

Capítulo 5

Oxidoredutases

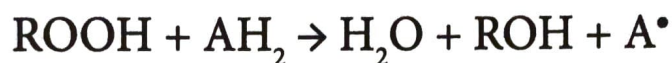
Severino Matias de Alencar • Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 168
- ▶ Polifenoloxidasas, 169
- ▶ Peroxidasas, 179
- ▶ Lipo-oxigenases, 184
- ▶ Catalases, 189
- ▶ Glicose-oxidases, 192
- ▶ Xantina-oxidases, 195
- ▶ Ascorbato-oxidases, 197
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 198
- ▶ Bibliografia, 201

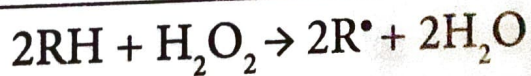
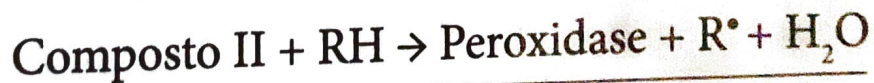
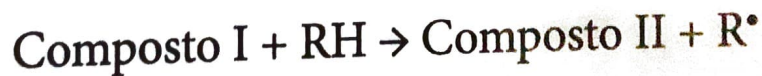
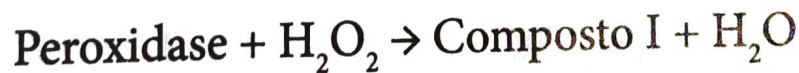
Peroxidases

PER são enzimas capazes de oxidar diferentes compostos (mono- e di-hidroxifenóis e compostos fenólicos complexos, preferencialmente) na presença de peróxidos, gerando radicais livres.

Peroxidases (PER) (EC 1.11.1.x) são enzimas capazes de oxidar diferentes substratos fenólicos e não fenólicos, na presença de peróxidos, gerando radicais livres. Na ausência de peróxidos, essas enzimas podem ainda catalisar a oxidação de alguns substratos com auxílio de oxigênio molecular e também hidroxilar diferentes compostos aromáticos (tirosina, fenilalanina e outros fenólicos). A reação geral catalisada pelas peroxidases pode ser descrita pela fórmula a seguir:



Nela, o composto ROOH é o substrato oxidante, normalmente o peróxido de hidrogênio ($\text{R} = \text{H}$), mas podendo ser também um metil ou etil peróxido. Durante a reação, o peróxido reage com a enzima, formando o composto I oxidado que se reduz em duas etapas (passando pelo intermediário composto II), para regenerar a enzima. Há então a geração de radicais livres (R^\bullet), conforme as equações a seguir:



Por utilizarem um grande número de substratos e formarem produtos que sofrem subsequentes reações (condensação e polimerização), os efeitos específicos da ação das peroxidases em organismos vivos são difíceis de se identificar, podendo ser confundidos com produtos de reação de outras enzimas (p. ex., PFO).

As PER de maior importância em alimentos são as de origem vegetal: ferritoporfirina-peroxidases em sua maioria.

Fontes e principais características

As peroxidases são onipresentes na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, algas, plantas e animais. Com base na presença ou ausência do grupo heme, essas enzimas têm sido classificadas em heme- e não heme-peroxidases. As heme-peroxidases são ainda divididas em duas superfamílias: a superfamília peroxidase-ciclo-oxigenase (PCOXS) e a superfamília peroxidase-catalase (PCATS). Um esquema geral de classificação das peroxidases está apresentado na Figura 5.9.

As peroxidases da superfamília PCOXS são peroxidases exclusivamente animais, que se acredita estarem envolvidas na imunidade inata, respostas de defesa etc. Mieloperoxidase (MPO), peroxidase de eosinófilos (EPO), lactoperoxidase (LPO) e peroxidase da tireoide (TPO) pertencem a essa família.

A superfamília PCATS contém as heme-peroxidases não animais mais estudadas. Inicialmente essa superfamília foi dividida em heme-peroxidase vegetal, fúngica e bacteriana, dependendo da fonte da peroxidase. Mais tarde, em função da descoberta de heme-peroxidase em invertebrados aquáticos, o nome foi alterado para peroxidase-catalase. As peroxidases não animais são ainda subdivididas em três classes:

- Peroxidases classe I: incluem as peroxidases de procariotos e eucariotos pertencentes a fontes não animais. Elas exibem um papel importante no estresse oxidativo, ou seja, na desintoxicação do H_2O_2
- Peroxidases classe II: são exclusivas de fungos e têm papel importante na biodegradação de lignina
- Peroxidases classe III: são amplamente distribuídas no reino vegetal. Nessa classe estão incluídas as peroxidases de rábano, peroxidase de amendoim, peroxidase de soja (SBP) etc., conhecidas por desempenhar diversas funções no ciclo de vida das plantas, como no metabolismo da parede celular, na lignificação, na suberização, no metabolismo de ROS, na cicatrização de feridas, no

