análise. Os autores mostram influências negativas de valores de temperaturas muito altas ou baixas.

A **Figura 5** mostra ótimo de temperatura de 60°C para o ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase de fermento de panificação.

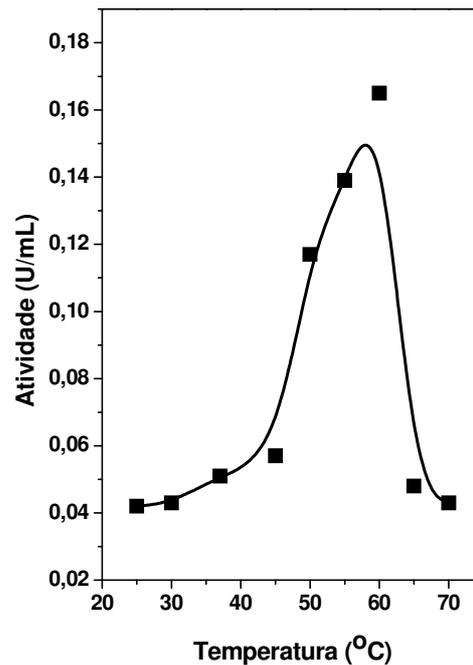


Figura 5. Atividade de glicerol-3-fosfato oxidase obtida por rompimento com esferas de vidro em função da temperatura no ensaio. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a diferentes temperaturas (acima descritas) /pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à centrifugação por 5 min a 12000 rpm (11671 x *g*). Leitura espectrofotométrica foi feita a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

3. Concentração de substrato

O substrato utilizado para a reação de medida de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase foi o glicerol-3-fosfato. A **Figura 6** mostra os resultados da variação da atividade da GPO em função da concentração do glicerol-3-fosfato. Pela análise dos dados obtidos, conclui-se que a melhor concentração de glicerol-3-fosfato na reação GPO é 0,45M.

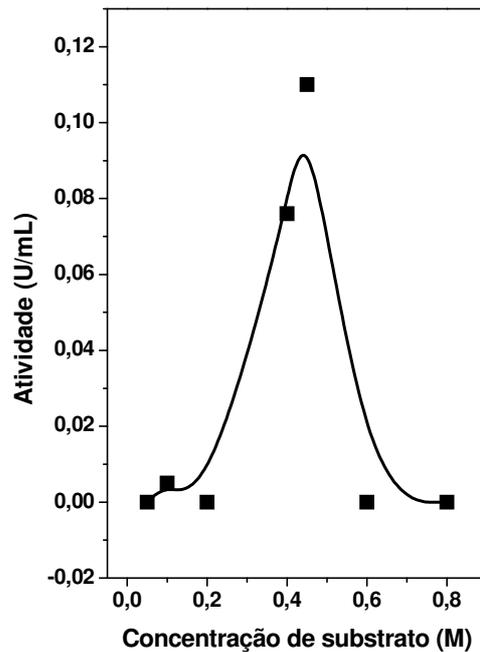


Figura 6. Efeito da concentração de solução de substrato (glicerol-3-fosfato) utilizada para ensaio de GPO obtida por rompimento com esferas de vidro. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à centrifugação por 5 min a 12000 rpm (11671 x *g*). Leitura espectrofotométrica foi feita a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

4. Diluição de extrato

Leituras de atividade enzimática em extratos celulares parcialmente purificado sofrem ação de inibidores e/ou interferentes presentes neste extrato. Portanto, determinações de atividades enzimáticas devem ser realizadas em extratos suficientemente diluídos, que possibilitam a leitura da atividade. Pela análise dos dados obtidos, a melhor diluição do extrato enzimático de levedura obtida por rompimento com esferas de vidro para o ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase é 0,015 mL (**Figura 8**), diluído 10 vezes (**Figura 7**).

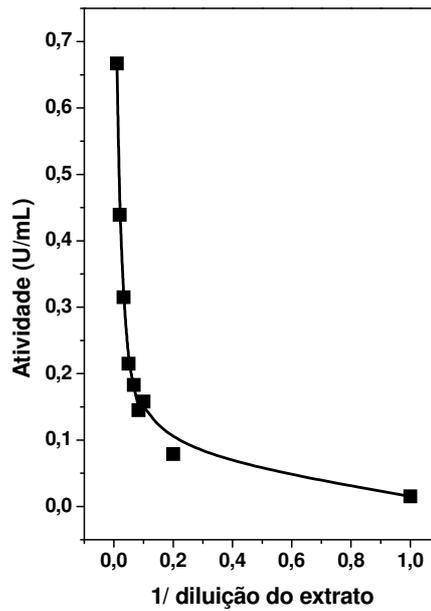


Figura 7. Efeito da diluição de extrato enzimático de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro) para ensaio de GPO. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à centrifugação por 5 min a 12000 rpm (11671 x *g*). Leitura espectrofotométrica foi feita a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

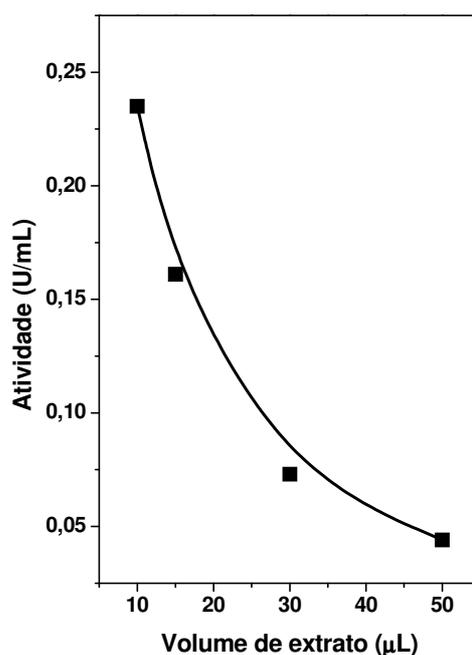


Figura 8. Efeito do volume de extrato enzimático de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro) no ensaio de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à centrifugação por 5 min a 12000 rpm (11671 x *g*). Leitura espectrofotométrica foi feita a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

5. Valor do pH de reação

A maioria dos estudos da literatura indica o ótimo do valor de pH para os ensaios de atividade desta enzima na faixa próxima ao neutro, sendo variáveis os valores conforme a fonte de enzima e soluções tampão utilizada no ensaio. Ince et al. (1997) encontraram o valor de 7,5 como ótimo de pH, quando utilizaram solução tampão ácido dimetilglutárico ou fosfato de sódio, porém, os mesmos autores obtiveram ótimo 7,0 de pH no ensaio contendo tampão Tris-HCl. O valor de pH ótimo 7,5 foi obtido por Macková et al. (2000) em estudos sobre propriedades e estabilidade de glicerol-3-fosfato oxidase de *Aerococcus viridans*.

Os resultados deste trabalho mostram valor ótimo de pH no ensaio de 8,0, conforme **Figura 9** e concentração de 0,1 M conforme **Tabela 18**.

