



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JONNATHAN AMARAL DE FREITAS

***PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES
DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E SUA
APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE FENÓIS***

FORTALEZA

2011

JONNATHAN AMARAL DE FREITAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [Vigna unguiculata (L.) Walp.] E SUA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE FENÓIS

Trabalho Final de Curso submetido à coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará com requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de
Oliveira

FORTALEZA

2011

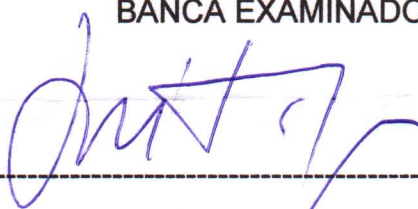
JONNATHAN AMARAL DE FREITAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAIZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E SUA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE FENÓIS

Trabalho Final de Curso submetido à coordenação do curso de engenharia química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química

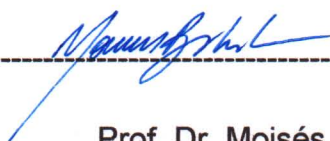
Aprovada em 15 / 12 / 11

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Moisés Bastos Neto

Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. (a). Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves

Universidade Federal do Ceará - UFC

“A vida é para quem topa qualquer
parada. Não para quem pára em
qualquer topada.”

(Bob Marley)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e me dar forças a cada dia e me impulsionar sempre a vencer meus desafios.

Ao meu orientador Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por abrir as portas de seu laboratório me proporcionando o gosto pela pesquisa científica, e ensinamentos valiosos de honestidade e responsabilidade.

Aos meus queridos e amados pais, que sempre fizeram de tudo para me proporcionar a melhor a educação possível e pelo seu apoio incondicional nos momentos mais difíceis de minha vida. Ao meu irmão Bruno, por quem tenho uma grande afeição pelo enorme coração que tem.

Ao amor de minha vida Paloma Pereira, pelo apoio, carinho, conselhos e me proporcionar alguns dos momentos mais felizes de minha vida.

Ao meu querido e amado filho Guilherme de Freitas, por quem me apaixonei no primeiro momento em que o vi. Você foi minha grande motivação de cada dia para a finalização deste trabalho.

Aos meus colegas de Laboratório Ana Lidia, Ana Luiza, Pedro Filho (Ash), Rodolpho, Vladimir, Darcy, Lyanderson, Handerson (Pota Black), Alexandra, Hélio pelos momentos de descontração e apoio no meu trabalho. E aos meus grandes colegas e amigos David e Fred que motivados assim como eu prestaram grande ajuda de forma direta neste trabalho.

Aos meus colegas de faculdade e engenheiros Rafael, Grace, Carol, Patricia, Gabriela (Preta e Branca), Priscila e Vinicius pelas horas proveitosas de estudo, mas também pelos grandes momentos de descontração.

Resumo

Peroxidasas vegetais são enzimas que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos, além de desempenhar importantes funções fisiológicas, como a remoção de H_2O_2 , a biossíntese e degradação de lignina presente na parede celular de plantas, e na proteção contra diversos fitopatógenos. Essas enzimas têm especificidade ampla pelo substrato, o que as torna potencialmente úteis na área industrial, biomédica e analítica. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de purificar e caracterizar uma peroxidase (VuPOx) de feijão de corda (*Vigna unguiculata*). Sementes de feijão de corda foram germinadas e cultivadas e as folhas primárias inoculadas com esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Após inoculação, as raízes foram maceradas por 30 minutos na presença do tampão de extração. O extrato obtido, após centrifugação, foi fracionado com sulfato de amônio na faixa de 0-90% de saturação. O precipitado foi ressuspenso no tampão e aplicado em coluna de quitina. A atividade enzimática peroxidásica concentrou-se no pico não retido (PNRQ). Em seguida, o PNRQ foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (GE Healthcare), equilibrada com tampão acetato-Na 0,05 M, pH 5,2, quando se obteve a enzima purificada (VuPox). A VuPox mostrou um ponto isoelétrico de 3,5. Sua atividade enzimática foi avaliada em diferentes pHs (2-10), sendo que a melhor atividade foi observada em torno do pH 6. Perda total de atividade foi observada em pH 9. Com relação à sua estabilidade térmica, a enzima reteve 100% de atividade quando aquecida a 75 °C por uma hora. Quanto à temperatura ótima de catálise, a enzima foi capaz de atuar numa ampla faixa de temperaturas (30 – 90 °C). A enzima purificada apresentou grande afinidade pelos substratos peróxido de hidrogênio e guaiacol, com valores de K_m de 120 μ M e 33,44 mM, respectivamente. Também, foi avaliado o seu potencial antifúngico, sendo observada atividade inibitória de germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, mas não de *Fusarium Solani*, indicando seletividade em relação à espécie testada.

Palavras-Chave: Peroxidase, Feijão de Corda, pH, Temperatura, Fungos, Eletroforese.

ABSTRACT

Plant peroxidases are enzymes that catalyze the oxidation of a variety of substrates, and play important physiological functions, such as the removal of H₂O₂, the biosynthesis and degradation of lignin present in plant cell walls, and protection against various pathogens. These enzymes have broad substrate specificity which makes them potentially useful for industries, biomedicine and analytical processes. This work was developed in order to purify and characterize a peroxidase (VuPOx) of cowpea (*Vigna unguiculata*). Cowpea seeds were germinated and grown and the primary leaves inoculated with spores of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. After inoculation, the roots were macerated for 30 minutes in the presence of the extraction buffer. The extract obtained after centrifugation was fractionated with ammonium sulfate in the range of 0-90% saturation. The pellet was resuspended in the extracting buffer and applied on a chitin column. The enzyme activity was concentrated in the non-retained peak (PNRQ). Then the PNRQ was submitted to ion exchange chromatography on Resource Q column, equilibrated with 0.05 M-Na acetate buffer, pH 5.2, through which the enzyme (VuPox) was purified to homogeneity. The VuPox showed a pI of 3.5. The enzymatic activity conducted at different pHs (2-10), demonstrated that the highest activity was at around pH 6, but at pH 9 the enzyme lost completely its activity. Thermal stability assay, showed that the enzyme preserve its full activity when treated at 75 °C for one hour. The optimum temperature for catalysis was within a range from 30 - 90 °C. The purified enzyme showed a great affinity for hydrogen peroxide and for guaiacol as substrates, with Km values of 120 mM and 33,44 mM, respectively. Evaluation of antifungal potential, of VuPox showed that it inhibited the spore germination of the phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*, but not of *Fusarium solani*, showing species selectivity.

Keywords: Peroxidase, pH, temperature, fungi, Electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Quantidade de artigos científicos publicados por ano relacionados com peroxidase na revista Science. Fonte: TORRES & AYALA, 2010.....pag. 5
- Figura 2.2:** Compostos fenólicos encontrados em efluentes industriais (TORRES & AYALA, 2010).....pag. 6
- Figura 2.3:** Mecanismo de atuação de Heme peroxidases com substratos fenólicos. Formação de produto precipitado (4,4-Bifenoquinona) (TORRES & AYALA, 2010)...pag. 7
- Figura 2.4:** Diagrama de fita das estruturas de algumas heme peroxidases. (a) peroxidase de leveduras CCP; (b) Lignina peroxidase (LiP); (c) peroxidase do rabanete (HRP) (TORRES & AYALA, 2010).....pag. 8
- Figura 2.5:** Mecanismo enzimático das Heme-peroxidases (GIANANTONIO *et al.*, 2010).....pag.09
- Figura 3.1:** Protocolo de purificação estabelecido para a obtenção da VuPox.....pag. 15
- Figura 4.1.** Dosagem de proteínas totais solúveis de raízes de feijão-de-corda do extrato e fração 0-90%. As proteínas das raízes foram extraídas com tampão acetato-Na 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M, ácido ascórbico 0.03 M, EDTA 0.003 M e polivinilpirrolidona 1%.....pag. 20
- Figura 4.2:** Perfil cromatográfico e atividade peroxidásica de uma cromatografia típica em coluna de quitina da fração 0-90. Foram aplicados 10,6 mgP. A atividade concentrou-se no pico não retido PNRQ.....pag. 21
- Figura 4.3:** Cromatografia de troca iônica (FPLC) da PNRQ e atividade peroxidásica dos picos eluidos. Foram aplicados 6,9 mg de proteínas solubilizadas em tampão acetato de sódio pH 5,2 50 mM. O pico retido foi eluido com concentrações crescentes de NaCl.....pag.23
- Figura 4.4:** Eletroforese nativa na ausência (A) e presença (B) de SDS e β -mercaptoetanol dos picos oriundos da cromatografia em coluna Resource Q. Quantidade de proteína aplicada por poço: 2 ug. Revelação do gel com prata.....pag.23
- Figura 4.5:** Zimmograma específico para identificação de peroxidases. Quantidade de proteína aplicada por poço: 2 ug.pag. 24

- Figura 4.6.** Eletroforese bidimensional desnaturante (2D-SDS-PAGE) da *VuPox*. 15 µg de proteína foram eletrofocalizadas (IEF) em tiras de gel de poliacrilamida de 13 cm, pH 3-10 linear. Coloração feita por CBB coloidal.....pag. 25
- Figura 4.7:** Efeito do pH na atividade peroxidásica de *VuPox*. A atividade enzimática foi mensurada nas condições padrões, após incubação da enzima em diferentes pHs.....pag. 26
- Figura 4.8:** Temperatura ótima da *VuPox*. Os dados foram gerados com a enzima incubada com seus substratos na temperatura assinalada.....pag. 27
- Figura 4.9:** Efeito da temperatura variando de 75 e 85 °C na estabilidade da *VuPox*. A atividade enzimática foi mensurada nas condições padrões de ensaio, após tratamento térmico no intervalo de 0-90 minutos.....pag. 28
- Figura 4.10.** Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk construído a partir de concentrações variadas do substrato guaiacol e concentração constante de H₂O₂. As condições do ensaio estão especificadas na metodologia.....pag. 30
- Figura 4.11.** Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk construído a partir de concentrações variadas do substrato peróxido de hidrogênio e concentração constante de guaiacol. As condições do ensaio estão especificadas na metodologia.....pag. 31
- Figura 4.12.** Ensaio de inibição de germinação de esporos frente aos fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum*. Foram utilizados 4,4 µg de *VuPox* purificada.....pag. 33
- Figura 4.13.** Ensaio de inibição de germinação de esporos frente ao fungo fitopatogênico *F. Solani*. Foram aplicados 2 µg de *VuPox* purificada.....pag. 34
- Figura 4.14.** Ensaio de oxidação do guaiacol em diferentes tempos pela ação da *VuPox*.....pag. 35

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Peroxidases	3
2.1.1 Aspectos Importantes.....	3
2.2 Algumas aplicações de peroxidases	6
2.2.1 Remoção de contaminantes fenólicos.....	6
2.3 Estrutura química e propriedades	8
2.4 Peroxidases e meio ambiente	10
2.5 Feijão-de-Corda	10
2.6 Fungos fitopatogênicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Materiais	12
3.1.1 Sementes.....	12
3.1.2 Fungos para ensaios de inibição enzimática.....	12
3.1.3 Reagentes.....	12
3.2 Métodos	13
3.2.1 Tratamento de sementes.....	13
3.2.2 Germinação das sementes.....	13
3.2.3 Preparação do extrato protéico.....	13
3.2.4 Purificação da peroxidase <i>VuPox</i>	14
3.2.5 Dosagem de proteínas.....	15

3.2.6	Determinação da atividade peroxidásica.....	16
3.2.7	Grau de pureza e determinação das propriedades físico-química da proteína 1purificada.....	16
3.2.8	Constante cinética dos substratos.....	16
3.2.9	Ótimo de pH.....	17
3.2.10	Ótimo de temperatura do ensaio.....	17
3.2.11	Estabilidade térmica.....	17
3.2.12	Preparação da suspensão de esporos dos fungos.....	17
3.2.13	Ensaio de atividade antifúngica da peroxidase purificada.....	18
3.2.14	Oxidação do Guaiacol utilizando a <i>VuPox</i>	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1	Purificação da <i>VuPox</i>.....	20
4.1.1	Extração e precipitação de proteínas.....	20
4.1.2	Cromatografia em coluna de quitina.....	21
4.1.3	Cromatografia de troca iônica.....	22
4.1.4	Eletroforese bidimensional.....	25
4.2	Determinação dos parâmetros de ótimo da <i>VuPox</i>.....	26
4.2.1	Ótimo de pH.....	26
4.2.2	Ótimo de temperatura.....	27
4.2.3	Estabilidade térmica.....	28
4.3	Parâmetros cinéticos.....	30
4.3.1	Km e V _{máx} para o substrato guaiacol.....	30
4.3.2	Km e V _{máx} para o substrato peróxido de hidrogênio.....	31
4.4	Atividade antifúngica.....	33
4.5	Remoção do Guaiacol utilizando a <i>VuPox</i>.....	35
5.	CONCLUSÕES.....	37
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A importância da preservação do meio ambiente vem sendo amplamente difundida ao longo das últimas décadas. Nesse contexto, muitas indústrias têm buscado meios de tornar os seus processos industriais menos impactantes e associados ao desenvolvimento sustentável que visa à preservação de importantes fatores ambientais como a biodiversidade, água, ar e solo (OECD, 2009). Estes fatores sustentam a ideia da substituição de processos químicos por processos de biotransformação e biocatálise (KURTS & ELBA, 2006). Essas biotecnologias já vem sendo empregadas nas indústrias por levar a produtos de melhor qualidade e propiciar menor consumo de energia, além de fortalecer a ideia de preservação do meio ambiente (OECD, 2001). Em decorrência dos benefícios econômicos, aliados ao benefício ambiental que estas tecnologias oferecem, há uma crescente demanda para a pesquisa, aperfeiçoamento e elaboração de novos processos utilizando biocatalisadores enzimáticos, permitindo o desenvolvimento mais acelerado e competitividade internacional de um país. Estes catalisadores biológicos estão presentes em muitos processos aplicados em várias áreas como na medicina, na indústria alimentícia, têxtil, de papel, química e muitas outras (KURTS, 2006).