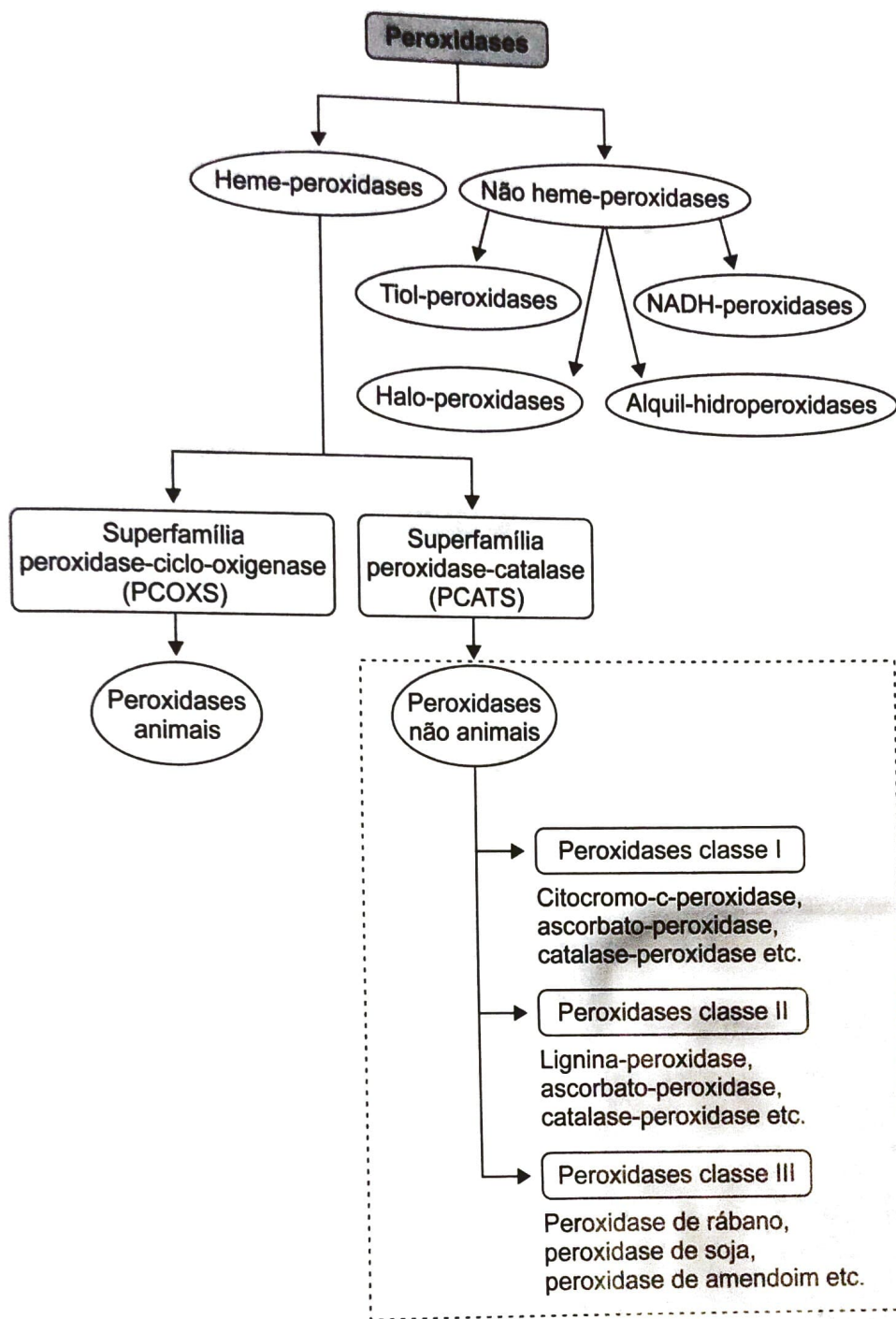


Figura 5.9 Esquema de classificação da peroxidases. Reproduzida de Pandey *et al.*, 2017.

crescimento e no amadurecimento de frutos, na germinação de sementes etc.

A principal característica das peroxidases é sua termoestabilidade, associada à sua capacidade de se regenerar após desnaturação térmica. Essa capacidade, incomum entre as enzimas, deve-se provavelmente à reincorporação do grupo prostético à apoenzima, após o tratamento térmico. A regeneração da atividade se dá em poucas horas, em temperatura ambiente, e em períodos mais longos de

A principal característica das peroxidases é sua termoestabilidade, associada à sua capacidade de se regenerar após desnaturação térmica, capacidade incomum entre as enzimas.

repouso, sob refrigeração e congelamento. Sua eficiência está relacionada a dois fatores:

- Grau de desnaturação alcançado durante o tratamento térmico: quanto mais eficiente for o branqueamento, mais lenta e menos eficiente é a regeneração
- pH do meio: em geral, em meios ácidos a desnaturação é mais eficiente e a renaturação, mais lenta.

As peroxidases são capazes, ainda, de manter sua atividade em condições de temperatura e atividade de água muito baixas, como as encontradas em produtos congelados.

Importância em alimentos

A atividade das peroxidases está intimamente ligada ao desaparecimento do aroma e ao surgimento de *off-flavors* em produtos vegetais, principalmente naqueles conservados por congelamento. Além disso, essas enzimas podem participar da alteração da cor e na destruição do valor nutritivo desses produtos (oxidação de vitamina C e de aminoácidos). Em virtude disso, é de extrema importância a aplicação de um tratamento térmico rigoroso antes do congelamento desses produtos. Para uma eficiente inativação das peroxidases, em geral, é recomendada a aplicação de temperaturas entre 90 e 100°C. A presença de NaCl e o pH baixo auxiliam no processo, podendo reduzir o tempo de tratamento. Dada a capacidade de regeneração dessas enzimas, a determinação da vida de prateleira de produtos vegetais congelados está condicionada ao estudo da taxa dessa regeneração no produto e ao conseqüente surgimento dos efeitos relacionados a sua atividade.

Aplicação industrial

Por apresentarem alta termorresistência, as peroxidases são usadas na indústria de alimentos como indicadores do processo de branqueamento, principalmente em produtos de origem vegetal. As peroxidases do leite também são utilizadas como parâmetros de eficiência da pasteurização. A lactoperoxidase do leite cru não causa grandes problemas de qualidade, pois não há peróxido de hidrogênio no

As PER apresentam atividade em condições de baixa temperatura e baixa atividade de água, características de produtos congelados. As principais conseqüências de sua atividade são desaparecimento de aromas, surgimento de *off-flavors* e alterações de cor e valor nutritivo.

Em virtude de sua alta termoestabilidade, as PER são utilizadas como indicadores da eficiência de tratamentos térmicos (branqueamento, pasteurização).

meio. Ela é inativada em processos térmicos de 82°C/20 s ou a 75°C/19 min. No entanto, uma vez que pode regenerar-se ao longo do tempo de armazenamento, mesmo sob refrigeração, esse tipo de teste deve ser realizado logo após o tratamento térmico. Em ambos os casos, aproveita-se a habilidade das peroxidases de formar compostos coloridos, que podem ser quantificados por colorimetria, na presença de diferentes compostos. Em geral se utiliza o guaiacol, que, após peroxidação gera o tetraguaiacol, um composto vermelho-escuro (Figura 5.10).

Outra aplicação da peroxidase é na remoção da lignina para a produção de papel, pois a deslignificação química leva à produção de vários poluentes. De fato, a degradação enzimática da lignina pela peroxidase é sugerida como a melhor alternativa para esse processo. A lignina-peroxidase (LiP) e a manganês-peroxidase (MnP) têm sido usadas com sucesso em biopolpação, biobranqueamento e deslignificação seletiva na indústria de papel.

Biossensores à base de peroxidase têm sido utilizados em sistemas analíticos para a determinação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido orgânico e, quando coimobilizados com a enzima produtora de peróxido de hidrogênio, podem ser utilizados para a determinação de glicose, alcoóis, glutamato e colina. A peroxidase também tem sido utilizada em *kits* de diagnósticos, para a quantificação de ácido úrico, glicose, colesterol, lactose etc. Ensaios de imunoadsorção ligados à enzima (ELISA), nos quais a

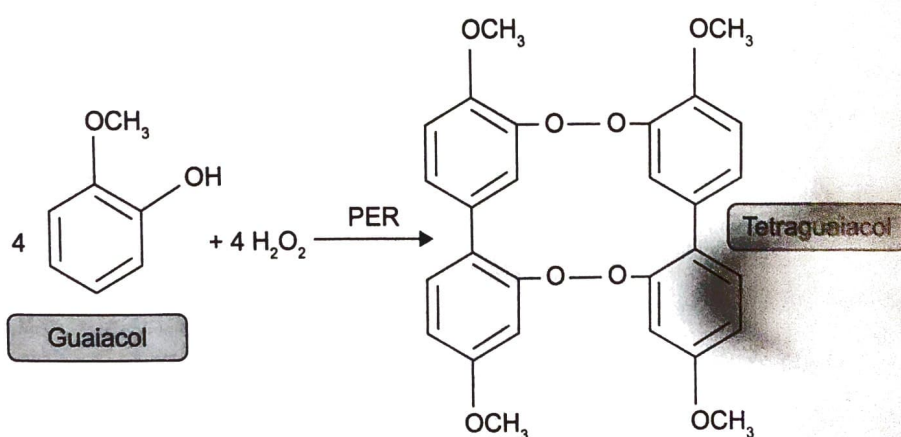


Figura 5.10 Ação da peroxidase sobre o substrato guaiacol. Formação de coloração vermelho-amarronada (tetraguaiacol).