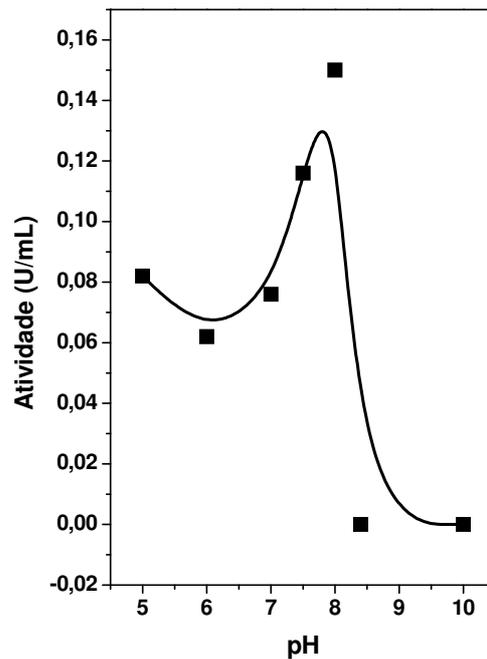


Figura 9. Efeito do pH na atividade de GPO de fermento de panificação seco (rompimento com esferas de vidro). Soluções tampão: acetato 0,1M (pH 5,0), fosfato 0,1M (pH 6,0-7,0), Tris-HCl 0,1M (pH 8,0-9,0), carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 10,0). Todas as soluções continham 0,1% de Triton X-100. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH a determinar pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

Tabela 18. Comparação de diferentes concentrações de tampão Tris-HCl quando aplicados no ensaio de dosagem enzimática de GPO (rompimento com esferas de vidro).

Tampão Tris-HCl	Atividade (U/mL)
0,1M com 0,1% de Triton X-100	0,150
“Controle”: 0,125M com 0,125% de Triton X-100	0,136

Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

7. Concentração e volume de fenol

Tendo como referência o texto descrito por Šůchová et al. (1992), realizou-se neste ensaio a verificação do efeito da concentração e o emprego de diferentes volumes de fenol para a obtenção de melhor resultado para detecção de glicerol-3-fosfato oxidase contido em extrato de levedura de panificação. Analisando a **Figura 11**, verificou-se que o emprego de solução menos concentrada, em volume de 0,35 mL, proporcionou os melhores resultados de atividade de GPO.

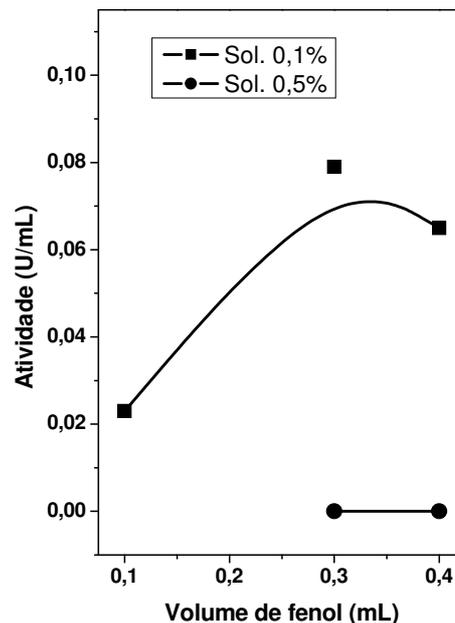


Figura 11. Concentração e volume de fenol. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

8. Concentração e volume de 4-AAP

Segundo a literatura, o peróxido de hidrogênio é um dos produtos formados na reação de óxido-redução catalisada pela glicerol-3-fosfato oxidase. A redução deste peróxido pelo emprego de um agente redutor ou cromogênico apropriado produz um composto colorido que pode ser determinado espectrofotometricamente, como, por exemplo, na oxidação do fenol pela peroxidase em presença de 4-aminoantipirina (VOJINÓVIC et al, 2004).

Neste ensaio, verificou-se ser a solução 0,1% a melhor concentração e 0,15 mL o volume de 4-AAP (4-aminoantipirina) necessários para a obtenção de melhor atividade de glicerol-3-fosfato oxidase (**Figura 12**).

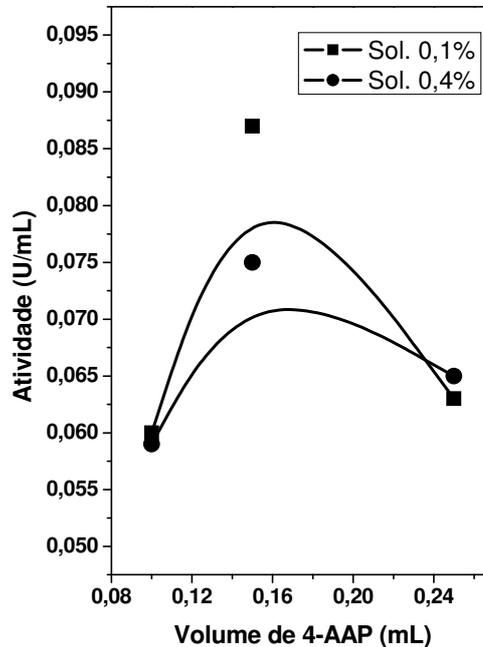


Figura 12. Concentração e volume de 4-AAP. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 0,9% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

9. Interrupção da reação

Alguns procedimentos são clássicos como forma de interromper uma reação enzimática, mas sem dúvida a fervura do conteúdo da reação é bastante empregada. Šúchová et al. (1992) utilizaram 2 ml de solução 0,25% de SDS para interromper a reação de determinação de atividade de glicerol-3-fosfato oxidase de *Aerococcus viridans*. O volume total do ensaio descrito pelos autores foi de 3,02 ml.

Experimentos adicionando 0,9%, 2%, 4% e 10% de SDS no ensaio foram realizados com o propósito de interromper a ação da enzima na reação. A **Figura 13** mostra resultados comparativos da atividade da GPO após adição das diferentes quantidades de SDS no instante zero e após 10 minutos. Ensaio comparativos entre a ação do SDS e a ação da alta temperatura (fervura) foram realizados no

tempo zero e após 10 minutos. A **Tabela 19** mostra os resultados das atividades da GPO após os dois diferentes tratamentos. Pela análise dos dados obtidos, o melhor resultado do ensaio foi obtido pelo emprego do SDS 10%, alcançando variação de 3,6% após 10 minutos, mesmo quando comparado ao emprego de fervura.

