

LUCAS MARTINS SANTOS

PURIFICAÇÃO DA PEROXIDASE NA CASCA DE SOJA

Assis

2012

LUCAS MARTINS SANTOS

PURIFICAÇÃO DA PEROXIDASE NA CASCA DE SOJA

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva

Área de Concentração: Ciências Exatas e da Terra

Assis
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Lucas Martins

Purificação da peroxidase na casca de soja / Lucas Martins Santos. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2012.

98p.

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva
Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Bioquímica. 2. Purificação enzimática.

CDD:660
Biblioteca da FEMA

PURIFICAÇÃO DA PEROXIDASE NA CASCA DE SOJA

LUCAS MARTINS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva

Analisador: Dr. Rosângela Aguiar da Silva

Assis
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, pelas bênçãos e as vitórias. Agradeço minha família, principalmente meus pais, por não terem medido esforços para me dar esta oportunidade. Aos meus amigos, por terem passado seus conhecimentos nos momentos que precisei. A todos os professores que transmitiram seus conhecimentos, e contribuíram na minha formação, em especial o professor Idécio Nogueira da Silva, pela orientação com seu conhecimento e compreensão para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao professor, Idécio Nogueira da Silva, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho.

Aos amigos, Marcelo Caetano, Clóvis, Eduardo Gazzolato, Alexandre, Rafael Luiz e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos familiares, Maria Aparecida Santana Martins Santos, Arlindo Pereira dos Santos que me ajudaram muito durante todo esse tempo.

A minha namorada Fernanda Santos de Oliveira pelo fiel esforço e dedicação para realização desse trabalho.

Toda a nossa ciência,
comparada com a
realidade, é primitiva e
infantil – e, no entanto
é a coisa mais preciosa
que temos.

Albert Einstein

(1879 – 1955)

RESUMO

As proteínas são polímeros que apresenta como monômero os aminoácidos. Entre suas diversas funções, destaca-se sua capacidade enzimática, catalisando diversas reações químicas e biológicas. A enzima peroxidase é considerada como hemeproteínas de oxidorreductase, específica para acceptor de hidrogênio, presente nas células animais, micro-organismos e tecidos vegetais. Esta envolvida em diversos campos de aplicação, como por exemplo, para uso de diagnóstico clínico. A casca de soja é atribuída como resíduo do processamento de soja, e considerada como uma importante fonte de peroxidase. O objetivo desse trabalho foi purificar a peroxidase presente na casca de soja. A metodologia de purificação foi baseada por métodos de solubilidade de cooperação de sulfato de amônio – acetona e precipitação fracionada com acetona. Para verificar a pureza da enzima, realizou a análise para encontrar o valor de RZ. O primeiro teste com precipitação de cooperação com sulfato de amônio – acetona apresentou uma atividade de 49,5 U e uma recuperação enzimática de 84,25%. A primeira precipitação fracionada com acetona obteve uma atividade enzimática de 39,6 U, e recuperação de 67,40%. A segunda precipitação fracionada com acetona apresentou uma atividade enzimática de 13,5 U, e uma recuperação de 23%. O RZ da enzima peroxidase foi de 1,03 e a recuperação enzimática da peroxidase utilizando uma metodologia simples e barata foi de 27,3%. De acordo com o RZ da enzima obtido, a enzima peroxidase pode ser comercializada para diferentes aplicações. A metodologia foi eficiente para purificar a enzima peroxidase na casca de soja e corrobora a boa termoestabilidade da enzima.

Palavras - chave: Peroxidase; casca de soja; purificação; recuperação enzimática, valor de RZ.

ABSTRACT

Proteins are polymers which presents amino acid as monomer. Among its many functions, the highlight is its ability of catalyzing various chemical and biological reactions as enzymes. Peroxidase enzyme is considered to Hemeproteins oxidoreductase specific for an acceptor of hydrogen present in animal cells, microorganisms and plant tissues. This enzyme is involved in various application fields, for example for use in clinical diagnosis. Soybean hulls is assigned as residue of soybean processing, and regarded as an important source of peroxidase. The aim of this study was to purify the peroxidase present in soybean hulls. Methodology was based in purification methods of cooperation solubility of ammonium sulfate - fractional precipitation with acetone and acetone fractional precipitation. Enzyme purity was evaluated by RZ value. After first test cooperation precipitation with ammonium sulfate - acetone enzyme showed an activity of 49.5 U and a recovery of 84.25%. After first fractional precipitation with acetone it was obtained an enzymatic activity of 39.6 U, and recovery of 67.40%. After second fractional precipitation with acetone showed it was obtained an enzymatic activity of 13.5 U, and a recovery of 23%. The RZ of enzyme peroxidase was 1.03 and recovery of peroxidase enzyme using a simple and inexpensive methodology was 27.3%. According to the RZ obtained, peroxidase may be utilized in different applications. The methodology was effective to purify the enzyme from soybean hulls and corroborate with good thermostability of the enzyme.

Keywords: Peroxidase; soybean hulls; purification; enzymatic recovery; RZ value.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura e nome dos 20 tipos de aminoácidos.....	21
Figura 2	- Unidades estruturais básicas das proteínas.....	22
Figura 3	- Formação da ligação peptídica.....	23
Figura 4	- Representação esquemática da estrutura primária de uma proteína.....	24
Figura 5	- Representação gráfica da estrutura secundária regular do tipo α -hélice.....	25
Figura 6	- Representação da estrutura secundária regular do tipo folha β -pregueada.....	26
Figura 7	- Representação da estrutura terciária de uma proteína.....	27
Figura 8	- Representação da estrutura quaternária do tipo <i>ribbon</i> da hemoglobina.....	28
Figura 9	- Proteína desnaturada.....	29
Figura 10	- Atuação do uso de catalisador na cinética de reações.....	32
Figura 11	- Mecanismo de uma reação enzimática.....	33
Figura 12	- Efeito do pH na atividade da peroxidase de extratos brutos de abacaxi.....	35
Figura 13	- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase de extratos brutos de abacaxi.....	36
Figura 14	- Velocidade de uma reação enzimática em função da concentração de substrato.....	37
Figura 15	- Diferença de uma inibição competitiva e uma não-competitiva de uma enzima.....	39

Figura 16 - Eletroforese com gel de poliacrilamida.....	42
Figura 17 - Princípio do método de cromatografia de troca iônica.....	44
Figura 18 - Cromatografia de filtração em gel.....	45
Figura 19 - Processo de separação de proteínas por diálise.....	46
Figura 20 - Forma simplificada de funcionamento da técnica de ultrafiltração.....	47
Figura 21 - Princípio do Método de Cromatografia de Afinidade.....	48
Figura 22 - Semente de soja <i>Glycine Max L</i>	53
Figura 23 - Cascas de semente de soja.....	55
Figura 24 - Ciclo catalítico da enzima peroxidase.....	59
Figura 25 - Representação da Estrutura da Ferritoporfirina.....	61
Figura 26 - Estrutura tridimensional da isoenzima C da peroxidase de rabano bravo.....	62
Figura 27 - Coloração positiva da presença de peroxidase no leite.....	71
Figura 28 - Solução inicial sem purificação.....	78
Figura 29 - Precipitação cooperação sulfato de amônio – acetona.....	79
Figura 30 - Primeira precipitação fracionada com acetona.....	81
Figura 31 - Solução enzimática final.....	82
Figura 32 - Formação do precipitado utilizando 1100 rpm.....	83

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS.....	17
2.1	AMINOÁCIDOS COMPONENTES DE PROTEÍNAS.....	18
2.2	POLÍMEROS DE AMINOÁCIDOS: LIGAÇÃO PEPTÍDICA.....	22
2.3	TIPOS DE ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS.....	23
2.3.1	Estrutura Primária.....	13
2.3.2	Estrutura Secundária.....	24
2.3.3	Estrutura Terciária.....	26
2.3.4	Estrutura Quaternária.....	27
2.4	A CARGA ELÉTRICA DAS PROTEÍNAS.....	28
2.5	DESNATURAÇÃO DE UMA PROTEÍNA.....	29
3.	ENZIMAS.....	30
3.1	FUNCIONAMENTO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	31
3.2	ATUAÇÃO DA ENZIMA COMO CATALISADOR.....	32
3.3	NOMENCLATURA.....	33
3.4	FATORES QUE AFETAM A CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	34
3.4.1	Efeito do pH.....	34
3.4.2	Efeito da Temperatura.....	35
3.4.3	Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade Enzimática.	36
3.5	COFATORES.....	38
3.6	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	38
3.7	MÉTODOS PARA QUANTIFICAR UMA ENZIMA.....	40
3.7.1	Absorção a 280 nm.....	40
3.7.2	Método de Lowry.....	40
3.7.3	Método de Bradford.....	41
3.8	MÉTODOS DE FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS.....	41

3.8.1	Eletroforese.....	42
3.8.2	Cromatografia de Troca Iônica.....	43
3.8.3	Cromatografia de Exclusão por Tamanho.....	45
3.8.3.1	Diálise.....	46
3.8.3.2	Ultrafiltração.....	46
3.8.4	Cromatografia de Afinidade.....	47
3.8.5	Solubilidade.....	48
3.8.5.1	Precipitação por sais (Salting- out e Salting- in).....	48
3.8.5.2	Precipitação da proteína por sais de metais pesados.....	49
3.8.5.3	Precipitação da proteína por Solvente Orgânico.....	49
3.8.6	Medição da atividade de uma enzima.....	50
3.8.7	Cálculo de Recuperação Enzimática.....	51
4.	SOJA.....	54
4.1	CASCA DE SOJA.....	55
5.	PEROXIDASE.....	57
5.1	ESTRUTURA DA PEROXIDASE.....	61
5.2	APLICAÇÕES DA ENZIMA PEROXIDASE.....	62
6.	BIOQUÍMICA COMO FERRAMENTA INTERDISCIPLINAR NO ENSINO MÉDIO.....	65
6.1	FORMAÇÃO INICIAL DE PROFESSORES PARA APLICAÇÃO DE INTERDISCIPLINA CIENTIFICA.....	67
6.2	BIOQUÍMICA COMO INTERDISCIPLINA NO ENSINO MÉDIO.	68
6.3	IDENTIFICAÇÃO DA PEROXIDASE NO LEITE: UM TEMA INTERDISCIPLINAR PARA OS ALUNOS DO 3º ANO DO ENSINO MÉDIO.....	70
7.	MATERIAL E REAGENTES.....	72
7.1	MATERIAL.....	72
7.2	REAGENTES.....	72
7.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	73
7.3.1	Formação da solução da casca de semente de soja.....	73
7.3.2	Precipitação por cooperação de sulfato de amônio – acetona.....	73

7.3.3	Precipitação fracionada da solução enzimática II com acetona...	75
8.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	78
9.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS :.....	86

1. INTRODUÇÃO

Proteínas são polímeros que se apresentam como uma sequência de dezenas ou centenas de resíduos de aminoácidos (monômeros) ligados através de ligações peptídicas. Dentre as diferentes funções das proteínas no organismo, destaca-se a sua atividade enzimática ou de catalise biológica (LIMA et al., 2008, p.47).

As enzimas são moléculas orgânicas que estão presentes nas células de organismos vivos, tendo como função específica a catalise de reações químicas. Dão início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisadores (FERREIRA et al., 2010, p.190). O consumo de enzimas divide-se em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico (MOURA, 2010, p.9).

Dentre as enzimas envolvidas nas reações biológicas dos sistemas animais e vegetais destaca-se a peroxidase de plantas que vem despertando grande interesse, pois está envolvida em diversas reações, como por exemplo, sua alta atividade de oxidações de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos, regulação da alongação de células, ligações de polissacarídeos e lignificação (CAMPOS, 2004, p.628).

A peroxidase é usada na determinação enzimática de pequenas quantidades de glicose para seres humanos, especialmente para pessoas que sofrem de diabetes (LOBARZEWSKI; GINALSKA, 1995 apud SOUZA, 2001, p.5). É a enzima mais utilizada para imunoensaios enzimáticos e para diagnósticos médicos (MIRANDA; CASCONI, 1994 apud SOUZA, 2001, p.5).

Casca de semente de soja, considerada um subproduto do processamento de soja, pode ser importante fonte de peroxidase (SANTOS; TOGNOLLI; OLIVEIRA, 2010, p.122).

As vantagens do uso da peroxidase de soja além das tecnologias oxidativas, dispõem baixo custo, maior reatividade, baixa produção de co-produtos, e uma

habilidade de oxidar totalmente compostos orgânicos em dióxido de carbono, água e sais (VIERLING ; WILCOX, 1996 apud SOUZA, 2001, p.5).

A soja é um dos produtos de maior importância para o Brasil, tendo grande destaque na exportação do país, sendo cultivada praticamente em todo território nacional (SILVA et al., 2002 p.67). Pode ser considerada como um alimento completo, pois, apresenta em sua composição; proteínas (40%), carboidratos (35%), lipídios (20%), e resíduos (5%), além de vitaminas e sais minerais (FÉLIX, 2011, p. 23).

Tendo em vista a importância da soja para a economia e nutrição dos brasileiros, bem como as diversas utilidades de aplicação da enzima peroxidase, o objetivo desse trabalho é purificar a peroxidase presente na casca de soja.

2. AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

As proteínas são consideradas como as biomoléculas mais abundantes dos seres vivos e que estão presentes em todas as partes das células, cujo nome é de origem grega *protos*, que significa “a primeira” ou “a mais importante”. (JUNIOR; FRANCISCO, 2006, p.12).

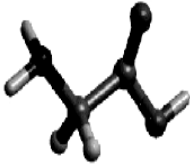
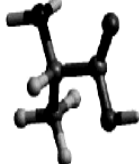

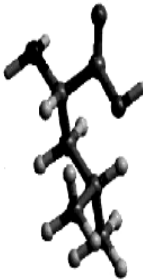

As proteínas são macromoléculas constituídas por unidades menores, denominadas aminoácidos. Uma alimentação balanceada é quando o ser humano inclui uma ingestão adequada de proteínas, presente nas carnes em geral, nos peixes, no leite e derivados, nos ovos e em grãos diversos (feijão, soja). Quando o ser humano se alimenta de proteínas, o tubo digestório digere as proteínas e formam inúmeros aminoácidos livres, que o organismo consome para a síntese de proteínas específicas, sobre o comando dos ácidos nucleicos (PAULINO, 2002, p. 24).

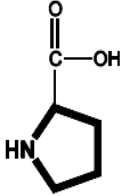
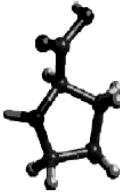
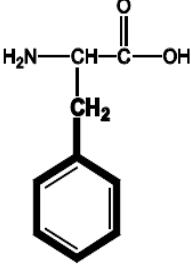

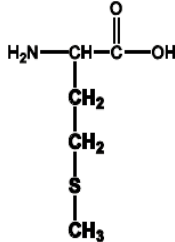
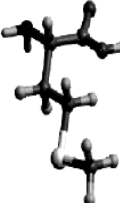
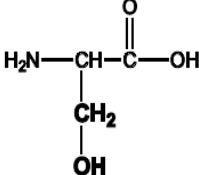
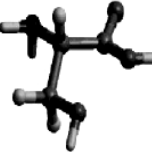
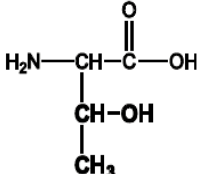

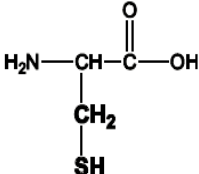
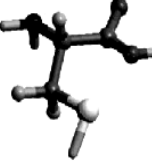
Uma característica bastante importante da proteína, é que ela pode ter diferentes formas, assim sendo relacionada a diferentes funções. Pode-se classificar as proteínas de acordo com as suas funções, denominando-as como: proteínas estruturais, proteínas de defesa, hormônais, catalisadoras e de transporte (LAURENCE, 2005, p. 22).

Conclui que todos os seres humanos tem a capacidade de sintetizar suas próprias proteínas segundo a mensagem genética inscrita no seu DNA (ácido desoxirribonucléico). A função do material genético do organismo é codificar toda a nossa diversidade estrutural e funcional do organismo. (RADAUTI, 2009, p.4902).

2.1 AMINOÁCIDOS COMO COMPONENTES DE PROTEÍNAS

As proteínas são sintetizadas por apenas 20 monômeros diferentes: os aminoácidos. Porém existem inúmeras possibilidades de existir proteínas diferentes, constituídas por esses monômeros. Um fator bastante interessante, é que considerando que a formação de proteínas contém apenas 20 aminoácidos, um de cada tipo pode ser obtido $2,4 \times 10^{18}$ moléculas diferentes. Pelo fato das proteínas serem formadas por diversos tipos de aminoácidos, cada um deles podendo estar presente mais de uma vez, a probabilidade de construção de moléculas diferentes é naturalmente muito maior (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.11). Na figura 1 se encontram os 20 aminoácidos para a formação de uma proteína, com os seus respectivos nomes e estruturas.

Nome (abreviação)	Aminoácidos	
Glicina (Gly)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	
Alanina (Ala)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
Valina (Val)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
Leucina (Leu)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
Isoleucina (Ile)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	

Nome (abreviação)	Aminoácidos	
Prolina (Pro)		
Fenilalanina (Fen)		
Metionina (Met)		
Serina (Ser)		
Treonina (Ter)		
Cisteína (Cis)		

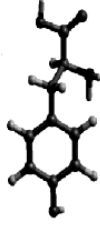
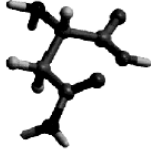
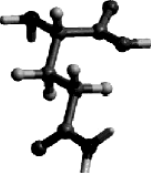
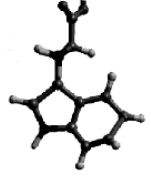
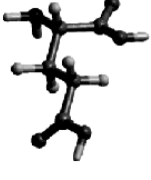
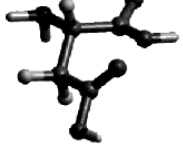
Nome (abreviação)	Aminoácidos	
Tirosina (Tir)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $	
Asparagina (Asn)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	
Glutamina (Gln)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	
Triptofano (Trp)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} \end{array} $	
Ácido glutâmico (Glu)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	
Ácido aspártico (Asp)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	

Figura 1- Estrutura e nome dos 20 tipos de aminoácidos (In: PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005, p. 22-24).

Os aminoácidos são considerados unidades estruturais básicas das proteínas. Um α -aminoácido é constituído de um grupamento amina ($-\text{NH}_2$), uma carboxila (COOH),

um átomo de hidrogênio (H) e um grupamento R (cadeia lateral) que pode ser diferenciado por carga, tamanho e solubilidade em água. Todos esses agrupamentos estão ligados a um átomo de *carbono* α . Este átomo de carbono é chamado de α por ser basicamente adjacente à carboxila ácida (STRYER, 1994, p.18) como se observa na figura 2, abaixo:

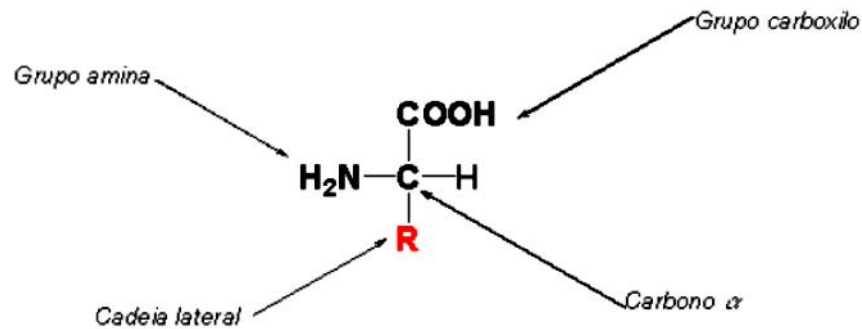


Figura 2- Unidades estruturais básicas das proteínas (In: SANTOS, 2010, p.1)

2.2 POLÍMEROS DE AMINOÁCIDOS: LIGAÇÃO PEPTÍDICA

Dois aminoácidos se unem através da ligação peptídica. O princípio da reação é por síntese de desidratação, onde envolve carboxila de um aminoácido e a amina de outro, e havendo uma perda de água. O produto que se origina quando dois aminoácidos se ligam é chamado de dipeptídeo, o que também tripeptídeo e o tetrapeptídeo são formados, respectivamente por três e quatro aminoácidos. Quando existe um maior número de aminoácidos ligados na molécula, fala-se em polipeptídeo. Geralmente costuma usar o termo proteína para designar peptídeos com número superior a setenta aminoácidos (JÚNIOR; SASSON, 2005, p.65). Na figura 3 abaixo se observa a formação de uma ligação peptídica.