Entre as várias enzimas que são utilizadas na indústria destacam-se as peroxidases como promissor potencial biotecnológico. Além de desempenhar funções importantes na defesa da planta e por ter sido por muitos anos alvo de estudo e pesquisa, não demoraria muito para se descobrir mais atribuições para esta classe de enzimas.

Na indústria, com a descoberta da via enzimática para a produção de químicos e derivados, logo se utilizou peroxidases na síntese de compostos orgânicos e polímeros (OGUCHI *et al.*, 1999). Na indústria têxtil, no tratamento de corantes e descolorização de pigmentos de jeans (DE SOUZA *et al.*, 2007). Algumas novas aplicações destas enzimas sugerem ação no processo de remoção de contaminantes fenólicos de águas industriais e remoção de peróxido de alimentos (AGOSTINI *et al.*, 2002).

Métodos utilizando tratamentos enzimáticos vêm sendo amplamente desenvolvidos e têm apresentado vantagens em relação às tecnologias tradicionais. Em primeiro lugar, enzimas são catalisadores moleculares altamente seletivos e eficientes na remoção de compostos específicos. Outro aspecto relevante é a solubilidade e, com relação às peroxidases, estas têm se mostrado bastante solúveis em águas contaminadas (AITKEN, 1993; WILBERG *et al.*, 2002). Outra vantagem é que estas enzimas são raramente inibidas por substâncias tóxicas presentes nas águas contaminadas que debilitam a vida dos organismos que habitam ambientes lacustres (HAMID *et al.*, 2009). Com relação aos custos, estes poderiam eventualmente ser menores do que de outras tecnologias convencionais empregados para estes fins. Enzimas podem ser produzidas em apreciáveis quantidades através de ferramentas de biologia molecular como clonagem e expressão gênica usando sistemas heterólogos, podendo, assim, ser produzida em larga escala em biorreatores (TORRES & AYALA, 2010). Além dessas vantagens, esses catalisadores biológicos podem operar sobre uma ampla gama de concentrações de substratos alvos, requerendo menos tempo e um menor custo em relação a outros métodos de tratamento (BISWAS *et al.*, 1993).

Com base neste contexto industrial e no conhecimento de que as peroxidases podem atuar como proteínas de proteção para a planta, a purificação e caracterização dessas enzimas são de fundamental importância. Por exemplo, com o auxílio da bioengenharia, tornando possível a expressão controlada dessas enzimas, vislumbra-se a obtenção de vegetais mais resistentes a patógenos, fator que pode contribuir para o aumento da produção e da qualidade dos alimentos de origem vegetal. Portanto, um aspecto que deve ser destacado é que uma vez sendo uma peroxidase purificada e caracterizada, surge uma enorme variedade de estudos e possíveis aplicações, sobretudo na área de biotecnológica.

O presente trabalho foi conduzido com o intuito de se estabelecer um protocolo de purificação de peroxidases de raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*); avaliar a cinética dessa enzima; verificar seu potencial em remover compostos fenólicos e seu potencial biotecnológico de ação antifúngica contra fungos fitopatogênicos.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, informações sobre as peroxidases, abordando definições, mecanismos das reações, características estruturais e moleculares, bem como, principais aplicações industriais, aplicação com fins ambientais e desafios futuros para aplicações de peroxidases serão apresentadas. Também, apresentará informações sobre os fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum* utilizados neste trabalho para a avaliação do potencial fungicida desta enzima e informações sobre o feijão-de-corda como a fonte da peroxidase em estudo.

2.1 PEROXIDASES

2.1.1 Importância

Peroxidases são heme proteínas que estão amplamente distribuídas na natureza. Essas enzimas contêm um átomo de ferro denominado de ferriprotopofirina IX, que funciona como seu grupo prostético (ALMAGRO *et al.*, 2009). Com massa molecular variando entre 30.000 a 150.000 Da, há uma grande variedade de peroxidases que são comumente classificadas como ácidas neutras ou básicas, de acordo com o seu ponto isoelétrico (YOSHIDA *et al.*, 2002). Nas plantas, há um grande número de isoenzimas de peroxidase, onde atuam de forma direta em processos fisiológicos e no ciclo de vida da planta (PASSARD *et al.*, 2005).

As peroxidases atuam como oxidoreduases oxidando uma variedade de substratos orgânicos utilizando o peróxido de hidrogênio como agente redutor (IKEHATA *et al.*, 2005). Este mecanismo catalítico faz com que a atividade dessas enzimas realize

importantes funções nas plantas, microorganismos e animais (HIRAGA *et al.*, 2001). Nas plantas, elas desempenham funções fisiológicas que incluem a remoção de peróxido, oxidação de compostos fenólicos (HAMID *et al.*, 2009), catabolismo de auxinas, biossíntese e degradação de lignina na parede celular e respostas de defesa contra patógenos (Fungos, vírus e insetos) (MANU *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, aplicações de peroxidases em processos industriais tem sido propostas devido às suas características peculiares (TORRES & AYALA, 2010). Essas enzimas possuem potencial biotecnológico já que pode haver a possibilidade de substituição de processos químicos convencionais pelos processos bioquímicos que, ao contrário dos químicos, utilizam insumos renováveis (JULSING *et al.*, 2008). No entanto, os processos baseados no uso de peroxidases tinham o fator econômico como uma resistência a esse avanço tecnológico. Suas aplicações estavam restritas a kits de diagnósticos (ensaios de imunidade) e ferramentas de pesquisa (AEHLE *et al.*, 2004). A Figura 2.1 mostra o número de publicações ao longo de 100 anos, de artigos científicos com a palavra “peroxidase” nos títulos dos trabalhos publicados nesse período na revista Science. O número de publicações está por volta de 400 trabalhos por ano observados nos últimos 30 anos. Deste total, 25% correspondem às áreas de bioquímica e biologia molecular, o restante está relacionado a objetivos concretos de aplicação dessas enzimas, sendo um terço voltado para aplicações em engenharia visando à indústria de modo geral (TORRES & AYALA, 2010, 2010). Esse levantamento mostra a tendência das pesquisas em estudar as propriedades estruturais, físico-químicas, biológicas e principalmente, os mecanismos de biocatálise dessas enzimas, que, sendo esclarecidos, podem possibilitar o uso extensivo dessas proteínas na indústria.

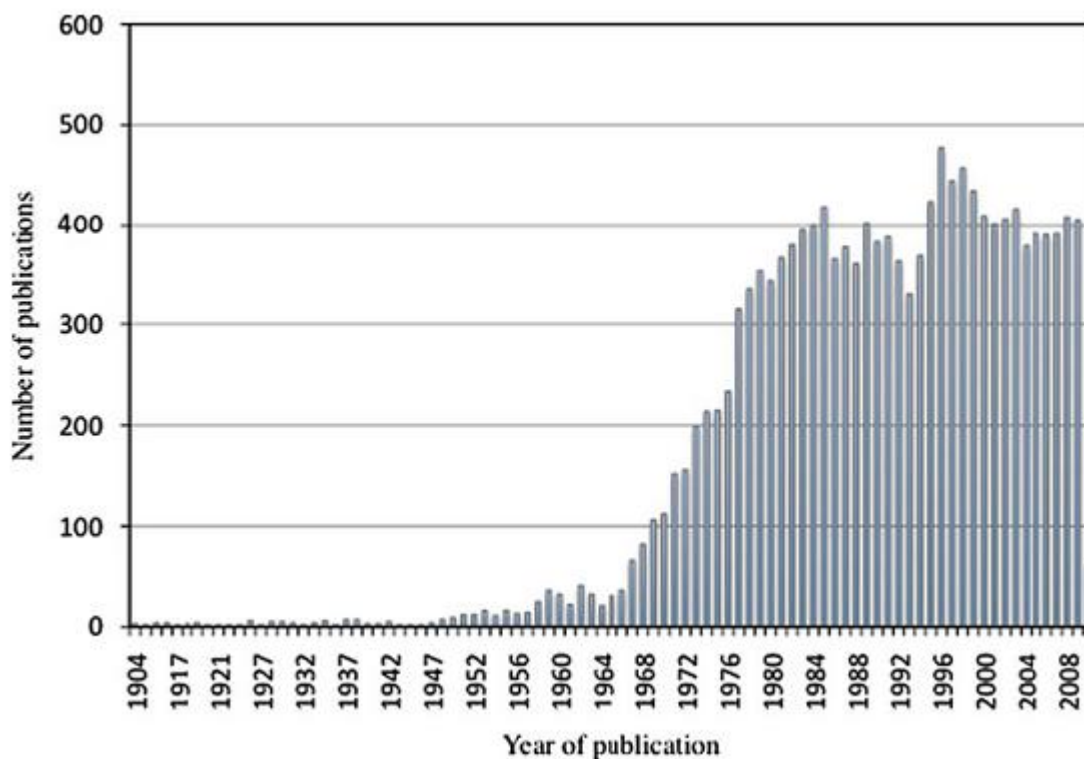


Figura 2.1 - Quantidade de artigos científicos publicados por ano relacionados com peroxidase (TORRES & AYALA, pág. 3, 2010).

Com o início da utilização de peroxidases em ensaios de imunidade e aplicações em bioquímica clínica (LIN, CHEN, & ZHANG, 1996), novas aplicações sugeridas para peroxidases firmaram ainda mais a importância de estudos aprofundados sobre essas enzimas. Com esses estudos, surgiram propostas de aplicações em tratamento de águas contaminadas com compostos fenólicos, sínteses de produtos em química fina, remoção de peróxido de produtos alimentícios, descolorização de corantes sintéticos, pesticidas, biossensores e produção de bicombustíveis com peroxidases fúngicas (AGOSTINI *et al.*, 2002; HAMID *et al.*, 2009).

2.2 Algumas aplicações de Peroxidases

2.2.1 Remoções de contaminantes fenólicos.

Compostos fenólicos e aminas aromáticas constituem uma das maiores classes de poluentes do setor industrial (MAMOUNATA *et al.*, 2011). Eles estão presentes em águas residuais de vários ramos da indústria, entre eles os setores de resinas e plásticos, revestimento de metais, refino de petróleo, têxtil, mineração, papel, carvão e corantes (NICELL *et al.*, 1993). Esses compostos, além de agredirem o meio ambiente, são extremamente nocivos a saúde humana. Sua exposição pode causar problemas cancerígenos, anemia e até complicações respiratórias devidas à sua ação tóxica (REN, 2003). Por exemplo, 10 dias de consumo de água contaminada com baixas concentrações (3 ppm) de 2,4-diclorofenol pode causar vômitos paralisia e até morte em crianças (KOBAYASHI *et al.*, 1972; AOYAMA *et al.*, 2005). Fenol, 2-clorofenol e 2,4 diclorofenol estão na lista entre os 250 poluentes mais perigosos (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1991).

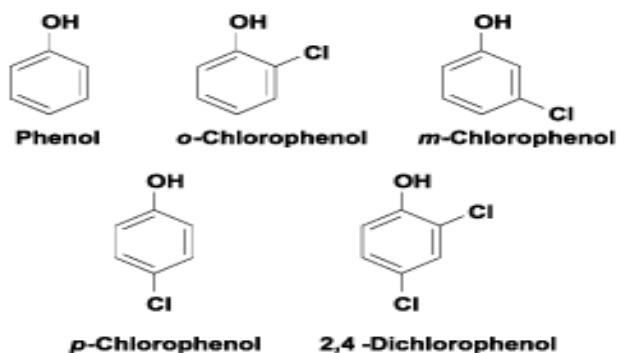


Figura 2.2 - Compostos fenólicos encontrados em efluentes industriais (TORRES & AYALA, 2010).

Muitos processos convencionais foram propostos para remoção de compostos fenólicos de efluentes industriais como extração, adsorção em carbono ativado, oxidação química, irradiação e técnicas eletroquímicas etc. (AITKEN *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2002; BRATKOVKAJA *et al.*, 2004). No entanto, muitos destes processos são dispendiosos de

tempo e dinheiro, por terem baixa eficiência na remoção desses compostos, formação de subprodutos também perigosos e aplicabilidade baixa por requererem uma faixa limitada de concentrações (LIU *et al.*, 2002; REGALADO *et al.*, 2004).

O tratamento enzimático tem sido proposto como uma alternativa em potencial para a substituição dos métodos convencionais para a remoção de compostos fenólicos. Isso se deve às características funcionais das enzimas, como sua alta especificidade pelo substrato, condições brandas de processo (temperatura e pressão), e facilidade de solubilização nas águas de tratamento (KIM & NICELL, 2006). As peroxidases, alvo desse presente estudo, tem-se mostrado bastante promissoras visto que são capazes de oxidar, eficientemente, uma ampla faixa de compostos fenólicos (BOLLAG *et al.*, 1992; SELVAN *et al.*, 2003). Alguns trabalhos desenvolveram e aperfeiçoaram o processo de remoção destes contaminantes obtendo altas taxas de reação, condições operacionais abaixo dos padrões convencionais e concentrações residuais mínimas de compostos fenólicos pós tratamento (KARAM *et al.*, 1997; HUSAIN *et al.*, 2000; BODALO *et al.*, 2006). O mecanismo de ação de peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio promove a conversão desses fenóis para radicais livres denominados de radicais fenox (Fig 2.3). Esses radicais, por serem instáveis, logo se aglomeram formando um precipitado polimérico (WARD *et al.*, 2001; NICELL *et al.*, 1993) que, facilmente, pode ser removido da água.

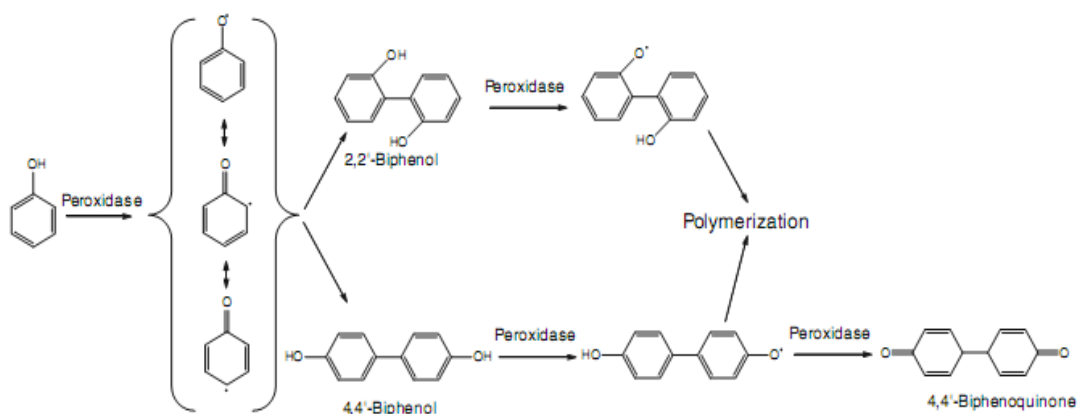


Figura 2.3 - Mecanismo de atuação de Heme-peroxidases com substratos fenólicos. Formação de produto precipitado (4,4-Bifenoquinona) (TORRES & AYALA, 2010).