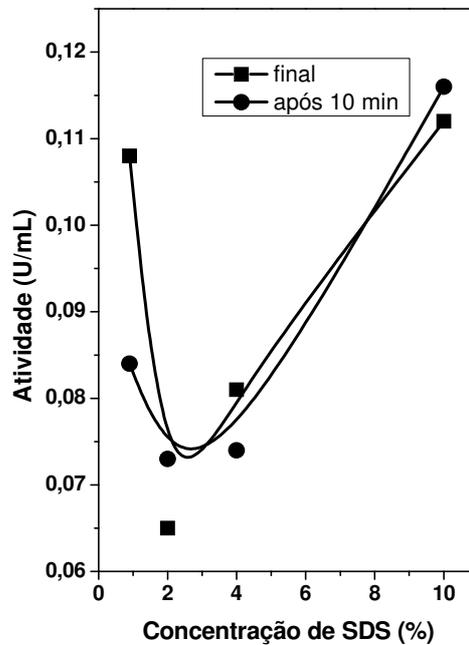


Figura 13. Porcentagens de soluções de SDS adicionadas para interromper a ação da GPO obtida por rompimento em esferas no ensaio de atividade. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução SDS (concentração a determinar) e submetida à leitura espectrofotométrica a 500 nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

Tabela 19. Comparação do emprego de SDS e fervura para interrupção de reação de GPO de extrato enzimático obtido por rompimento com esferas de vidro.

Técnica	Tempo final*	Após 10min.*
	Atividade (U/mL) **	Atividade (U/mL) **
SDS 10%	0,112	0,116
Fervura	0,016	0,029

*Tempo final: Tempo final de reação de dosagem de atividade enzimática em que após 2 horas de incubação adicionou-se SDS para interrupção da mesma. A verificação da estabilidade foi feita com nova leitura após 10 minutos.

**Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS ou fervura e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

10. Volume de peroxidase no ensaio

A enzima glicerol-3-fosfato oxidase é responsável por catalisar reações de óxido-redução de substrato fosforilado na presença de oxigênio, que resulta na formação da espécie H_2O_2 . Peroxidases são enzimas capazes de decompor a espécie H_2O_2 . Algumas metodologias de dosagem utilizam sistemas cromógenos que resulta em um produto colorido de absorção em comprimento de onda no visível (FOSSATI et al., 1992). Este conjunto de reações tem interesse na determinação de substratos químicos, com potenciais aplicações nas áreas médicas, farmacêuticas e de alimentos. Na padronização do volume de extrato enzimático, contendo peroxidase obtida de rabanete, diferentes quantidades de uma mesma preparação foram adicionadas no ensaio de determinação da atividade de glicerol-3-fosfato oxidase. A adição de 60 μ L de amostra resultou em maior quantidade de redutores. Maiores volumes de extrato enzimático no ensaio, não significaram aumento da quantidade de grupos redutores. A **Tabela 20** mostra os resultados da atividade da glicerol-3-fosfato oxidase (lidos como redutores) em função do volume de extrato enzimático na reação por 120 min a 60 °C.

Tabela 20 Efeito do volume de peroxidase de extrato de rabanete no ensaio de medida de atividade da glicerol-3-fosfato oxidase de extrato de fermento de panificação obtida por rompimento com esferas de vidro

Volume (μL)	Atividade (U/mL)
15	0,144
30	0,180
60	0,212
90	0,198
115	0,201

Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

IV. Dosagens nas condições otimizadas

O ensaio de determinação de atividade da GPO de extrato celular purificado e obtido a partir de fermento de panificação (massa salgada) realizado, para um volume final de 1,63 mL, foi otimizado para as seguintes condições:

Concentração de glicerol-fosfato no ensaio: 250mM

Valor do pH: 8,0

Valor da temperatura: 60°C

Concentração do tampão: tampão Tris-HCl 0,1M com 0,1% de Triton X-100

Tempo de reação: 2 horas ou 120 minutos

Volume e diluição do extrato enzimático de levedura: 15 µL, diluição 10 vezes

Concentração de fenol no ensaio: 0,0226%

Concentração de 4-aminoantipirina (4-AAP) no ensaio: 0,0113%

Atividade de peroxidase (extrato bruto de rabanete): cerca de 0,40 unidade.

A reação foi interrompida pela adição de 300µL de solução SDS 10% e a leitura espectrofotométrica realizada a 500 nm.

Mediante tais condições, novos ensaios foram realizados a fim de verificar a melhor diluição deste extrato enzimático de levedura e a melhor concentração de glicerol-3-fosfato necessárias para a obtenção de uma máxima atividade de GPO.

A **Figura 14** mostra os resultados de variação de absorbância em função da diluição do extrato. Extrato enzimático de levedura (rompimento com esferas de vidro) diluído 10 vezes mostrou-se melhor para o ensaio.

Os valores de atividade da GPO em função da concentração do substrato estão representados na **Figura 15**. A melhor concentração de glicerol-3-fosfato no ensaio foi 250mM, equivalente à utilização de uma solução de glicerol-3-fosfato 0,45M.

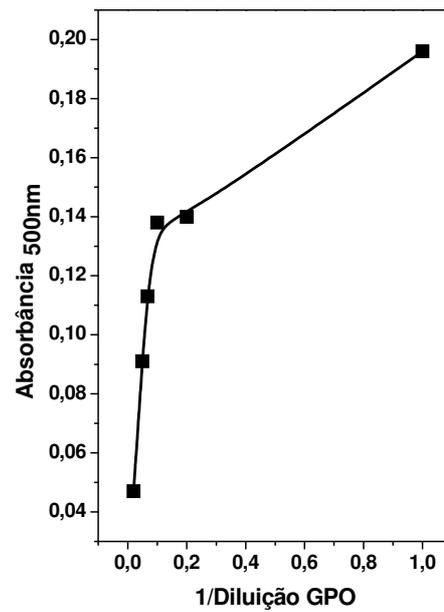


Figura 14. Curva Analítica para dosagem de absorbância de GPO obtida por rompimento com esferas. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

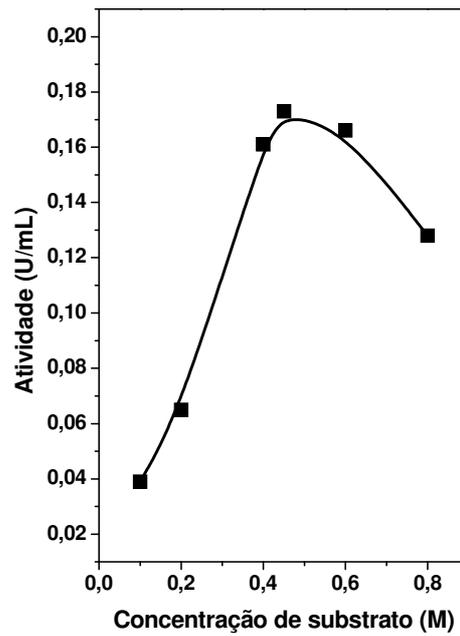


Figura 15. Curva Analítica para dosagem de concentração de solução de substrato glicerol-3-fosfato. Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

V. Estudos sobre a estabilização enzimática

Extratos enzimáticos foram submetidos à elevação da temperatura (variando de 0 – 80°C) por 60 minutos. Os resultados de atividade da GPO em função da temperatura estão representados na **Tabela 21**. A enzima apresentou alta resistência térmica, ficando o ótimo ao redor de 60 °C, a partir da qual, o aumento de temperatura provocou pequenas quedas na atividade da GPO.