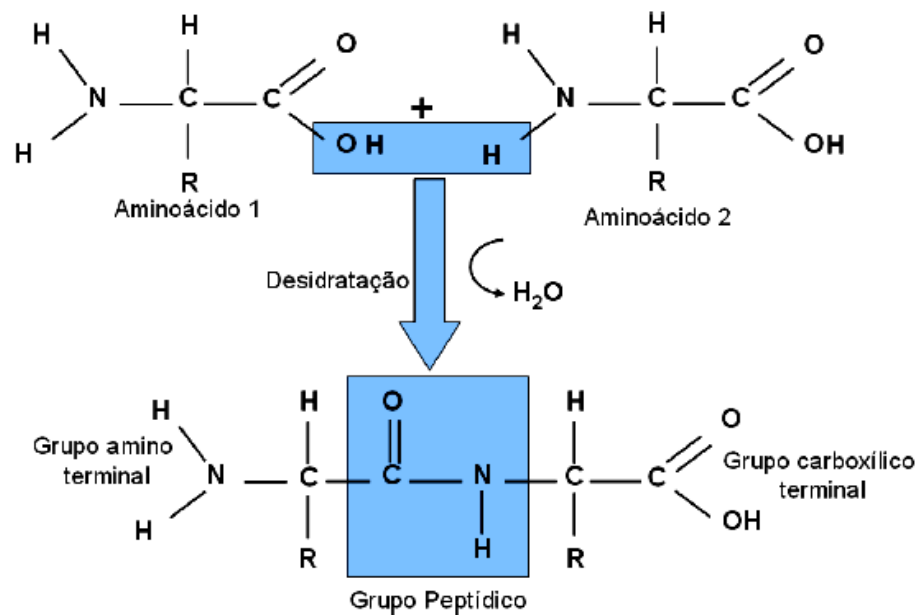


Figura 3- Formação da ligação peptídica (In: DORN, 2008, p.28)

2.3 TIPOS DE ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

A sequência linear de aminoácidos de uma proteína corresponde à estrutura primária, que é determinada geneticamente. No entanto não se pode considerar a molécula de proteína como um fio esticado, mas sim, representado por dobramentos e enrolamentos que são determinados por atrações químicas entre os aminoácidos. Esses dobramentos que acontecem na proteína podem conferir a ela formas tridimensionais, que correspondem às estruturas secundárias e as terciárias. Quando duas ou mais cadeias se juntam para formar uma proteína, temos a estrutura quaternária (LOPES; ROSSO, 2005, p.46).

2.3.1 Estrutura Primária

A estrutura primária de uma proteína se forma através de uma sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, que é determinada geneticamente, sendo específica para cada proteína. Considera-se que a estrutura primária é escrita

na direção amino terminal → carboxila terminal (MARZZOCO; TORRES, 1999, p. 20). A figura 4 seguinte representa uma proteína de estrutura primária.

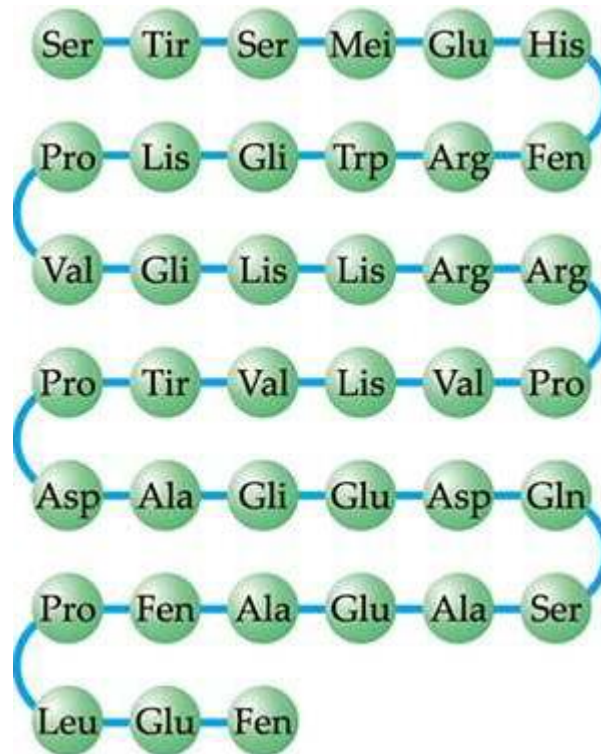


Figura 4- Representação esquemática da estrutura primária de uma proteína.
(In: SILVA, 2010, p.11)

2.3.2 Estrutura Secundária

Quando se trata da estrutura secundária de uma proteína, ela apresenta estruturas regulares bidimensionais formadas por segmentos da cadeia polipeptídica. Existem dois tipos de organizações que são praticamente estáveis: o primeiro é o enrolamento da cadeia ao redor de um eixo e o segundo pela interação lateral de segmentos de uma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes. Estas conformações são conhecidas no ramo bioquímico, respectivamente, de α -hélice e folha β -pregueada, porque foram descobertas nessa ordem (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.20).

A figura 5 representa a α -hélice, que é um arranjo de uma cadeia fortemente retorcida em torno de um eixo imaginário, o qual se pode estabelecer o mais simples arranjo que uma proteína pode assumir com ligações rígidas. Esta estrutura é composta por ligações de hidrogênio em suas laterais de um aminoácido ligado a outro (NELSON;COX, 2002, p.126).

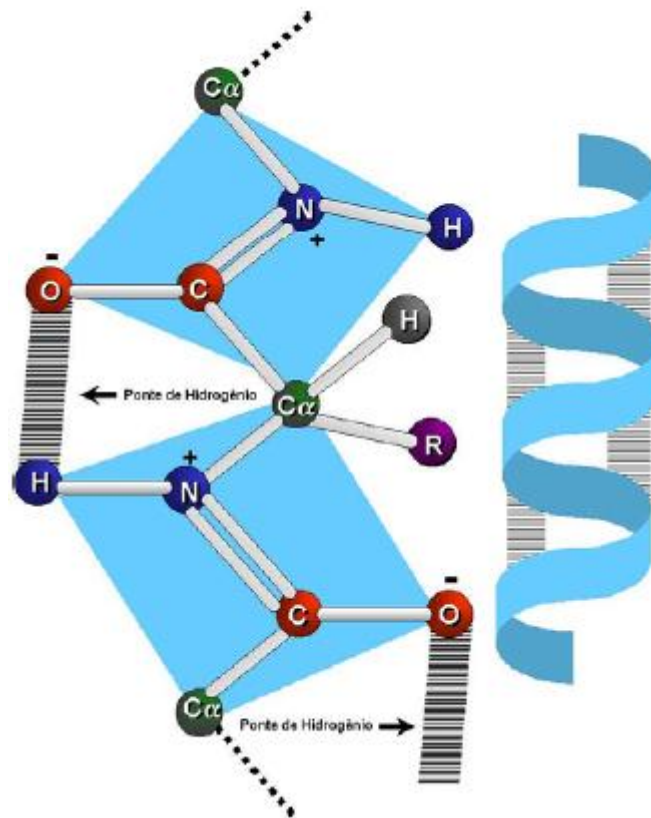


Figura 5- Representação Gráfica da Estrutura Secundária Regular do Tipo α -Hélice (In: VIEIRA, 2003, p.49)

A figura 6 representa a conformação folha β -pregueada, que é uma estrutura secundária mais estendida das cadeias polipeptídicas em forma de ziguezague em vez de helicoidal. Nesta disposição as ligações são formadas entre segmentos adjacentes da cadeia, que, no entanto podem estar próximos ou mesmo longe na sequência linear e que também podem ser paralelas ou antiparalelas com as orientações dos grupos amino iguais ou diferentes (MURRAY et al.,1998, p.45).

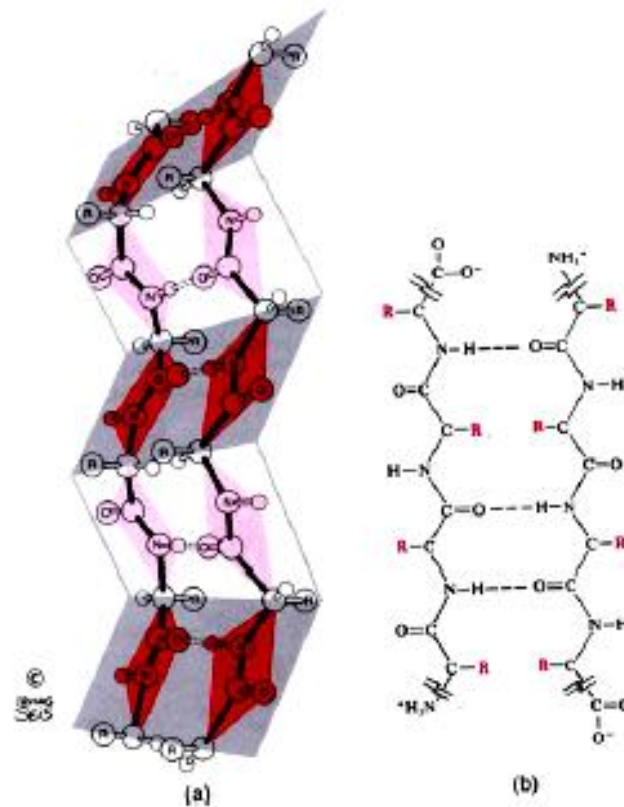


Figura 6- Representação da estrutura secundária regular do tipo folha β -pregueada (In: ULRICH; ARMELIN, 2006, p.18)

2.3.3 Estrutura Terciária

Quando a proteína apresenta dobramento final da cadeia polipeptídica por interação de regiões com estrutura regular (α -hélice ou folha β -pregueada) ou de regiões que não apresentam estrutura definida descreve a estrutura terciária. Já neste nível de organização que se encontra, existem segmentos distantes da estrutura primária que podem aproximar-se e interagir, através de ligações não covalentes (ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas ou iônicas) entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.23). A figura 7 representa a estrutura terciária de uma proteína.



Figura 7- Representação da estrutura terciária de uma proteína (In: JUNIOR, 2012, p.4)

2.3.4 Estrutura Quaternária

As proteínas que contêm mais de uma cadeia polipeptídica mostram um nível adicional de organização estrutural. Cada cadeia polipeptídica em tal proteína é determinada ou chamada de subunidade. Estrutura quaternária refere-se praticamente ao arranjo espacial de subunidades e à natureza de seus contatos (STRYER, 1994, p.34). A figura 8 abaixo representa uma estrutura quaternária.

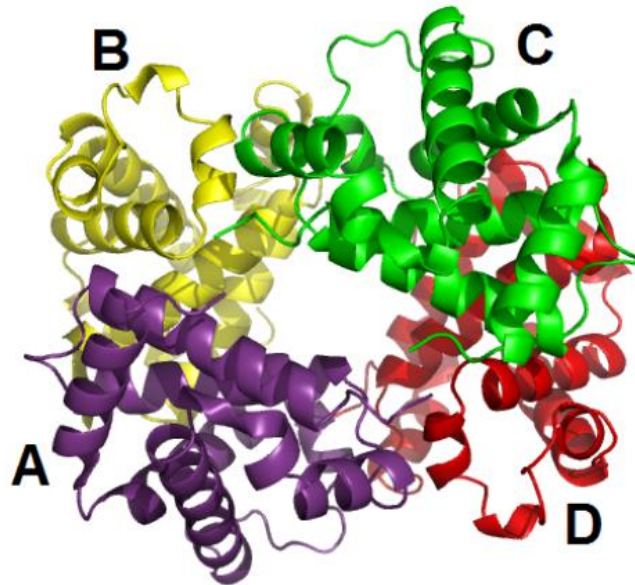


Figura 8- Representação da Estrutura Quaternária do Tipo *Ribbon* da Hemoglobina (In: DORN, 2008, p.37)

2.4 A CARGA ELÉTRICA DAS PROTEÍNAS

Para obter a carga elétrica total de uma proteína, é feito um somatório das cargas apresentadas pelos radicais dos aminoácidos que as compõem. As cargas destes radicais dependem basicamente, por sua vez, do valor de seu pK_a e do pH da solução. Logicamente para cada tipo de proteína existe um determinado valor de pH, conhecido por *ponto isoelétrico* (pI), que representa o número de cargas positivas equivalente ao número de cargas negativas. Deve observar-se que o pI das proteínas não pode ser praticamente calculado a partir dos valores de pK_a dos aminoácidos componentes, devido pelo seu alto número na proteína e, principalmente, porque o valor de pK_a dos aminoácidos varia conforme a sua localização na estrutura da proteína (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.27).

2.5 DESNATURAÇÃO DE UMA PROTEÍNA

A perda de atividade de uma proteína é um fator que deve ser bastante detalhado quando se trata de um experimento com uma proteína, pois quando esta perde a sua atividade biológica, devido ao desenrolamento da cadeia polipeptídica, se diz que ela sofreu uma desnaturação, que pode ser ocasionada por um aquecimento, valores extremos de pH, por solventes orgânicos miscíveis com água, por solutos como a uréia e pela exposição da proteína a detergentes ou simplesmente pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma (LEHNINGER, 1984, p.106). A figura 9 mostra a conformação original da proteína e na forma desnaturada.

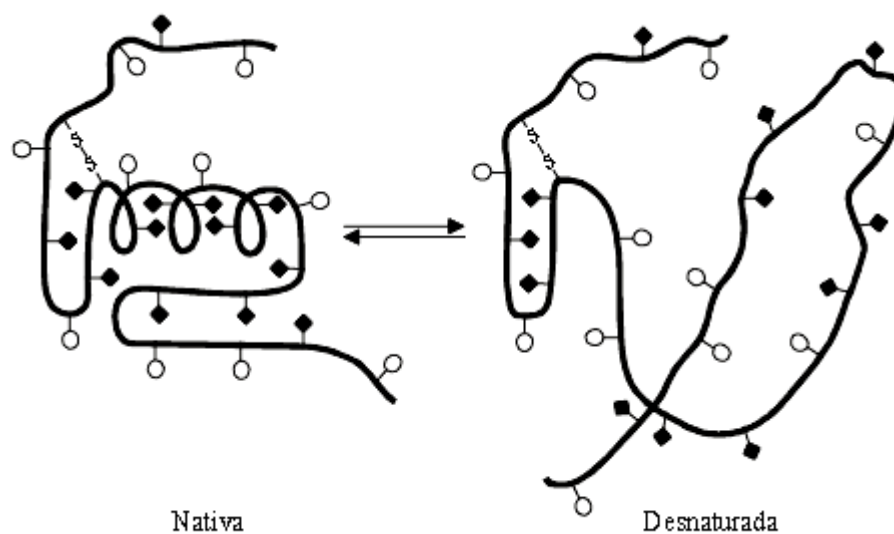


Figura 9- Proteína desnaturada (In: MOTTA, 2005, p.52)

3. ENZIMAS

As enzimas são consideradas responsáveis praticamente por todas as atividades químicas que podem ocorrer nos seres vivos. Elas atuam no organismo como *catalisadores*, que traz referência a um termo usado pelos químicos para poder descrever qualquer substância que basicamente sem se alterar, regulam a velocidade de uma reação química. Uma característica importante da enzima, é que ela pode ser usada várias vezes. Tipicamente, as enzimas são bastante efetivas em quantidades muito pequenas. Uma única molécula de enzima pode de certa maneira catalisar milhares de reações por segundos.

No nosso organismo, pelo fato das enzimas atuarem como catalisador, as células realizam reações químicas que, de outra maneira, exigiriam uma grande quantidade de calor. O fato do calor aumentar a velocidade das reações, é porque provoca um aumento na aceleração do movimento das moléculas; quanto maior for a rapidez de movimentos de reagentes, aumenta a probabilidade de que se choquem as moléculas com energia suficiente para provocar uma reação química (CURTIS 1977, p.64).

Agora considerando o tamanho de uma enzima, ela pode apresentar massa molar variada por cerca de doze mil até acima de um milhão. Podendo considera-las muito grandes, quando comparadas com os substratos ou com os grupos funcionais sobre os quais agem. Algumas enzimas são formadas por cadeias polipeptídicas e não contêm nenhum outro grupo químico além de resíduos de aminoácidos. Outras para terem atividade necessitam da presença de um cofator (LEHNINGER, 2007, p.358).

Atualmente, são conhecidas mais ou menos cerca de duas mil enzimas, sendo algumas delas comercializadas na forma pura e cristalina. O seu uso em química analítica e em outras áreas similares é bastante desenvolvido, e com isso permite a determinação de vários substratos (LASKIN, 1985, p.51).

3.1 FUNCIONAMENTO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para explicar a cinética de reação de uma enzima, primeiro deve-se recordar que a quantidade de energia associada à molécula individual em uma população, a temperatura constante é muito variável e pode ser caracterizada por uma curva em forma de sino. No ramo químico, existem moléculas que são muito ricas em energia, mas também existem umas que são muito pobres, mas a maioria tem conteúdo de energia próximo a um valor médio. Uma reação química, tal como $A \rightarrow P$, ocorre, pois certa fração de moléculas de A, em qualquer momento considerado, possui mais energia interna que o restante da população, energia suficiente para levá-las ao topo da *colina de energia*, uma forma reativa que é conhecida de **estado de transição** (LEHNINGER, 1984, p.156).

A energia de ativação de uma reação é considerada como uma quantidade de energia em calorias necessária para que possa levar todas as moléculas de 1 mol de uma substância, a uma dada temperatura, ao estado de transição, no topo da barreira energética (LEHNINGER, 1984, p.156).

Para que a velocidade de uma reação seja aumentada, existem três caminhos para que isso ocorra; aumento da temperatura, aumento da concentração de reagentes e o uso de catalisadores. Quando se aumenta a temperatura de uma reação, faz com que aumente o número de moléculas que podem reagir, tanto por elevação da sua energia cinética, como também por aumento da frequência de colisões. Outra forma de aumentar a velocidade de reação é usar altas concentrações de reagentes, pois se dobrar a concentração de reagente, aumentara praticamente a probabilidade das colisões, assim fazendo com que as moléculas se choquem com maior facilidade para formar o produto (MURRAY et al., 1998, p.76).

Existe também uma maneira de acelerar a velocidade de uma reação química, que é o caso de diminuir a energia de ativação (um número maior de moléculas estará em condições de reagir), que pode ser obtida na presença de catalisadores, e é de certa maneira o processo empregado pelos seres vivos para acelerar suas reações químicas. Os catalisadores são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação, e o fato deles serem bastante úteis, é que na sua utilização não ocorre à

alteração na proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e um fato bastante curioso é que não são consumidos durante o processo. Podemos resumir que todas as moléculas dispõem de proteínas capazes de fazer função catalítica: são as *enzimas*, que, na verdade, catalisam praticamente todas as reações químicas que ocorrem nos seres vivos (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.62).

Na figura 10 abaixo, mostra como o uso de catalisadores, faz com que a velocidade de uma reação aumente.

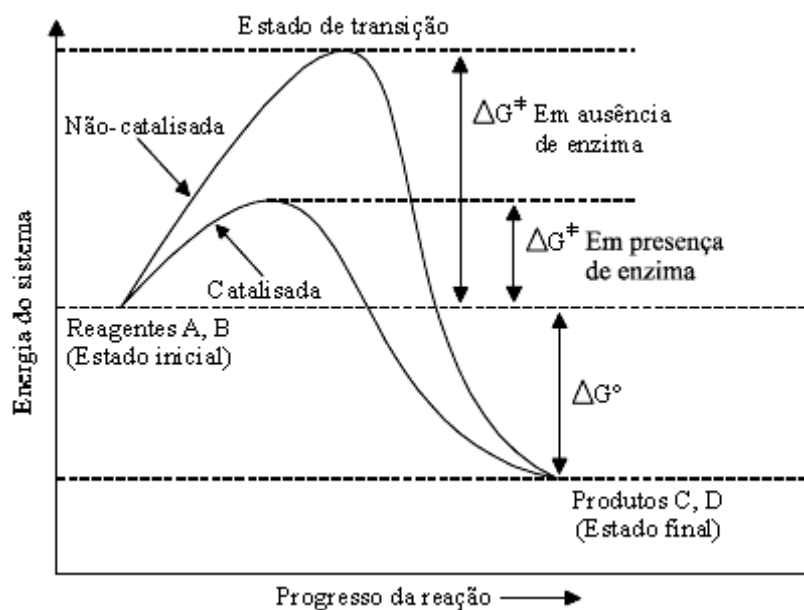


Figura 10- Atuação do uso de catalisador na cinética de reações (In: MOTTA, 2005, p.76)

3.2 ATUAÇÃO DA ENZIMA COMO CATALISADOR

Praticamente, para que uma enzima possa atuar como catalisador, ela deve primeiro ligar o(s) substrato(s), e depois baixar a energia de ativação de modo que a reação possa ocorrer a uma velocidade maior do que aconteceria na ausência de catalisador. O modelo **chave-fechadura** é uma teoria considerada clássica que explica como o substrato se liga à enzima, em que o sítio de ligação do substrato na

enzima é uma entidade rígida e só um composto com uma forma bastante específica se encaixará, analogamente uma fechadura (enzima) permite que apenas uma chave (substrato) faça um contato correto (DEVLIN, 2007, p.364). A figura 11 representa o mecanismo de uma reação enzimática, ilustrando como ocorre o modelo chave-fechadura.