2.3 Estrutura química e Propriedades das Peroxidases

A super família de peroxidases de plantas, fungos e bactérias são categorizadas em três classes baseadas na sequencia de alinhamento e origem biológica, tal como inicialmente proposta por K. G. Wellinder usando cristalografia (WELLINDER, 1992 e 1993). A figura 2.4 mostra diagramas de fita da estrutura molecular de algumas heme peroxidases como a CcP peroxidase (Citocromo C), LiP Lignina peroxidase de Basidiomiceto (Fungo) e a (HRP) peroxidase do rabanete (*Armoracia rusticana*). Como pode ser observado, há grande semelhança na estrutura helicoidal dessas enzimas, principalmente para a CCP e a LiP.

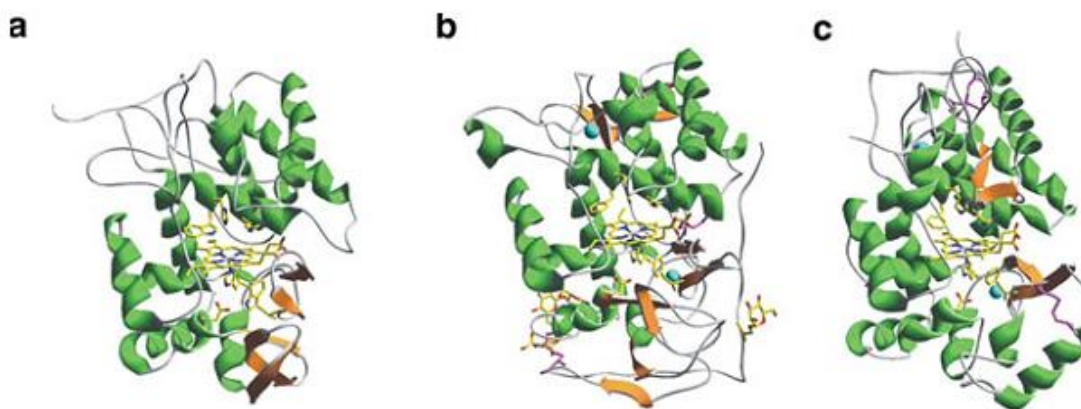


Figura 2.4 - Diagrama de fita da estruturas de algumas heme peroxidases. (a) Citocromo c peroxidase (CcP); (b) *P.chrysosporium* (LiP); (c) Horseradish (HRP) (TORRES & AYALA, 2010).

Essa classe de peroxidases apresenta um átomo de ferro denominado ferriprotopofirina IX (grupamento Heme), não covalente, que atua como sítio ativo da proteína, estando localizado em cavidades internas da enzima, com um estado de oxidação +3, podendo realizar até 6 ligações coordenadas (BANCI *et al.*, 1997). As Hemes peroxidases, usualmente, possuem 10 a 12 α -hélices conservadas, incorporadas ao grupo prostético, 2 folhas β e 4 pontes dissulfeto (ALMAGRO *et al.*, 2009).

Peroxidasas são as enzimas encontradas na natureza com o maior potencial oxidativo (CUSANOVICH *et al.*, 1989). O potencial redox desempenha papel importante na determinação de peroxidases hábeis para catalisar, de forma eficiente, as reações de oxidação (TORRES & AYALA, 2010). No entanto, esse não é o único fator, pois em outras heme proteínas a atividade também depende das interações eletrostáticas, orientação do substrato e atividade do sítio catalítico (CUSANOVICH *et al.*, 1989). São observadas três etapas no mecanismo redox de peroxidases (Fig 2.5); São as mudanças de nox do átomo de Ferro, que são nomeadas pelas etapas Fe^{3+} / composto 1, composto 1/composto 2, composto 2/ Fe^{3+} que sofrem influências termodinâmicas e da cinética do ciclo catalítico (DUNFORD *et al.*, 1999).

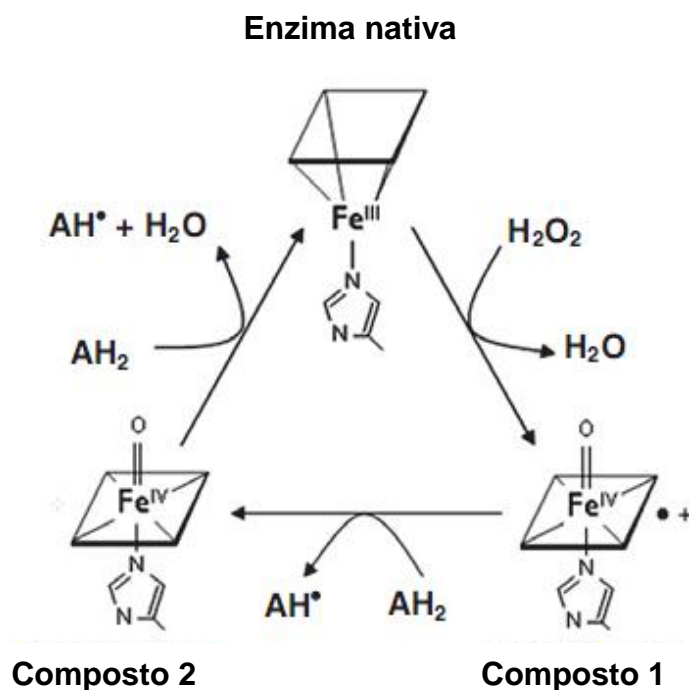


Figura 2.5 - Mecanismo enzimático das Heme-peroxidases (GIANANTONIO *et al.*, 2010).

2.4 Peroxidases e meio ambiente

Apesar de peroxidases se mostrarem versáteis e bastante eficientes na transformação de moléculas nocivas ao meio ambiente, o seu uso ainda é restrito em aplicações em larga escala. Sua aplicação para fins ambientais ainda precisa ser revisado com cautela (AYALA *et al.*, 2008). É preciso melhorar alguns fatores relevantes, fatores estes envolvendo o aprimoramento das condições operacionais e de estabilidade, ampliação eficiente quanto à faixa de compostos aromáticos a serem oxidados e o desenvolvimento de protocolos para sua expressão heteróloga que atenda a escala industrial (CONESA *et al.*, 2002). A principal limitação para a produção, em larga escala, de peroxidases é a inativação pelo peróxido de hidrogênio, que é o seu substrato natural, fato que pode ser generalizado para todas as Hemes peroxidases, tornando-se um problema, em potencial, que precisar ser analisado e resolvido para que em grandes quantidades esse substrato não possa causar problemas operacionais (VALDERRAMA *et al.*, 2002).

2.5 Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

O feijão-de-corda é uma leguminosa de grande importância para o Brasil, em especial para a região nordeste. Devido ao seu valor nutritivo, destacou-se com um dos mais importantes alimentos, constituindo parte da culinária de diversas populações que vivem nas regiões de clima quente. Com uma fácil adaptação a solos de baixa fertilidade e grande tolerância às condições de seca e salinidade, o feijão-de-corda se constitui uma opção vantajosa para os agricultores em comparação com outras culturas que apresentam custos de produção mais elevados e que dependem de grande volume de insumos como fertilizantes e defensivos agrícolas (SILVA *et al.*, 2011; TEOFILO *et al.*, 2008). Como um constituinte básico nos hábitos alimentares de diversas populações no Brasil e no mundo, desde 1960 vem sendo pesquisado em várias áreas científicas que vão desde banco de

dados para o material genético até o melhoramento genético de espécies não tolerantes a condições estressantes de natureza biótica e abiótica (FREIRE FILHO *et al.*, 2009).

No Brasil, diversos projetos genômicos sobre o feijão-de-corda estão sendo desenvolvidos. Estes projetos envolvem aspectos de mapeamento genômico, funcional e estrutural dessas espécies, visando seu melhoramento genético e obtenção, de variedades mais resistentes contra ataques de pragas, fungos, vírus, bactérias e nematóides (SILVA, 2011; PADOVAN *et al.*, 2010).

2.6 Fungos fitopatogênicos

Dentre os vários fatores que limitam a produção e a qualidade do feijão-de-corda produzido no Brasil, encontram-se as doenças causadas por agentes patogênicos. Nesse contexto, os vírus e os fungos são os patógenos que apresentam maior número de espécies nocivas a essa cultura (SOBRINHO *et al.*, 2000). Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizado a espécie de fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloesporioides*, agente causador da doença denominada antracnose, caracterizada por lesões necróticas profundas nas folhas (JOSÉ *et al.*, 2004). Também foram usadas as espécies de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, responsáveis pela doença conhecida por murcha-de-fusário, que causa podridão seguida de queda das folhas e morte da planta (COELHO 2001 & SOBRINHO *et al.*, 2005).

Capítulo 3

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Sementes

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp.], genótipo TE-97 411, foram obtidas da Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Meio Norte, Teresina – PI.

3.1.2 Fungos para os ensaios de inibição

Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* foram obtidos na micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Os fungos foram mantidos em placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), a 22 °C, em câmara de crescimento de microorganismos.

3.1.3 Reagentes

Reagentes de grau analítico como ácido ascórbico, álcool etílico, ácido acético, acetato de sódio, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio, sulfato de amônio, nitrato de prata, sulfato de cobre e meios de cultura de microorganismos foram obtidos comercialmente de fornecedores em Fortaleza – CE. Acrilamida, azul brilhante de coomassie (G e R) 250, azul de bromofenol, quitina, dodecil sulfato de sódio (SDS), β - mercaptoetanol, tiosulfato de sódio, albumina sérica bovina (BSA), N,N,N,N- tetrametiletlenodiamino (TEMED), guaiacol,

polivinilpirrolidona (PVPP) foram obtidos da Sigma Chemical Co., EUA. Matrizes cromatográficas e tiras de eletrofocalização foram obtidos da GE HealthCare do Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Tratamento das sementes

As sementes de feijão-de-corda foram tratadas durante 5 minutos com hipoclorito de sódio 1% e, em seguida, lavadas com água destilada em 5 ciclos de 2 minutos. Após a lavagem, as sementes foram embebidas em água destilada por 20 minutos e, posteriormente, submetidas a outro ciclo de lavagem igual ao procedimento já descrito.

3.2.2 Germinação das sementes

As sementes foram colocadas em vasos plásticos, cada um contendo 6 sementes, sendo o substrato, areia de rio, exaustivamente lavada e esterilizada em autoclave nas seguintes condições: 121 kgf/cm² a 120 °C durante 20 minutos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com variações de temperatura entre 25 – 35 °C. As plantas foram regadas com a solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon (1950) (SILVEIRA *et al.*, 2001), diluída na proporção de 1:10 (v/v) em água destilada. Esta solução nutritiva foi aplicada em intervalos de 2 dias, com volumes fixos de 100 ml por vaso. No 12º dia as plantas mais saudáveis foram selecionadas e inoculadas com a solução de esporos (10⁵ esporos/ml) do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, nas folhas primárias. Após 3 dias da inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes foram separadas do restante da planta (BARRETO *et al.*, 2005) e colocadas em sacos plásticos onde foram acondicionadas em freezer a -83 °C, para posterior preparação de extratos protéicos.

3.2.3 Preparação do extrato protéico

Os extratos protéicos foram obtidos através da maceração das raízes com nitrogênio líquido e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M, ácido

ascórbico 0.03 M, EDTA 0.003 M e polivinilpirrolidona 1%. O tempo de maceração foi de, aproximadamente, 30 minutos sob banho de gelo. Após este tempo, foi feita uma filtração em pano de trama fina e a suspensão centrifugada a 12000 *g* a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e dialisado contra o tampão de extração e estocado em freezer a -83 °C, para procedimentos posteriores.