PER encontram ainda aplicações na indústria de papel e celulose e em testes analíticos na forma de biossensores.

peroxidase é a enzima mais comumente usada para marcar um anticorpo, são uma maneira simples e confiável para se detectarem toxinas, patógenos, risco de câncer na bexiga e próstata e muitos outros analitos.

Lipo-oxigenases

Lipo-oxigenases catalisam a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, gerando hidroperóxidos na presença de O_2 . O produto da reação é instável e se degrada espontaneamente em compostos de menor massa molecular e aroma característico de ranço.

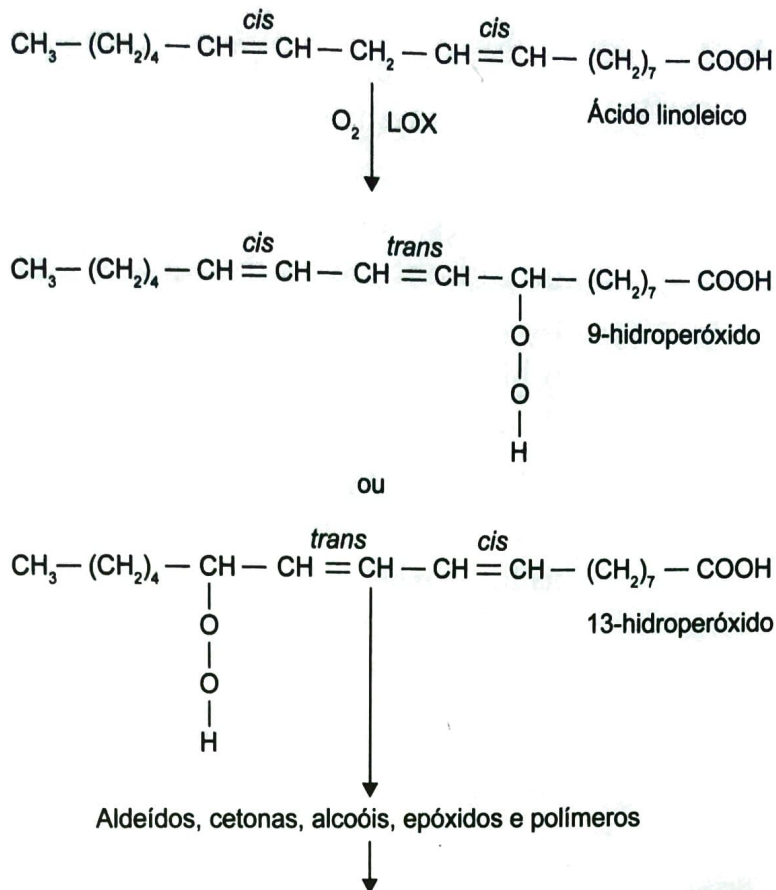
As lipo-oxigenases (LOX) (EC 1.13.11.12) são também conhecidas como lipoxidases ou caroteno-oxidases, sendo encontradas em muitas plantas e animais. Essas enzimas catalisam a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados contendo *cis*, *cis*-1,4-pentadieno para o seu conjugado correspondente *cis*, *trans*-dienoico-mono-hidroperóxido, na presença de oxigênio molecular.

Essas enzimas estão presentes em um grande número de tecidos, mas são particularmente abundantes em sementes de feijão, ervilha e tubérculos de batata. As LOX de diferentes fontes catalisam a oxigenação em diferentes pontos ao longo da cadeia de carbono, apresentando, portanto, regiosseletividade. Tal especificidade tem implicações significativas para o metabolismo dos hidroperóxidos resultantes nos diversos metabólitos secundários. Os ácidos linoleico e linolênico são os principais ácidos graxos poli-insaturados nos tecidos vegetais e a inserção do oxigênio ocorre na posição 9 ou 12, para gerar 9 ou 13-hidroperóxido, respectivamente. Os produtos da reação são instáveis e se degradam, formando compostos de baixa massa molecular, em geral aldeídos e cetonas, responsáveis pelo aroma de ranço (Figura 5.11).

Fontes e principais características

São enzimas produzidas por plantas, animais e microrganismos em níveis muito variáveis, dependendo do tecido, da idade, de características genéticas, ambientais e de manejo. De maior interesse para a ciência de alimentos são as lipo-oxigenases de origem vegetal. Estas são mais encontradas em sementes, sendo mais abundantes em leguminosas do que em gramíneas (cereais). Na maioria das vezes são encontradas isoenzimas, que podem diferir significativamente nas propriedades, tais como pH ótimo, especificidade do substrato,

As lipo-oxigenases de maior interesse em alimentos são as produzidas por grãos (cereais e leguminosas). Nesses produtos e em seus derivados, as lipo-oxigenases podem ser responsáveis pelo fim da vida de prateleira.



Alterações no *flavor*, na cor, no sabor e no valor nutricional

Figura 5.11 Formação de hidroperóxidos pela enzima lipo-oxigenase (LOX).

produto final, estabilidade térmica e habilidade para participar em reações de co-oxidação. Nas plantas existem duas categorias principais de lipo-oxigenases: (1) lipo-oxigenases do tipo 1 (soja), que se encontram em poucas plantas, têm pH ótimo de 9,0 e apresentam especificidade para ácidos graxos livres; (2) lipo-oxigenases do tipo 2, que ocorrem em uma grande variedade de plantas, têm pH ótimo de 6,5 e participam de reações de co-oxidação de carotenoides.

Em geral, as lipo-oxigenases são específicas para lipídeos que apresentam dupla insaturação, com um grupo metileno entre elas, localizado no carbono $\omega 8$ (*cis, cis*-1,4-pentadieno). É comum que as lipo-oxigenases de origem vegetal tenham maior afinidade pelos ácidos linoleico e linolênico, enquanto as de origem animal apresentam menor K_m para os ácidos araquidônico e eicosapentaenoico. A reação pode acontecer mais rapidamente sobre ácidos graxos esterificados (em triglicerídeos ou metilados) ou livres, de acordo com a fonte da enzima.

É comum que as lipo-oxigenases de origem vegetal tenham maior afinidade pelos ácidos linoleico e linolênico, e as de origem animal pelos ácidos araquidônico e eicosapentaenoico. A reação pode ocorrer mais rapidamente sobre ácidos graxos esterificados ou livres, de acordo com a fonte da enzima.

Inicialmente a enzima deve ser ativada, passando de sua forma Fe^{2+} para a forma Fe^{3+} . Essa ativação é favorecida por hidroperóxidos de ácidos graxos já presentes no meio (formados por oxidação fotoquímica, por exemplo). A enzima ativada promove a retirada estereoquímica de 1 hidrogênio do carbono $\omega 8$, formando um radical. Em seguida, a enzima insere o O_2 na molécula, que se isomeriza para formar o hidroperóxido final. Esse produto pode sofrer o ataque de diferentes enzimas (isomerases, desidrogenases etc.) ou sofrer decomposição química, gerando aldeídos e cetonas cujo aroma é característico de rancidez. Na ausência de O_2 , as lipo-oxigenases catalisam reações de peroxidação entre o radical formado no primeiro passo da reação e hidroperóxidos presentes no meio (Figura 5.12).