Tabela 21. Estabilidade térmica de GPO*.

Temperatura (°C)	Atividade** (U/mL)
0	0,222
30	0,244
50	0,257
60	0,262
70	0,260
80	0,238

*Extrato enzimático contendo GPO obtido por rompimento com esferas e dividido em porções de igual volume submetidas a banho de gelo (0°C) ou banho-maria (30-80°C) pelo período de 1 hora, após o qual se procedeu a reação para determinação da dosagem de atividade de GPO.

**Condições de ensaio: Reação realizada em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

As análises das tabelas permitiram concluir que, à temperatura de 60°C, a estabilidade da enzima GPO presente no extrato enzimático foi maior. Os resultados indicam a ocorrência de pequena ativação enzimática da GPO pela temperatura, fato este que nos levou a realizar uma curva de tempo (Inicial, 30, 60, 90 e 120 minutos) de estabilidade térmica da enzima em questão. Utilizou-se a mesma metodologia realizada acima para determinação da estabilidade térmica, à 60°C. A **Figura 16** mostra a variação da atividade da GPO em função do tempo de permanência a 60°C.

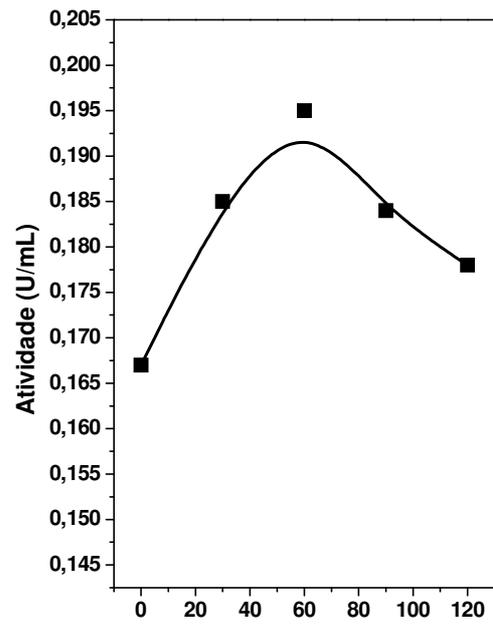


Tabela 22. Estabilidade ao pH.

Tempo (dias)	Atividade da GPO (U/mL)						
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0
	Acetato 0,1M	Fosfato 0,1M	Fosfato 0,1M	Tris-HCl 0,1M	Tris-HCl 0,1M	Carb.-bicarb. 0,1M	Carb.-bicarb. 0,1M
Zero	0,259	0,244	0,275	0,297	0,274	0,253	0,271
1	0,256	0,250	0,255	0,295	0,274	0,230	0,150
3	0,240	0,240	0,241	0,280	0,268	0,170	0,070
7	0,232	0,175	0,232	0,273	0,241	0,120	0,000
14	0,200	0,129	0,234	0,248	-	0,046	0,000

Condições de ensaio: Extrato enzimático contendo GPO obtido por rompimento com esferas de vidro e dividido em porções de igual volume submetidas a diferentes pH, determinados com o tipo de tampão utilizado, mantidos a 40°C por até 14 dias, em que se realizou, em determinados intervalos de tempo, reação para determinação da dosagem de atividade de GPO em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

Alguns estabilizantes de atividade enzimática são citados na literatura. A azida de sódio adicionada sobre o extrato enzimático atua na preservação de atividade de diversas enzimas, segundo Leskovac, 1998.

Estudos prévios utilizando azida de sódio 0,05%, sacarose 5%, trealose 1%, dextrina 5%, glicerol 50%, EDTA 0,1M; cloreto de cobalto 6,7mM e caseína hidrolisada 1% foram realizados a 30°C, frente a um controle (extrato enzimático sem presença de estabilizantes), pelo período de 14 dias (dados não mostrados). Os estabilizantes que obtiveram melhores resultados (azida de sódio 0,05%, sacarose 5% e sulfato de cobalto na concentração de 6,7 mM) foram novamente ensaiados sobre extratos enzimáticos contendo GPO e mantidos na temperatura de 40°C (\pm 0,3°C, B.O. D.) por até 21 dias, a fim de permitir a melhor visualização dos efeitos promovidos pelos estabilizantes. A **Tabela 23** mostra os resultados da atividade da GPO em função do tempo de estocagem na presença dos diversos estabilizantes. Pelos resultados da tabela, a azida de sódio na concentração de 0,05% foi a que manteve melhor a atividade da enzima nas condições de estocagem.

Tabela 23. Estabilidade da GPO do extrato enzimático em função do tempo de estocagem e mantida na presença de diversos estabilizantes.

Estabilizantes	Atividade da GPO (U/mL)			
	Controle	Azida 0,05%	Cobalto 6,7 mM	Sacarose 5%
Inicial	0,242 (100%)	0,261 (100%)	0,261 (100%)	0,260 (100%)
1 dia	0,247	0,261	0,262	0,250
3 dias	0,242	0,268	0,257	0,248
7 dias	0,239	0,269	0,255	0,243
14 dias	0,223	0,261	0,233	0,218
21 dias	0,192 (79,21%)	0,257 (98,44%)	0,219 (83,85%)	0,193 (74,34%)

Condições de ensaio: Extrato enzimático contendo GPO obtido por rompimento com esferas de vidro e dividido em porções de igual volume submetidas a diferentes agentes estabilizantes, mantidos a 40°C por até 21 dias, em que se realizou, em determinados intervalos de tempo, reação para determinação da dosagem de atividade de GPO em banho-maria a 60°C/pH 8,0 pelo período de 2 horas, após o qual foi interrompida por solução 10% SDS e submetida à leitura espectrofotométrica a 500nm devido à dosagem de atividade de GPO no extrato enzimático ter sido feita mediante sistema 4-AAP e fenol.