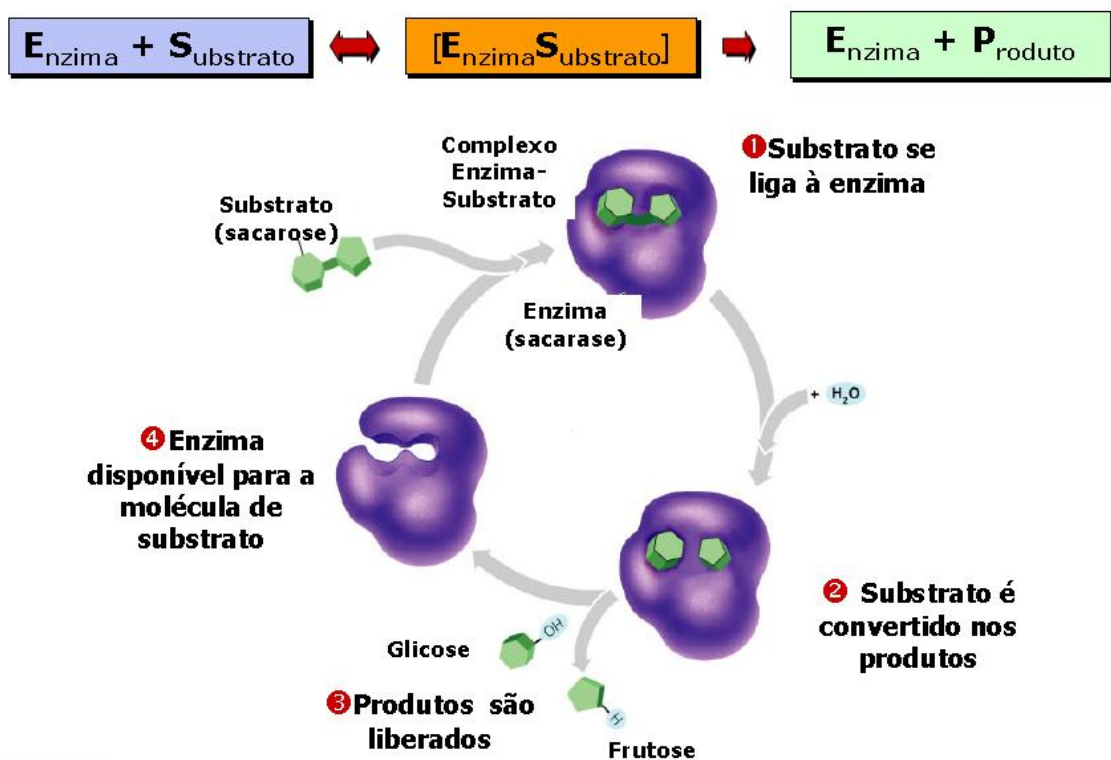


Figura 11- Mecanismo de uma reação enzimática (In: CHAVES; FARIAS, 2008, p.10)

3.3 NOMENCLATURA

Uma enzima apresenta dois tipos de nomes. O primeiro é a existência de seu nome curto ou nome que é recomendado, conveniente para o uso no dia-a-dia. O segundo é o nome sistemático, que é mais completo, pois é usado quando a enzima deve ser identificada sem ambiguidade. Quando a enzima apresenta seu nome recomendado

mais comumente tem no final o sufixo “ase” unido ao substrato da reação, por exemplo, glicosidase, uréase, sacarase. O nome sistemático se deve a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) que desenvolveu um sistema de nomenclatura no qual as enzimas são divididas em seis classes principais; oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (CHAMPE; HARVEY, 1996, p.53). A tabela 1 a seguir demonstra as funções específicas de cada enzima das seis classes citadas.

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxidorredutases	Reações de oxidação-redução
Transferases	Transferências de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Remoção de grupos para formar ligações duplas
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

Tabela 1- Representação das funções das classes enzimáticas

3.4 FATORES QUE AFETAM A CATÁLISE ENZIMÁTICA

Uma enzima pode ser isolada da célula, e ser estudada para desvendar suas propriedades em tubos de ensaio (in vitro). Diferentes enzimas mostram suas respostas diferentes às alterações na concentração do substrato, temperatura e pH (CHAMPE; HARVEY, 1996, p.57).

3.4.1 Efeito do pH

Uma vez que as enzimas são proteínas, mudanças de pH podem afetar drasticamente o caráter iônico dos aminogrupos e também dos grupos carboxílicos da proteína, e portanto, o sítio catalítico e a conformação de uma enzima. Pode também considerar que além de ocorrer os efeitos puramente iônicos, valores baixos ou altos de pH podem chegar a causar desnaturação considerável e por

consequência causar uma possível inativação da proteína enzimática. Podemos dizer que uma vez que muitos substratos apresentam caráter iônico (por exemplo, ATP, NAD⁺, aminoácidos e CoASH), o sítio ativo de uma enzima pode precisar de espécies iônicas determinadas para atingir uma atividade ótima (CONN; STUMPF, 1980, p.142)

Os efeitos são provavelmente, os principais determinantes de uma típica correlação com atividade enzimática-pH. Assim, no gráfico obtêm-se uma curva num formato de sino, com um platô relativamente pequeno e velocidades de decréscimo acentuadas em qualquer dos lados. O platô é conhecido usualmente como sendo a faixa de *pH ótimo* (CONN; STUMPF, 1980, p.142). A figura 12 indica a relação enzimática com o pH.

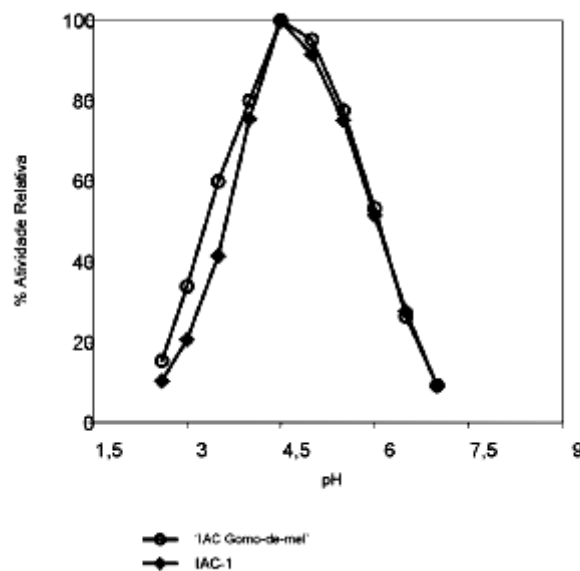


Figura 12- Efeito do pH na atividade da peroxidase de extratos brutos de abacaxi (BRITO et al., 2005, p.246)

3.4.2 Efeito da Temperatura

Fatores do tipo: pH, força iônica e a presença ou a ausência de ligantes podem ser responsáveis para causar efeito na temperatura. Os substratos basicamente protegem a enzima da desnaturação pelo calor (JUNIOR, 2001, p.11).

De acordo com estudos experimentais, acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares, enzimas inclusive, são desnaturadas pelo calor (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.67).

Em um processo de desnaturação térmica pode-se concluir que a enzima perde a sua atividade biológica. Considera-se que toda enzima apresenta uma temperatura ótima, em razão da enzima obter sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima pode apresentar uma atividade constante por um período de tempo (JUNIOR, 2001, p. 11). A figura 13 representa a relação da atividade da enzima com o aumento da temperatura.

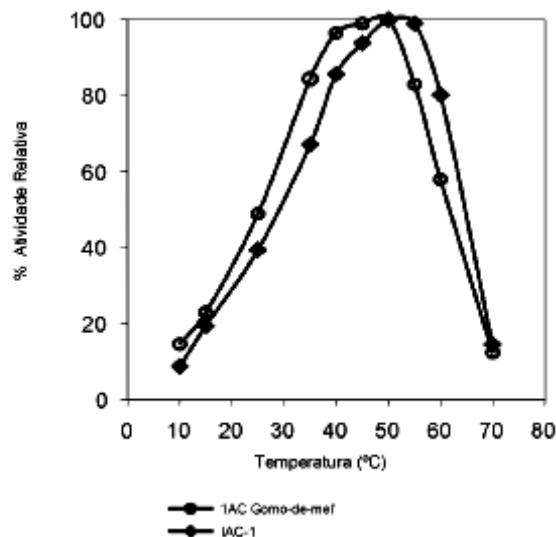


Figura 13- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase de extratos brutos de abacaxi (In: BRITO et al., 2005, p.246)

3.4.3 Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade Enzimática

Um fator considerado principal para afetar a velocidade de uma reação *in vitro*, catalisada por uma enzima purificada, é a concentração do substrato, [S]. Entretanto, estudar e entender um pouco dos efeitos da concentração do substrato na catálise enzimática é complicado, pois pode haver uma variação da [S] durante o curso de uma dada reação, na medida em que o substrato é convertido em produto.

Uma abordagem simplificada que pode ser realizado com experimentos cinéticos consiste em medir a **velocidade inicial** da reação, designada por V_0 , quando a concentração de substrato é praticamente muito maior que a concentração de enzima, $[E]$. Assim quando ocorrer um tempo de reação suficientemente curto, as mudanças na concentração de substrato serão desprezíveis, portanto a $[S]$ é considerada constante (NELSON;COX, 2002, p.199).

Quando a concentração da enzima é constante, a velocidade de reação aumenta com o aumento da concentração do substrato, até que seja atingida uma velocidade máxima. Por outro lado, se tratando das reações não catalisadas, elas não apresentam este efeito de saturação. Em 1913, Leonor Michaelis determinou a **velocidade máxima** de uma reação enzimática em função da formação de um complexo ES (enzima-substrato) distinto. Quando a concentração é suficientemente alta de substrato, os centros catalíticos (sítio ativo) são preenchidos e, então, a velocidade de reação alcança um máximo. Apesar de ser considerado um pouco indireto, esta é a evidência é considerada a mais geral da existência do complexo ES (STRYER, 1994, p.178). A figura 14 demonstra a velocidade de uma reação enzimática, em função da concentração do substrato.

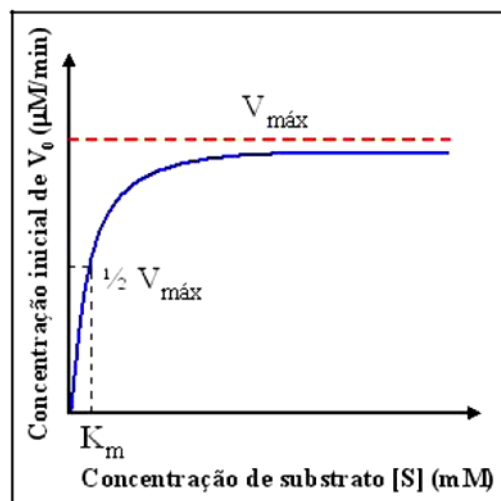


Figura 14- Velocidade de uma reação enzimática em função da concentração de substrato (In: MARIOTTO, 2006, p.2)

Um fator determinante é que a curva que expressa à relação entre $[S]$ e V_0 tem em geral a mesma forma para a maioria das enzimas, que é representado

algebricamente pela equação de Michaelis-Menten, no qual esta apresentada pela form.(1).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Os termos importantes são [S], V_0 , $V_{\text{máx}}$ e uma constante chamada de Michaelis, K_m (determina a afinidade da enzima pelo substrato). Todos os termos que foram correlacionados na fórmula de Michaelis-Menten são facilmente medidos experimentalmente (NELSON; COX, 2002, p.200).

3.5 COFATORES

Considera-se que um grande número de enzimas necessita de um componente adicional antes que a proteína enzimática possa exercer suas funções catalíticas. Cofator é um termo geral que inclui esse componente. Cofatores podem ser divididos mais livremente em três grupos que inclui: (a) **grupo prostético** (considerado como um cofator que esta firmemente ligada à proteína enzimática), (b) **coenzimas** (uma molécula orgânica pequena, termoestável, que facilmente pode dissociar da proteína enzimática), (c) **ativadores metálicos** (representado por cátions metálicos mono ou divalentes como K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+} ou específicos para a catálise, como; Fe, Cu, Ni, Co, Zn, Se e outros) (CONN; STUMPF, 1980, p.153).

3.6 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Quando se pensa em inibição enzimática, grande parte das enzimas pode ser envenenada ou inibida por certos reagentes químicos. Através do estudo de

inibidores enzimáticos, pesquisadores têm obtido valiosas informações que se diz respeito a especificidade pelo substrato das enzimas, o tipo de natureza dos grupos funcionais no sítio ativo, e o tipo de mecanismo da atividade catalítica. Conhecimentos sobre os inibidores enzimáticos também tem dado uma grande importância na elucidação das vias metabólicas celulares. Além disso, a medicina esta utilizando algumas drogas que podem ter a função de inibir certas enzimas em células doentes. Praticamente existem dois grandes tipos de inibidores enzimáticos: irreversíveis e reversíveis (LEHNINGER, 1984, p.163).

Formação de ligações covalentes com grupos específicos de enzimas, por exemplo, os efeitos neurotóxicos de certos inseticidas, são considerados como sendo inibição irreversível. Os inibidores reversíveis atuam de forma diferente, pois liga às enzimas através de ligações não covalentes e são classificados como competitivos e não-competitivos. O inibidor competitivo tem como principio ligar reversivelmente ao mesmo sítio que o substrato, assim competindo com o substrato por aquele sítio. A inibição não-competitiva age de maneira diferente, pois o inibidor e substrato ligam-se em diferentes sítios na enzima, simplifcadamente o inibidor não-competitivo pode se ligar à enzima livre ou até mesmo ao complexo ES, inibindo a reação (CHAMPE; HARVEY, 1996, p.60).

A figura 15 representa o modelo de como o inibidor age na enzima, assim inibindo a reação catalisada.

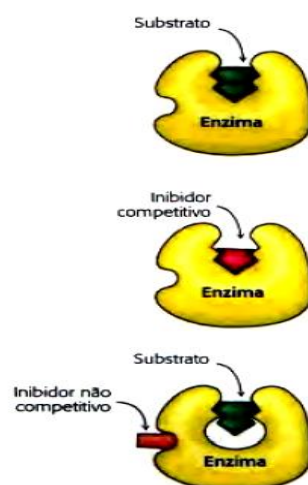


Figura 15- Diferença de uma inibição competitiva e uma não-competitiva de uma enzima (In: STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2002, p. 221)

3.7 MÉTODOS PARA QUANTIFICAR UMA ENZIMA

Durante os processos de fracionamento protéico, o mais importante requer a recuperação da proteína em estudo, seja pela atividade enzimática, (se ela for uma enzima) pela bioatividade de uma proteína não enzimática ou também por algum método que seja capaz de quantificar o componente desejado. Alguns métodos que são utilizados estão descritos na literatura para a quantificação das proteínas, em materiais biológicos já que as proteínas constituem uma grande classe heterogênea de macromoléculas (BRÁZ, 2008, p.21).

3.7.1 Absorção a 280 nm

É um tipo de método muito utilizado para traçar um perfil protéico após uma amostra ter sido submetida a uma cromatografia de coluna. A vantagem desse método são a rapidez e o fato de não destruir as proteínas das amostras. As principais desvantagens são: método pouco quantitativo, pois a falta de alguns aminoácidos (tirosina, fenilalanina, triptofano) pode fazer com que não seja detectado e, também o método sofre uma forte interferência de ácidos nucléicos (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.197).

3.7.2 Método de Lowry

Têm como princípio básico, a formação de um complexo cobre-proteína e na redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos resíduos de tirosina e triptofano das proteínas (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.197). Um fator determinante é a sensibilidade e a precisão que esse método pode apresentar, e assim caracterizando as vantagens de utilizar este procedimento, mas o tempo que ocorre esta reação, instabilidade que pode apresentar dos reagentes, desnaturação

irreversível e interferência de muitas substâncias, caracterizam suas desvantagens (BRÁZ, 2008, p.22).

3.7.3 Método de Bradford

É um método considerado rápido e sensível para quantificar as proteínas utilizando o princípio de ligação proteína-corante. A cor do *coomassiebrilliant blue G250* em solução ácida diluída muda proporcionalmente à ligação do corante às proteínas. As principais desvantagens que existem nesse método são; sua rapidez, simplicidade e o fato de acabar sofrendo poucas interferências (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.197).

3.8 MÉTODOS DE FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS

Existem vários métodos de fracionamento de uma enzima, para que ela seja purificada, assim desenvolvendo seu papel catalítico com eficiência. Para conseguir purificar uma proteína (enzima) até obtenção de uma fração homogênea, são necessárias muitas etapas de fracionamento, o que pode tornar o procedimento mais demorado e caro. Além disso, um fator determinante é que quanto mais etapas forem necessárias para a purificação, menor pode-se dizer que será a recuperação protéica. Em algumas literaturas, existem descrições de procedimentos de purificação nos quais, ao final, apenas 5% da proteína desejada foi totalmente recuperada. Em certas situações, para deixar o processo mais barato e econômico, não utiliza uma fração homogênea para trabalho, e sim, apenas uma purificação parcial do extrato protéico bruto é realizado. (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.212).

3.8.1 Eletroforese

Uma molécula carregada pode-se mover quando um campo elétrico é aplicado. Esse fenômeno é conhecido de eletroforese, o que oferece um meio poderoso de separação de proteínas e também outras macromoléculas, tais como DNA e RNA. As separações eletroforéticas podem ser quase sempre executadas em géis (poliacrilamida) ou em suportes sólidos como o papel ao invés de solução livre, por dois motivos; os géis tem capacidade de suprimir as correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura, o que é necessário para que a separação seja eficiente e em segundo, os géis também servem de peneiras moleculares que acentuam a separação (STRYER, 1994, p.44). A figura 16 demonstra como esse método de fracionamento funciona.

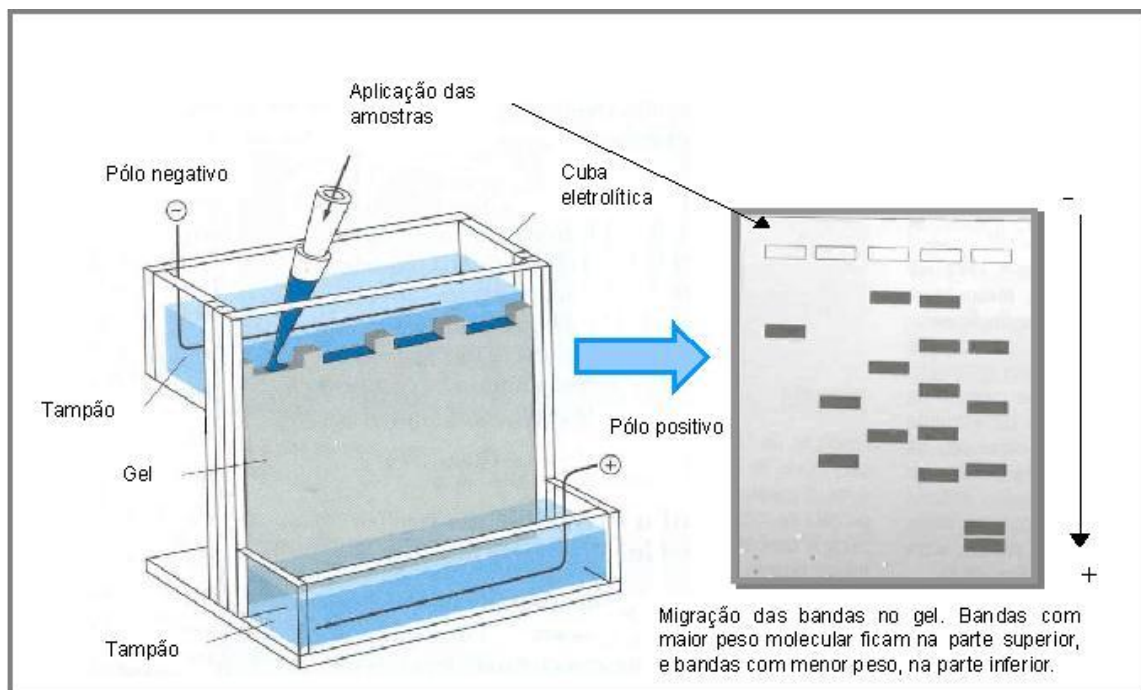


Figura 16- Eletroforese com gel de poliacrilamida
(In:http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06f1.htm)

3.8.2 Cromatografia de Troca Iônica

Essa técnica de separação explora um campo, que abrange a existência de diferenças no sinal e a magnitude das cargas elétricas líquidas das proteínas em um determinado pH. A matriz da coluna de cromatografia de troca iônica é apresentada por um polímero sintético que apresenta grupos carregados ligados a ela; as que possuem grupos aniônicos ligados são caracterizadas por trocadoras catiônicas, e as com grupos catiônicos ligados são denominados trocadoras aniônicas. Para fazer a proteína adquirir uma afinidade pelos grupos carregados da coluna é necessário um valor de pH determinante para proteína se ligar a matriz. O pH determina o estado de ionização da molécula e pela concentração dos íons salinos livres da solução envolvente que com ela competem. A separação pode ser ótima alterando-se o pH ou a concentração salina da fase móvel de modo a desenvolver um gradiente de pH ou um gradiente salino (NELSON; COX, 2002, p.102).