A função biológica dessas enzimas não é muito clara. Mas sabe-se que sua atividade aumenta significativamente

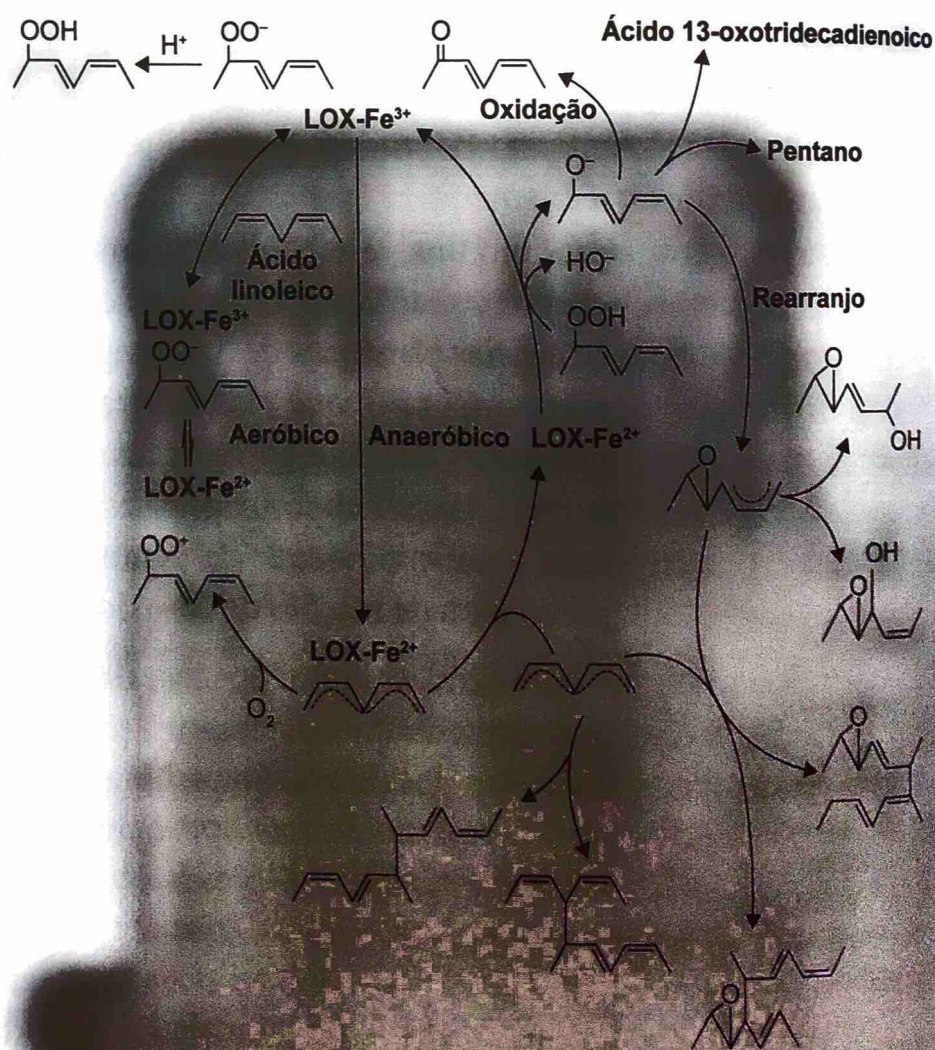


Figura 5.12 Formação de produtos pela lipo-oxigenase (LOX) durante reações aeróbicas e anaeróbicas a partir de substratos lipídicos poli-insaturados. Reproduzida de Gardner, 1988.

durante os primeiros dias da germinação e há evidências de que as lipo-oxigenases estejam envolvidas na síntese do etileno (oxidação do ácido 1-aminopropano) e na síntese de xantonina, um inibidor do crescimento (a partir de violaxantina e ácido linoleico). Há também fortes indícios de que a lipo-oxigenase seja crucial para a defesa das plantas. Apesar de o mecanismo de resistência não ser conhecido, muitas plantas respondem ao ataque de insetos ou ferimentos com a produção de ácido jasmônico (Figura 5.13).

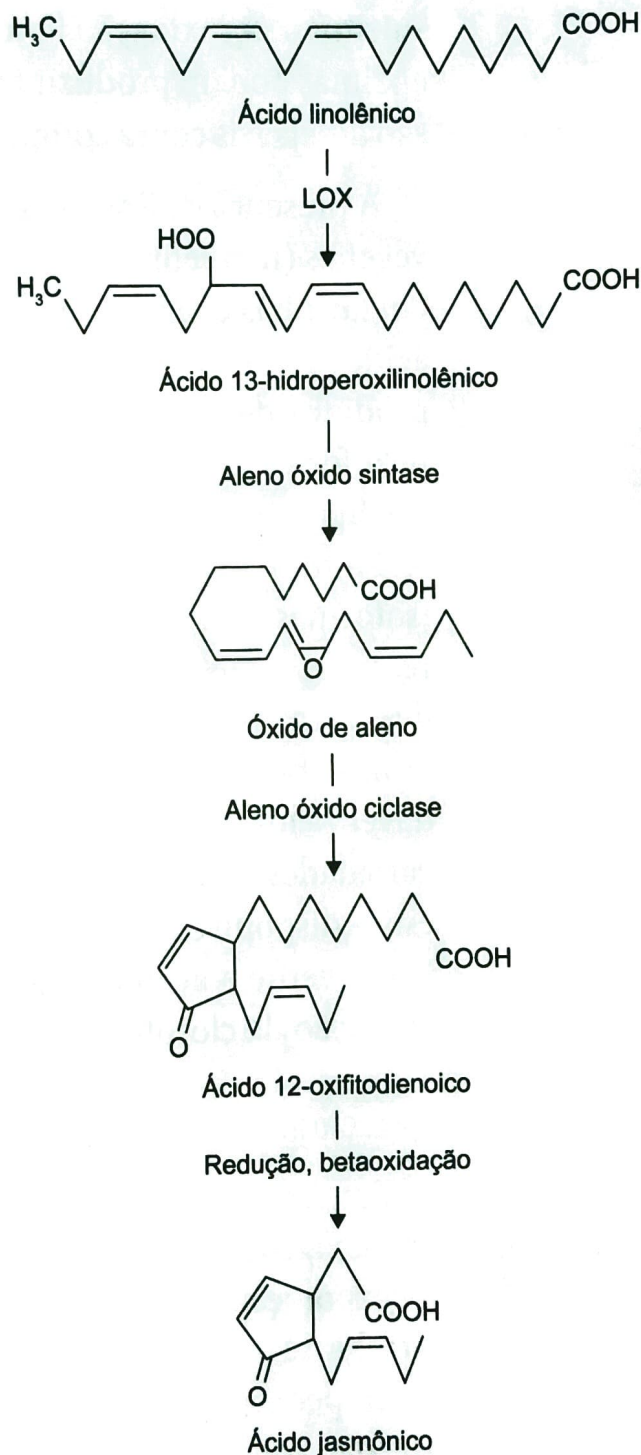


Figura 5.13 Formação de ácido jasmônico pela lipo-oxigenase (LOX).

Lipo-oxigenases animais estão envolvidas na síntese de compostos bioativos (lipoxinas e oxieicosanoides).