_____ *Conclusões*

- A melhor condição de rompimento das células de leveduras foi a trituração com esferas de vidro de 425-600 micras em meio contendo solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 6,2 contendo 2 mM β - mercaptoetanol.
- O consumo de oxigênio, determinado através de leituras em oxígrafo, foi aumentado em cerca de 30% quando o extrato bruto contendo GPO foi concentrado em 16 vezes.
- A purificação de glicerol-3-fosfato oxidase foi mais eficiente utilizando a seguinte seqüência de operações: centrifugação do extrato bruto por 10 minutos a 6000 rpm (2917 x g); precipitação do sobrenadante com sulfato de estreptomicina 1%; centrifugação por 20 minutos a 12000 rpm (11671 x g); precipitação do sobrenadante com igual volume de solução 30% (p/v) PEG 3350; repouso por aproximadamente 12 horas em geladeira e centrifugação a 12000 rpm (11671 x g) por 20 minutos. A ressuspensão do precipitado com solução tampão Tris- HCl 0,01M pH 7,2 foi dialisada em solução tampão citrato de sódio 0,2mM contendo 2 mM β - mercaptoetanol por 24 horas na presença de sulfato de manganês 10 mM . A fração resultante foi centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm (8105 x g) e o sobrenadante utilizado como extrato bruto parcialmente purificado.
- O extrato celular bruto ficou 21,2 vezes mais concentrado em GPO após ser submetida à metodologia de precipitação (PEG 3350), seguida de diálise.
- O ensaio de dosagem da GPO ficou assim padronizado neste trabalho: concentração de glicerol-fosfato no ensaio: 250 mM; Valor do pH: 8,0; Tampão: solução tampão Tris-HCl 0,1M com 0,1% de Triton X-100; 0,0113% 4-aminoantipirina; 0,226% fenol; cerca de 0,40 unidade de peroxidase; volume e diluição do extrato enzimático: 15 μ L, diluição 10 vezes; água destilada para volume final de 1,33 mL; valor da temperatura: 60°C; Tempo de reação: 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de solução SDS 10% e a leitura espectrofotométrica realizada a 500 nm.
- A enzima GPO apresentou alta resistência térmica, ficando o seu ótimo ao redor de 60 °C.
- A estabilidade da enzima realizada em diferentes valores do pH na reação mostrou faixa de ótimo situado entre os valores 7,0 – 8,0.
- A enzima GPO manteve melhor a atividade, nas condições de estocagem, na presença de azida de sódio na concentração de 0,05%.

_____ *Bibliografia e sites*

1. AFAR, H.; DEMIRATA, B. Indirect spectrophotometric determination of hydrogen peroxide. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v.347, n.10-11, p. 460-461, 1993.
2. ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M. Efeito do cloreto de cálcio na qualidade de abacaxi pérola minimamente processado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, n. 9, p. 1105-1110, 2003.
3. AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C.; PRAZERES, D. M. F.; VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. **Biotechnol. Annu. Rev.**, v.9, p.199-247, 2003.
4. BANHAM, A. D.; PETHICA, B. A. **Proc. Roy. Soc. Edinburgh A** 28, p.43-52, 1960 apud ESDERS, T. W.; MICHIRINA, C. A. Purification and Properties of L- α -glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faeciu* ATCC 12755. **J. Biol. Chem.**, p. 2710-2715, 1979.
5. BRENDA - Enzyme Database. Disponível em: <<http://www.brenda.uni-koeln.de/>>. Acesso em 21 jan. 2007.
6. BRITO, N. N.; PATERNIANI, J. E. S.; ZAMORA, P. P.; OLIVEIRA NETO, A. L.; BATTISTI, A.; PELEGRINI, R. T. **Regeneração de enzimas oxidorreduzases em processos contínuos**. In: VI FÓRUM DE ESTUDO CONTÁBEIS, 2004. 7p.
7. CHILAKA, F. C.; EZE, S.; ANYADIEGWU, C.; UVERE, P. O. Browning in processed yams: peroxidase or polyphenol oxidase? **J. Sci. Food Agric.**, v. 82, p. 899-903, 2002.
8. CLAIBORNE, A. Studies on the structure and mechanism of *Streptococcus faeciu* L- α -glycerophosphate oxidase. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.31, p.14398-14407, 1986.
9. DAWSON R. M. C.; ELLIOT, D. C.; JONES, K. M. **Data for biochemical research**. 2. ed. Oxford: Oxford, 1969.
10. DEVAUX- BASSÉGUY, R.; GROS, P.; BERGEL, A. Eletroenzymatic process: a clean technology alternative for highly selective synthesis? **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 68, p. 389-396, 1997.
11. DEUTSSCHER, M. P. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**. New York: Academic, 1990. v. 182, p.162-164.
12. DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme classification. In: **Enzymes**. 3rd.ed. New York: Academic Press, 1979. Cap. 4, p. 201-220.

13. EMI, S., KOJIMA, Y.; ANDO, M. (1984). Process for producing alpha-glycerophosphate oxidase. U.S.Pat. 4463095. Toyo Boseki Kabushiki Kaisha (Osaka, JP). Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4463095.html>>. Acesso em 21 jan. 2007.
14. ESDERS, T. W.; MICHIRINA, C. A. Purification and Properties of L- α -glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faeciu* ATCC 12755. **J. Biol. Chem.**, p. 2710-2715, 1979.
15. ESKIN, N. A. M. Biotechnology: Enzymes in food industry. In: **Biochemistry of foods**. 2nd.ed. San Diego: Academic, 1990. p. 506-507.
16. FOSSATI, P.; PONTI, M.; PARIS, P.; BERTI, G.; TARENGHI, G. Kinetic colorimetric assay of lipase in serum. **Clin. Chem.**, v.38, n.2, p. 211-215, 1992.
17. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 10, p.2077-2080, 1982.
18. GANCEDO, C.; GANCEDO, J .M.; SOLS, A. Glycerol metabolism in yeasts. **European J. Biochem.**, v.5, p.165-172, 1986.
19. GERHARTZ, W. (ed.) General production methods. In: **Enzymes in industry: production and applications**. Weinheim (Alemanha): VCH, 1990.Cap.3, p. 43-53.
20. HUANG, H-S.; YOSHIDA, T.; MENG, Y.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and characterization of thermostable glycerol kinase from *Ther us flavus*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.83, n.4, p.382-332,1997.
21. INCE, J. E.; MACADAM, A. M.; KNOWLES, C. L-glycerol phosphate oxidase from *Propionbacteriu freudenreichii*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.44, p. 185-191, 1987.
22. IUBMB. **Enzyme nomenclature**: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. San Diego (EUA): Academic Press, 1992. 863p.
23. JACOBS, N. J.; VANDEMARK, P.J. Comparison of the mechanism of glycerol oxidation in aerobically and anaerobically grown *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol.**, v.79, n.4., p. 532-538, 1960.
24. KATRLÍK, J.; MASTIHUBA, V.; VOŠTIAR, I.; ŠEFČOVIČOVÁ, J.; ŠTEFUCA, V.; GEMEINER, P. Amperometric biosensors based on two different enzyme systems

and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process. **Anal. Chim. Acta**, v.566, p.11-18, 2006.

25. KENTEN, R. H.; MANN, P. J. G. A simple method for the preparation of horseradish peroxidase. **Biochem. J.**, v.57, p.347-348, 1954.

26. KIRANAS, E. R.; KARAYANNIS, M. I.; TZOUWARA-KARAYANNI, S. M. Enzymatic methods for the determination of α -glycerophosphate and α -glycerophosphate oxidase with an automated FIA system. **Talanta**, v. 45, p. 1015-1021, 1998.

27. KISHIMOTO, T.; MATSUOKA, T.; IMAMURA, S.; MIZUNO, K. A novel colorimetric assay for the determination of lysophosphatidic acid in plasma using an enzymatic cycling method. **Clin. Chim. Acta**, v.333, p. 59-67, 2003.

28. KODITSCHKEK, L. K.; UMBREIT, W. W. α -Glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F24. **J. Bacteriol.**, v.98, n.3, p.1063-1068, 1969.