3.2.4 Purificação da peroxidase (VuPox)

Após a extração, as proteínas do extrato dialisado (EXD) foram precipitadas com sulfato de amônio na faixa 0-90% de saturação. Em seguida, as frações foram centrifugadas a 15000 *g* por 30 minutos e o precipitado resuspenso e dialisado contra o tampão de extração. As frações obtidas foram aplicadas em coluna de afinidade de quitina (5 x 30 cm; Sigma®) e posteriormente, em coluna de troca iônica(FPLC Pharmacia® LKB) com a matriz RESOURCE-Q (troca aniônica) de onde foi obtida a *VuPox* eluída com 50 mM de NaCl, onde através de eletroforese, foi constatada sua purificação. Em seguida, o pico foi dialisado contra tampão sem sal e acondicionado em freezer para procedimentos posteriores. O procedimento descrito acima pode ser observado de forma resumida na figura a seguir:

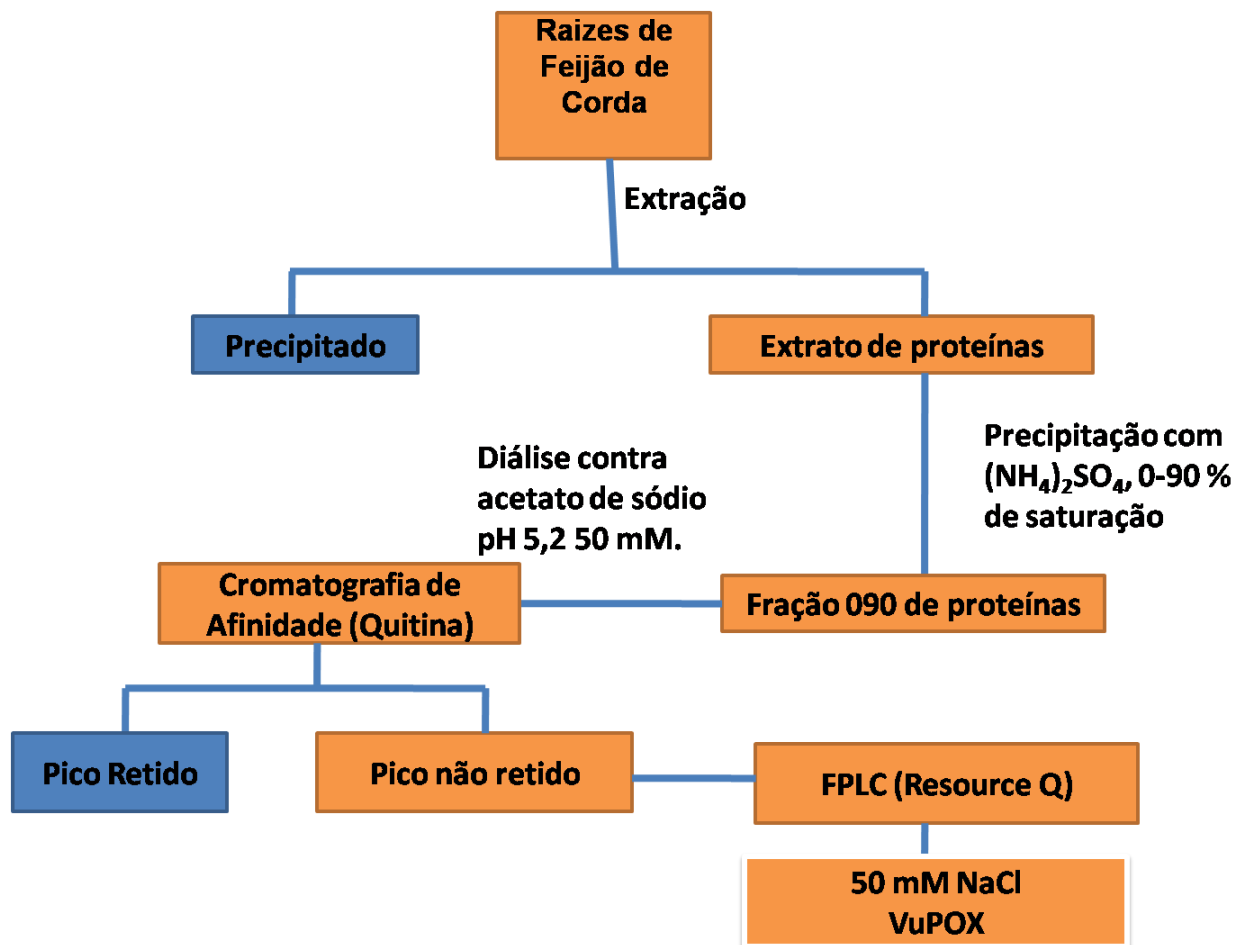


Figura 3.1 - Protocolo de purificação estabelecido para a obtenção da *VuPox*.

3.2.5 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteína foi determinada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). 2500 μL do reagente de Bradford foram adicionados a 100,0 μL de amostra e após 10 minutos, foram realizadas leituras de absorvâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Novaspec II da Phamarcia). O cálculo da quantidade de proteínas foi feito através, de uma curva padrão construída a partir das leituras de absorvância obtidas para concentrações conhecidas de BSA.

3.2.6 Determinação da atividade peroxidásica.

A atividade peroxidásica foi determinada, segundo a metodologia descrita por (URBANEK *et al.*, 1991), tendo como parâmetro de medição, a formação do composto orgânico 3,3 – dimetoxi-4,4-bifenol quinona, pela ação da enzima sobre os dois substratos, o peróxido de hidrogênio como receptor de prótons e o guaiacol como doador de prótons. Para a determinação da atividade, as misturas reacionais consistiram de 980,0 µL de tampão de extração, 500 µL de guaiacol 20 mM e 500 µL de peróxido de hidrogênio 60 mM. A mistura foi, então, incubada em banho-maria a 30 °C, por 10 minutos. Posteriormente, 20 µL de amostra foram adicionados, perfazendo um volume final de 2 mL. As absorbâncias foram lidas a 480 nm durante 3 minutos. Para o cálculo de atividade, foi admitido que uma unidade de absorbância por minuto seja igual a uma unidade de atividade peroxidásica.

3.2.7 Grau de pureza e determinação das propriedades físico-química da proteína purificada

A determinação da pureza e verificação do número de subunidades da VuPox foram ensaiadas em eletroforese em gel de poliacrilamida de uma dimensão (1D) (LAEMMIL, 1970). Para a identificação de peroxidases no gel foi utilizado Zimmograma específico para peroxidases pela metodologia de CARUSO *et al.*, 1991. Eletroforese bidimensional (SARMA *et al.*, 2008) foi empregada para estimar o ponto isoelétrico e a presença de isoformas da proteína.

3.2.8 Constante cinética dos substratos

Para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) de reação para os substratos guaiacol e peróxido de hidrogênio, a atividade enzimática da VuPOX foi mensurada variando as concentrações de guaiacol (1-20 mM) e mantendo a concentração de peróxido de hidrogênio constante ou variando as concentrações de peróxido de hidrogênio (20-300 µM) e mantendo a concentração de

guaiacol constante. Em seguida, os dados foram linearizados através do uso do gráfico de duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk, para obtenção dos valores de K_m e V_{max} .

3.2.8 Ótimo de pH

Para o estudo cinético da dependência de pH, foram utilizados os tampões citrato (pH 3-4), acetato (pH 5-6), fosfato (pH 7), Tris (pH 9) e glicina (pH 10), na concentração de 50 mM, sob temperatura de 30 °C.

3.2.9 Ótimo de temperatura do ensaio

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da VuPox, a mistura reacional foi incubada a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85 e 90 °C em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6. O ensaio foi realizado no tempo de 3 minutos.

3.2.10 Estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da VuPOX, a enzima foi incubada nas temperaturas de 75 e 85 °C, num intervalo de tratamento variando de 5 a 90 minutos. Após cada tempo, alíquotas de 100 µL foram retiradas e a atividade medida conforme protocolo descrito no item 3.2.6.

3.2.11 Preparação da suspensão de esporos dos fungos

Os microorganismos foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em placas de Petri. Passados 15 dias após a repicagem, as culturas foram lavadas com água Milli-Q. Os esporos foram coletados do meio de cultura com auxílio de uma alça de Drigalsky e, a seguir, foi feita filtração em pano de trama fina estéril. A concentração de

esporos foi determinada com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60).

3.2.12 Ensaio de atividade antifúngica da peroxidase purificada

A avaliação da ação da peroxidase sobre a germinação de esporos de vários fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* etc.) foi avaliada colocando em contato 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL), com concentrações crescentes das amostras. O controle negativo, ou seja, de não inibição da germinação, foi feito usando água estéril em substituição à solução de peroxidase e o positivo, ou seja, que promovia inibição da germinação, com peróxido de hidrogênio 0,5 M. Durante 24 horas, as placas permaneceram em temperatura de 37 °C, acondicionadas em caixa com fundo contendo papel de filtro umedecido para conservação da umidade próxima a 100 °C (JT E KUÉ, 1996). Após este período, o efeito sobre a germinação dos esporos foi avaliada pela visualização da placa por microscopia óptica (Olympus System Microscope BX 60) e fotografado com câmara digital Sony, modelo MCV-CD350 (3,2 megapixels). O esporo foi considerado como tendo germinado quando apresentou tubo germinativo correspondendo a 2 vezes o tamanho do esporo não germinado.

O ensaio, *in vitro*, da inibição do crescimento vegetativo dos fungos pela peroxidase foi realizado segundo método descrito por (BROEKAERT *et al.*, 1990), em placas do tipo ELISA, com 96 poços. Cada poço da placa continha um volume final de 200 µL, sendo 100 µL de meio YPD líquido + 10 µL de solução contendo 2×10^3 esporos dos fungos testados (*C. gloeosporioides*, *F. solani* etc.) e 90 µL da solução de peroxidase na concentração desejada. Inicialmente, os esporos foram depositados nos poços e deixados incubados por 12 horas, a 30 °C, no escuro, a fim de permitir sua germinação. Em seguida, as soluções de peroxidase e os controles (H₂O estéril; tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2; H₂O₂, 0,5 M) foram adicionados aos esporos germinados. A primeira leitura no leitor de ELISA (Automated Microplate Reader, modelo ELX800-Bio-Tek Instruments, Inc.) foi

realizada no momento em que as soluções de peroxidase foram adicionadas, sendo, portanto, este instante considerado o ponto de partida ($t=0$) em comparação aos sucessivos monitoramentos da turbidez de cada poço mensurada pela absorbância medida a 630 nm, executados de 12 em 12 horas até completar o tempo estimado de 72 horas.

3.2.13 Oxidação do guaiacol utilizando a *VuPox*

Todo o procedimento descrito abaixo segue a metodologia desenvolvida por (LAVERY 2010) com ajustes. Todas as reações foram realizadas no tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6, na temperatura de 60 °C. Inicialmente, a mistura reacional (1 mL) foi preparada pela adição de 20 mM de guaiacol e 10 mM de peróxido de hidrogênio para 950 µL de tampão (No caso do branco o peróxido de hidrogênio foi excluído da mistura reacional). 50 µL da amostra de *VuPox* (0,004 mgP/ml) foram adicionados à mistura reacional em triplicatas nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Ao final de cada tempo, foram adicionados 50 µL de catalase (2000 U/ ml) para a decomposição residual de peróxido e assim parar a ação da *VuPox*. Este procedimento informara a capacidade de remoção da *VuPox* em diferentes tempos.

A análise da capacidade de oxidação do guaiacol foi determinada adicionando 150 µL de Ferricianeto de potássio (83,4 mM em 250 mM de bicarbonato de sódio) e 150 µL de 4-aminoantipirina (20,8 mM em 250 M de bicarbonato de sódio) para o branco do experimento (Branco) e as outras triplicatas (Exp). A concentração remanescente de guaiacol foi visualizada por medição colorimétrica em espectrofotômetro com leitura em 505 nm. Para o cálculo da concentração residual de fenol foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\%Fenol = \left[1 - \frac{Exp}{Branco} \right] \times 100.$$

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da VuPox

4.1.1 Extração e precipitação das proteínas

Raízes de plantas de feijão-de-corda, 3 dias após inoculação com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, foram coletadas, e as plantas colocadas em sacos plásticos onde foram acondicionadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para preparação de extratos protéicos e posterior fracionamento com sulfato de amônio na faixa 0-90% de saturação. O resultado dos teores de proteínas no extrato e na fração 0-90% são mostrados na figura 4.1. De acordo com o resultado, metade das proteínas presentes no extrato foi perdida após precipitação com sulfato de amônio. A menor quantidade de proteínas presente na fração 0-90% pode estar associada à ausência de compostos presentes no extrato como fenóis e pigmentos que superestimam a quantidade de proteínas e a perdas inerentes ao processo de purificação das peroxidases.

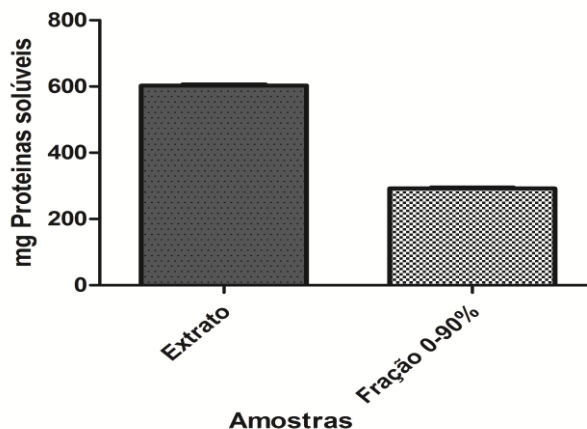


Figura 4.1. - Teores de proteínas totais solúveis de raízes de feijão-de-corda encontrados no extrato e fração 0-90%. As proteínas das raízes foram extraídas com tampão de extração.

4.1.2 Cromatografia em coluna de quitina

A fração 0-90%, obtida a partir da precipitação do extrato protéico com sulfato de amônio, foi aplicada em coluna de quitina a fim de separar possíveis proteínas ligantes a quitina, como por exemplo, as quitinases, que são enzimas que também estão relacionadas com a defesa vegetal da planta. Essa cromatografia gerou um pico não retido que concentrou toda atividade peroxidásica e dois picos retidos pequenos eluídos com ácido acético 0,1 M ausentes de atividade peroxidásica (Figura 4.2). A separação das peroxidases das proteínas com interação a quitina não foi satisfatória, pois o resultado mostrou que praticamente a maioria da proteína aplicada na quitina não interagiu com a matriz. Pelo perfil de atividade foi visto que as isoformas de peroxidases de raízes ficaram todas no pico não retido. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de um sítio de ligação nas peroxidases que reconheceriam quitina.

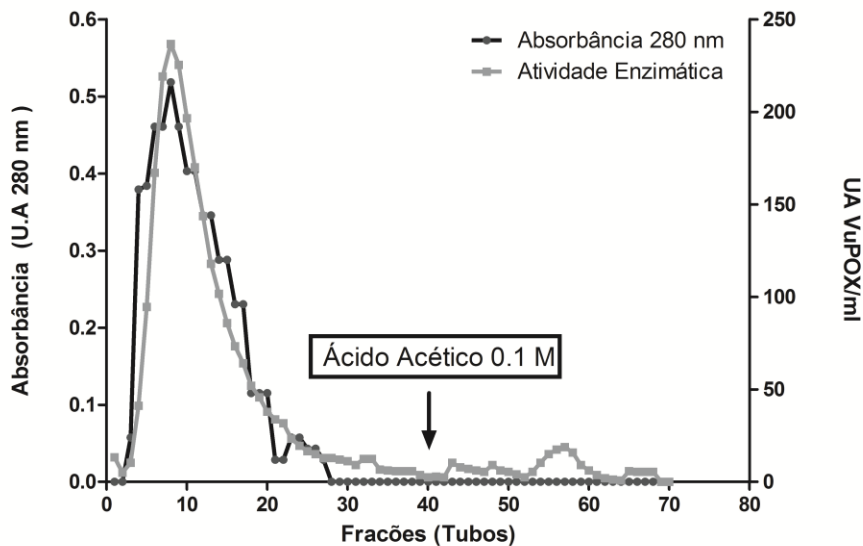


Figura 4.2 - Perfil cromatográfico e atividade peroxidásica dos picos obtidos através de cromatografia da fração 0-90% em coluna de quitina. Foram aplicados 10,6 mg de proteína. A atividade concentrou-se no pico não retido PNRQ.