Importância em alimentos

Lipo-oxigenases causam o surgimento de rancidez e *off-flavor* em produtos vegetais, além de serem responsáveis pela destruição de pigmentos, vitaminas (clorofila, carotenoides) e ácidos graxos essenciais.

Lipo-oxigenases são de grande interesse para a ciência de alimentos, principalmente por seu papel na gênese do *off-flavor* e compostos de aroma, além de sua influência na textura e nas propriedades nutritivas dos alimentos. A maioria dos vegetais contém ácidos linoleico e linolênico, que são sujeitos à peroxidação lipídica pelas lipo-oxigenases. Essas enzimas podem produzir tanto compostos com aromas que são desejáveis como compostos responsáveis pelo *off-flavor*.

A presença de lipo-oxigenases, principalmente em óleos vegetais (não refinados), em grãos e cereais armazenados e em farinhas e farelos, pode levar à rancidez, destruição de ácidos graxos essenciais, de pigmentos e de vitaminas. Em produtos de soja, a ação de lipo-oxigenases é responsável pela formação de *off-flavor* (também comum em milho e ervilha) e pelo surgimento de amargor (pela oxidação de fosfatidil-colina). A soja contém pelo menos 6 diferentes isoformas de lipo-oxigenase, codificadas por genes diferentes, das quais 4 são encontradas nos cotilédones. A ação dessas enzimas sobre os lipídeos do grão é responsável pelo aroma (*beany*) característico da soja, considerado desagradável pelos consumidores ocidentais. Em virtude disso, variedades mutantes de soja, deficientes em lipo-oxigenases, estão disponíveis para cultivo, atualmente. Em ervilhas e feijão-verde a ação dessas enzimas é responsável pela degradação da clorofila.

Lipo-oxigenases podem ser aplicadas para branqueamento da farinha de trigo destinada ao consumidor final, pela destruição de seus carotenoides e também podem ser utilizadas em panificação, para aumento da força do glúten e melhora das características do pão. Em ambos os casos, deve-se incorporar até 2% de farinha de soja à farinha de trigo utilizada.

Aplicação industrial

Em farinhas e em produtos de panificação, a adição de lipo-oxigenases é extremamente benéfica. Ela é feita pela incorporação de pequenas quantidades de farinha de soja à farinha de trigo. Em farinhas, as lipo-oxigenases são responsáveis pelo branqueamento por destruição dos carotenoides que dão cor indesejada ao produto. Essas enzimas também provocam o aumento de volume em pães, melhoram sua

textura e retardam a sinérese. Acredita-se que a reação entre os hidroperóxidos formados e grupos sulfidríla do glúten formem ligações cruzadas que melhoram as propriedades de glúten. Assim, as lipo-oxigenases aumentam também a resistência da massa ao trabalho excessivo e substituem, com sucesso, o uso de aditivos químicos. Em massas alimentícias tipo macarrão as lipo-oxigenases não são benéficas. Nesses casos, a cor amarelada é um importante atributo de qualidade e deve ser protegida da ação de lipo-oxigenases nativas do trigo pelo tratamento térmico da farinha, antes da formulação (mistura com água).

O uso de dessa enzima como indicador de um branqueamento eficiente também tem sido recomendado, o que é muito importante para a determinação da estabilidade de vegetais congelados.

Catalases

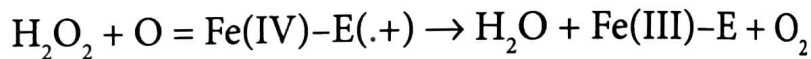
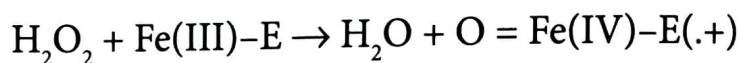
A habilidade dos organismos em usar o oxigênio molecular foi um grande avanço na evolução, o que proporcionou a extração de uma grande quantidade de energia dos alimentos. Entretanto, essa vantagem teve o custo da geração de produtos tóxicos durante o metabolismo mitocondrial, pois uma parte desse oxigênio não é reduzido a água, o que resulta em derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERS), respectivamente. Como exemplo destas espécies reativas, podemos citar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio *singlet* (1O_2), radical hidroxila (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^-$), que, quando em excesso, poderiam inviabilizar a vida desses organismos. Para poderem se proteger dos efeitos deletérios dessas espécies reativas, os organismos aeróbicos produziram enzimas antioxidantes protetoras, tais como a catalase (EC 1.11.1.6), a superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) e a glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9), o que tornou o metabolismo celular oxidativo viável.

Catalases são enzimas antioxidantes protetoras capazes de decompor o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

A catalase foi relatada pela primeira vez em 1811 quando Louis Jacques Thénard, descobridor do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sugeriu que a sua decomposição era catalisada por uma substância desconhecida. Em 1900, Oscar Loew deu pela primeira vez o nome a essa substância de catalase. Assim, as catalases são enzimas produzidas pelos organismos aeróbicos, de bactérias até o homem, que catalisam a decomposição do H_2O_2 em oxigênio molecular e água, de acordo com a seguinte equação:



Embora o mecanismo de ação da catalase não seja ainda totalmente conhecido, acredita-se que a reação ocorra em dois estágios, conforme as equações a seguir:



Nelas, Fe(IV)-E(.+) é uma forma mesomérica de Fe(V)-E , o que significa que o ferro não está completamente oxidado (+V), mas recebe alguns elétrons do heme ligante. O grupo heme foi ilustrado como um cátion radical (.+).

Fontes e principais características

Catalases são enzimas tetraméricas contendo quatro unidades de ferriprotoporfirina, cada uma com mais de 500 aminoácidos. São encontradas em células animais, vegetais e microbianas e, assim como outras oxidorreduções, são encontradas em múltiplas isoformas em uma mesma espécie. Em organismos eucariotas, estão localizadas em peroxissomas e mitocôndrias e sua principal função biológica é evitar o acúmulo de H_2O_2 proveniente de diferentes reações do metabolismo celular (oxidação de ácidos graxos e de glicolato, por exemplo). A catalase possui uma das maiores taxas de reação (*turnover*) entre todas as enzimas; uma molécula de catalase pode converter milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio a cada segundo. A Figura 5.14 ilustra a estrutura de 3 tipos diferentes de catalases.

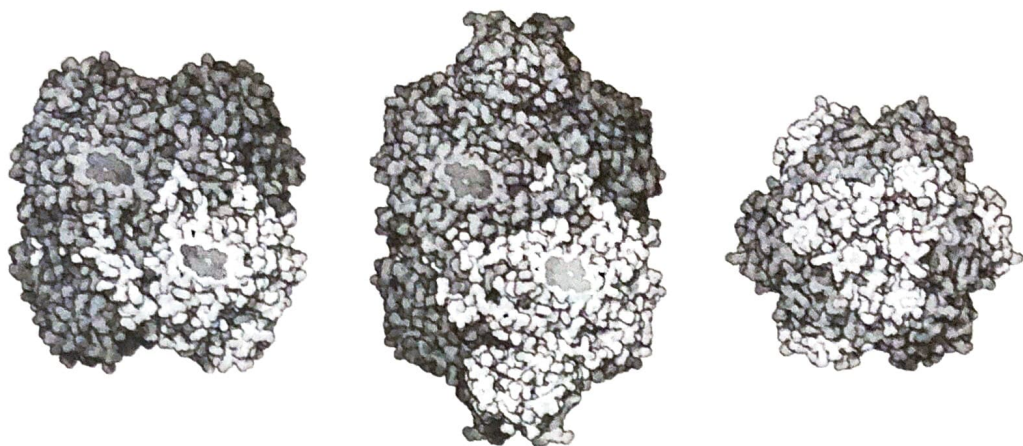


Figura 5.14 Estruturas de três diferentes tipos de catalases. Retirada de Protein Data Bank.