29. KRÄMER, L.; STECKHAN, E. Coimmobilization of L- α -glycerophosphate oxidase with catalase and its application for the synthesis of dihydroxyacetone phosphate. **Tetrahedron**, v. 53, n. 43, p. 14645-14650, 1997.

30. KULA, M. R. Enzymes. In: PRÄVE, P.; FAUST, U.; SITTIG, W.; SUKATSCH, D. A. (ed.). **Fundamentals of biotechnology**. Weinheim (Alemanha): VCH, 1978. Cap. 12. p.473-513.

31. LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: COLOWICH, S.P.; KAPLAN, N. C. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1957. v. 3, p. 447-454.

32. LASCU, I.; LEBLAY, K.; LACOMBE, M. -L.; PRESECAN, E.; VÉRON, M. Assay of nucleoside diphosphate kinase in microtiter plates using a peroxidase-coupled method. **Anal. Biochem.**, v. 209, p. 6-8, 1993.

33. LESKOVAC, V.; TRIVIC, S.; ANDERSON, B. M. Use of competitive dead-end inhibitors to determine the chemical mechanism of action of yeast alcohol dehydrogenase. **Mol. Cell. Biochem.**, v.178, p.219-227, 1998.

34. LIN, S-F.; CHIOU, C-M; TSAI, Y-C. Purification and characterization of a glycerol oxidase from *Penicillium* sp. TS-622. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 383-387, 1996.

35. MACKOVÁ, M.; KOŠTÁL, J.; DEMNEROVÁ, K. Properties and stability of glycerophosphate oxidase isolated from a mutant strain of *Aerococcus viridans*. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 30, p. 188-191, 2000.
36. MCGOWAN, M. W.; ARTISS, J. D.; STRANDBERGH, D. R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clin. Chem.**, v. 29, n. 3, p. 538-542, 1983.
37. MELLO, L. D.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. **Food Chem.**, v. 92, p. 515-519, 2005.
38. MELLO, L. D.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. HRP- based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. **Sensors and Actuators B**, v. 96, p. 636-645, 2003.
39. MERCHIE, B.; GIRARD, A.; MAISTERRENA, B.; MICHALON, P.; CONTURIER, R. Reliable Amperometric determination of glycerol and glycerol-3-phosphate with a bienzymatic nylon membrane electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 263, p. 85-91, 1992.
40. MILDVAN, A. S. In: SNELL, E. E. et al. (ed). **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto (EUA), 1974. v.43, p.357-399 apud ESDERS, T. W.; MICHIRINA, C. A. Purification and Properties of L- α -glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faeciu* ATCC 12755. **J. Biol. Chem.**, p. 2710-2715, 1979.
41. MURPHY, L.J.; GALLEY, P.T. Measurement in Vitro of Human Plasma Glycerol with a Hydrogen Peroxide Detecting Microdialysis Enzyme Electrode. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 4345-4353, 1994.
42. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
43. NEVES, V. A.; LOURENÇO, E.J. Extração e atividade da peroxidase e polifenoloxidase de batata-doce (*Ipo oea batatas* Lam.) **Rev. Ciênc. Farm.**, v.7, p.101-107, 1985.
44. NGUYEN, H. T. T.; DIETERICH, A.; ATHENSTAEDT, K.; TRUONG, N. H.; STAHL, Y.; NEVOIGT, E. Engineering of

46. PARSONAGE, D.; LUBA, J.; MALLETT, T.C.; CLAIBORNE, A. The Soluble α -Glycerophosphate oxidase from *Enterococcus casseliflavus*: sequence homology with the membrane-associated dehydrogenase and kinetic analysis of the recombinant enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n.37, p.23812-23822, 1998.
47. PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C.S.; KRIEG, N. R. Biotecnologia: a aplicação industrial da microbiologia. In: __. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2.ed., 1997. v.1, cap. 31, p.398-422.
48. PRICE, N. C. Techniques for enzyme extraction. In: PRICE, R.; DANSON, M. J. (ed.). **Enzyme Assays: a practical approach**. Oxford: Oxford, 1998. Cap. 9, p.255-275.
49. ROCHE APPLIED SCIENCE. L- α -glycerol phosphate oxidase, microorganism, rec. p. 65-67, 2003/2004.
50. SAKHAROV, I. Y.; VESGA, M. K.; GALAEV, I. Y.; SAKHAROVA, I. V.; PLETJUSHKINA, O. Y. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. **Plant. Sci.**, v. 161, p. 853-860, 2001.
51. SAKUYAMA, H.; ENDO, Y.; FUJIMOTO, K.; HATANO, Y. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. **J. Biosoc. Sci.**, v.96, n.3, p.227-231, 2003.
52. SANT'ANNA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 14, p. 351-353.
53. SARIRI, R.; JAFARIAN, V.; SAJEDI, R. H.; KHAJED, K. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. **J. Mol. Liq.**, v. 128, p.175-177, 2006.
54. SCHOEVAART, R.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A. A four-step cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 6940-6943, 2000.
55. SILVA, E.; LOURENCO, E. J.; NEVES, V. A. Soluble and Bound peroxidases from papaya fruit. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1051-1056, 1990.
56. SOYSAL, Ç.; SÖYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **J. Food Eng.**, v. 68, p. 349-356, 2005.

57. SPENCER-MARTINS, I.; SÁ-NOGUEIRA, I. Biotecnologia microbiana. In: LIMA, N.; MOTA, N. (coord.). **Biotecnologia: fundamentos e aplicações**. Lisboa: Lidel, 2003. Cap. IX. p.249-265.
58. STREITENBERGER, S. A.; LÓPEZ-MAS, J. A.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Highly efficient *Aerococcus viridans* L- α -glycerophosphate oxidase production in the presence of H₂O₂-decomposin agent: purification and Kinetic characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p. 329-333, 2001.
59. STRITTMATTER, C. F. Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei*. **J. Biol. Chem.**, v.234, n.10, p.2794-2800, 1959.
60. ŠŮCKOVÁ, M.; DEMNEROVÁ, K. B.; KRÁLOVÁ, B. Production of L- α -glycerophosphate oxidase by lactic acid bacteria. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 917-922, 1992.
61. SULLIVAN, D.R.; KRUIJSWIJK, Z.; WEST, C. E.; KOHLMEIER, M.; KATAN, M.B. Determination of serum triglycerides by an accurate enzymatic method not affected by free glycerol. **Clin. Chem.**, v.31, n.7, p.1227-1228, 1985.
62. TININIS, C.R.C.S. **Ensaio enzimático para dosagem do glicerol**. 2001. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de Ciência Farmacêuticas-UNESP. Araraquara.
63. THONG, Z; QINQXIANG, Z.; HUI, H.; QIN, L.; YI, Z. Kinetic study of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. **Chemosphere**, v. 37, n. 8, p. 1571-1577, 1998.
64. TOMÁS-BARBERÁN, F.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.**, v. 81, p. 853-876, 2001.
65. TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.1, cap. 5, p. 151-176.
66. VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus co unis*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.21, p.321-325, 2001.
67. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Cr. Rev. Food Sci.**, p. 49-127, 1981.