A tabela 2 demonstra alguns tipos de resinas de cromatografia de troca iônica utilizadas para purificação de proteínas.

Nome	Tipo	Grupo Ionizável	Características
Dowex1	Resina de poliestireno fortemente básica	$\text{CH}_2\text{n}+(\text{CH}_3)_3$	Trocadora Aniônica
Dowex 50	Resina de poliestireno fortemente ácida	SO_3H	Trocadora Catiônica
Deae – Celulose	Básica	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Fraciona proteínas neutras e ácidas
CM – Celulose	Acídica	CH_2COOH	Fraciona proteínas neutras e básicas

Tabela 2- Algumas resinas comuns utilizadas em cromatografia de troca iônica de proteínas

A cromatografia de troca iônica é um método mais amplamente utilizado para que se deseje separar, identificar e quantificar cada um dos aminoácidos em uma mistura deles. Essa técnica também tem a capacidade de explorar as diferenças no

comportamento ácido-base dos aminoácidos, mas fatores adicionais contribuem bastante para efetividade do processo (LEHNINGER, 1984, p.81).

Existe também um tipo particular de cromatografia de troca iônica que é a **focalização isoelétrica**. Esse método tem como intuito separar as proteínas através do resultado da formação isocrática de um gradiente interno de pH nas colunas trocadoras de íons. Se um tampão de determinado pH flui através de uma coluna trocadora de íons equilibrada e com um segundo tampão como outro pH, um gradiente é gerado à medida que um tampão se mistura com o outro, e as proteínas ligadas à resina serão eluídas dependendo de seus pI's (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.197).

A figura 17 abaixo demonstra como funciona a técnica de fracionamento por troca iônica.

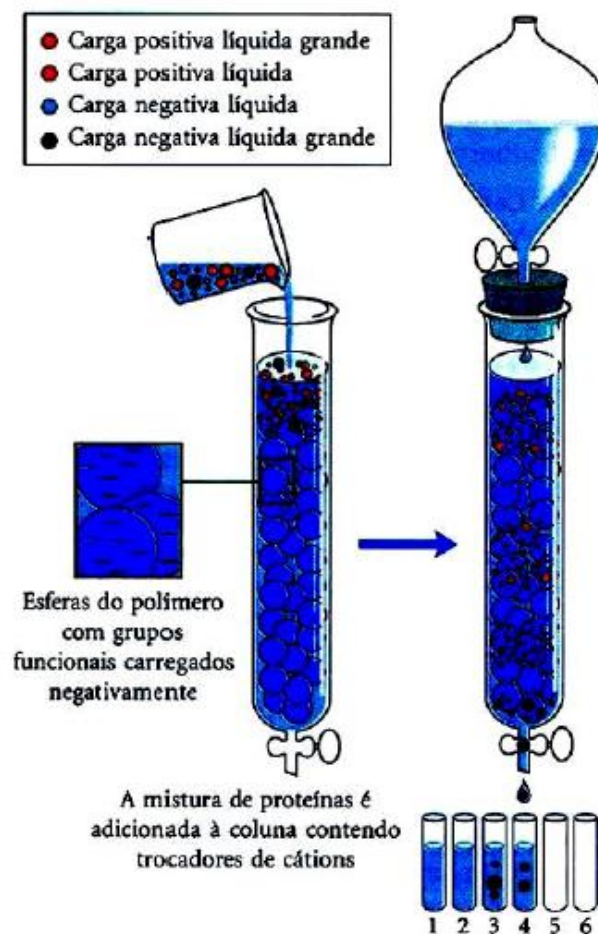


Figura 17- Princípio do Método de Cromatografia de Troca iônica (In: HENRIQUE, p. 58)

3.8.3 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Essa técnica pode também ser chamada de filtração em gel, e ela tem a capacidade de separar as proteínas de acordo com seus tamanhos. Para matriz da coluna é utilizado um polímero que contém ligações cruzadas com poros de um determinado tamanho. As proteínas maiores migram mais rapidamente do que as menores por serem grandes demais para penetrar nos poros das esferas, o que faz com que se obtenha um percurso mais direto através da coluna. As proteínas que são menores penetram nos poros do polímero e são retardadas pelo caminho mais tortuoso que executam através da coluna (NELSON; COX, 2002, p.102). A figura 18 demonstra como a cromatografia de exclusão age para que as proteínas sejam separadas.

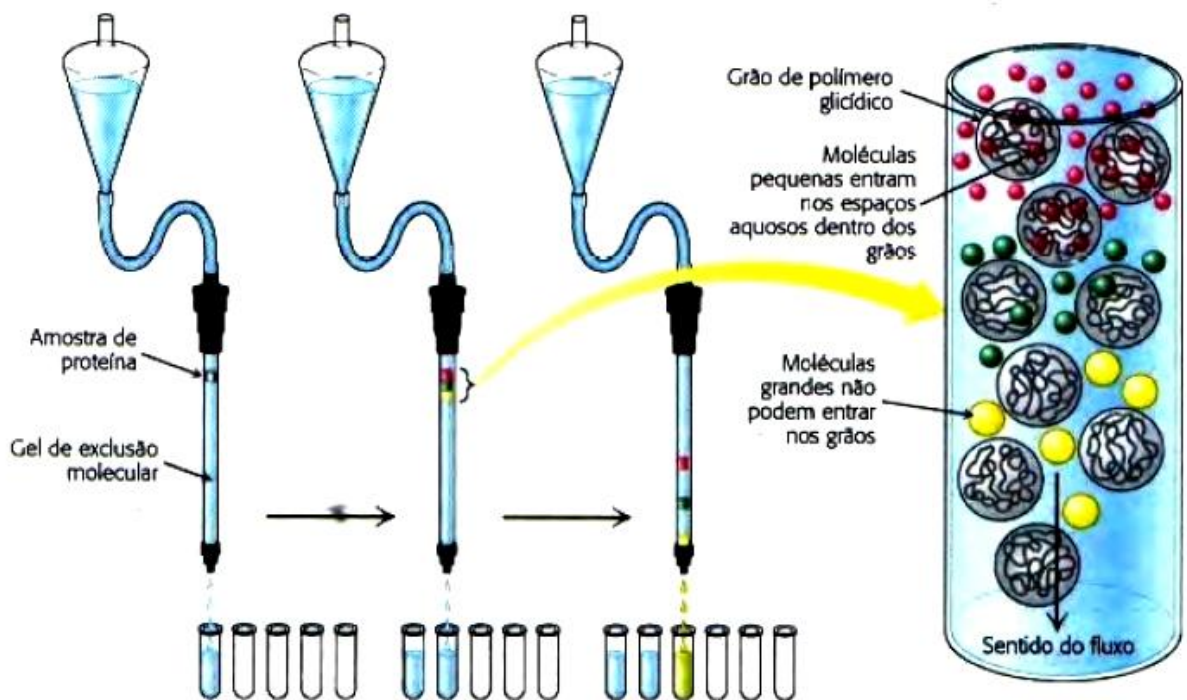


Figura 18- Cromatografia de filtração em gel (In:STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2002, p. 85)

3.8.3.1 Diálise

Também é outra técnica que separa as moléculas de acordo com o seu tamanho através da utilização de membranas contendo poros de dimensões inferiores aos tamanhos das macromoléculas (membranas semipermeáveis). Esses poros permitem que moléculas pequenas, tais como solventes, sais e metabólitos pequenos, possam difundir através da membrana, mas que também podem impedir a passagem de moléculas maiores. O celofane (acetato de celulose) é o material que mais é utilizado em diálise (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.202). A figura 19 abaixo representa a técnica de diálise.

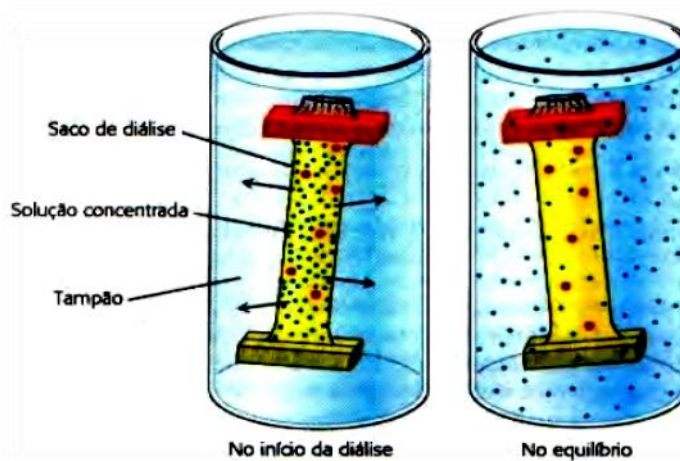


Figura 19- Processo de separação de proteínas por diálise (In: STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2002, p. 85)

3.8.3.2 Ultrafiltração

Esse é um método que tem como base utilizar a pressão de um gás para forçar o líquido através de uma membrana. Os poros da membrana são aqueles que permitem que as moléculas de proteínas passem, e assim um fracionamento é realizado. Moléculas que são maiores são retidas na membrana e a solução torna-se muito mais concentrada do que a solução original, visto que a água pode passar pela membrana (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.203). Como já foi esclarecido,

esse método de ultrafiltração também pode ser aplicado para a purificação de proteínas de acordo com o tamanho das moléculas. Apesar de ser uma técnica atrativa para purificação, na prática não é muito viável, pois a resolução da técnica é muito baixa. A explicação para isso resulta porque a distribuição do tamanho dos poros não é uniforme. As moléculas que são lineares passam mais facilmente pela membrana do que as globulares (HARRIS, 1994; KILIKIAN, 2001 apud WEINGARTNER, 2010, p.54). A figura 20 apresenta de uma forma simples, de como é o princípio da técnica de ultrafiltração.

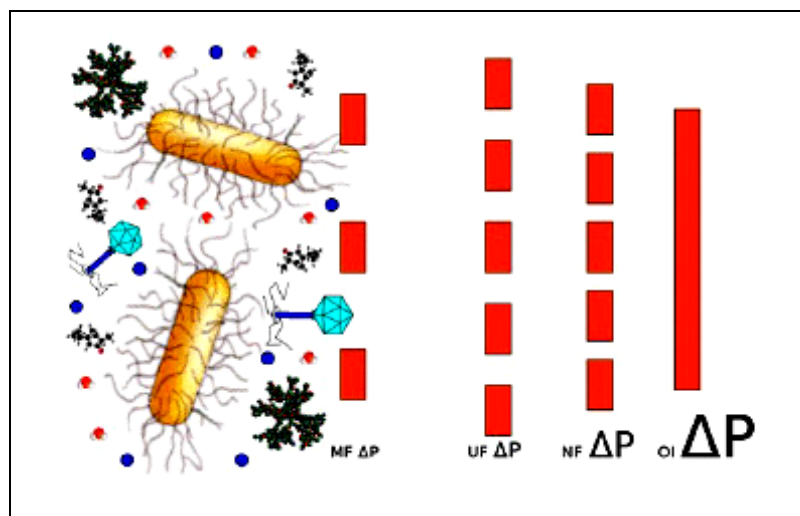


Figura 20- Forma simplificada de funcionamento da técnica de ultrafiltração
(In: AMARAL; COELHO, 2006, p. 24)

3.8.4 Cromatografia de Afinidade

O ponto chave desse princípio é ligar a molécula pela qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel, sendo a mais utilizada no processo a agarose, um polímero de açúcares encontrado em algas vermelhas. No caso da enzima, o ligante tem como intuito de ser o substrato, o produto ou o inibidor competitivo (MARZZOCO; TORRES, 1999, p. 34). A figura 21 representa de maneira simplificada o fracionamento por cromatografia de afinidade.

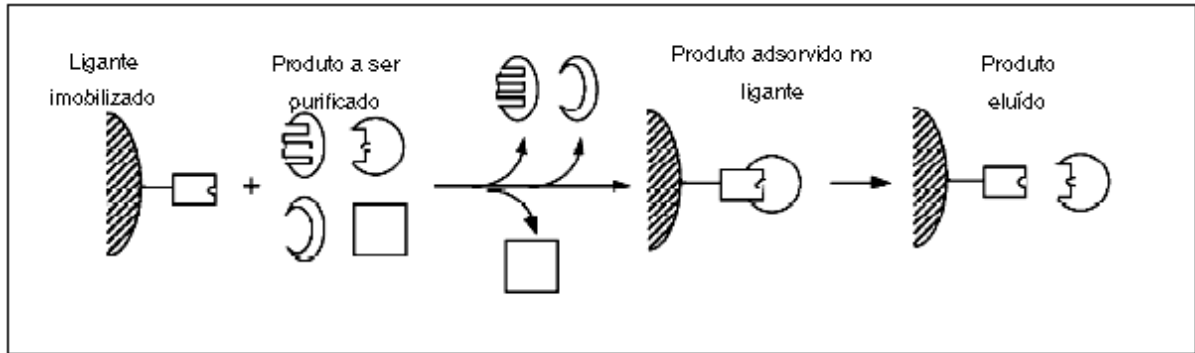


Figura 21- Princípio do Método de Cromatografia de Afinidade (In: MELLADO, 2005, p.25)

3.8.5 Solubilidade

Para que se possa ocorrer uma precipitação de uma proteína em um extrato, basta a adição de sais, solventes orgânicos ou polímeros orgânicos, ou alterando a temperatura e o pH da solução. Alguns desses métodos de precipitação também apresentam características desnaturantes, como por exemplo, a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.198-199).

3.8.5.1 Precipitação por sais (Salting out e Salting in)

Técnicas de precipitação de proteínas em soluções aquosas provem umas das técnicas mais importantes na questão de processos de recuperação e purificação de proteínas (BLUNDELL; JOHNSON, 1976 apud LIMA, 2006, p.5).

Em primeiro caso, a precipitação salting-out, ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal (solução concentrada), em que os íons competem com a proteína pelas moléculas de água; uma vez que está removida parcialmente à camada de hidratação, as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas, se tornam revelantes. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado para essa técnica, pois apresenta características importantes para seu uso; alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções e também o fato de

prevenir o crescimento de bactérias na solução. Quando se adiciona baixas concentrações de sais (baixa força iônica), a solubilidade em geral aumenta, pois os íons salinos presentes tendem a se associar às proteínas favorecendo para uma hidratação ou repulsão entre as moléculas, aumentando a solubilidade (salting-in) (DEUTSCHER, 1990 apud WATANABE, 2004, p.5).

3.8.5.2 Precipitação da proteína por sais de metais pesados

Os cátions de metais pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} formam precipitados insolúveis de proteínas, denominados de acordo com o elemento formador (exemplo: proteinato de mercúrio, proteinato de chumbo, etc.) Essa precipitação é mais intensa quando o pH está acima do ponto isoelétrico (pI). Isso porque, acima do pI, a carga líquida sobre a proteína é negativa, favorecendo a interação com os cátions provenientes do sal. Basicamente este princípio se baseia na desnaturação da proteína, isto é, modifica a conformação natural com a sua atividade biológica (conformação nativa) para uma conformação não natural biologicamente inativa (desnaturada). As moléculas protéicas desnaturadas precipitam, assim, portanto os sais de metais pesados precipitam as proteínas (PINTO, 2008, p.19).

3.8.5.3 Precipitação da proteína por solvente orgânico

A adição de solvente orgânico na solução protéica, também pode causar um efeito de precipitação na proteína, pois o principal efeito dessa adição é a redução da atividade da água: a capacidade de solvatação da água diminui em uma proteína, com o aumento da concentração do solvente orgânico. Isto ocorre devido à diminuição da constante dielétrica do solvente aliada ao deslocamento da água e à imobilização parcial das moléculas de água pela hidratação do solvente orgânico. A estrutura ordenada da água ao redor das áreas hidrofóbicas na superfície da proteína pode ser deslocada pelo solvente orgânico causando maior solubilidade

destas áreas e um aumento das forças de atração entre cargas opostas da proteína. Como resultado, as moléculas de proteína tendem a se agregar e precipitar (WATANABE, 2004, p.5).

Os procedimentos experimentais que utilizam a adição de solventes orgânicos para que possa ocorrer uma precipitação de proteínas, devem ser realizados a 0°C, porque, em temperaturas mais altas, eles têm como caráter provocar a desnaturação das proteínas (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.29-30).

Os mais utilizados para precipitação de proteínas são o etanol e a acetona, mas existe também uma variedade de outros solventes, tais como, metanol, n-propanol, dioxano, e éteresservem para o mesmo propósito (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003, p.201).

3.8.6 Medição da atividade de uma enzima

Quando se trata de atividade enzimática, nada mais estamos considerando também, que é a quantidade de substrato que em uma reação enzimática particular é convertida em produto por unidade de tempo em condições determinadas (U – Unidade internacional de atividade enzimática, 1 U = 1 µgmol/min – quantidade de enzima que converte 1µmol de substrato por minuto em condições padronizadas). O ensaio quantitativo da atividade enzimática é realizado de maneira mais rápida e conveniente quando o substrato ou produto são compostos coloridos ou absorvem a luz na região do UV, pois a velocidade de aparecimento ou desaparecimento de um produto ou substrato que absorve a luz pode ser acompanhada com um espectrofotômetro, dando um registro contínuo do processo (FORGIARINI, 2006, p.50).

3.8.7 Cálculo de Recuperação Enzimática

A medida percentual da atividade de uma enzima é conhecida como recuperação de atividade enzimática, que é calculada após o procedimento de purificação. O valor obtido da recuperação pode ser maior ou igual a zero e menor que infinito. Um valor menor que 100% indica que parte da atividade enzimática foi perdida durante o procedimento de purificação. Já uma recuperação também pode ser maior que 100%, assim sugerindo que houve ativação da enzima em análise, talvez, por exemplo, pela remoção de um inibidor presente no material inicial. Como resultado, uma recuperação de 100% indica que toda a enzima foi recuperada após o procedimento de purificação. Como as condições que se apresentam durante o procedimento de purificação da enzima (por exemplo, pH, força iônica, presença de solventes orgânicos, etc) podem causar inativação da enzima, e o cálculo da recuperação é um indicador importante no aprimoramento das condições de purificação de uma enzima. Para ter como base de cálculo da recuperação, é necessário o conhecimento do número total de unidades de atividade enzimática utilizado no início do procedimento de purificação e também do número total de unidades presente na amostra final (após o procedimento). Assim para obter o resultado da recuperação basta realizar o seguinte cálculo; $(\text{atividade final})/(\text{atividade inicial}) \times 100$ (SAMARA, 2003, p.1).

4. SOJA

A soja se classifica como sendo uma planta herbácea pertencente à família das leguminosas, subfamília das Papilionáceas e à tribo das Faseoláseas. Geralmente uma plantação de soja é anual e raramente perene (GOMES, 1986 apud FRACASSO, 2011, p.19). A composição do grão de soja é composta basicamente por: cotilédone, cerca de 90%, hipocotilédone de 2 a 3% e casca cerca de 8% da massa total (TSUKAMOTO et al., 2001).

Essa planta teve origem na Ásia (sendo a China como provável centro de origem) de onde se expandiu para o resto do mundo. No início do século XVIII, essa leguminosa chegou à Europa e, logo após, aos Estados Unidos (MUNDSTOCK, 2005, p. 2). A chegada da soja ao Brasil é relatada por alguns pesquisadores, que foi por volta de 1882, e outros por volta de 1892, e ainda alguns dizem que o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908. Porém pode-se considerar que a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional. No início do plantio, toda a soja cultivada, estava concentrada nos estados do sul do país, aproveitando a entressafra da cultura do trigo. Praticamente até 1975, toda a produção brasileira que praticava o cultivo de soja, era realizada com cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, onde que as condições climáticas e os solos são bem diferentes do Brasil. O ponto positivo da soja é que ela trouxe a implantação de indústrias de óleo, sustentou o mercado de sementes e proporcionou uma grande estabilidade à exploração econômica das terras onde antes só existiam matas e cerrados (CANÇADO, 2004 apud OLIVO, 2010, p.16). O nome científico pertencente a essa planta é *Glycine Max L* (MUNDSTOCK, 2005, p. 2). A figura 22 abaixo representa a semente de soja *Glycine Max L*.