Aplicação industrial

Assim como na natureza, na indústria de alimentos as catalases são usadas na remoção de peróxido de hidrogênio:

- Na oxidação de glicose de clara de ovo, em conjunto com glicose-oxidases (discutido mais adiante neste mesmo capítulo)
- Na destruição de H_2O_2 intencionalmente adicionado ao leite e na detecção deste tipo de adulteração.

A existência de catalase em leite cru é um indicativo de leite de boa qualidade. Muitos produtores de leite adicionam água oxigenada a ele, para prevenir sua degradação, pelo efeito biocida do H_2O_2 . Dependendo da quantidade adicionada, a catalase nativa do leite é capaz de destruir todo o H_2O_2 adicionado, evitando que haja dano para o consumidor final. Entretanto a catalase tem a propriedade de ser inativada pelo substrato, isto é: quando em contato muito prolongado com o peróxido de hidrogênio, a enzima perde atividade. Se for muito grande a quantidade de água oxigenada adicionada, inativará toda catalase presente, deixando H_2O_2 residual, que torna o leite impróprio para o consumo. Para detectar a presença de catalase, durante o controle de qualidade do leite cru, deve-se adicionar algumas gotas de H_2O_2 a uma amostra. Caso a catalase esteja ativa, haverá borbulhamento, consequência da liberação de O_2 . Caso não se alcance este efeito, é possível que o leite tenha sido adicionado de água oxigenada pelo produtor.

Catalases são utilizadas na remoção enzimática de glicose da clara de ovo (em conjunto com glicose-oxidases) na remoção e na detecção da adição de água oxigenada ao leite cru.

Catalases podem ainda ser utilizadas em todas as situações e processos que necessitam de uma rápida e completa eliminação de H_2O_2 , sem reações indesejáveis ou geração de subprodutos.

Glicose-oxidases

Glicose-oxidases oxidam a glicose a ácido glicônico, gerando peróxido de hidrogênio. São flavoproteínas de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

As glicose-oxidases (EC 1.1.3.4) são oxidorredutases que catalisam a oxidação da glicose a δ -D-gliconolactona, na presença de oxigênio molecular, gerando também peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em meio aquoso, o produto da reação se hidrolisa espontaneamente a ácido glicônico.

A glicose-oxidase foi primeiramente relatada por Muller, em 1928, em extratos do fungo *Aspergillus niger*. Essa enzima atua como uma desidrogenase, transferindo 2 hidrogênios do carbono 1 (C1) da molécula de glicose para o oxigênio, por meio da redução/oxidação do FAD, conforme ilustrado na Figura 5.15.

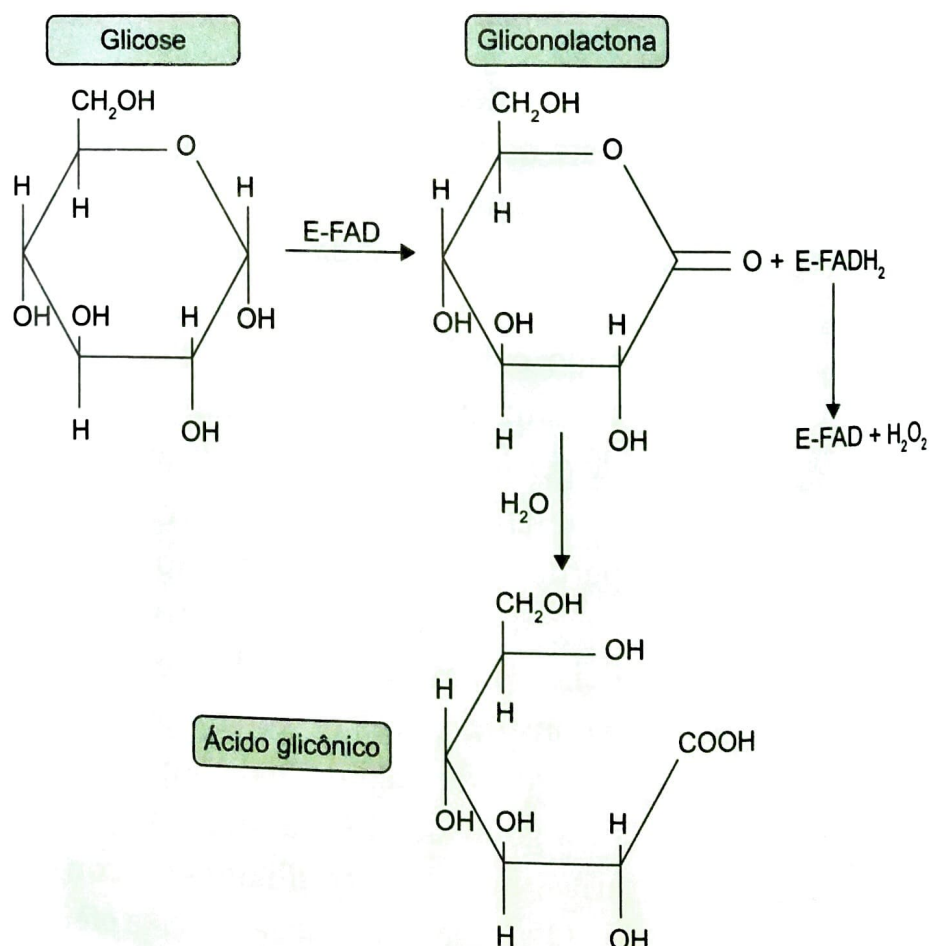


Figura 5.15 Formação de ácido glicônico pela ação da glicose-oxidase.

Fontes e principais características

A glicose-oxidase é uma flavoproteína formada por duas subunidades proteicas idênticas de 80 kDa e duas flavinas adenina dinucleotídeo (FAD) não ligadas covalentemente. Essas enzimas são produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, entre outros, não sendo encontradas em animais e vegetais.

A glicose-oxidase é capaz de oxidar monossacarídeos, nitroalcanos e compostos hidroxílicos. Utilizando a reação da glicose como referência (100%), apenas o 2-desoxi-D-glicose (20 a 30%), o 4-O-metil-D-glicose (15%) e a 6-desoxi-D-glicose (10%) são oxidados pela glicose-oxidase de *A. niger* a uma taxa significativa. A atividade da glicose-oxidase perante outros substratos é muito baixa, com taxas inferiores a 2% em relação à glicose.

A principal função da glicose-oxidase é a de agente antibacteriano e antifúngico por meio da produção de H_2O_2 . O estresse oxidativo permanente, por meio da manutenção em baixa concentração de H_2O_2 pela glicose-oxidase, tem sido relatado como uma forma muito eficaz de se controlar o crescimento de bactérias e fungos, especialmente se esses microrganismos não possuírem sistemas capazes de eliminar o H_2O_2 , como a catalase. Isso ocorre naturalmente no mel não maduro, em que as glicose-oxidases introduzidas pela saliva das abelhas mantêm a conservação da solução até que a evaporação e a concentração do produto garantam a estabilidade final.