68. VELDHOVEN, P. P.; SWINNEN, J. V.; ESQUENET, M.; VERHOEVEN, G. Lipase-based quantitation of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography. **Lipids**, v.32, n.12, p.1297-1300, 1997.
69. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. Cap. 11, p.283-287.
70. VOJINOVIĆ, V.; AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C. B.; CABRAL, J. M. S.; GIBSON, T. D.; FONSECA, L.P. Assay of H₂O₂ by HRP catalysed of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterization and optimization. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 28, p.129-135, 2004.
71. WEBER, F. H.; ELIAS, M. C.; GUTKOSKI, L. C. Estabilização de farinha de aveia da cultivar UPF 18 por tratamento hidrotérmico a vapor. **R. Bras. Agrocienc.**, v. 8,n. 3, p. 253-258, 2002.
72. WHITAKER. Enzyme Purification. In: __. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Dekker, 1972. Cap.3, p.65-129.
73. WIMMER, M. C.; ARTISS, J. D.; ZAK, B. A kinetic colorimetric procedure for quantifying magnesium in serum. **Clin. Chem.**, v.32, n.4, p.629-632, 1986.
74. ZHONG, K.; HU, X.; ZHAO, G.; CHEN, F.; LIAO, X. Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field. **Food Chem.**, v. 92, p. 473-479, 2005.

Apêndice

Preparo das soluções

O preparo das soluções utilizadas ao longo desta dissertação está descrito, em ordem alfabética, a seguir.

- 4-aminoantipirina 0,1%: Pesou-se 0,0100 g de 4-aminoantipirina (Sigma), dissolveu-se em 5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 10 mL.
- Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico sódico 0,1%: Pesou-se 0,0100g de DHBS (Sigma), dissolveu-se em 5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 10 mL.
- Azida de sódio 0,05%: Pesou-se 0,005 g de NaN_3 (Mallinckrodt OR) e dissolveu-se em 1 mL de extrato de levedura contendo glicerol-3-fosfato oxidase obtido por rompimento com esferas de vidro.
- Cálcio 10 mM: Pesou-se 0,020 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth), dissolveu-se em 0,5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 1 mL.
- Carbonato de sódio 2%: Pesou-se 1,000 g de Na_2CO_3 anidro (Synth), dissolveu-se em 10 mL de solução hidróxido de sódio 0,1M e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 50 mL.
- Cloreto de cobalto 6,7 mM: Pesou-se 0,0184 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), e dissolveu-se em 1 mL de extrato de levedura contendo glicerol-3-fosfato oxidase obtido por rompimento com esferas de vidro.
- Cobalto 10 mM: Pesou-se 0,0320g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), dissolveu-se em 0,5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 1 mL.
- Fenol 0,1%: Pesou-se 0,010 g de fenol (Synth), dissolveu-se em 5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 10 mL. Armazenou-se em frasco escuro, vedando a boca com filme plástico a fim de evitar a evaporação do álcool e a oxidação do reagente.
- Glicerol-3-fosfato 60mM: Pesou-se 1,2960 g de glicerol 3-fosfato (Sigma), dissolveu-se em 80 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 100 mL.

- Glicerol 3-fosfato 0,45 M em solução tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,1% Triton X-100: Pesou-se 2,4300 g de glicerol 3-fosfato (Sigma), dissolveu-se em 20 mL de tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,1% Triton X-100 e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 25 mL.
- Guaiacol 72,4 mM: Pipetou-se 0,081 mL de guaiacol (Fluka), dissolveu-se em 5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 10 mL. Armazenou-se em frasco escuro, vedando a boca com filme plástico a fim de evitar a evaporação e a oxidação do reagente.
- Hidróxido de sódio 0,1 M: Pesou-se 0,200g de NaOH P.A. (CIRQ), dissolveu-se em 10 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 50 mL.
- Magnésio 10 mM: Pesou-se 0,0330 g de MgSO₄. 7H₂O (Synth), dissolveu-se em 0,5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 1 mL.
- Manganês 10mM: Pesou-se 0,0225 g de MnSO₄.H₂O (Mallinckrodt), dissolveu-se em 0,5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 1 mL.
- O-dianisidina 7,2 mM: Pesou-se 0,0176 g de O-dianisidina (Vetec) e solubilizou-se, com auxílio de agitador magnético, em 8 mL de etanol (Mallinckrodt). Transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com etanol. Armazenou-se em frasco escuro, vedando a boca com filme plástico a fim de evitar a evaporação do álcool e a oxidação do reagente.
- O-dianisidina 15 mM: Pesou-se 0,0183 g de O-dianisidina (Vetec) e solubilizou-se, com auxílio de agitador magnético, em 4 mL de etanol (Mallinckrodt). Transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com etanol. Armazenou-se em frasco escuro, vedando a boca com filme plástico a fim de evitar a evaporação do álcool e a oxidação do reagente.
- O-tolidina 0,76 mM: Pesou-se 0,0016 g de o-tolidina pura (Nuclear), e solubilizou-se, com auxílio de agitador magnético, em 4 mL de etanol (Mallinckrodt). Transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com etanol. Armazenou-se em frasco escuro, vedando a boca com filme plástico a fim de evitar a evaporação do álcool e a oxidação do reagente.

- Peróxido de hidrogênio 30 mM: Pipetou-se 9,189 μ L de peróxido de hidrogênio (30%, Synth) para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água destilada.
- Sacarose 5%: Pesou-se 0,050 g de sacarose (Reagen) e dissolveu-se em 1 mL de extrato de levedura contendo glicerol-3-fosfato oxidase obtido por rompimento com esferas de vidro.
- Sódio dodecil sulfato 10%: Pesou-se 1,0000 g de SDS (Sigma), dissolveu-se em 5 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 10 mL.
- Solução estoque de ácido cítrico 0,1 M (Conforme descrito por Tininis, 2001): Pesou-se 4,8033 g de ácido cítrico anidro (Synth), dissolveu-se em 120 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 250 mL.
- Solução estoque padrão (proteína): Albumina de soro bovino 0,06%: Pesou-se 0,0150g de BSA (Inlab), dissolveu-se em 10 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 25 mL. Frações desta solução foram armazenadas em congelador (porções de 1,0mL).
- Solução tampão acetato 0,1M pH 5,0: Pesou-se 0,6804 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 15 mL de água destilada, ajustou-se o pH 5,0 com solução de ácido acético (Synth) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 50 mL.
- Solução tampão acetato 0,1M pH 5,0 contendo 0,1% de Triton X-100: Pesou-se 1,3600 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 80mL de água destilada e ajustou-se o pH 5,0 com solução de ácido acético (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, adiu-se 0,1 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën) e completou-se o volume com água destilada.
- Solução tampão acetato 0,1M pH 6,0: Pesou-se 1,3600 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH 6,0 com solução de ácido acético (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada.
- Solução tampão acetato 0,1 M pH 6,0 contendo 1% Triton X-100: Pesou-se 1,3600 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH 6,0 com solução de ácido acético (Synth). Transferiu-se

para balão volumétrico de 100 mL, adiu-se 1 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën) e completou-se o volume com água destilada.