O pico não retido oriundo da coluna de quitina foi reunido e dialisado contra água e liofilizado. Após liofilização o material foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio pH 5,2 50 mM e submetido à dosagem de proteínas e atividade peroxidásica como demonstrado

na tabela Tabela 4.1. Como mencionado anteriormente, os dados mostram considerável perda no teor de proteínas e atividade específica da fração 0-90% comparado ao extrato. Entretanto, após aplicação da fração 0-90% em coluna de quitina, houve recuperação dessa atividade com purificação de 1,10 vezes.

Tabela 4.1 - Etapas de purificação da peroxidase *VuPox*

Amostras	mgP/ml	UA/ml	Vol. total (mL)	UA/mgP	Purificação
Extrato	0,107	187	5850	1747,66	1
F 090%	0,31	260	170	838.70	0,47
PNRQ	0,98	1889	7	1927,55	1,10
RQ 50 mM (<i>VuPOX</i>)	0,04	2798	10	52450	40.02

4.1.3 Cromatografia de troca iônica.

Após a cromatografia em coluna de quitina, o pico (PNRQ) não retido nessa matriz foi cromatografado em coluna de troca aniônica (Resource Q), acoplada a um sistema FPLC (cromatografia líquida de rápida performance), conforme mostra a figura 4.3. Com esse passo foi possível obter uma excelente separação das proteínas presentes na fração não retida da quitina de onde obteve-se cinco picos cromatográficos. O primeiro denominado de pico não retido na resource Q (PNR), o pico eluído com 25 mM de NaCl, o pico eluído com 50 mM de NaCl, o pico eluído com 100 mM de NaCl e o pico eluído com 1000 uM de NaCl. Todos os picos apresentaram atividade peroxidásica com exceção do pico eluído com 25 mM de NaCl. Para avaliação do grau de pureza destes picos, eles foram submetidos à eletroforese na ausência (nativa) e presença de β -mercaptoetanol (SDS-PAGE), como mostrado na figura 4.5 a seguir.

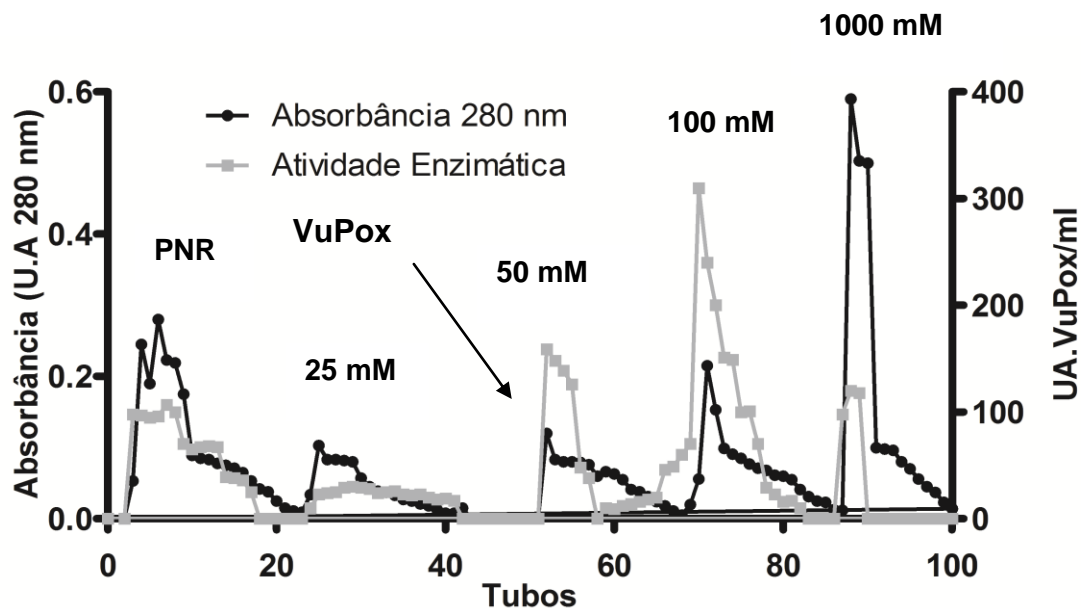


Figura 4.3 - Cromatografia do pico PNRQ em coluna de troca aniônica (Resource Q) acoplada a um sistema FPLC e atividade peroxidásica dos picos gerados. Foram aplicados 6,9 mg de proteínas solubilizadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. Os picos retidos foram eluídos com concentrações crescentes de NaCl (mM).

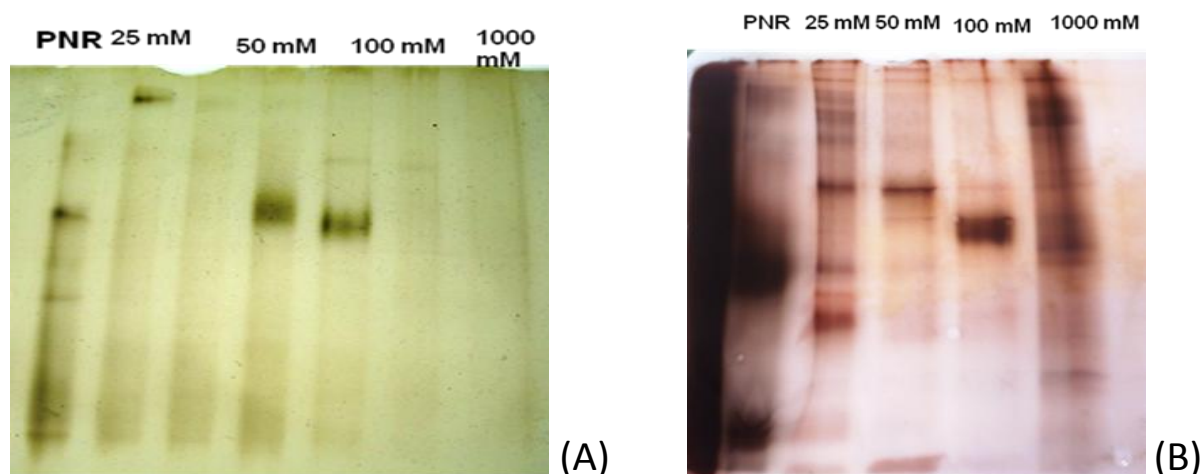


Figura 4.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na ausência (A) e presença (B) de SDS e β -mercaptoetanol, dos picos oriundos da cromatografia em coluna Resource Q. Quantidade de proteína aplicada por poço: 2 ug. Revelação do gel com prata. O gel (A) contém um poço vazio entre 25 e 50 e entre 100 e 1000mM.

O resultado mostrado na Fig. 4.5 (B) demonstra a presença de grande quantidade de proteínas na fração eluída com 25 e 1000 mM de NaCl e uma menor quantidade no pico não retido. Em destaque nos géis estão às frações eluídas com 50 e 100 mM com atividade peroxidásica, como demonstrado na figura 4.5 (A), apresentando, cada uma, uma banda bem proeminente e destacada. Entretanto, apesar das frações eluídas com 50 e 100 mM apresentarem atividade peroxidásica, os resultados obtidos até esse passo não eram conclusivos sobre se as bandas observadas nessas frações eram peroxidases. Com o intuito de confirmar essa hipótese, atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma) dos picos da resource Q foi realizada. O resultado está apresentado na figura 4.6.

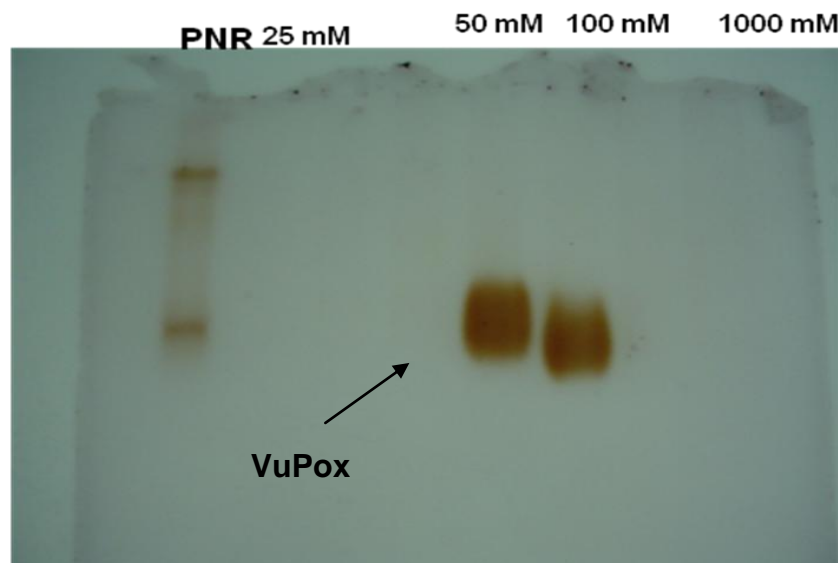


Figura 4.5 - Zimmograma específico para identificação de peroxidases. Quantidade de proteína aplicada por poço: 2 ug. Revelação do gel com prata.

Conforme observado na figuras 4.6, as bandas bem proeminentes na eletroforese nas concentrações de 50 e 100 mM realmente tratavam-se de peroxidases com expressivas atividades peroxidásicas. Além disso foi observada a presença de duas isoformas no pico não retido. Sendo assim, foi possível obter dois picos com um alto grau de pureza e uma elevada atividade, demonstrando um resultado satisfatório do protocolo estabelecido para purificação de peroxidases. Todos os passos de purificação da *VuPox*, bem como as atividades e rendimentos estão listados na Tabela 4.1.

4.1.4 Eletroforese Bidimensional

A Figura 4.6, mostra o ensaio de eletroforese bidimensional da *VuPox*. A presença de quatro *spots* bastante próximos indica a possibilidade da existência de isoformas. O *pI* estimado para a *VuPox* foi de, aproximadamente, 3,5. A figura mostra, também, a ausência de contaminantes por todo o gel, indicando uma excelente pureza da amostra, e confirmando, assim, a adequação do protocolo de purificação utilizado nesse trabalho.

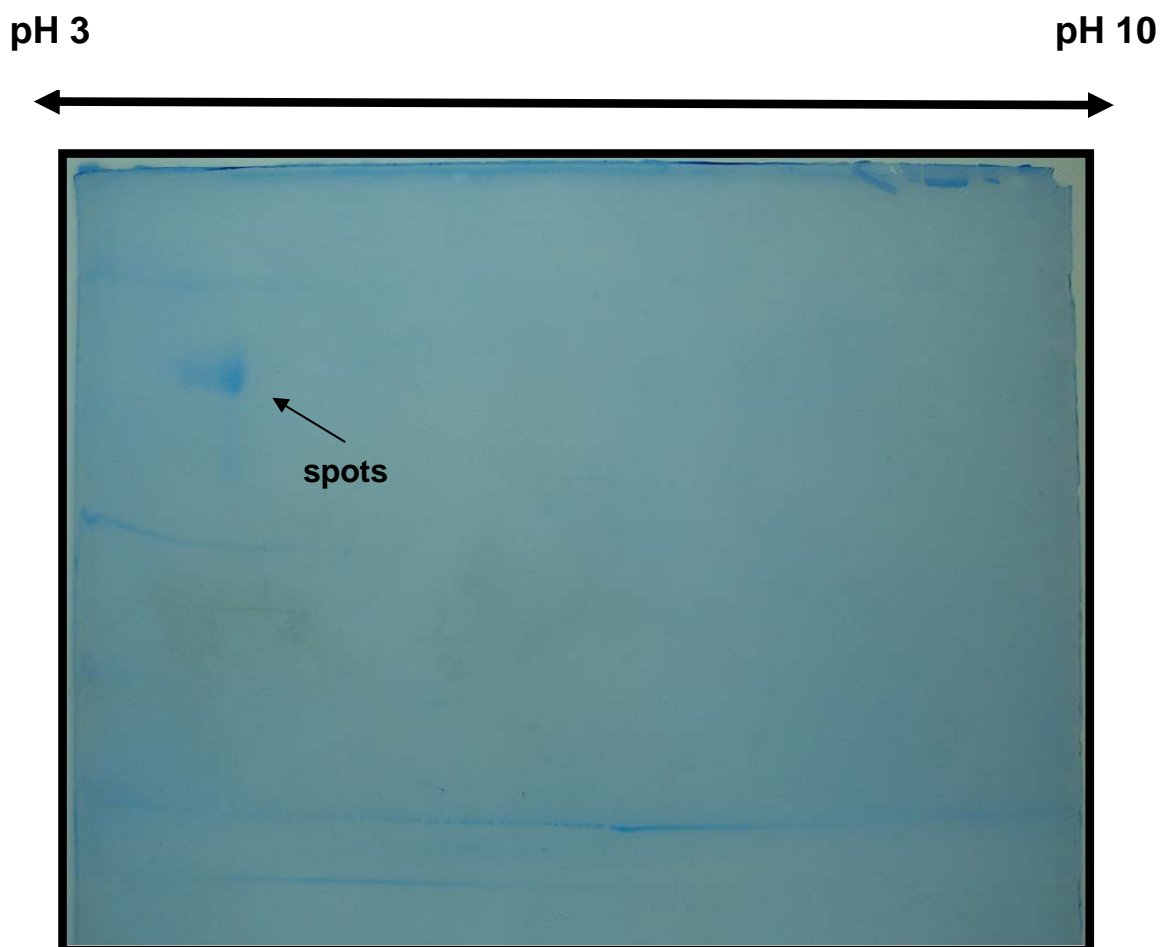


Figura 4.6 - Eletroforese SDS-PAGE 2D para a POX 50. 15 μ g de proteína passaram por uma IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear. Coloração por CBB coloidal.