Figura 22 - Semente de soja *Glycine Max L* (In: OLIVO, 2010, p.18)

Como já foi relatada, a expansão do cultivo de soja em 1970 foi bastante significativa, tanto que a área de cultivo de soja era de cerca de 1,3 milhões de hectares e já em 1980 teve um incremento surpreendente de 8 milhões de hectares. Atualmente pode-se dizer que já são 23 milhões de hectares que representam 24% da área mundial plantada, posicionando o Brasil como o segundo maior produtor mundial da oleaginosa (WEINGARTNER, 2010, p.36).

Pelo fato da soja ser uma fonte rica de proteínas e interessantes propriedades funcionais, a soja tem sido muito utilizada como um importante alimento em escala industrial (SILVA, 2004, p.1).

Na indústria de alimentos a soja abrange uma composição de vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros produtos. As proteínas que estão presentes na soja é base de ingredientes para produtos cárneos, misturas preparadas para bebidas, massas, produtos de padarias, alimentação de bebês, alimentos dietéticos, etc. Além da soja fazer parte da alimentação humana, a soja também tem sido muito útil na alimentação animal, e também de outras maneiras, do tipo: adubo, fabricação de fibras, revestimentos, papel, tintas, na indústria de adesivos (ULIANA, 2009, p.8).

Um ponto bastante interessante da soja, é que ela é o único vegetal que contém uma proteína completa com qualidade equivalente à albumina do ovo, (proteína

conhecida como padrão ouro, dentro da escala de classificação) pode estar relacionada como fonte única de proteínas, tanto a curto, como em longo prazo. A soja apresenta um baixo potencial de sódio e tem um alto teor de Fe, Cu, Mg, P, K, Zn; e seu conteúdo varia nos diferentes produtos (AMARAL, 2006, p.20).

Considera-se que o grão da soja é composto por 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de germen e quando descascado apresenta cerca de 40% de proteína, 20% de lipídios, 35% de carboidratos e 5% de minerais. Os lipídios e grande parte da parte das proteínas, encontram-se em corpusculos contidos nas células cotiledonares (FÉLIX, 2011, p.23).

A soja é avaliada como um bom alimento, tanto se tratando do seu lado econômico, como também pelo lado agrícola. O ponto de interesse nessa planta, é que ela apresenta características agrônômicas favoráveis, tanto pela sua boa capacidade de adaptação com o solo, clima e sua habilidade em fixar nitrogênio, em simbiose da bactéria, o que faz da soja, ser uma cultura de rotação com outras culturas que necessitam de altas concentrações de nitrogênio, como o milho e arroz (BORRMANM, 2009, p.6).

Contudo se tratando da soja pode-se resumir que existem muitos benefícios que ela pode trazer, tanto se pensando na escala industrial, econômica, agrícola e principalmente para a saúde humana, o que contribui bastante para o aumento do consumo dessa leguminosa. Segundo Rosenthal et al. (2003), o leite proveniente da soja é muito útil nos países do ocidente, sendo principalmente como substituto ao leite de vaca para pessoas intolerantes à lactose e alérgicas, pois é uma fonte de baixo custo, possui alta qualidade protéica e energética. Também existem outros benefícios que têm contribuído muito para o aumento do consumo do leite de soja, vários estudos têm sido demonstrados vantagens na utilização de produtos de soja na prevenção de várias doenças, tais como: doença cardíaca, colesterol, câncer, obesidade, diabetes, osteoporose, doenças renais e regulação da pressão arterial (FRACASSO, 2011, p.25).

4.1 CASCA DE SOJA

A casca de soja é considerada como sendo uma película que envolve os grãos, e também considerada um subproduto da indústria processadora de soja, principalmente da produção de óleo de soja e da lecitina. A casca de soja pode ser obtida em uma das primeiras etapas do processamento, quando os grãos são quebrados e as cascas retiradas por aspiração (PEDROSO, 2006 apud SANTOS, 2008, p.29). A figura 23 abaixo representa a película (casca) que envolve a semente da soja.



Figura 23- Cascas de semente de soja

Habitualmente considera a casca do grão de soja como sendo um resíduo, pois pesquisadores explicam que é devido sua baixa digestibilidade, no entanto a casca de soja vem sendo utilizada como suplemento energético, pois o seu fornecimento a ruminantes, permite um desempenho muitas vezes comparáveis aos do milho, devido à boa digestibilidade da parede celular, basicamente composta por celulose (HSU et al., 1987). Segundo alguns autores, eles classificam a casca de soja, como sendo um ingrediente volumoso – concentrado (TAMBARA et al., 1995) por apresentar um elevado teor de fibras e dentro de certos limites funcionar como um grão cereal em termos de disponibilidade de energia (NAKAMURA; OWEN, 1989;

SARWAR, FIRKINS; EASTRIDGE, 1991 apud FERREIRA, 2008, p.24). A tabela 3 representa a composição média da casca da soja.

Nutriente	Valores Médios
Matéria seca (%)	87,94
Energia bruta (Kcal/Kg)	3632
Proteína Bruta (%)	13,17
Extrato etéreo (%)	2,49
Fibra bruta (%)	34,50
Cinzas (%)	3,76
Cálcio (%)	0,44
Fósforo (%)	0,14
Magnésio (%)	0,19
Cobre (mg/kg)	13,09
Ferro (mg/kg)	864,96
Manganês (mg/kg)	30,96
Zinco (mg/kg)	53,20

Tabela 3- Composição da casca de soja

Casca de semente de soja é considerada um subproduto do processamento de soja como já citado e pode ser importante fonte de peroxidase. A padronização de uma metodologia extrativa acessível desta enzima pode praticamente levar a um maior valor agregado das cascas, e o uso das cascas para purificação de enzima é muito mais vantajoso do que o próprio grão, pois a semente apresenta um alto valor protéico, assim dificultando a realização desse trabalho. Pelo fato de utilizar um maior valor agregado das cascas e a purificação da peroxidase de casca de soja apresentar o mesmo padrão cinético da peroxidase de rábano bravo, leva a mostrar uma fonte de alternativa para substituir a peroxidase de rábano bravo (SANTOS; TOGNOLLI; OLIVEIRA, 2010, p.122).

5. PEROXIDASE

Os primeiros relatos envolvendo produtos de ação das peroxidases doador: H_2O_2 oxidoreductase (EC 1.11.1.7) foram descritos por Schoenbein em 1855 (citado por Whitaker, 1994) ao observar que a presença de peroxidase em extratos de cogumelos e tecidos animais causaram um aparecimento da cor azul em soluções de guaiacol na presença de ar ou soluções diluídas de água oxigenada. Um dos pesquisadores fundamentais, que deu início as pesquisas nesse ramo, foi Onslow em 1920 e nos últimos vinte e cinco anos houve um grande aumento no seu conhecimento com descrições detalhadas sobre as propriedades da grande classe destas enzimas em relação à cinética, estrutura e mecanismo. A característica química da peroxidase vem sendo fonte de estudo de vários cientistas, sendo o Dr. H.B. Dunford o cientista de maior destaque nesta área. Existe um campo amplo de literatura sobre peroxidases e um grande número de patentes relacionadas com suas aplicações industriais e comerciais. A presença de um grupo de ferro heme nestas enzimas tem sido o ponto chave de grande interesse das pesquisas e também estimulado o desenvolvimento de métodos biofísicos modernos para estudar os vários estados de oxidação do ferro heme (PEREIRA, 2003, p.6).

As peroxidases podem ser caracterizadas por hemeoproteínas de oxidoreductase, específica para aceptor de hidrogênio e estão presentes em células animais, em micro-organismos e tecidos vegetais. Ela está presente em diversos componentes celulares, como o núcleo, mitocôndria, ribossomos, paredes celulares e membranas celulares (FRIC, 1976; HOAGLAND, 1990 apud MAGALHÃES, 2002, p.15).

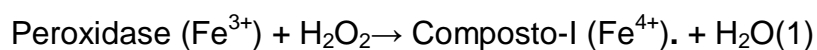
Devido o poder de catálise para formação de peróxido de hidrogênio, essa enzima gera oxidação de muitos doadores de hidrogênios cromogênicos. O pH ótimo varia na faixa de 6,0 a 6,5 sendo estável na faixa de pH entre 5,0 e 9,0 e sua massa molecular é de 44 000 Da (SCHMIDT, 2008, p.27). A temperatura ótima é cerca de 50 °C, e estabilidade a -20 °C por um ano (FORGIARINI, 2006, p.61).

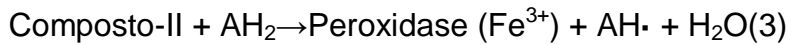
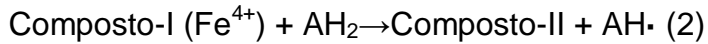
As peroxidases, e muitas outras enzimas, podem ocorrer em mais de uma forma molecular em uma mesma espécie, em um mesmo tecido, ou até mesmo, em uma mesma célula. Nestes casos é conhecido como isoenzimas, pois catalisam a mesma reação, mas diferem em suas propriedades cinéticas, composição e sequência de aminoácidos. Um fator negativo é que a presença de múltiplas isoenzimas torna difícil a atribuição de funções biológicas específicas às isoformas individualmente. Assim, a função fisiológica de cada isoenzima, pode se encontrar apenas parcialmente compreendida, devido em parte, a complexidade das isoenzimas presentes em um dado tecido (FORGIARINI, 2006, p. 53).

O comportamento da enzima peroxidase durante o aquecimento e resfriamento ou congelamento é um ponto mais investigado em relação a esta enzima. A peroxidase tem sido muito relacionada à qualidade dos alimentos no processamento devido a sua alta estabilidade térmica. Um ponto bastante interessante é que a inativação térmica da peroxidase obtida a partir de muitas fontes é, em certas condições, um processo bifásico e parcialmente reversível. Esta enzima é composta de unidades ou frações de diferentes resistências térmicas, e a restauração de sua atividade é durante períodos curtos ou longos de estocagem em temperatura ambiente ou mais baixa após o tratamento térmico (PEREIRA, 2003, p. 20).

As peroxidases podem ser localizadas na célula das frutas e vegetais na forma parcialmente solúvel, no citoplasma, e também parcialmente insolúvel, ligadas de forma covalente e ionicamente à parede celular. Uma forma de purificação das peroxidases a partir dos extratos brutos é baseada em métodos que variam de acordo com a fonte da enzima e o grau de pureza a ser obtido. Segundo alguns cientistas, se tratando de obter a peroxidase purificada de forma homogênea, são difíceis, pois pode ser devido à presença de um grande número de isoformas e substratos. Muitos trabalhos envolvendo sobre as peroxidases obtidas de várias frutas e vegetais, e um grande número de isoenzimas têm sido encontradas em raiz forte (PEREIRA, 2003, p. 13).

A reação enzimática da peroxidase ocorre em três etapas distintas, como mostram as reações 1, 2 e 3:





No primeiro estágio da reação do processo catalítico, ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. A água oxigenada é então reduzida, produzindo água e a proteína oxidada formando o chamado composto-I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação bem mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto-I oxida uma molécula de substrato (AH_2) produzindo um substrato radicalar e o composto-II. Finalmente, o composto-II é então reduzido por uma segunda molécula de substrato para o estado ferro III latente (BANCI, 1997; HINER et al., 2001 apud PEREIRA, 2003, p.7). A figura 24 abaixo demonstra o ciclo catalítico da enzima peroxidase.

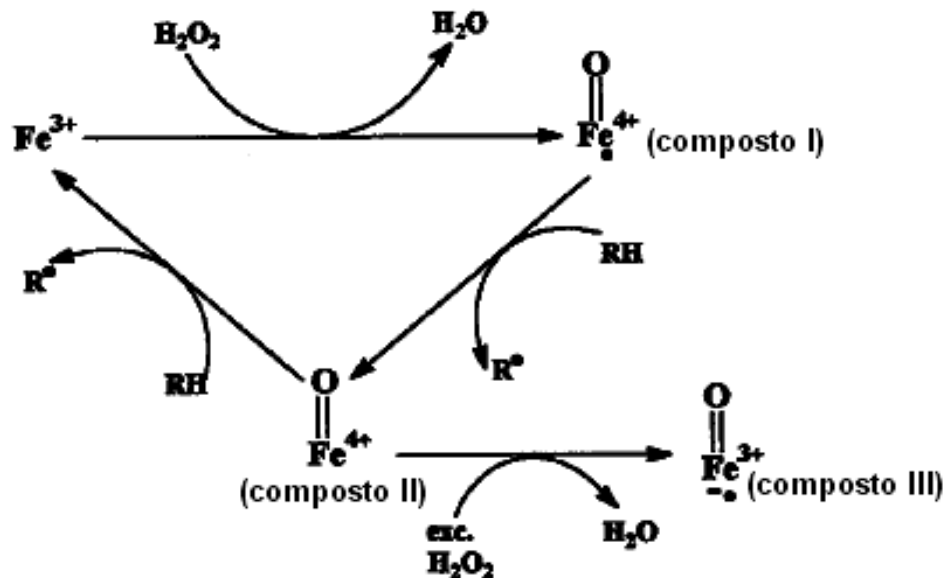


Figura 24- Ciclo catalítico da enzima peroxidase (In: FORGIARINI, 2006, p.52)

Existem dois tipos de classes diferentes de peroxidases:

Classe I: caracteriza por peroxidases que contém o átomo ferro, que podem então ser subdivididas em dois grupos: peroxidases ferritoporfirina e verdoperoxidases.

O primeiro grupo contém o grupo prostético ferriprotoporfirina II (hematina) e tem como característica de apresentar cor marrom quando são purificadas. Elas são encontradas em plantas superiores (principal fonte: raiz forte), animais e micro-organismos. O segundo grupo obtém um grupo ferriprotoporfirina diferente. Estas enzimas tem caráter verde quando purificadas, e ocorrem em órgãos de animais e no leite (lactoperoxidase) (PEREIRA, 2003, p.8).

Classe II: Essa classe se apresentam as peroxidases flavoproteínas, que são purificadas de alguns *estreptococos* e de alguns tecidos animais. Essas classes têm como característica de apresentar o grupo prostético Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) (FERREIRA, 1983, p.3).

A enzima peroxidase geralmente reage com compostos contendo grupo(s) hidroxila ligado(s) a um anel aromático. O mais comumente usado para medir a atividade da enzima peroxidase é o guaiacol (o-metoxi-fenol). (HIRAGA et al., 2001). Muitas isoenzimas de guaiacol peroxidase se apresentam em tecidos de plantas e podem estar sendo localizados no vacúolo, parede celular e citossol, mas não sendo encontrado em organelas celulares como cloroplastos (SOUZA, 2006, p.27). Cientistas tem citado que as peroxidases ligadas à parede celular estão envolvidas no passo final do processo de lignificação e tem uma especial afinidade por siringaldazina, um substrato usado até então para testes histoquímicos (GOLDEBERG et al., 1983). A enzima peroxidase apresenta uma afinidade pela siringaldazina que é cerca de 100 a 1000 vezes maior do que a afinidade pelo guaiacol (BENATTI, 2004 apud SOUZA, 2006, p.27). Um ponto chave dessa enzima são as necessidades de obter purificadas a preços viáveis para aplicação prática, como para produção industrial de aromatizantes ou uso como componente de reagentes para testes de diagnóstico clínico, a onde a demanda aumenta cada vez mais uma série de pesquisas de purificação e caracterização dessa enzima obtida de diferentes fontes, além do desenvolvimento de novas técnicas de extração e purificação (KAMIMURA, 2006, p.7).

5.1 ESTRUTURA DA PEROXIDASE

Como já citado, essa enzima pertence à família das proteínas com ferritoporfirina como grupo prostético, é uma glicoproteína constituída por 308 aminoácidos, constituída por dois tipos de centros metálicos. Apresenta um grupo prostético, nomeado por ferritoporfirina IX (com um átomo de Fe^{3+}) e dois átomos de cálcio (Ca^{2+}). Pode-se dizer que tanto o ferro ou átomos de cálcio são essenciais para a integridade funcional para a estrutura da enzima. Uma perda dos átomos de cálcio pode causar tanto uma diminuição da atividade enzimática como também uma diminuição da estabilidade térmica (PINTO, 2008, p.6). A figura 25 representa a estrutura da ferritoporfirina.

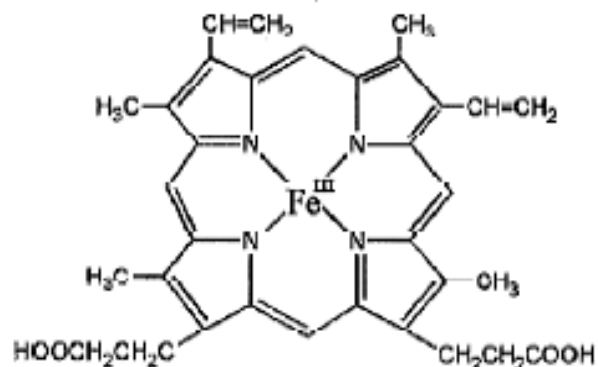


Figura 25- Representação da estrutura da ferritoporfirina (In: PINTO, 2008, p.6)

Com a ajuda da tecnologia, e com os estudos dos últimos anos, ficou disponível a estrutura tridimensional da peroxidase através de cristalografia de raios-X, bem como a descrição dos intermediários no ciclo catalítico da mesma, resultando uma alta resolução. Um ponto bastante interessante da enzima é possuir dois domínios, o domínio distal e o proximal e entre estes se encontra a presença do grupo heme. Uma explicação para o aparecimento dos domínios na enzima seria duplicação genética, no qual foi o que se deu origem a esses dois domínios, fato apoiado pela

presença comum de átomos de cálcio e outros elementos estruturais. A Figura 26 abaixo representa a estrutura tridimensional da isoenzima C da peroxidase de rabano bravo, onde o grupo heme na estrutura se encontra colorido em vermelho e os átomos de cálcio em azul (PINTO, 2008, p.7).

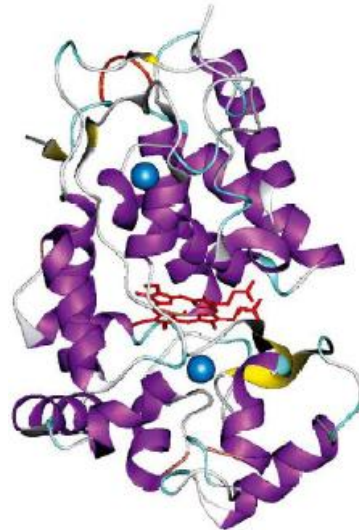


Figura 26- Estrutura Tridimensional da Isoenzima C da Peroxidase de Rabano Bravo (In: PINTO, 2008, p.8)

5.2 APLICAÇÕES DA ENZIMA PEROXIDASE

A enzima peroxidase é de grande importância em termos de processamento de alimento, pois ela é bastante termo-resistente, sendo largamente utilizada como um indicador da eficiência do branqueamento ou outro tratamento térmico aplicado a um produto que se encontre em processamento. Se pensando por outro lado existe uma relação que já é comprovada entre a atividade residual da peroxidase e o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, a onde já foi imposto para ervilhas, feijões verdes, nabos e para o milho. A capacidade que a enzima peroxidase tem de regenerar a atividade é outra característica bastante notável desta enzima, o que faz com que frequentemente os tratamentos térmicos precisem ser aplicados de maneira mais severa possível que o normal, para prevenir a regeneração (FERREIRA, 1983, p.4).

Como já podemos notar as peroxidases isoladas de plantas, animais e micro-organismos têm sido atraente para as indústrias, devido às suas propriedades catalíticas como a versatilidade em reconhecer vários substratos e a sua termoestabilidade. A peroxidase, no entanto apresenta um campo muito amplo de aplicações de interesse na área de análises clínicas como determinação de glicose e colesterol por método enzimático, também na área de síntese orgânica, tratamento de resíduos industriais, confecção de biosensores e imunoenaios enzimáticos. As peroxidases, dependendo da fonte que está sendo purificada, pode chegar a apresentar aplicações únicas (PEREIRA, 2003, p.26).

Outro ramo bastante aplicada, são em diversas reações de ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol – 3 – acético, ligação de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e regulação da elongação das células , entre outras (PUGINE, 2008, p.24).