Aplicação industrial

A glicose-oxidase possui a designação GRAS (geralmente reconhecido como seguro), de acordo com a classificação da FDA dos EUA, e está disponível para uso pelas indústrias de alimentos nas formas líquida e em pó.

A principal aplicação da glicose-oxidase é a remoção de glicose da clara de ovo ou do ovo integral. Esses produtos sofrem escurecimento indesejado, causado pela reação de Maillard, quando submetidos a tratamentos térmicos, como pasteurização ou desidratação. O modo atualmente mais

Glicose-oxidases são aplicadas na remoção de glicose de produtos de ovos, de modo a evitar o escurecimento químico durante tratamento térmico. Encontram aplicação ainda na quantificação de glicose em análises clínicas e de alimentos, em conjunto com peroxidases.

utilizado de se evitar o escurecimento é a transformação da glicose presente na clara em ácido glicônico, pelo uso de glicose-oxidases. Para a remoção do peróxido de hidrogênio formado, é conveniente a aplicação conjunta de catalases, que ainda fornecem o oxigênio necessário à primeira reação. Para acelerar o processo, é indicada a adição de pequenas quantidades de H_2O_2 ao meio. Esse processo evita a reação de escurecimento, por supressão de um dos reagentes (glicose) e evita perdas significativas de sólidos da matéria-prima, o que garante o rendimento do produto desidratado.

A glicose-oxidase também é um oxidante eficaz para a produção de pão com textura melhorada e maior volume, principalmente pelo desuso do bromato ($KBrO_3$), que tem sido reconhecido como carcinogênico. Por isso, a maioria dos países já proibiu o uso de $KBrO_3$ como agente oxidante, e a glicose-oxidase tem sido uma alternativa usada. A base da oxidação pela glicose-oxidase se deve à produção de H_2O_2 no meio, o que faz com que se obtenha massa elástica e viscosa.

Como a reação geral catalisada pela glicose-oxidase envolve o consumo de duas moléculas de glicose e uma molécula de oxigênio (ver Figura 5.15), essa característica permite que essa enzima possa ser usada como um removedor ativo de oxigênio, antioxidante e conservante em vários alimentos. Como exemplo, podemos citar alimentos com alto teor de gordura, como maionese e molhos para salada, em que a oxidação lipídica pode causar deterioração e aroma de ranço. O mesmo vale para o vinho e a cerveja, em que manter o oxigênio fora da bebida ajuda a manter o sabor e o aroma. Em alimentos enlatados/embalados, o oxigênio também promove o crescimento bacteriano, portanto, é desejável a sua remoção de forma a se manter um ambiente anaeróbico. Além disso, o produto formado, o ácido glicônico, é seguro para o consumo humano. Isso, combinado com a demanda dos consumidores para substituir os antioxidantes e os removedores de oxigênio sintéticos por compostos naturais, torna a glicose-oxidase um candidato de grande potencial na preservação desses alimentos.

A glicose é um ingrediente muito importante, principalmente quando se trata da produção de álcool por meio

da fermentação, porque é o principal substrato utilizado pela *Saccharomyces cerevisiae*. Como há demandas para a produção de bebidas alcoólicas com reduzido teor de álcool, uma das maneiras mais fáceis de fazer isso é adicionando a glicose-oxidase ao mosto antes da fermentação, para o consumo de parte da glicose, e consequente produção de menor teor de álcool.

Glicose-oxidases são ainda utilizadas, em grandes quantidades, em análises clínicas, de alimentos e fármacos, em conjunto com peroxidases, na detecção e quantificação de glicose (em amostras de sangue, por exemplo). As reações envolvidas estão descritas na Figura 5.16.

A glicose-oxidase oxida a glicose presente na amostra, liberando H_2O_2 , que é utilizado pela peroxidase, formando tetraguaiacol, que poderá ser quantificado colorimetricamente. Desse modo, pela quantidade de tetraguaiacol formado, é possível determinar a quantidade de glicose da amostra.

Xantina-oxidases

Em 1922, Morgan *et al.* mostraram que o leite contém uma enzima capaz de oxidar a hipoxantina para xantina e a xantina para ácido úrico (Figura 5.17), e que foi denominada de xantina-oxidase (EC 1.1.3.22). Ela também catalisa a oxidação de uma grande variedade de purinas, aldeídos e pteridinas.

Durante a reação catalisada pela xantina-oxidase o oxigênio molecular atua como aceptor de elétrons, formando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\bullet-}$, de forma espontânea ou por meio da ação da enzima superóxido dismutase (SOD), se transforma em H_2O_2 e O_2 .

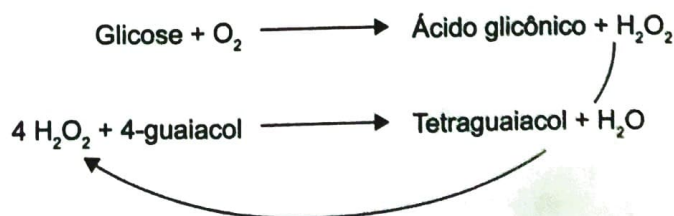


Figura 5.16 Esquema de reações para a quantificação de glicose pelo método enzimático.

Xantina-oxidases oxidam hipoxantina, xantina, além de purinas e pteridinas, com auxílio de O_2 e formação de H_2O_2 . Em meio ácido, as xantina-oxidases formam superóxidos altamente reativos.

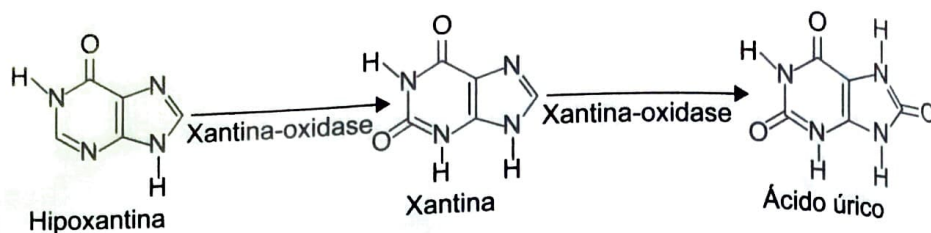
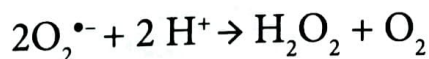
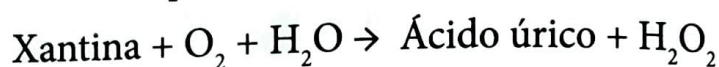
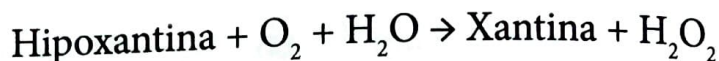


Figura 5.17 Formação de ácido úrico a partir de hipoxantina pela ação da xantina-oxidase.

De maneira geral, essas reações podem ser ilustradas da seguinte forma:



Fontes e principais características

O leite bovino é uma fonte muito rica de xantina-oxidase, com aproximadamente 35 mg/ℓ. Essa enzima também existe em leite caprino e no leite humano. A xantina-oxidase apresenta-se distribuída entre a fase do creme e a do soro.