4.2 Determinação dos parâmetros de ótimo da *VuPox*

4.2.1 Ótimo de pH

A Figura 4.7 mostra a influência do pH na atividade da *VuPox*. Há aumento da atividade peroxidásica conforme vai sendo elevado o pH da mistura reacional de 2 a 6, quando se observa o pH ótimo da enzima. Após esse valor de pH 6, a enzima começa a demonstrar decaimento na sua atividade, tendo perda total de atividade em pH 9.

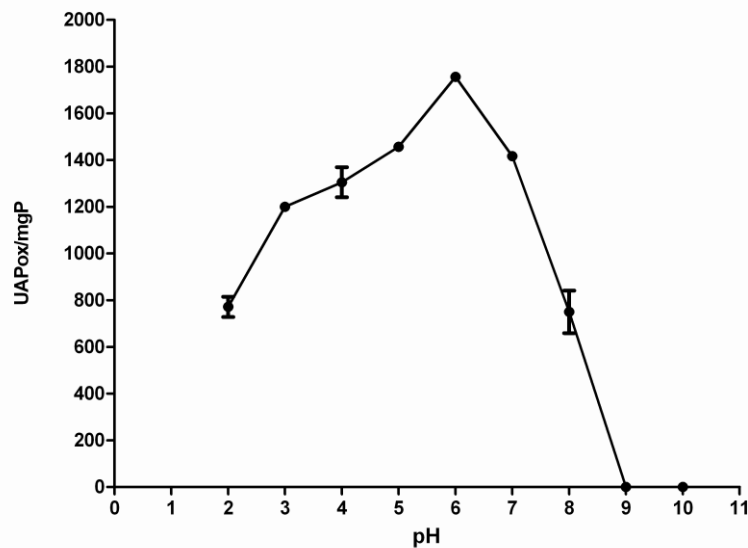


Figura 4.7 - Efeito do pH na atividade peroxidásica de *VuPox* de *V. unguiculata*. A atividade enzimática foi mensurada após tratamento da enzima a diferentes pHs, e ensaiada sob condições padrões.

O ensaio ótimo de pH é uma análise importantíssima na caracterização de uma enzima, uma vez que o pH altera o estado de ionização de cadeias de aminoácidos ou a ionização do substrato, podendo, dessa forma, alterar o comportamento catalítico da enzima. O efeito do pH na atividade da *VuPox* foi mostrado na Figura 4.7, tendo um máximo de atividade no pH 6. Isso está de acordo com outros trabalhos científicos como o observado para peroxidases de *Vigna Mungo* que apresentou ótimo de atividade em pH 5.5 (Ajila *et al.*, 2009) de *Beta vulgaris* L. pH 5 (Thimmaraju *et al.*, 2007) de *Vigna unguiculata* pH 6 (Fernandes *et al.*, 2006). Também, houve uma acentuada perda de atividade em pHs

superiores, mostrando sua dificuldade de catálise em ambientes básicos. Nesse contexto, sabe-se que a liberação do grupo heme, como um sítio ativo, presente no grupo prostético da enzima é dependente do pH, ou seja, mudanças para valores altos ou baixos de pH podem levar a uma inativação da enzima pelas mudanças na estrutura conformacional da proteína ou ionização do grupo prostético (Lopez *et al.*, 1995). Desta forma, a *VuPox* demonstrou aumentos significativos de atividade em pHs ácidos alcançando sua inativação em pH 9.

4.2.2 Ótimo de temperatura

Os dados da Figura 4.8 mostram aumento gradativo da atividade peroxidásica da *VuPox* conforme vai sendo aumentada a temperatura do ensaio que ocorreu no tempo fixo de 3 minutos. É visto que com a temperatura de 90 °C, a enzima alcança um máximo de atividade específica parecendo não sofrer nenhum tipo de inativação na ampla faixa de temperaturas do experimento.

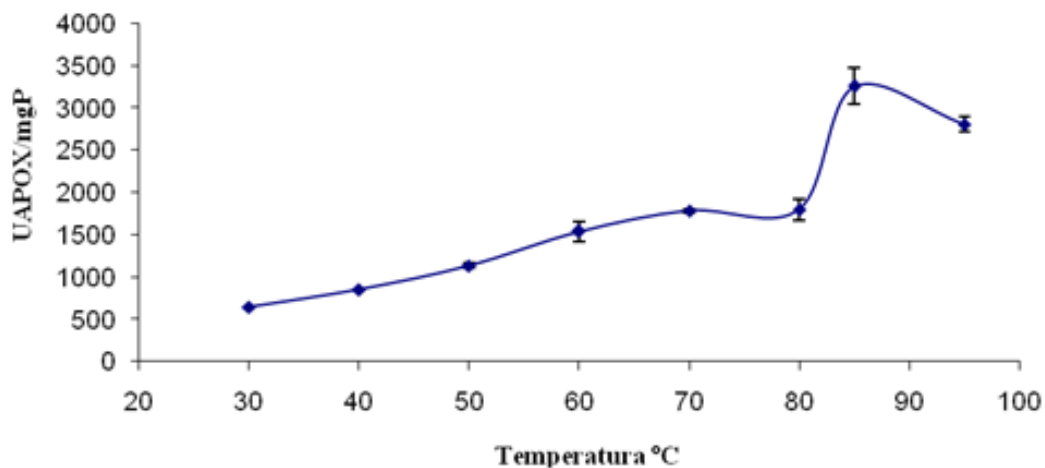


Figura 4.8 - Temperatura ótima da *VuPox*. Os dados foram gerados com a enzima incubada com seus substratos na temperatura assinalada.

4.2.3 Ensaio de estabilidade térmica

A Figura 4.9 mostra a atividade enzimática da *VuPox* nas temperaturas de 75 e 85 °C em função do tempo de tratamento térmico. Na temperatura de 75 °C, a atividade quase não variou até, aproximadamente, 1 hora de incubação. A partir daí, houve queda de atividade, com perda de cerca de 40% da original, aos 90 minutos. Na temperatura mais elevada de 85 °C, a *VuPox* ainda demonstrou atividade residual de cerca de 40% no tempo inicial do ensaio, mas tendo sua atividade diminuída, progressivamente, até se extinguir, totalmente, aos 90 minutos de ensaio.

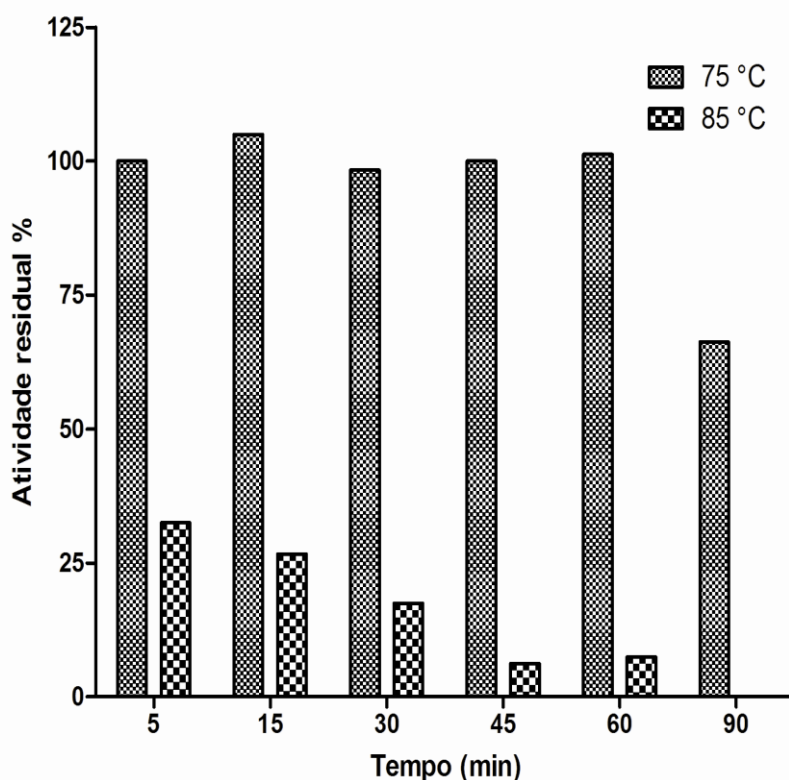


Figura 4.9 - Efeito da temperatura de 75 e 85 °C na estabilidade da *VuPox*. A atividade enzimática foi mensurada, após retirada de alíquotas de 100 μ L de enzima no intervalo de 0-90 minutos, sobre condições padrões de ensaio.

As peroxidases já são bem descritas na literatura como proteínas termoestáveis, ou seja, proteínas que são bastante resistentes a mudanças drásticas de temperatura. Essa afirmativa pode ser comprovada na Figura 4.9, para a *VuPox*, pois, a enzima atuou com sua capacidade máxima à temperatura de 75 °C. Isso indica que ela não sofreu desnaturação significativa nessa temperatura. Essa alta estabilidade pode estar associada à presença de açúcares em sua estrutura (MELLON *et al.*, 1991). No entanto, este fato não pode ser generalizado para todas as enzimas, visto que existem várias isoformas e cada uma tem uma resistência específica frente a diversas temperaturas. Esse efeito, também, pode estar relacionado à dissociação, mudanças ou degradação dos grupos prostéticos da enzima ou mudanças na conformação protéica (TAMURA *et al.*, 1975). Todos esses argumentos discutidos aqui sobre a alta estabilidade térmica de peroxidases podem, também, servir como argumentos para explicar seu comportamento anômalo observado na Figura 4.8, que ilustra um ensaio de determinação de ótimo de temperatura. Nesse, a *VuPox* se mostrou bastante ativa para temperaturas altas, impossibilitando determinar sua temperatura ótima para catálise. Esse fato pode ser bem explicado pelo gráfico de estabilidade térmica (Figura 4.8), visto que a atividade enzimática se manteve quase constante ao longo de 60 minutos. Ao compararmos com o ensaio da Figura 4.9, cujo tempo de reação foi de somente 3 minutos, pode-se afirmar que nesse pequeno intervalo de tempo a peroxidase não sofre os efeitos de temperatura. Por fim, foi possível constatar que o aumento da temperatura maximiza a atividade da *VuPox* devido, provavelmente, aos substratos estarem em uma condição de alta energia, favorecendo os choques efetivos entre as moléculas e gerando, assim, uma maior atividade específica.

4.3 Parâmetros cinéticos

4.3.1 Km e Vmax para o substrato Guaiacol

O gráfico da Figura 4.10 mostra uma excelente linearização dos dados de atividade enzimática com diferentes concentrações de guaiacol, mantida fixa a concentração do H_2O_2 , obtida através do método de Lineweaver-Burk, que permitiu a dedução da equação da reta $y = 36,07x + 1,080$, através da qual foi calculado o valor de K_m de 33,44 mM e a velocidade máxima de 0,9259 ABS/min.

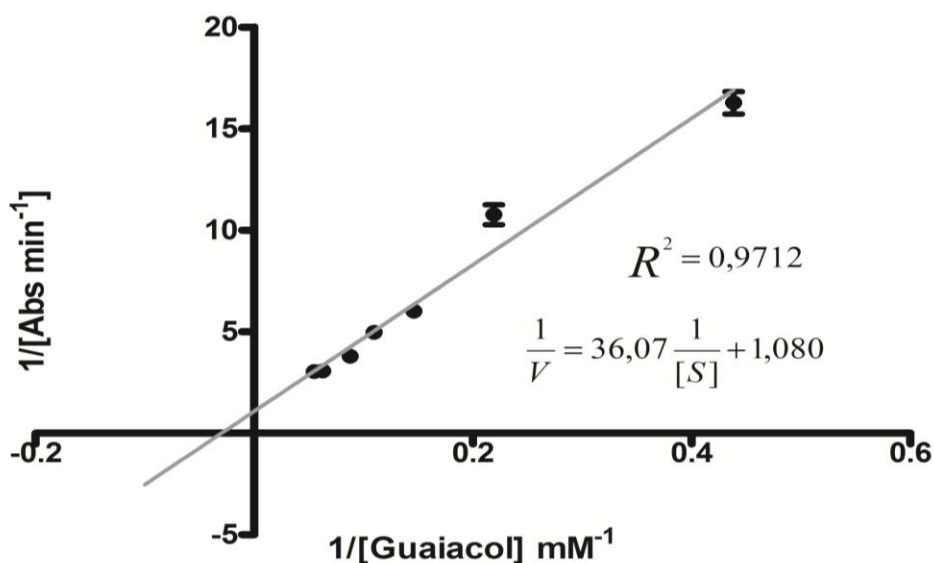


Figura 4.10 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk construído a partir de concentrações variadas do substrato guaiacol. Condições do ensaio especificadas na metodologia.

4.3.2 Km e Vmáx para o substrato peróxido de hidrogênio

No gráfico duplo-recíproco representado pela Figura 4.11. Construído para determinação dos parâmetros cinéticos da VuPox, quando houve variação da concentração de H_2O_2 , mantida fixa a concentração de guaiacol, foi possível deduzir a equação da reta $y = 802.3x + 6.638$, através da qual os valores de K_m e de velocidade máxima foram calculados como sendo, respectivamente, de $120,91 \mu\text{M}$ e 0.150 ABS/min .

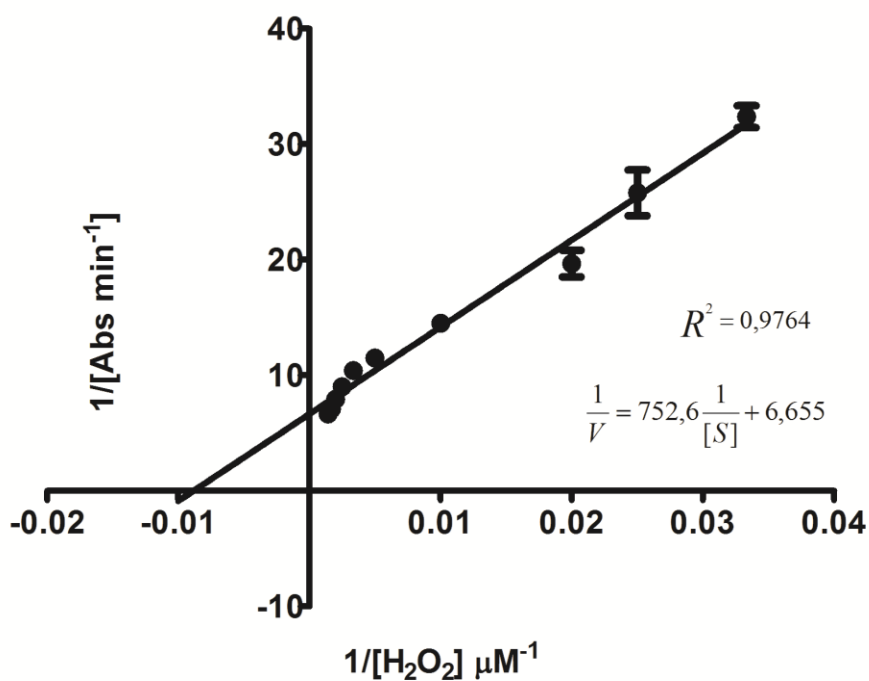


Figura 4.11 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, construído a partir de concentrações variadas do substrato peróxido de hidrogênio. Condições do ensaio especificadas na metodologia.