Útil também em indústria de laticínios para conseguir detectar antibióticos presentes no leite e também para tratamentos de efluentes industriais perigosos (PINTO, 2008, p.8). Outro meio de utilização bastante interessante, é também em kits de diagnóstico laboratoriais, ensaio de higiene de alimentos e pela medicina dermatológica para avaliar e monitorar os tratamentos de psoríases, câncer de pele, na purificação da água devido à oxidação de fenóis e polifenóis, agentes tóxicos e biodegradação de corantes tóxicos das indústrias têxteis e efluentes das estações de tratamento de esgoto de águas residuais (BRÁZ, 2008, p.6).

Uma das explicações da peroxidase ser utilizada para kits de diagnóstico laboratoriais é que essa enzima pode-se ligar a anticorpos ou proteínas específicas (AIDS, câncer) e por isso é muito útil como kits de diagnóstico com atividade de biossensor ou detector químico para testes de alta sensibilidade. Vários estudos atuais estão demonstrando um imenso leque para o uso de peroxidases na medicina, no auxílio de diagnósticos indiretos ou em análises diretas do nível de peróxidos formados em processos patológicos inflamatórios, e análise em medicina ortomolecular para detectar a atividade de radicais livres (MACIEL, 2002, p.25-26).

Também pode ser utilizada na polimerização do radical acrilamida e branqueamento de corante, e na indústria de papel e celulose a peroxidase é empregada na etapa

de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em lavanderias e inibir a transferência de cor durante alavagem (FORGIARINI, 2006, p.55).

6. BIOQUÍMICA COMO FERRAMENTA INTERDISCIPLINAR NO ENSINO MÉDIO

A partir do que é significativo e contextualizado na realidade do aluno, é o que faz o aluno aprender. Por sua vez, a prática pedagógica disciplinar, muitas vezes, acaba criando um pensamento e construção de conhecimento dos educandos. As escolas concebem a educação por meio de disciplinas e proporciona um trabalho isolado para que o aluno aprenda conhecimentos parcelados, o que se deve em grande parte à própria formação do professor, enraizada em modelos tradicionais de ensino. A proposta pedagógica da interdisciplinaridade pode vir a satisfazer esta necessidade do aluno, de aprender a partir do contexto e de suas vivências, já que propõe um olhar de muitas facetas do conhecimento e não mais de um conhecimento específico (PEREIRA; CAZEIRO; SANTOS, 2011, p. 84).

Durante o ensino médio, a apresentação dos conteúdos relacionados às Ciências Naturais ocorre de um modo dividido, provocando uma abordagem de conhecimento de diferentes disciplinas. A busca por essas disciplinas são frequentemente estabelecidas pelos livros didáticos, que determinam os conteúdos e a sequência dos tópicos. Nesse contexto, a discussão ou a reflexão de temas complexos, como as questões ambientais e os problemas de saúde, fica em certo ponto prejudicado devido à necessidade de combinar ou relacionar conhecimentos de diferentes disciplinas (CORRELA et al., 2003, p.19).

A discussão de uma abordagem interdisciplinar no Ensino Médio é uma das indicações dos documentos oficiais e pode estar sendo considerado, como uma das maneiras de superar a fragmentação do conhecimento. A aplicação de interdisciplina no ensino médio, evita uma visão reducionista da Ciência, promovendo o uso de assuntos mais interessantes para contextualizar as aulas, favorecendo a integração de conteúdo expondo os alunos a assuntos complexos do processo de geração do conhecimento. A combinação dessas vantagens pode favorecer um valor mais

significativo na aprendizagem dos conceitos científicos (CORRELA et al., 2003, p.20).

Segundo Mügge (2011, p.18), nos últimos anos, o termo interdisciplinaridade tem sido tratada ou pronunciada e escrita com muito mais frequência no meio educacional, mas não faz levantar dúvidas e questionamentos, tanto em relação ao seu significado quanto à sua aplicabilidade, pois os educadores não sabem como colocar em prática a interdisciplina. A insegurança ou a incerteza é uma marca do próprio conceito de interdisciplinaridade, muito próximos a outros como multidisciplinaridade, transdisciplinaridade, pluridisciplinaridade, todos com um mesmo propósito: dar um ponto final a visão de conhecimento baseado, arbitrariamente, na compartimentação; na educação apresenta em forma de disciplinas muitas vezes com fronteiras bem definidas e de difícil diálogo.

Segundo Silva (2005, p.47), muitos autores têm-se pronunciado a respeito da interdisciplinaridade, porém todos tratam o termo interdisciplinar a partir de diferentes ângulos ou pontos de vista que uma leitura mais apressada poderia conduzir o leitor a dois possíveis labirintos: o antagonismo ou o ecletismo. O que faz a levar a isso, se deve, em parte, ao fato de que não existe, ainda, uma teoria interdisciplinar cujos fundamentos poderiam dar mais solidez aos projetos e ações interdisciplinares. Por outro lado, há certa tentativa crescente de aplicar um método interdisciplinar com vistas à integração e cooperação das disciplinas escolares em busca de um conhecimento integrado.

Dois enfoques de estudos sobre interdisciplinaridade podem ser fundamentais. O primeiro é aquele diretamente relacionado ao saber, que demonstra principalmente deixar único o conhecimento científico, o que pode ser entendido como a constituição de uma *ciência da ciência*. O segundo enfoque está mais direcionado a uma perspectiva instrumental e metodológica, ou uma prática particular e específica, direcionada para a abordagem de problemas relacionados à existência cotidiana (BATISTA; LAVAQUI; SALVI, 2008, p. 211).

A aplicação dessa perspectiva de ação interdisciplinar no ensino médio implica na adoção de formas de organização do trabalho interdisciplinar e propostas pedagógicas que contemplem modelos didáticos que permitam a sua aplicação no

cotidiano escolar. Uma das formas de organizar um trabalho interdisciplinar nessa perspectiva é deixar efetivo como prática educativa em três planos: o curricular, o didático e o pedagógico, de maneira que as ações interdisciplinares se mostrem organizadas coerentemente (BATISTA; LAVAQUI; SALVI, 2008, p. 212).

6.1 FORMAÇÃO INICIAL DE PROFESSORES PARA APLICAÇÃO DE INTERDISCIPLINA CIENTIFICA

Quando se trata de formação inicial de professores, mobiliza-se uma série de conceitos que irão definir o tipo de profissional a ser formado. Estes conceitos determinam habilidades, capacidades, entre outros aspectos necessários ao professor para uma realização mais adequada de sua prática. Existem alguns propósitos para a formação essencial de professores, para que possam ser capazes de realizar sua docência de forma interdisciplinar. Um exemplo disso é adotar algumas ideias que conduz ao desenvolvimento de um profissional, e que possua autonomia em sua própria formação e que possa, durante sua prática, aumentar seus conhecimentos e conciliar os diversos campos numa integração para resolver os problemas complexos existentes no contexto científico e tecnológico atual (OHIRA, 2006, p. 18).

Segundo Leoni (2005, p.20), neste fazer interdisciplinar para a área de ciências é importante e necessário que o professor esteja sempre atento e disposto a ajudar, a orientar os alunos para que busquem explicações adequadas aos fatos que circula o mundo físico e social em que convivem, visto que poderão sentir o prazer nas descobertas, estabelecendo suas próprias relações com o mundo, construindo um conhecimento que possa aumentar seus limites explicativos.

Segundo Fazenda (1994, p. 78-79), dispõe aos professores uma prática de revisão de suas ações pedagógicas como modo de perceber ou relacionar os aspectos a serem transformados, e o quanto progride em suas atividades interdisciplinares. Para tanto, sugere que o professor interdisciplinar busque, se interesse por uma leitura ampliada de suas práticas diárias, como fonte de conhecimento, tornando

estas a estrutura para explorar a dimensão complexa de interação intersubjetiva, humana, e não apenas que sejam voltadas ao intelectual, resultando em uma maior capacidade de aprender, a enxergar por meio do olhar dos outros, além de suas próprias intenções e possibilidades de interdisciplinaridade (FAZENDA, 1994, p. 78-79 apud LEONI, 2005, p.7).

6.2 BIOQUÍMICA COMO INTERDISCIPLINA NO ENSINO MÉDIO

A bioquímica, por si só, representa uma área interdisciplinar uma vez que possui como base as ciências químicas e biológicas. Logo, a bioquímica constitui-se num nicho temático muito rico e promissor para abordagens interdisciplinares, contextualizadas social e experimentalmente (FRANCISCO, 2006 apud JUNIOR, 2007, p.1).

Bioquímica possui, como objetivo básico, mostrar como moléculas destituídas de vida conseguem interagir entre si e perpetuar a vida como se conhece, isto é, mostrar em termos químicos a vida em suas diferentes formas. Entretanto, a bioquímica seja por si só uma área interdisciplinar, e tenha potencial para ser utilizada no ensino de química, ainda é pouco explorada pelos professores de química no ensino básico (CORREIA et al.,2004 apud JUNIOR; FRANCISCO, 2006, p.12).

Segundo Santos e Schnetzler (1996, p.28) em pesquisa realizada com professores de química, reportaram que a bioquímica aparece como um dos dez temas com os quais a química pode ser abordada socialmente. Para tanto, entende-se que o conhecimento em bioquímica preconiza um conhecimento concomitante de química. Todavia, a recíproca não é verdadeira, ou seja, nem sempre o professor de química tem sólidos conhecimentos de bioquímica.

Para Junior (2007, p.1) isso ocorre porque a maioria dos cursos superiores em química coloca a bioquímica em segundo plano se comparada às áreas tradicionais, como química orgânica, físico-química, química analítica ou inorgânica. Geralmente, o que se verifica são apenas disciplinas introdutórias à bioquímica. Tal questão é

preocupante, uma vez que os professores de química acabam os cursos de graduação apenas com conhecimentos superficiais de bioquímica e, conseqüentemente, quando ao acaso abordarem o tema no ensino médio, muito provavelmente o único recurso será o livro didático.

De acordo com Ana Lucia professora de bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (UFC), o aprendizado que envolve bioquímica no ensino médio é muito discreto, pode-se dizer até que essa disciplina não é apresentada pelos alunos e os conceitos bioquímicos são discutidos às vezes em tópicos de química ou de biologia. Uma grande deficiência nessa questão é que o próprio professor não tem consciência que existem temas dentro da química ou da biologia que pode ser trabalhado com os alunos, assim, portanto não esclarece ou situa os temas apresentados. Um ponto bastante crítico é que o aprendizado, do aluno sempre ocorre de maneira superficial. Isso se deve pelo fato dos alunos decorarem os conceitos para as provas, e quando o aluno se deparar com o vestibular não apresentará um bom desempenho. Um das justificativas das escolas particulares são a “falta de tempo” para se construir o conhecimento, e as escolas públicas existe a uma suposta ausência de interesse de aprendizagem nesse tema. Conceitualmente, os diferentes tópicos da bioquímica poderiam ser abordados por meio de um enfoque abrangente, como o da “Bioquímica no dia-a-dia”. Uma forma de o professor trabalhar com os alunos é gerar quadros de conhecimentos prévios e descrever processos bioquímicos a partir de produtos e fenômenos corriqueiros, como por exemplo: as reações que ocorre entre carne e Coca-Cola ou maisena e saliva; um respirômetro construído com vidro de maionese, rolha de cortiça e grãos de feijão; a ação do detergente sobre a gordura na formação de micelas; a extração de DNA de banana, cebola, ou morango; leitura, acompanhada pelo professor, de textos ligados ao tema; etc (FREITAS, 2006).

6.3 IDENTIFICAÇÃO DA PEROXIDASE NO LEITE: UM TEMA INTERDISCIPLINAR PARA OS ALUNOS DO 3º ANO DO ENSINO MÉDIO

A apresentação dos conteúdos relacionados às ciências naturais durante o ensino médio ocorre de maneira dividida, provocando o fracionamento do conhecimento em disciplinas isoladas. Uma das características importantes das aulas de química no ensino médio é a grande diversidade de assuntos relacionados com outras disciplinas; história, geografia, física, matemática, biologia (CORRELA et al., 2004, p. 19).

O intuito desse trabalho é purificação da peroxidase a partir da casca da soja, com interesse de obter a enzima concentrada para usos diversos. Assim esse trabalho abrange diversos assuntos que possibilitam diversos tópicos para serem trabalhados com alunos do 3ª ano do ensino médio por meio de uma aula teórica e prática em laboratório.

Numerosas enzimas podem ser encontradas no leite, entre elas esta a peroxidase. O desenvolvimento intencional ou não de micro-organismos no leite contribui para o complexo enzimático. A atividade das enzimas no leite, esta influenciada pelas condições que são expostas ao meio (pH, temperatura e acesso ao substrato) sendo alteráveis pelo processamento tecnológico (SILVA, 1997, p. 4).

A verificação da peroxidase no leite é importante para avaliar a eficiência do processo de pasteurização (aquecimento entre 67 – 72°C) do leite, por ser termoresistente, ou seja, ela permanece ativa após o tratamento térmico (FERREIRA, 2007, p. 13).

A aula a ser trabalhada com os alunos do 3º ano do ensino médio será uma aula experimental, para verificar a presença de peroxidase no leite. A tabela 4 apresenta os materiais e os reagentes utilizados na aula experimental.

Material	Reagentes
Tubo de ensaio	Peróxido de Hidrogênio
Suporte para tubo de ensaio	Guaiacol 1%
Pipeta de 10 mL, 2mL	

Tabela 4 – Materiais e reagentes utilizados na verificação da peroxidase no leite

O procedimento consiste em aquecer o leite a 45°C, e a pipetar-se 10 mL de leite para um tubo de ensaio. E em seguida 2 mL de guaiacol a 1% e 2 a 3 gotas de peróxido de hidrogênio. O desenvolvimento da cor salmão é a prova **positiva** conforme apresentado na figura 27 da presença da peroxidase (leite cru ou propriamente pasteurizado) e a cor branca é a prova **negativa** da presença da peroxidase (leite super aquecido ou fervido acima de 80°C).

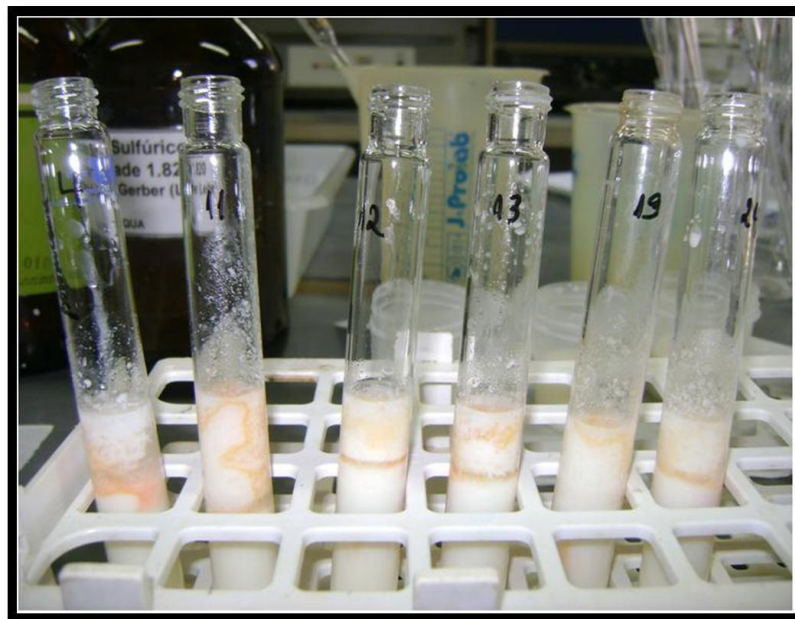


Figura 27 – Coloração positiva da presença de peroxidase no leite (ROSA, 2012, p. 91)

7. MATERIAL E REAGENTES

7.1 MATERIAL

Material TNT

Becker

Bastão de vidro

Balança analítica (MARTE; Modelo: AY220)

Centrifuga (CELM; Modelo: Combate)

Erlenmeyer

Espectrofotômetro (FEMTO; Modelo: Cirrus 80)

Liquidificador de uso doméstico (Marca: Becker go; Modelo: LTA – 1,5C. Inox)

Peneira Granulométrica (GRANUTEST; Abertura em mm: 1,00)

pHmetro (ARACA PROLAB; Versão 7.1; Modelo: mPA – 210)

Papel filme

Suporte de tubo de ensaio

Tripa de diálise

Tubo de ensaio

7.2 REAGENTES

Anilina ($C_6H_5NH_2$) P.A. – A.C.S. (Synth)

Acetona ($CH_3)_2CO$) P.A. – A.C.S. (Qhemis)

Álcool etílico absoluto (C₂H₅OH) CAS [64 – 17 -5] (Dinâmica)

Água destilada e deionizada

7.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.3.1 Formação da solução da casca de semente de soja

A metodologia de referência para realização desse trabalho, esta de acordo com o trabalho de LIU et al.,2005.

Para realização do experimento, a casca de semente de soja foi cedida pela fazenda Estância Vitória, bairro Água do Jacu, localizada na cidade de Cândido Mota-SP.

Primeiramente a casca de semente de soja foi peneirada manualmente para ser separada de impurezas macroscópicas como: folha da própria planta, grãos de soja e grãos de terra. Após esse procedimento a casca da semente de soja foi levada para o laboratório da FEMA (Fundação Educacional do Município de Assis), para ser realizado o experimento de purificação da enzima peroxidase na casca de soja.

Para início do experimento pesou-se cerca de 22,70 g de casca de soja em balança analítica, e adicionou-se 272,45 mL de água destilada e deionizada. A solução foi deixada em repouso durante 1 hora.

7.3.2 Precipitação por cooperação de sulfato de amônio – acetona

Após o tempo de repouso da solução de casca de soja, deixou-se a solução armazenada no refrigerador, em um período de 24 horas, coberta por papel filme. Realizou-se filtração na solução, para que houvesse apenas uma solução sem resíduos da casca. A solução filtrada foi centrifugada para que se retirasse qualquer resíduo que ainda pudesse estar presente na solução.

Após centrifugação, o precipitado foi descartado, e o sobrenadante foi mantido. Realizou-se um teste cinético para verificar a presença de peroxidase na solução (solução enzimática I).

O teste cinético incidiu de uma solução de anilina e etanol (1:8), e uma solução de peróxido de hidrogênio 0,2 %. Pipetou-se 0,8 mL da solução de casca de soja, e diluiu-se 10 vezes com água destilada e deionizada, com intuito de obter uma absorvância menor que 0,8 no espectrofotômetro. Após a diluição, adicionou-se 2 mL da solução de anilina, e regulou-se o pH para 5,5, com HCl 0,1 mol. L⁻¹.

Com o pH já regulado, adicionou-se 0,2 mL de peróxido de hidrogênio e realizou o teste no espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. A cada 30 segundos, a absorvância foi anotada em um período de 5 minutos.

O volume inicial de solução filtrada foi de 47 mL. Adicionou-se 38,4 mL de solução saturada de sulfato de amônio 4,1 mol/L, com agitação, para impedir maior concentração local. Também acrescentou 14,1 mL de acetona, na presença de banho de gelo. O volume a ser adicionado de sulfato de amônio na solução filtrada, está de acordo com a equação 1.

$$\frac{V_a \times 100}{V_i + V_a} = X \quad (1)$$

Onde:

V_a = Volume adicionado de sulfato de amônio (mL)

V_i = Volume inicial de solução enzimática (mL)

X = porcentagem a ser precipitada

A solução enzimática foi centrifugada por cerca de 15 minutos, e mantido o sobrenadante. O volume de solução obtido foi de 75 mL.

Com o volume de 75 mL de solução, adicionou-se cerca de 90 mL de solução saturada de sulfato de amônio para forma 75% de saturação. Após a adição de sulfato de amônio, a solução enzimática foi centrifugada por cerca de 15 minutos, mantendo-se o precipitado.

O precipitado obtido foi diluído com água destilada e deionizada (solução enzimática II). Para que pudesse realizar o teste cinético no espectrofotômetro, realizou-se diálise para eliminar resíduos de sais que pudessem estar presentes na solução, e o volume obtido após a diálise foi de 45 mL de solução enzimática.

O processo de diálise consistiu, em uma tripa de diálise, onde se adicionou a solução na tripa e amarrou-se com barbante. Após ter adicionado a solução enzimática II na tripa de diálise, colocou-se a tripa em um becker, e adicionou-se água destilada e deionizada até deixar completamente a tripa coberta. Trocou-se a água a cada 3 horas, durante um período de 12 horas. O volume obtido após a diálise foi de 45 mL.

7.3.3 Precipitação fracionada da solução enzimática II com acetona

Com 45 mL de solução enzimática, adicionou-se 45 mL de acetona P.A sobre banho de gelo, e efetuou-se centrifugação por cerca de 15 minutos, para obter o precipitado. O precipitado foi diluído com água destilada e deionizada, obtendo-se 33 mL de solução (solução enzimática III). Após esse procedimento, realizou-se o teste cinético.