- Solução tampão acetato 0,1M pH 6,5: Pesou-se 1,3600 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH 6,0 com solução de ácido acético (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

- Solução tampão acetato 0,1 M pH 6,5 contendo 0,1% Triton X-100: Pesou-se 1,3600 g de acetato de sódio (Synth), adicionou-se cerca de 80mL de água destilada e ajustou-se o pH 6,0 com solução de ácido acético (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, adiu-se 0,1 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën) e completou-se o volume com água destilada.

- Solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,5 -10,0): Pesou-se 1,0600 g de carbonato de sódio (Synth) e 0,168 g de bicarbonato de sódio (Reagen), preparando-se 25 mL e 5 mL de solução ácida (0,2 M) e básica (0,2 M), respectivamente, em balões volumétricos. Através de misturas, em devidas proporções, das duas soluções obtivemos o pH desejado (pH 9,5 ou 10,0) e completando-se o volume para 25 mL em balão volumétrico, chegou-se à concentração desejada.

- Solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M contendo 0,1% de Triton X-100 (pH 10,0): Pesou-se 1,0599 g de carbonato de sódio anidro (Synth) e 0,4201 g de bicarbonato de sódio (Reagen), preparando-se 50 mL e 25 mL de solução ácida (0,2 M) e básica (0,2 M), respectivamente, em balões volumétricos. Através de misturas, em devidas proporções, das duas soluções obtivemos o pH desejado (pH 10,0). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se 0,1 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën). Completou-se o volume com água destilada chegando-se à concentração desejada.

- Solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 5,5 contendo sulfato de manganês 10 mM e β -mercaptoetanol 2 mM: Pipetou-se 4 mL da solução estoque de ácido cítrico 0,1 M, em cerca de 1800 mL de água destilada. Acertou-se o pH para 5,5 com NaOH (Synth) 0,1 M e adicionaram-se 3,3802 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt) e 280 μL de β -mercaptoetanol (Riedel-deHaën) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 2 L.

▪ Solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 6,2 contendo β - mercaptoetanol 2 mM (Conforme descrito por Tininis, 2001): Pipetou-se 2 mL da solução estoque de ácido cítrico 0,1 M em cerca de 80 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para 6,2, (Medidor de pH Marconi PA 200) com NaOH (Synth) 0,1 M, adicionou-se 14 μ L de β -mercaptoetanol (Riedel-deHaën) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 100 mL.

▪ Solução tampão citrato 2 mM pH 6,2 contendo cloreto de cobalto 10mM e β -mercaptoetanol 2 mM: Pipetou-se 4 mL da solução estoque de ácido cítrico 0,1 M, em cerca de 1800 mL de água destilada. Acertou-se o pH para 6,2 com NaOH (Synth) 0,1 M e adicionaram-se 5,478 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma) e 280 μ L de β -mercaptoetanol (Riedel-deHaën) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 2 L.

▪ Solução tampão citrato de sódio 2 mM pH 6,2 contendo sulfato de manganês 10mM e β -mercaptoetanol 2 mM: Pipetou-se 4 mL da solução estoque de ácido cítrico 0,1 M, em cerca de 1800 mL de água destilada. Acertou-se o pH para 6,2 com NaOH (Synth) 0,1 M e adicionaram-se 3,3802 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt) e 280 μ L de β -mercaptoetanol (Riedel-deHaën) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 2 L.

▪ Solução tampão citrato-fosfato 0,08 M pH 5,5: Pesou-se 1,9210 g de ácido cítrico anidro (Synth) e 7,1700 g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Synth), preparando-se 100 mL de solução ácida (0,1 M) e básica (0,2 M), respectivamente, em balões volumétricos. Através de misturas, em devidas proporções, das duas soluções obtivemos o pH desejado (pH 5,5) e completando-se o volume para 100 mL em balão volumétrico, chegou-se à concentração desejada.

▪ Solução tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0-7,0): Pesou-se 0,695 g de fosfato de sódio monobásico hidratado (Reagen) e 1,7925 g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Synth), preparando-se 25 mL de solução ácida (0,2 M) e básica (0,2 M), respectivamente, em balões volumétricos. Através de misturas, em devidas proporções, das duas soluções obtivemos o pH desejado (pH 6,0 ou 7,0) e completando-se o volume para 25 mL em balão volumétrico, chegou-se à concentração desejada.

- Solução tampão fosfato 0,1 M contendo 0,1% de Triton X-100 (pH 6,0-7,0): Pesou-se 1,3799 g de fosfato de sódio monobásico hidratado (Reagen) e 0,71628 g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Synth), preparando-se 50 mL e 10 mL de solução ácida (0,2 M) e básica (0,2 M), respectivamente, em balões volumétricos. Através de misturas, em devidas proporções, das duas soluções obtivemos o pH desejado (pH 6,0 ou 7,0). Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se 0,05 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën). Completou-se o volume com água destilada chegando-se à concentração desejada.
- Solução tampão Tris-HCl 10mM pH 7,2: Pesou-se 0,1211 g de Tris (hidroximetilaminometano, Inlab) em cerca de 80 mL de água destilada. Ajustou-se o pH com HCl 6 M (Synth) e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 100 mL.
- Solução tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0-9,0): Pesou-se 0,3029 g de Tris (hidroxiaminometano, Inlab), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 8,0 ou 9,0 com solução de ácido clorídrico (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução tampão Tris-HCl 0,1 M contendo 0,1% de Triton X-100 (pH 7,5-8,4): Pesou-se 1,2114 g de Tris (Hidroxiaminometano, Inlab), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 7,5, 8,0 ou 8,4 com solução de ácido clorídrico (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, adiu-se 0,100 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën) e completou-se o volume com água destilada.
- Solução tampão “controle” Tris-HCl 0,125 M contendo 0,125% de Triton X-100 (pH 8,0): Pesou-se 1,5143 g de Tris (Hidroxiaminometano, Inlab), adicionou-se cerca de 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 8,0 com solução de ácido clorídrico (Synth). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, adiu-se 0,125 mL de Triton X-100 (Riedel-deHaën) e completou-se o volume com água destilada.
- Sulfato de cobre 0,5%: Pesou-se 0,025g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (CIRQ), dissolveu-se em 10 mL de solução tartarato de sódio e potássio 1% e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 50 mL.
- Tartarato de sódio e potássio 1%: Pesou-se 0,050g de tartarato de sódio e potássio (Merck), dissolveu-se em 10 mL de água destilada e completou-se o volume, em balão volumétrico, para 50 mL.

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](#)