Em relação aos experimentos de cinética enzimática, realizados nesse trabalho, as Figura 4.10 e 4.11 permitem mostrar uma ótima reta experimental de dados de velocidade *versus* concentrações dos substratos, guaiacol (Fig 4.10) e peróxido de hidrogênio (Fig 4.11), indicando boa concordância com a cinética de 1ª ordem de *Michaelis-Menten*. O baixo valor de Km para o peróxido indica alta afinidade da enzima por esse substrato. A faixa de concentração desse ensaio foi de 20-300 µM de H₂O₂, uma vez que foi observado no presente trabalho, que concentrações acima de 10 mM inibiram a atividade enzimática da VuPox. Outros trabalhos reportam essa inibição de peroxidases por peróxido (RANI 2006; OLSEN 1979). Essa inibição está associada à oxidação do grupo heme para íon ferril, o que favorece a formação de oxyperoxidases. Por sua vez, o valor de Km para o guaiacol pode ser comparado com outros trabalhos, como por exemplo, THIMMARAJU *et al.* (2007) e FERNANDES *et al.*, (2006) com 98,63 e 0,0048 mM, respectivamente. Esses resultados instigam a necessidade de estudos futuros de cinética enzimática na presença de outros substratos, assim como a presença de inibidores. Com esta perspectiva, novos mecanismos de catálise podem ser propostos, alargando o potencial de aplicação da VuPox.

4.4 Atividade antifúngica

De acordo com a Figura 4.13, a VuPox apresentou propriedades antifúngicas ao inibir a germinação dos esporos dos fungos *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum*, tanto em estado normal como aquecida. Neste ensaio, também, podemos observar que mesmo uma baixa concentração da proteína foi capaz de inibir, totalmente, o crescimento dos esporos dos fungos citados

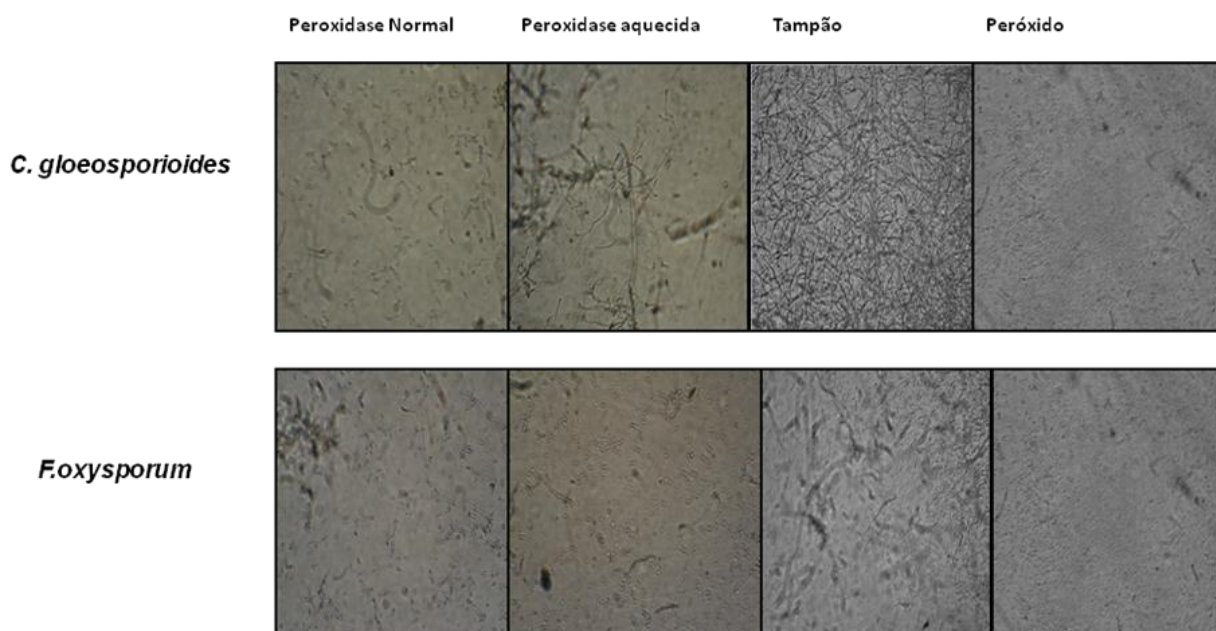


Figura 4.12 - Ensaio de inibição de germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *gloeosporioides* e *F. oxysporum*. Foram utilizados 4,4 µg de proteína purificada.

. Já, de acordo com a figura 4.14, ficou demonstrado que a VuPox não foi capaz de inibir a germinação de esporos do fungo *Fusarium Solani*, indicando seletividade em sua atividade antifúngica.

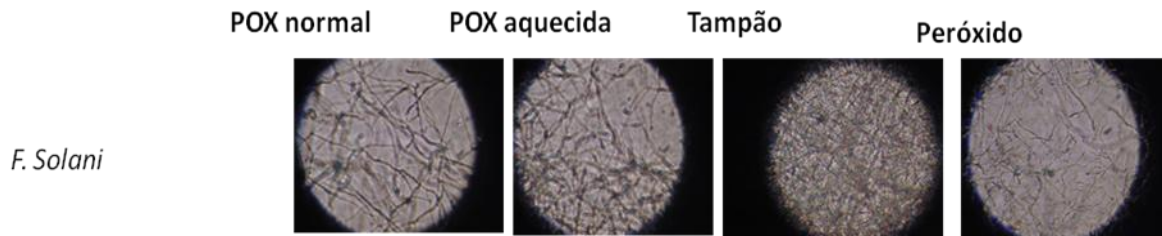


Figura 4.13 - Ensaio de inibição de germinação de esporos do fungo fitopatogênico *F. Solani*. Foram aplicados 2 µg de proteína purificada.

A figura 4.13 mostra a ação inibitória da *VuPox* sobre a germinação dos esporos de dois fungos fitopatogênicos – *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum*. Poucos trabalhos descrevem as propriedades antifúngicas de peroxidases, mas, muitos deles reportam a indução de sua expressão durante a resposta de defesa vegetal contra ataque de patógenos (HILAIRE *et al.*, 2001). Alguns trabalhos têm atribuído às heme-peroxidases ações de defesa contra patógenos. Dentre as principais hipóteses que justificam essa afirmativa estão: a formação de barreiras estruturais como lignificação, suberização (HAMMERSCHMIDTAND & KUC, 1982; ESPELIE *et al.*, 1986), ligações “cross-linking” (BRADLEY *et al.*, 1992) e dimerização de fenóis antimicrobianos pela ação catalítica dessas enzimas (MARTINEZ *et al.*, 2000). Nos ensaios *in vitro*, alguns trabalhos, também, reportam a inibição do crescimento dos fungos por peroxidases na presença de H₂O₂ (Joseph *et al.*, 1998; Yang e Anderson, 1999). No entanto, outros trabalhos sugerem que a natureza antifúngica de peroxidases específicas independe de H₂O₂. Ye e Ng (2002) isolaram uma peroxidase de feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.) que exibiu atividade antifúngica contra os fungos das espécies *Coprinus comatus*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Essa inibição pode ter sido causada por radicais livres de oxigênio liberados pelas peroxidases que, de forma indireta, são descritos como citotóxicos para fungos (LAURA *et al.*, 2008). A não inibição do fungo *F. Solani* pela *VuPox* (Figura 4.14) pode ter sido devido à ocorrência de uma parede celular mais resistente neste patógeno, evitando, assim, o ataque catalítico por parte da *VuPox*. Outra hipótese é que o fungo em questão não tenha sofrido efeitos deletérios com a liberação das espécies reativas de oxigênio. Também, a quantidade

de enzima utilizada no experimento pode ter sido insuficiente para provocar uma inibição evidente. Contudo, é preciso elucidar ainda mais os mecanismos antifúngicos destas enzimas para uma maior compreensão desses resultados.

4.5 Remoção do Guaiacol utilizando a *VuPox*

Como observado na Figura 4.15, foi realizado ensaio de remoção do guaiacol, em diferentes tempos, utilizando a *VuPox*. Houve aumento de 10% de remoção nos primeiros 10 minutos de ensaio, chegando aos 40% com 30 minutos e assim permanecendo. A conclusão é de que há fatores que estão influenciando diretamente na ação da *VuPox* em catalisar a remoção do guaiacol em função do tempo.

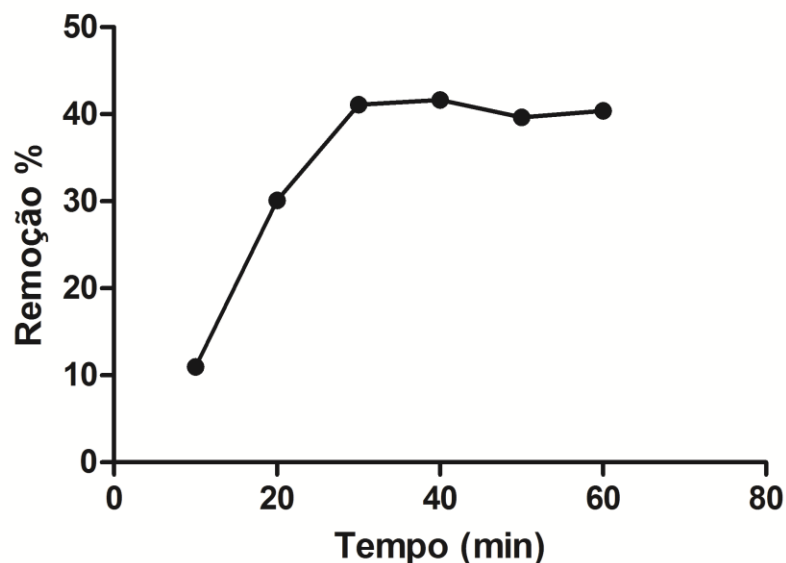


Figura 4.14 - Efeito do tempo na remoção do guaiacol pela ação enzimática da *VuPox*. O ensaio foi promovido no ótimo de pH na temperatura de 60 °C. O cálculo da remoção fenólica está descrito nos materiais e métodos.

O resultado obtido com a *VuPox*, demonstrado na figura 4.15, pode ser explicado pelo fato de todas as peroxidases serem inativadas pelo peróxido de hidrogênio, este fato é conhecido como o suicídio das peroxidases (VALDERRAMA *et al.*, 2002). Com peróxido em excesso e ausência de doadores de elétrons pontuais, a enzima em questão é inibida irreversivelmente com o tempo (VLASITS *et al.*, 2010). Esta inativação inclui a destruição do grupo Heme e a oxidação de amino ácidos essenciais (TORRES E AYALA, 2010). Em adição a esta discussão, outros estudos sugerem a inativação das heme-peroxidases pela estabilidade do radicais fenox em conjugação π com o composto 1, que é um estado intermediário no mecanismo catalítico desta enzima e a adsorção de moléculas da enzima no polímero fenólico produzido, limitando a difusão do substrato para o sítio ativo (KIBANOV *et al.*, 1983). Com base nessa discussão, pode-se tentar descobrir meios de diminuir esses efeitos contra a atividade de heme-peroxidases. Por exemplo, há relatos na literatura científica pertinente do uso de alguns aditivos, como polietileno glicol (PEG) e gelatina, para mitigar esses efeitos (NAKAMOTO & MACHIDA, 1992; TATSUMI *et al.*, 1996). Duarte e colaboradores observaram que 50 mg/L de PEG proveram um aumento de 99% na remoção do bisphenol, 3-clorophenol e m-cresol com a peroxidase livre do Nabo (*Brassica napus*) (DUARTE *et al.*, 2003). Isso ocorre por que a presença de PEG na mistura reacional protege a enzima da polimerização dos radicais fenólicos (QUINTANILLA *et al.*, 2008). Dessa forma, estudos futuros da avaliação da *VuPox* frente a compostos fenólicos sugerem a adição de PEG e uma concentração otimizada do peróxido de hidrogênio, para melhor avaliação da enzima em questão.

Capítulo 5

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer um excelente protocolo de purificação para a *VuPox*, visto que somente foram utilizados 2 passos cromatográficos e, ainda, além de se obter uma quantidade de enzima purificada satisfatória, uma vez que foi possível realizar vários ensaios de caracterização físico-química. E como pode ser visto no zimmograma (Figs. 4.6) há a presença de novas peroxidases em condições bastante promissoras de purificação tornando um protocolo que pode ser muito bem utilizado para a descoberta futura de novas peroxidases da raiz do feijão de corda *Vigna unguiculata*.

Nesse trabalho foram obtidos vários parâmetros importantes para a caracterização da *VuPox*, como a obtenção do pH ótimo, pI , estabilidade térmica e K_m e V_{max} para seus dois substratos, guaiacol e peróxido de hidrogênio. Também, foram identificados dois importantes fungos fitopatogênicos suscetíveis a ação desta enzima, demonstrando um grande potencial biotecnológico dessa enzima.

Em relação ao estudo enzimático da remoção fenólica da *VuPox*, a enzima foi totalmente inibida pela ação do peróxido e radicais fenox. Em experimentos futuros é sugerida a adição de PEG, visto que ele é um aditivo que implica em melhores resultados, como relatado em estudos similares com peroxidases.