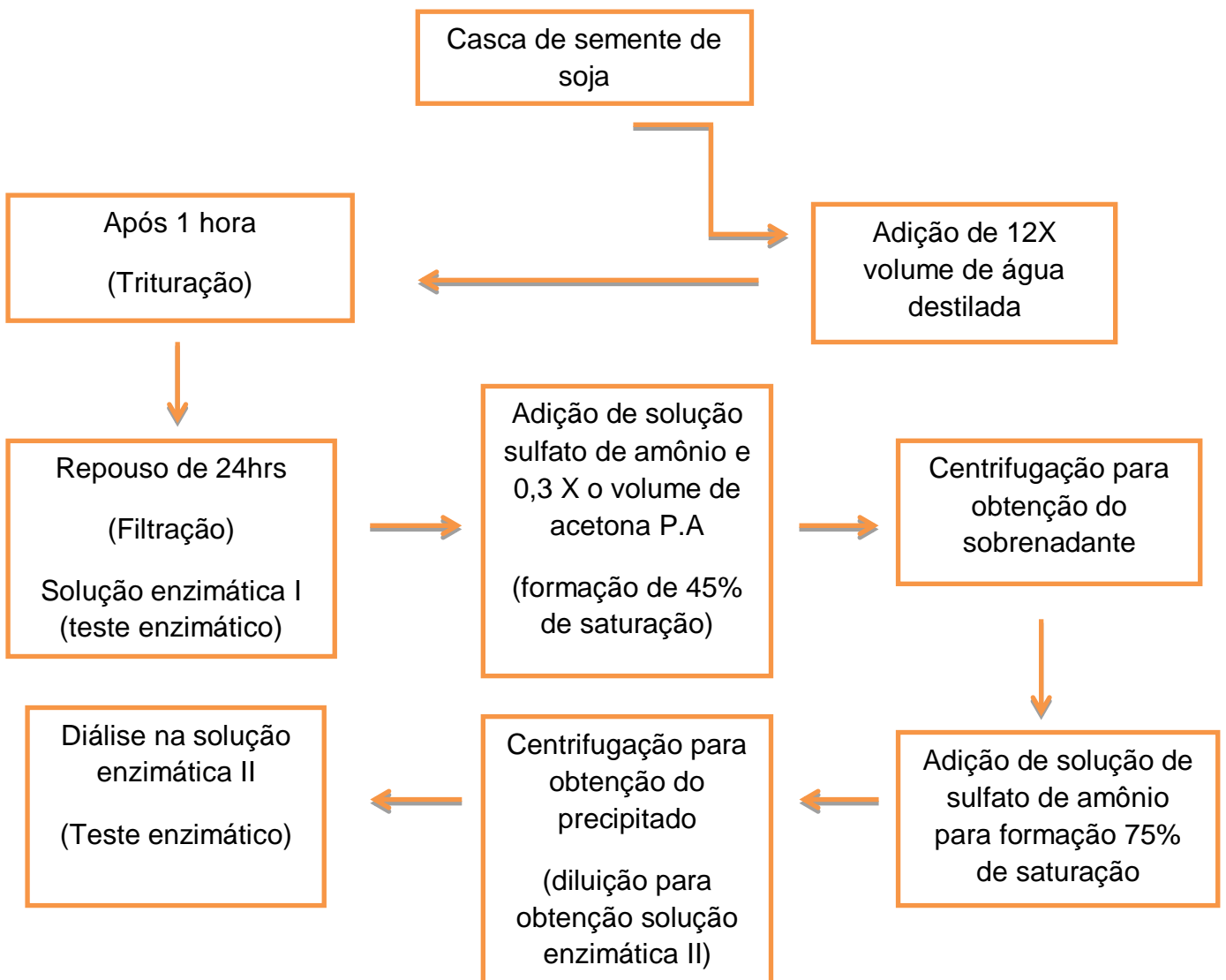
Com 33 mL de solução, adicionou-se 26,4 mL de acetona P.A sobre banho de gelo. Após adição de acetona, realizou-se a centrifugação na solução, por cerca de 15 minutos, para obter-se o precipitado. O precipitado foi diluído com água destilada e deionizada, obtendo-se um volume de 15 mL de solução (solução enzimática IV). Com a solução enzimática final, realizou-se o teste cinético.

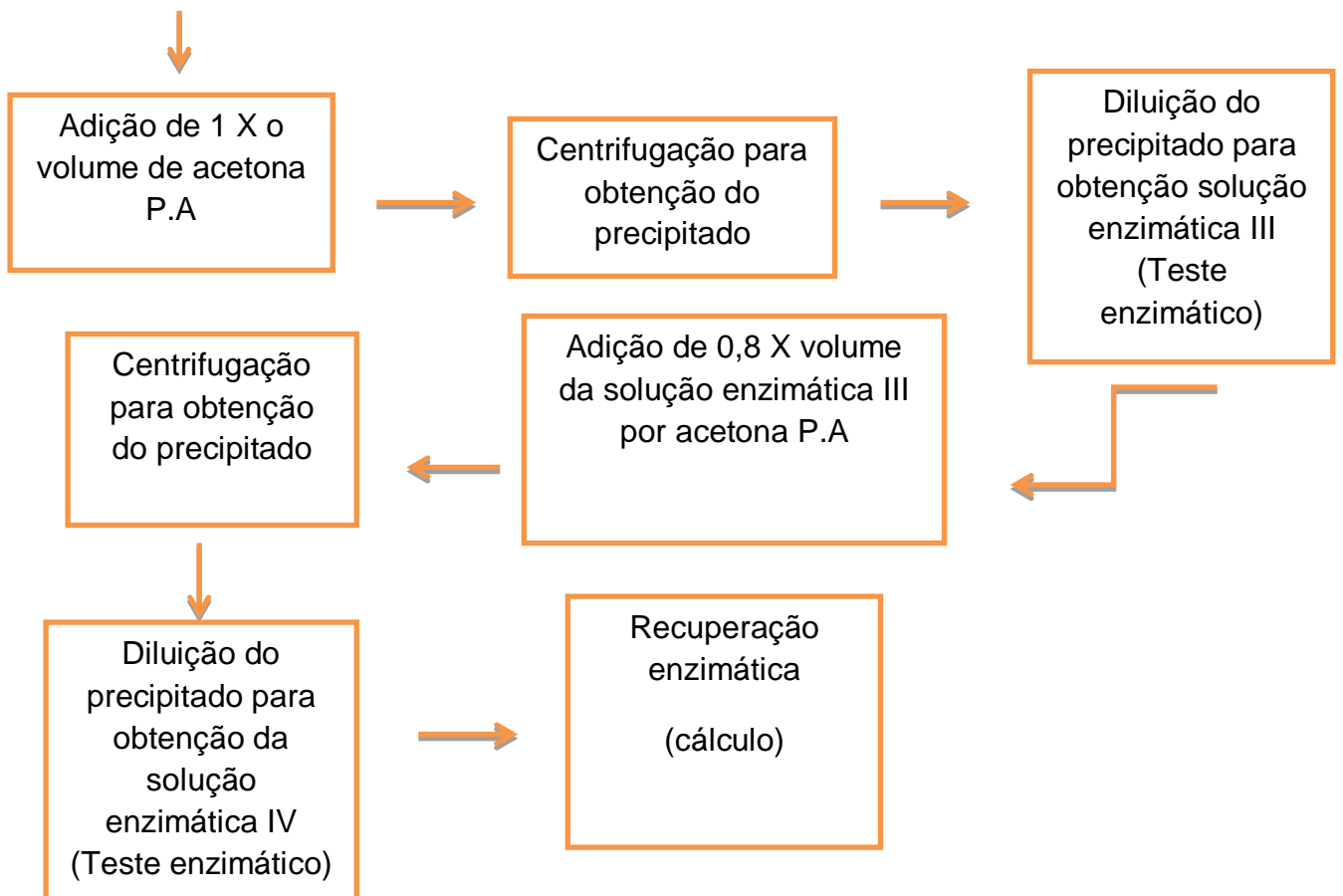
Para determinação da pureza da enzima peroxidase, existe um fator conhecido por valor de Reinheitszahl (RZ), citado por Shannon, L. M; Kay, E; e Lew, J. Y, pelo *Journal of Biological Chemistry*, que representa a pureza da peroxidase para ser comercializada. De acordo com a literatura e com a empresa Sigma Aldrich a peroxidase pode ser comercializada com o $RZ \geq 1$. A solução enzimática é medida no espectrofotômetro, no comprimento de onda 275 nm e 403 nm, utilizando água

destilada e deionizada como branco. A equação 2 abaixo , representa a equação de Reinheitszahl.

$$RZ = \frac{A_{403}}{A_{275}} \quad (2)$$

Abaixo está o fluxograma do experimento para purificação da peroxidase presente na casca de soja.





8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O primeiro teste enzimático foi realizado na solução inicial filtrada (47 mL de solução). A figura 28 representa o gráfico do teste enzimático na solução inicial.

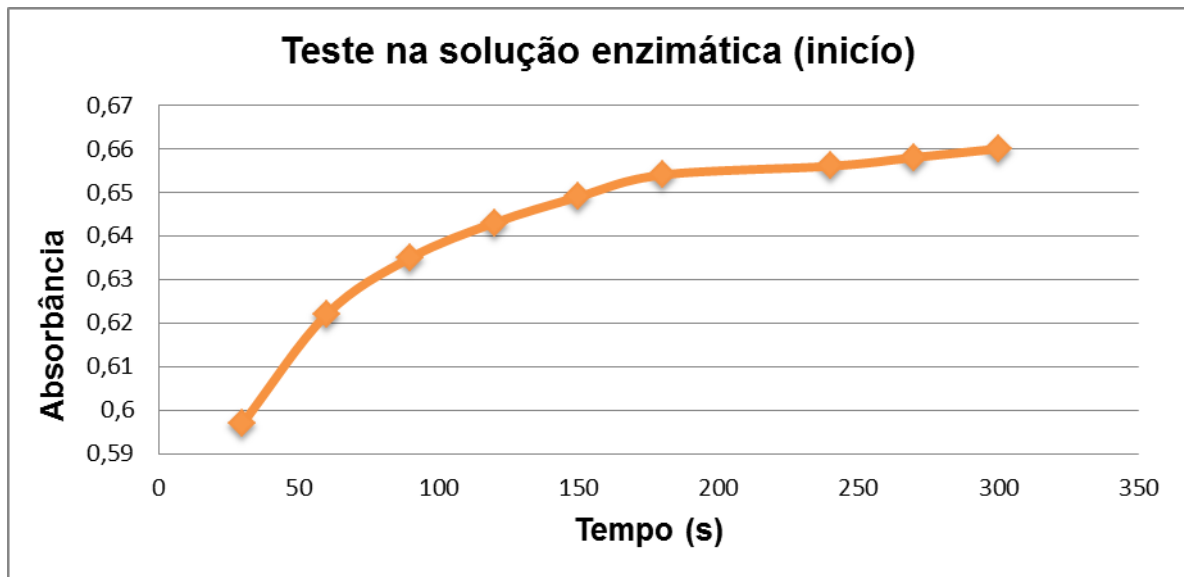


Figura 28 – Solução inicial sem purificação

A solução inicial apresentou 58,75 U de atividade (1U – representa a mudança de absorbância em 1 minuto) que representa 100%, incluindo a enzima peroxidase, inibidores e outras proteínas presentes na solução. Para determinação da atividade inicial, determinou-se a variação da absorbância no tempo entre 30 a 60 segundos, a partir da equação 3 abaixo.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_F - \text{Abs}_i \quad (3)$$

$$\Delta\text{Abs} = 0,622 - 0,597$$

$$\Delta\text{Abs} = 0,025$$

0,025 ----- 30 segundos

X ----- 60 segundos

$$\boxed{X = 0,050}$$

Em 1 minuto apresentou uma variação de absorbância de 0,050 (referência padrão para os outros testes). Para o teste, utilizou-se cerca de 0,8 mL da solução inicial, assim calculou-se quantos de atividade apresenta na solução inicial.

0,8 mL ----- 1U

47 mL ----- X

$$\boxed{X = 58,75 \text{ U}}$$

Após a realização da diálise com efeito da precipitação cooperação sulfato de amônio - acetona realizou-se o teste cinético no espectrofotômetro. A figura 29 representa o gráfico obtido após a precipitação cooperação sulfato de amônio – acetona.

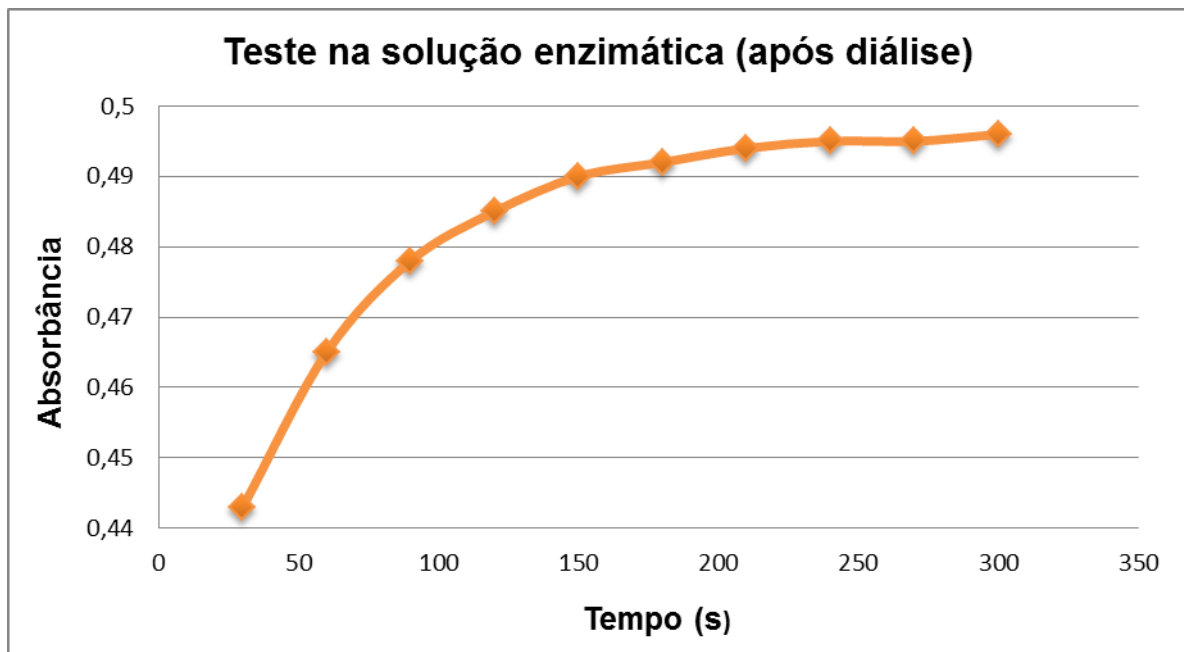


Figura 29 – Precipitação cooperação sulfato de amônio – acetona

A solução enzimática após a precipitação com sulfato de amônio – acetona apresentou uma atividade de 49,5 U, que representa uma recuperação enzimática de 84,25 %. A atividade foi determinada pela seguinte equação 3.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_F - \text{Abs}_i \quad (3)$$

$$\Delta\text{Abs} = 0,465 - 0,443$$

$$\Delta\text{Abs} = 0,022$$

$$0,022 \text{ ----- } 30 \text{ segundos}$$

$$X \text{ ----- } 60 \text{ segundos}$$

$$\boxed{X = 0,044}$$

Essa solução apresentou uma variação de absorvância de 0,044 em 1 minuto. Como na solução inicial (padrão) calculou-se que 1 U apresenta uma variação de 0,050, calculou-se quanto apresenta de atividade essa solução.

$$1\text{U} \text{ ----- } 0,050$$

$$X \text{ ----- } 0,044$$

$$\boxed{X = 0,88\text{U}}$$

$$0,88\text{U} \text{ ----- } 0,8 \text{ mL}$$

$$X \text{ ----- } 45 \text{ mL}$$

$$\boxed{X = 49,5\text{U}}$$

A atividade da solução enzimática após precipitação fracionada com acetona (1,0 X o volume da solução enzimática) foi de 39,6 U, que representou uma recuperação enzimática de 67,40 %. A figura 30 representa o gráfico obtido após a precipitação fracionada com acetona.

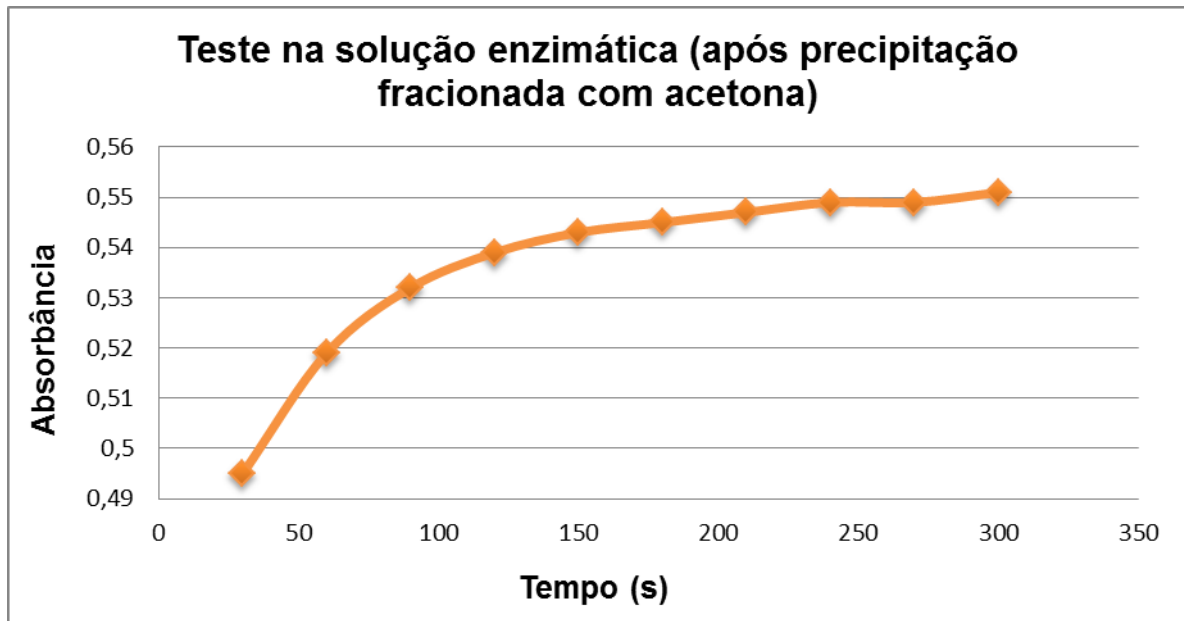


Figura 30 – Precipitação fracionada com acetona (1,0 X o volume da solução enzimática)

O cálculo para atividade da solução enzimática após precipitação fracionada com acetona foi baseado como já descrito nos testes anteriores.

O teste na solução enzimática final foi realizado após a segunda precipitação fracionada com acetona (adição de 0,8 X o volume da solução enzimática), que obteve uma atividade de 13,5 U, e uma recuperação enzimática de 23%.

De acordo com LIU et al., 2005, a absorbância no espectrofotômetro tem que apresentar uma absorbância menor que 0,8. Em seu trabalho foi utilizado 8 mL de solução para os testes enzimáticos. Nesse experimento utilizou-se 0,8 mL de solução enzimática e diluiu-se 10 X com água destilada e deionizada para obter 8 mL de solução para realizar os testes enzimáticos.

Com a diluição, obteve-se uma absorbância menor que 0,8, porém antes de efetuar a diluição, o teste enzimático foi realizado com 8 mL da solução enzimática, que exibiu uma absorbância maior que 0,8 no espectrofotômetro.

No teste final, a absorbância no período de 5 minutos foi baixa, porém, crescente, representada de forma linear no gráfico (8 mL de solução ultrapassou a absorbância

de 0,8). A figura 31 abaixo apresenta o gráfico da solução enzimática final obtido após o teste no espectrofotômetro.