Assim, podemos concluir que o trabalho realizado ao longo destes 2 anos obteve bons resultados tendo em vista que boa parte dos objetivos foi alcançada bem como a obtenção de dados que serão importantíssimos para um estudo futuro da enzima *VuPox* na busca para sua aplicação biotecnológica.

Capítulo 6

6. Referências bibliográficas

AEHLE W. (2004), Enzymes in industry. **Wiley**, NewYork.

AGOSTINI, E.; HERNANDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B.; MILRAND, S. R.; TIGIER, H. A.; ACOSTA, M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassicanapus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application indidiagnostic kits. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, p.1–7.

AITKEN, M.D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: Opportunities and Obstacles. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. B49–B58.

AJILA, C. M., PRASADA, U.J.S.R. (2009), Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS; L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO, A.; PEDREN, E. M. A. (2009), Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, No. 2, p. 377–390.

AOYAMA H.; HOJO H.; AKAHASHIK, LET A.L. (2005), A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. **Toxicol Sci**, v. 30, p. 59–78.

ATHAYDE SOBRINHO, C., FERREIRA, P.T.O. & CAVALCANTI, L.S.C. (2005), Indutores abióticos. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. p. 51-80.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; MORAES, S. M. D. (1998), Microrganismos associados às sementes de feijão caupi com ênfase à presença de *Macrophomina phaseolina*. Teresina: EMBRAPA, CPAMN, (comunicado Técnico, 88).

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. (2000.), Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M.J. (Org.). A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina: **Embrapa** Meio-Norte, p.120-145.

AYALA M.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHAL T.R. (2008) Fungal enzymes for environmental purposes, a molecular biology challenge. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.15, 172–180.

BARRETO, A. L. H.; VASCONCELOS, I. M.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. M.; MATOS, T. E.; ELOY, Y. R. G.; FERNANDES, C. F.; TORRES, D. C.; FREIRE-FILHO, F. R.; FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA J. T. A. (2005), Infection Process and Host Defense Responses in Compatible and Incompatible Interactions Between Cowpea [*Vigna unguiculata*] and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Plant Sciences** v. 211, p. 168-193.

BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; HENDERSON, W. D.; NICELL, J. A. (1995). Recent advances in treatment of selected hazardous wastes. **Water Quality Journal of Canada**, v. 30, p. 115–125.

BODALO, A.; GOMEZJ. L. (2006) Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. **Chemosphere**, v. 63, p. 626–632.

BOOLAG, J. M.; DEE J.; HUANG P.M. (1998). Formation mechanisms of complex organics structures in soil habitats. **Adv. Agronomy**, v. 63 p. 237- 266.

BRADFORD, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.

BRADLEY D.J.; KJELBORN P.; LAMB C.J. (1992), Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. **Cell** v. 70, p. 21-30.

BRADLEY, D.J.; KJELLBOM P.; LAMB C.J. (1992), Elicitor and wound-induced Oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel, rapid defence response. **Cell**, v. 70, p. 21–30.

BRATKOVSKAJAI; VIDZIUNAITE R; KULYS J. (2004), Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. **Biochemistry**, v. 69, p. 985–992.

BROEKAERT WILLEM F.; FRANK R.G. TERRAS; BRUNO P.A. CAMMUE; JOS VANDERLEYDEN. (1990), An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 55-59.

C.M. AJILAU; J.S. PRASADA RAO. (2009), Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 36-44.

COELHO, R. S. B. 2001, Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, Teresina: Embrapa Meio-Norte, v. 5 p. 321-322.

COELHO, R.S.B. (2001) Doenças fúngicas do caupi. In: **reunião nacional de pesquisa do caupi**, 5, 2001, Teresina. Anais. p.321-322.

CONESA, A.; PUNT P.J.; VANDEN, HONDEL.; CAM J.J. (2002), Fungal peroxidases :molecular aspects and applications. **J Biotechnol**, v.93, p.143–158.

CUSANOVICH ,M. A.; HAZZARD J.T.; MEYERT E. *et al.*, (1989), Electron transfer mechanisms in heme proteins. **J Macromol Sci**, v.26, p. 433–443.

DE SOUZA, S.M.A.G.U., FORGIARINI, E., & DE SOUZA, A.A.U. (2007), Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**,v. 147, p.1073–1078.

DUNFORD, H.B. (1999), Heme peroxidases. **Wiley**, New York, pp141–142

EDUARDO TORRES; MARCELA AYALA. Biocatalysis based on Heme Peroxidases. 1^o edição. **Springer**. 2010, cap 1.

ESPELIE K. E.; FRANCESCHI V.R.; KOLATTUKUDY P.E. (1986), Immunocyto-chemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 87, p. 487-492.

ESPELIE, K.E., FRANCESCHI, V.R.; KOLATTUKUDY, P.E.(1986). Immunocyto-chemical localization and timecourse of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 87, p. 487–492.

FERNANDES, C. B.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. (2006), Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048.

FREIRE FILHO, F.R., ROCHA, M. M., SILVA, K. J. DE NOGUEIRA, M. S. R. (2009), Feijão Caupi: Melhoramento genético, resultados e perspectivas. In: **Anais de I simpósio Nordeste de Genética e Melhoramentos de plantas**.

GIANANTONIO B.; MARZIA B.; BORTOLOTTI C. A.; SOLA M. (2010), Redox Properties of Heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 21- 36.

HAMID M.; REHMAN K. (2009), Potencial application of peroxidases. **Food chemistry**, v. 115, p. 1177-1186.

HAMMERSCHMIDT R; KUC J.(1982), Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 20, p. 61-71.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in *cucumber*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 20, p. 61–71.

HILAIRE E; YOUNG S A; WILLIARD L.H.; M.C. GEE. J.D.; SWEART T.; CHITTOR J.M.(2001), Vascular defense response in rice: peroxidase accumulation in Xylem parenchyma cells and xylem thickening. **Molecular Plant – Microbe Interactions**, v.14, p. 1411-1419.

HILAIRE, E.; YOUNG, S.A.; WILLARD, L.H.; MCGEE, J.D.; SWEAT T. CHITTOOR J.M. et al., (2001), Vascular defence responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 14, p. 1411–1419.

HIRAGA S.; SASAKI K.; ITO H.; OHASHI Y.; MATSUI H. (2001), A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol**, v. 42, p. 462–468.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California**, v. 139, p. 2347.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; PICKARD, M.A.; SMITH, D.W. (2005), Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1758-1770.

JOSÉ, A. R. S., DIAS, N. O., BONFIM, M. P., REBOUÇAS, T. N. H., TAVARES, G. M., SILVA, A. C., NOVAES, Q. S. (2004), Aspectos gerais das anonáceas no nordeste brasileiro. **Encontro sobre anonáceas: geração de emprego e renda**, p. 51-74.

JOSEPH, L. M.; KOO T.T.; MAN W. S. (1998), Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelia growth of *Pseudocercospora* species. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 2119–2124.

JULSING M.; CORNELISSEN S.; BUHLERBET A. L. (2008), Heme iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts?. **Curr Opin Chem Biol**, v.12, p.177–186.

JUTTA, VLASITS., JAKOPITSCH C., BERNROITNER, M., ZAMOCKY, M., FURTMÜLLER, P. G., OBINGER, C. (2010), Mechanisms of Catalase of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 74-81.

KARAM J.; NICELL J.A. (1997), Potential applications of enzymes in wastetreatment.**J. Chem. Technol Biotechnol**, v.69, p.141–153.

KIM Y.; NICELL J. A. (2006), Impact of reaction conditions on laccase catalyzed oxidation of bisphenol. **A. Biores. Technol**, v. 97, p.1431–1442.

KLIBANOV, A.M.; TUT, M.; SCOTT, K.P. (1983), Peroxidase catalyzed removal of phenols from coa conversion wastewater. **Science**, v. 221, p.259–261.

KOBAYASHI S.; FUKUDA,T.; KAWAGUCHIK, ETA L. (1972), Chronic toxicity of 2,4-dichlorophenol in ice: a simple design for checking the toxicity of residual metabolites of pesticides. **J Med**, v. 19, p. 356–362.

KURTS POLITZER, ELBA PINTO S B. (2006), Enzimas industriais e especiais. 1ª Edição. Rio de Janeiro. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). pag. 09.

Kurtz, D. M. Jr. (2006), Avoiding high-valent iron intermediates: superoxide reductase an *drubrerythrin*. **J Inorg Biochem**, v. 100, p. 679–693.

LAEMMLI, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680-685.

LAURA LEVIN , CLAUDIA HERRMANN, VICTOR L. PAPINUTTI. (2008), Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. [Biochemical Engineering Journal](#), v. 8, p. 207-214.

LAVERY, C.B., MACINNIS, M. C., MACDONALD, M. J., WILLIAMS, J. B., SPENCER, C. A., BURKE, A.A., IRWIN, J. G., D' CUNHA, G.B. Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. **Journal of agricultural and food chemistry**. 2010, 58, 8471-8476.

LIN,Z.F.; CHEN ,L.H.; ZHANG, W. Q. (1996). Peroxidase from *I.Cairica* (L) SW. Isolation ,purification and some properties. **Process of Biochemistry**, v. 5, p. 443–448.

LIU J. Z.; SONG H.Y.; WENG L. P.; JIL N. (2002), Increased thermo-stability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. **J Mol Catalyse B- Enzyme**, v.18, p. 225–232.

MAMOUNATA DIAO; NAFISSÉTOU OUÉDRAOGO; LAMINE BABA-MOUSSA; PAUL W. SAVADOGO; AMANI G. N'GUESSAN; IMAEL H.N. BASSOLÉ; MAMOUDOU H. DICKO. (2011), Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. **Biodegradation**, v. 22, p. 389 – 396.

MANU, B. T.; PRASADA RAO, U. J. S. (2009), Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chem**, v. 114, p. 66-71.

MARTINEZ C.; BACCON J.; BRESSON E.; BAISSAC Y.; DANIEL J. JALLOUL. (2000), Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 757-766.

MELLON, J.E. (1991), Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. **Plant Physiology**, v.95, p.14-20.

NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. (1992), Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase catalyzed reaction using additives. **Water Res**, v.26, p. 49–54.

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

OECD (2009) The bioeconomy to 2030: designing a policy agenda. OECD. **report. OECD**, Washington,DC. ISBN-978-92-64-03853-0.

OGUCHI, T.; TAWAKI, S.; UYAMA, H.; KOBAYASHI,S. (1999). Soluble polyphenol. **Macromolecular Rapid Communication**, v.20, p.401–403.

OLSEN, R. L.; LITTLE, C. (1979), The Peroxidase Activity of Rat Uterus. **J. Biochem**, v. 101, p. 333-339.

P. LOPEZ; JUSTINO B. (1995), Lipoxygenase Inactivation by Manothermosonication: Effects of Sonication on Physical Parameters, pH, KCl, Sugars, Glycerol, and Enzyme Concentration. **J. Agric. Food. Chem**, v. 43, p. 620-625.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. (2005), Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 255–26.

QUINTANILLA-GUERRERO, F.; DUARTE VÁZQUEZ M.A.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.E. ET AL., (2008), Polyethyleneglycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 8605–8611.

RANI, D. N.; ABRAHAM, T.E. (2006), Kinetics and thermal stability of two peroxidases isozymes from *Eupatorium odoratum*. **Appl. Biochem Biotechnol**, v. 128, p. 215-235.

REGALADO C.; GARCIA-ALMENDÁREZ B.E.; DUARTE-VÁZQUEZ M. A. (2004), Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochem Rev**, v.3, p. 243–256.

REN S. (2003), Phenol mechanism of toxicaction classification and prediction: a decision tree approach. **Toxicol Lett**, v. 144, p. 313–323.

SARMA, A.D.; OEHRLE, N.W.; EMERICH, D.W. (2008), Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 379, p. 192–195.

SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; CHAE, KEON-SANG. (2003) Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 115-119.

SILVA (2011). Caracterização bioquímica e molecular de uma 2 cys-peroxirredoxina de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Tese de mestrado em bioquímica. **Departamento de bioquímica e biologia moelcular**, UFC, Fortaleza.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA, J. T. A. (2001), Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194.

TAMURA, Y. & MORITA, Y. (1975), Thermal denaturation and regeneration of Japanese radish peroxidase. **J. Biochem.**, 78, 561-71.

TATSUMI, K.; WADA S.; ICHIKAWA, H. (1996), Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. **BiotechnolBioeng**, v. 51, p. 126– 135.

TEÓFILO, E. M. et al., (2008). Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 03, p. 443-448.

THIMMARAJU RUDRAPA; VENKATACHALAM LAKSHMANAN; ROOHIE KAUNAIN; NARAYAN MANDAYAN SINGARA; BHAGYALAKSMI NEELARE (2007), Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Analytical, Nutricional and Clinical Methods**, v. 105, p.1312-1320.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. (1991), Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43-50.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1991), Super fund national priorities list for remediation. **Code of Federal Regulations**, .40CFR423.A.

VALDERRAMA, B.; AYALA, M.; VAZQUEZ-DUHALT R. (2002), Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. **ChemBiol**, v.9, p. 555–565.

WARD, G.; HADAR, Y.; BILKISI *et al.*, (2001), Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. **JBiolChem**, v. 276, p.18734–18741.

Wastewater by using phenoloxidases. **J. Scilnd Res**, v. 59, p. 286–293.

WELINDER, K.G. (1992), Super family of plant,fungal and bacterial peroxidases.**Curr Opin Struct. Biol**, v. 2, p. 388–393.

WELINDERKG,GAJHEDE,M. (1993), Structure and evolution of peroxidases. In:Greppin H, Rasmussen S.K, Welinder K. G. et al (eds) Plant peroxidases: **biochemistry and physiology**. University of Copenhagen and University of Geneve, Geneve, p 35–42.

YANG, Y.; ANDERSON,E.J. (1999). Antimicrobial activity of a porcine myelo peroxidase against plant pathogenic bacteria and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 211–220.

Ye, X.Y.; Ng. T.B. (2002). Isolation of novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of anon-milk peroxidase. **Life Science**, v. 71, p.1667–1680.

YOSHIDA, K.; KAOTHIEN, P.; MATSUI, T.; KAWAOKA, A.; SHINMYO, A. (2002). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 665–670.