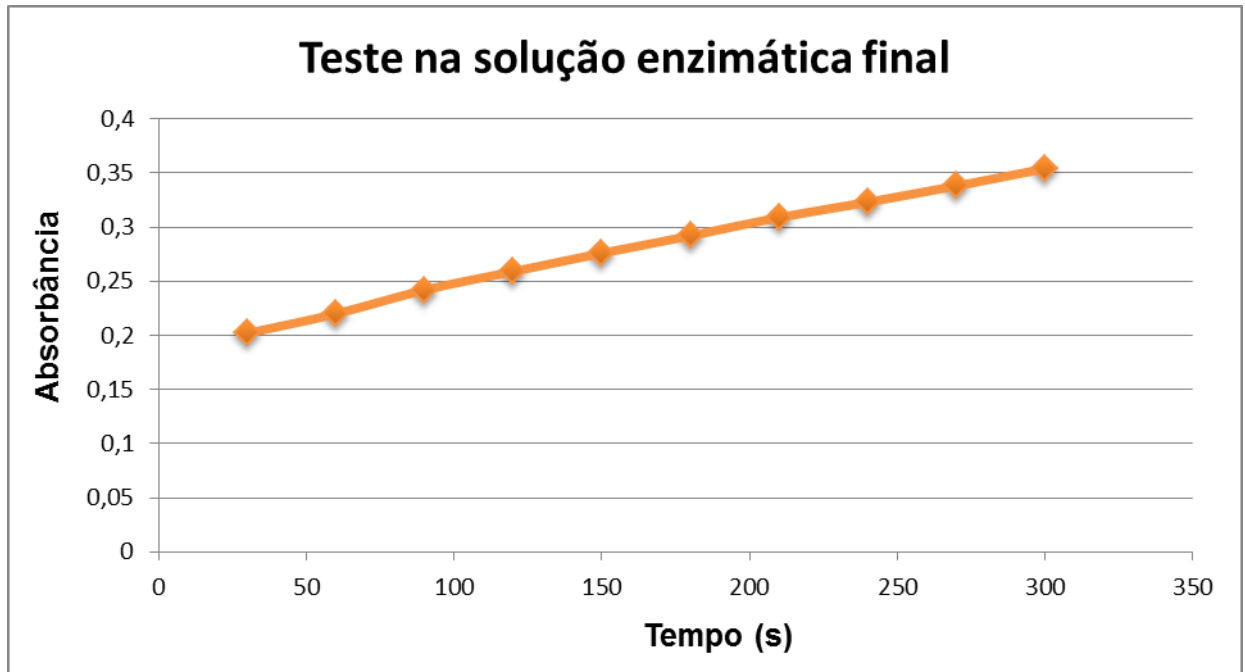


Figura 31 – Solução enzimática final

Para confirmar a pureza da enzima peroxidase, calculou-se o valor de RZ da enzima. O valor da absorbância obtido no comprimento de onda de 275 nm foi de 0,114 e no comprimento de onda de 403 foi de 0,118. Assim o RZ da enzima peroxidase nesse experimento apresentou um valor de 1,03.

De acordo com a empresa Sigma Aldrich, a enzima peroxidase para ser comercializada no mercado deve apresentar um valor de $RZ \geq 1,0$. No trabalho de LIU et al., 2005 a peroxidase apresentou um RZ de 1,32, e uma recuperação de 65%. Comparando o RZ em que LIU et al., 2005 encontrou, e o RZ apresentado nesse experimento, a diferença pode existir pela quantidade de solução inicial em que LIU et al., 2005 utilizou, pois este realizou o seu experimento com 2300 mL de solução inicial, enquanto nesse experimento utilizou-se 47 mL. Conclui-se que quanto maior for a quantidade de solução inicial, maior a chance de recuperação enzimática e maior o valor de RZ.

Não se utilizou a mesma quantidade da solução inicial do trabalho de LIU et al., 2005, pois a centrífuga não era compatível para trabalhar com um alto volume de solução.

Em todo o experimento, não se utilizou solução tampão, e a temperatura foi de 25°C (temperatura ambiente), no entanto a solução enzimática foi armazenada no refrigerador. De acordo com os resultados apresentados, tanto o pH, quanto a temperatura não foram interferentes para a purificação, assim corroborando com a literatura que a enzima peroxidase apresenta boa termoestabilidade.

Outro fator muito importante para a realização do experimento é a frequência da centrífuga, pois os primeiros experimentos foram realizados numa centrífuga de 1100 rotação por minuto, que mostrou-se insuficiente para separação do precipitado do sobrenadante. A figura 32 representa o precipitado formado com a centrífuga de 1100 rpm.

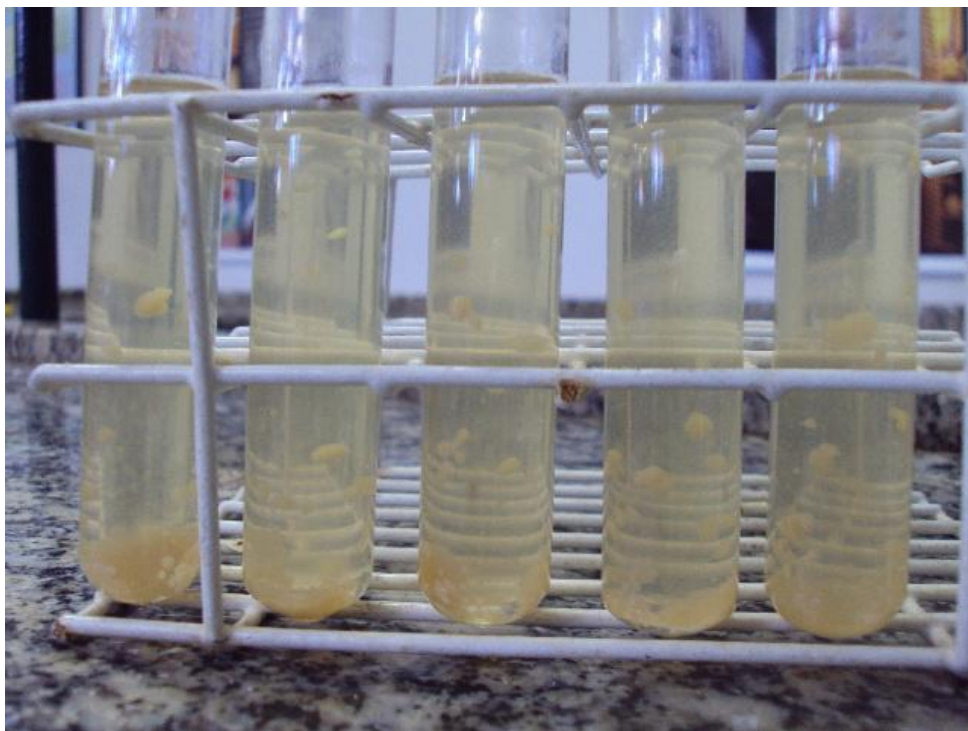


Figura 32 – Formação do precipitado utilizando 1100 rpm

Os experimentos foram realizados na centrífuga CELM, modelo; Combate, com 3500 rpm, que foram suficientes para uma boa separação do precipitado do sobrenadante.

O processo de purificação da enzima peroxidase apresentou uma recuperação de 27,3 %, que de fato foi relativamente baixa quando comparado com a do trabalho de LIU et al., 2005, que obteve 65%.

A metodologia demonstra que o uso de uma maior quantidade de casca de soja, aumenta a probabilidade de uma boa purificação da enzima peroxidase com condições que possam facilitar o experimento.

A tabela 5 abaixo resume todos os dados obtidos no experimento da purificação da enzima peroxidase na casca de soja.

Experimento	Total de volume (mL)	Total de atividade U	Recuperação enzimática %
Solução de enzima inicial	47	58,75	100
Cooperação sulfato de amônio - acetona	45	49,5	84,25
1º precipitação fracionada com acetona	33	39,6	67,40
2º precipitação fracionada com acetona	15	13,5	23

Tabela 5 – Resultados do experimento da purificação da enzima peroxidase

9. CONCLUSÃO

O método utilizado para purificação da peroxidase na casca de soja foi considerado simples, e se mostrou eficiente para purificação da enzima. A boa termoestabilidade da peroxidase foi evidenciada durante o procedimento.

Existem vários métodos para purificar uma enzima, e depende do método e a recuperação da enzima, se avalia o custo para comercialização. A forma de purificação realizada nesse trabalho foi de baixo custo, e a enzima pode receber um valor menor do que, por exemplo, se fosse purificada por método de cromatografia de afinidade ou outros tipos de cromatografia.

O RZ obtido para a enzima peroxidase nesse trabalho permite a sua comercialização em inúmeras aplicações como: laboratórios, indústrias, síntese de resina fenólica, degradação da lignina entre outras aplicações envolvendo a peroxidase.

O objetivo desse trabalho foi purificar a peroxidase presente na casca de soja, e os resultados obtidos demonstram que ela pode ser comercializada para algumas aplicações. São necessários estudos específicos para comprovar a sua aplicação na prática, com a utilização de outro método de quantificação para comprovar a sua pureza.

Por ser um método simples e de baixo custo mostra-se útil para a purificação da peroxidase de casca de soja. No entanto são necessários estudos para investigar as limitações que este método pode apresentar.

REFERÊNCIAS

AMARAL, Vera Maria Gurgel do. **A importância da soja como alimento funcional para a qualidade de vida e saúde**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BANCI, L. Sctrural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**. v. 53, 1997, p.253-263.

BATISTA, Irinéa de Lourdes; LAVAQUI, Vanderlei; SALVI, Rosana Figueiredo. Interdisciplinaridade escolar no ensino médio por meio de trabalho com projetos pedagógicos. **Investigações em Ensino de ciências**, v.13, 2008, p.209-239.

BENATTI, L.B. **Vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar: caracterização da resposta fisiopatológica de três variedades de cana-de-açúcar**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, 2004.

BORRMANM, Daniela. **Efeito do déficit em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores**. 2009. 107p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – São Paulo, 2009.

BLUNDELL, T.L; JOHNSON, L.N. **Protein Crystallography**. New York: Editora Academic Press, 1976.

BRÁZ, Leandro Mateus. **Extração e Purificação de Peroxidase de Soja**. 2008. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/ Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA.

BRACHT, Adelar, ISHII-IWAMOTO, Emy Luiza, **Métodos de Laboratório em Bioquímica**, 1.ed. Barueri: Editora Manole, 2003.

CANÇADO, R. A. **Avaliação Microbiológica e Micotoxicológica De Grãos de Milho (*Zea Mays* Linné) e Soja (*Glycine Max.* (Linné) Merrill) Provenientes de Cultivo Convencional das Sementes Naturais e Geneticamente Modificadas**. Tese (Doutorado) - Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CONN, Erica E, STUMPF, P. K, **Introdução à Bioquímica**, 4.ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980.

CORRELA, R.M; DAZZANI, Mellssa; MARCONDES, Marla Eunice R; TORRES, Bayardo B. A bioquímica como ferramenta interdisciplinar. **Química Nova na Escola**, n.19, 2004, p.19-23.

CURTIS, Helena. **Biologia**, 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1977.

CHAMPE, Pamela C, HARVEY, Richard A, **Bioquímica Ilustrada**, 2.ed. Porto alegre: Editora Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996.

DEVLIN, Thomas M, **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**, 6.ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2007.

DEUTSCHER, M.P. **Methods in Enzymology**. San Diego: Editora Academic Press, 1990, p.285-306.

FAZENDA, I. **Integração e interdisciplinaridade no ensino brasileiro: efetividade ou ideologia?** São Paulo: Editora Loyola, 1979.

FERREIRA, Marcia de Aguiar, **Controle de Qualidade Físico-Químico em Leite Fluído**. 2007. 17p. Dossiê Técnico – Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília - CDT/UnB, Brasília, 2007.

FERREIRA, Evandro Maia. **Substituição parcial do milho pela casca de soja na alimentação de cordeiros de raça Santa Inês em confinamento**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERREIRA, João Carlos Dias. **Purificação e caracterização parcial da peroxidase do abacaxi**. 1983. P.89. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1983.

FÉLIX, Ananda Portella. **Avaliação nutricional de derivados proteicos de soja para cães**. 2011. 168p. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FORGIARINI, Elaine. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 2006.110p. Dissertação (Mestrado) – Pós – Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

FRACASSO, Aline Francielle. **Cinética de hidratação de soja: Estudo comparativo entre soja transgênica e convencional**. 2011. 123p. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FRIC, F. Oxidative Enzymes. In: HEITEFUSS.; WILLIAMS, P.H. (Ed). **Physiological plant pathology**. New York: Springer-Verlag, 1976, p.617-631.

FREITAS, Ana Lúcia Pontes. **Bioquímica do cotidiano para as salas de aula**. Disponível em <http://143.107.180.237/cbme/index.php/news_site/sala_dos_professores/reportagens_entrevistas_e_artigos/educacao_e_difusao_de_ciencia/bioquimica_do_cotidiano_para_as_salas_de_aula> . Acesso em 22. Abr. 2012

GOLDBERG, R; LÊ, T, CATESSON, A.M. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.36, p.503-510, 1985.

GOMES, P. **A soja**. 5.ed., São Paulo: Editora Nobel, 1986.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**. 5. ed. Oxford: IRL Press, 1994.

HIRAGA, S; SASAKI, K; ITO, H; OHASHI, Y; MATSUI, H.A. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, New York, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HINER, A.N.P; HÉRNANDEZ-RUIZ, J; WILLIAMS, G.A; ARNAO, M.B; GÁRCIA-CÁRNOVAS, F; ACOSTA, M. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalysed reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysic**.v.392, n.2, p.295-302, 2001.

HOAGLAND, R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington :**Americal Chemical Society**,1990, p.87-113.

HSU, J.T; FALKNER, D.B; GARLEB, K.A; BARCLAY, R.A; FAHELY, G.C; BERGER, L.L. Evaluation of corn fiber, cottonseed hulls, oat hulls and soybean hulls as roughage sources for ruminants. **Journal of Animal Science**. Savoy, v.65, n.1, 1987, p.244-255.

JÚNIOR, César da Silva, SASSON, Sezar. **Biologia**, 8.ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2005.

JUNIOR, Agenor Furigo. **Enzimas e suas aplicações cinética enzimática**. Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis. Disponível em <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatica.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2012.

JUNIOR, Wilmo Ernesto Francisco; FRANCISCO, Wellington. Proteínas: Hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, n.24, 2006, p.12-16.

JUNIOR, Wilmo E. Francisco. Bioquímica no ensino médio?! (de)limitações a partir da análise de alguns livros didáticos de química. **Ciência & Ensino**, v.1, n.2, 2007, p.1-10.

KAMIMURA, Gengis Ferro. **Isolamento, purificação e caracterização da peroxidase de Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*)**. 2006. p.100. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001.

LAURENCE, J; **Biologia**, 1.ed. São Paulo: Editora Nova Geração, 2005.

LASKIN, A.I.; **Enzymes and immobilized cells in biotechnology**, 1.ed. London: Editora Cummings, 1985.

LEHNINGER, Albert L. **Princípios de Bioquímica**, 1.ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1984.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**, 6 .ed. Tradução de Thomas M. Devlin. São Paulo: Editora Blücher, 2007.

LEONI, Vanessa Bara. **A Interdisciplinaridade no fazer pedagógico na disciplina de Ciências: reflexões sobre a intervenção Mito e Verdades Sobre a Raiva**. Disponível em < <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/416-4.pdf> >. Acesso em 21. maio. 2012.

LIMA, Leonardo Henrique França de. **Precipitação de lisozima e insulina bovina e suína por “salting-out” com o uso de eletrólitos voláteis**. 2006. 87p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LIU, J; ZHANG, Y; QIU, L; YE L, XIA, Y; SU, Z. A novel process of purifying soybean hull peroxidase. **University of Science and Technology**, v.19, may/december, 2005. p. 205 – 199.

LOPES, Sônia, ROSSO, Sergio. **Biologia**, 1.ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2005.

MACIEL, Hermelinda Penha Freire. **Extração, purificação e caracterização bioquímica de peroxidase de folhas de CopaiferaLangsdorffii (COP)**. 2002. 155p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MARZZOCO, Anita, TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica Básica**, 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. S.A., 1999.

MAGALHÃES, Giuliana Castro. **Análise da atividade de algumas enzimas antioxidantes em plantas de soja (Glicine Max L. Merr.) sob níveis de manganês, em função da micorrizaarbuscular**. 2002. 102p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MUGGE, Ernani. **Ensino médio e educação literária: propostas de formação do leitor**. 2011. 187p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Letras – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MURRAY, Robert K., GRANNER, Daryl K., MAYES, Peter A., RODWELL, Victor W., **Harper: Bioquímica**, 8.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

MUNDSTOCK, Claudio. M. **A cultura da soja como fator de transformação e viabilização das propriedades agrícolas produtoras de grãos do Rs: uso de tecnologia e os efeitos na inclusão social e conservação ambiental**. In: ENCONTRO CEPAN: VANTAGENS COMPETITIVAS DOS AGRONEGÓCIOS NO MERCOSUL, 3, 2005. São Paulo. Brasil. **Resumos**. São Paulo: Centro de eventos da PUC, 2005.

NAKAMURA, T; OWEN, F.G. High amounts of soyhulls for pelleted concentrate diets. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.4, 1989, p.988-994.

OHIRA, Márcio Akio. **Formação inicial de professores para uma**

interdisciplinaridade escolar. 2006. 89p. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ensino de Ciências e Educação Matemática – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

OLIVO, Tânia Evelyn. Determinação da Umidade da Soja por medida Capacitiva. 2010. 78p. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em engenharia elétrica – Universidade do Paraná, Curitiba, 2010.

PAULINO, Wilson Roberto; **Biologia Atual**, 3.ed. São Paulo: Editora Ática, 2002.

PEDROSO, A. M. **Substituição do milho em grãos por subprodutos da agroindústria na ração de vacas em confinamento**. 2006. 120p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PEREIRA, Ana Maria. **Purificação e caracterização da peroxidase do Taperebá (Spondias lutea L.)**. 2003. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PEREIRA, Carolina Arantes; CAZEIRO, Ana Claudia Martins; SANTOS, Leticia Leal Oberding M. Currículo e formação de professores em uma perspectiva interdisciplinar. **Eccom**, v.2, n.4, 2011, p.83-90.

PINTO, Andreia Maria Almeida. **Efeito de alta pressão na atividade da enzima peroxidase**. 2008. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química

– Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

PUGINE, Silvana Marina Piccoli. **Efeito do sistema ácido indol – 3 – acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus*.** 2008. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

RADAUTI, Píceo. **Enciclopédia Barsa Universal**, 2.ed. Espanha: Editora Planeta, S.A, 2009.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L. M. C.; CABRAL, L. C.; FARIAS, C. A. A.; DOMINGUES, A. M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **FoodControl**, vol. 14, n. 3, 2003 p. 187-192.

SAMARA, Sandro Roberto. **Cálculo de Recuperação e Enriquecimento de atividade enzimática.** <<http://www2.iq.usp.br/docente/srmarana/guia2.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2012.

SANTOS, M.C; TOGNOLLI, J.O; OLIVEIRA, O.M.M.F.Quimiometria como ferramenta analítica para definição das condições de ensaio da enzima peroxidase. **Revista Eclética Química**, v.35, n.4, 2010, p. 121-131.

SANTOS, Patricia Pimentel dos. **Uso de casca de soja ou bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de ovinos como fonte de fibra em rações contendo alta proporção de concentrado.** 2008. 62p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SANTOS, Wildson Luiz P. dos; SCHNETZLER, Roseli Pacheco. Função Social: O que significa ensino de química para formar o cidadão? **Química Nova na Escola**, n.4, 1996, p.28-34.

SARWAR, M; FIRKINS, J.L; EASTRIDGE, M.L Effect of replacing neutral detergent fiber of forage with soyhulls and corn gluten feed for dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.3, 1991, p.1006-2017.

SILVA, Luciano Bruno de Carvalho. **Identificação de lipoxigenases em sementes de soja Glycine Max (L) Merrill de diferentes linhagens**. 2004. 68p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, Marilice Pompeu da. **Interação e interdisciplinaridade: pilares da produção textual no ensino fundamental**. 2005. 126p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Letras – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. Leite: Aspectos de composição e propriedades. **Química nova na escola**, n. 6, 1997, p. 5 – 3.

SOUZA, Simão Lindoso. **Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase acoplástica responsiva micorriza arbuscular**. 2006. p.101. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SCHMIDT, T.E. **Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturados**. 2008. p.151. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

STRYER, Lubert. **Bioquímica**, 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. S.A., 1994.

TAMBARA, A.A.C; OLIVO, C.C.J; PIRES, M.B.G; SANCHEZ, L.H.B. Avaliação *in vivo* da digestibilidade da casca do grão de soja moída com ovinos. **Ciência Rural**, v.25, n.2,1995, p.283-287.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration, and physiological effects. **Documentos da Embrapa**, v.169, n.1, 2001, p.9-14.

ULIANA, Maíra Rodrigues. **Bebida mista de extrato de soja e suco de amora: Análises químicas e sensorial**. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu, 2009.

WATANABE, Érika Ohta. **Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis**. 2004. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

WEINGARTNER, Valesca. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e**

Aspergillus niger. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Processos Biotecnológicos – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.