Trata-se de uma enzima dimérica (metalo-flavoproteína), com massa molecular aproximada de 300.000 Da. O sítio ativo contém molibdênio, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), ferro e enxofre na proporção de 1:1:1:4. A acidificação ou aquecimento a 100°C, a pH 7, rapidamente libera enxofre na forma de H₂S. Essa enzima também contém 1 mol de fósforo covalentemente ligado ao sítio ativo, além de dois sítios distintos de ligação ao substrato. Vários resíduos de aminoácidos, como Arg 880, Fen 914, Fen 1009, Thr 1010 e Glu 1261, são importantes para a formação de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.

Importância em alimentos

A atividade da xantina-oxidase está associada à deterioração oxidativa do leite e produtos lácteos, via produção de superóxido (O₂^{•-}). Há também evidências de que, no leite, a presença dessa enzima e de purinas possam gerar H₂O₂ para a lactoperoxidase, apresentando dessa forma uma

Xantina-oxidases estão associadas à ativação de lactoperoxidases no leite e à degradação oxidativa desse produto.

ação bactericida ou bacteriostática. Além disso, a inibição da atividade dessa enzima é muito útil para a avaliação da bioatividade de compostos presentes nos alimentos, como flavonoides, pois substâncias que exibem propriedades inibitórias da xantina-oxidase podem ter uso terapêutico, visto que o ácido úrico está relacionado a eventos vasculares em pacientes com hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares.

Ascorbato-oxidases

Ascorbato-oxidases (EC 1.10.3.3) são enzimas que catalisam a oxidação reversível do ácido ascórbico (vitamina C) para ácido desidroascórbico com a concomitante redução de oxigênio molecular para água (Figura 5.18). Entretanto, vale lembrar que a oxidação do ácido ascórbico também pode ocorrer na ausência dessas enzimas, com formação de ácido desidroascórbico e peróxido de hidrogênio.

As funções biológicas dessas enzimas ainda não estão totalmente esclarecidas. Porém, algumas hipóteses descritas são a participação em um sistema redox que envolve o ácido ascórbico, processos relacionados ao amadurecimento de frutos, promoção do crescimento vegetal e resistência a doenças.

Fontes e principais características

A ascorbato-oxidase é uma enzima homodimérica com massa molecular de 70 kDa e 552 resíduos de aminoácidos por subunidade. Essa enzima pertence à família das oxidases azuis multicobre que inclui as lacases (EC 1.10.3.2), em plantas e microrganismos, e as ceruloplasminas (EC

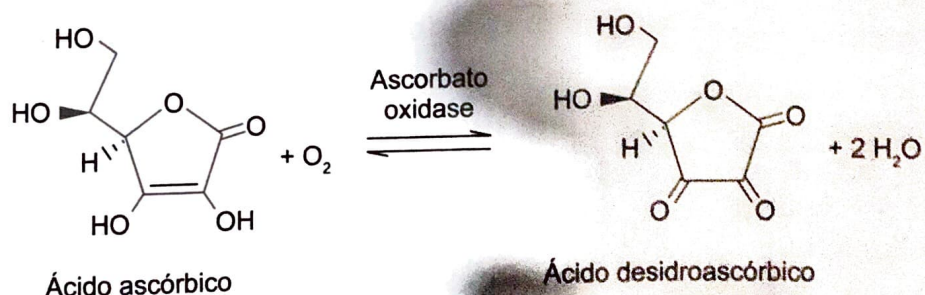


Figura 5.18 Reação catalisada pela enzima ascorbato-oxidase.

Ascorbato-oxidases oxidam o ácido ascórbico, destruindo sua atividade como vitamina C. O produto oxidado (ácido desidroascórbico) sofre escurecimento químico, provocando perda de qualidade em diversos produtos: sucos cítricos, espécies do gênero *Cucumis*, sementes e grãos.

1.16.3.1), em animais. As oxidases azuis formam um sub-grupo de cupro-proteínas que são classificadas de acordo com as propriedades espectroscópicas dos seus íons de cobre (Cu), a saber: cobre tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e o tipo 3 (T3). O cobre T1 é responsável pela forte coloração azul, enquanto o cobre T2, pela transferência de elétrons para o O_2 . O tipo T3 possui dois íons cobre ligados por meio de uma ponte OH, responsáveis pela transferência de elétrons.

Essas enzimas ocorrem em todas as espécies do gênero *Cucumis* (pepino, melão, maxixe etc.), em sementes e em algumas frutas, por exemplo, as cítricas.

Importância em alimentos

A ascorbato-oxidase apresenta uma grande importância em frutas e produtos de origem vegetal, como sucos de frutas cítricas. Na fruta intacta, as oxidases e as redutases estão balanceadas de modo que a interação desses dois sistemas enzimáticos determina o nível final de ácido ascórbico. No entanto, durante a extração de sucos, as redutases sofrem grandes danos, o que deixa as oxidases livres para destruir o ácido ascórbico. Esse processo é responsável pela iniciação do escurecimento não enzimático e pela perda da atividade da vitamina C durante o armazenamento. Essas reações podem ser minimizadas pela exclusão do oxigênio molecular ou pelo tratamento prévio de branqueamento para inativação enzimática.

Métodos de detecção da atividade

.....
O método mais simples de detecção da atividade de PFO é a observação da formação de cor na presença de catecol.

Polifenoxidases

A determinação de sua atividade não é muito simples, uma vez que os produtos de reação (quinonas) sofrem modificações químicas que dificultam sua quantificação. Além disso, outras enzimas (peroxidases e lacases), também presentes nas fontes de PFO, interferem na leitura dos resultados. Nesses casos, podem ser adicionados ao meio inibidores seletivos capazes de diferenciar as PFO de outras oxidorreduções contaminantes.

Para ensaio da atividade de monofenolase, os substratos mais aplicados são *p*-cresol, tirosina e o ácido *p*-cumárico. Para determinação da atividade de difenolase, os principais substratos usados são o catecol e o metilcatecol. A detecção pode ser feita por espectrofotometria (detecção do surgimento da cor) ou, em reatores fechados, pelo consumo de O_2 (uso de sensores específicos – eletrodos). O método mais acurado de se fazer essa determinação é pelo uso de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para separação dos produtos de reação e sua quantificação por curvas de calibração. Nesse método, o meio deve conter agentes redutores que impeçam a polimerização das quinonas. Essa metodologia apresenta a desvantagem de ser bastante demorada e cara.

Peroxidases

Essas enzimas geram produtos coloridos, mensuráveis quantitativamente via espectrofotometria de luz visível, com uma grande variedade de substratos, na presença de H_2O_2 . Dentre eles, o substrato mais usado é o guaiacol, uma vez que o procedimento é bastante simples e os parâmetros de reação são bem conhecidos.

O meio reacional é composto de guaiacol e H_2O_2 , e a reação inicia-se pela adição da enzima. A formação de cor é acompanhada por absorbância a 470 nm e é proporcional à atividade da enzima, em função do tempo.

Lipo-oxigenases

O substrato padrão para medida de atividade destas enzimas é o ácido linolênico. A formação do produto pode ser acompanhada de diversas formas, a saber:

- Em reatores fechados, pode ser determinado o consumo de O_2 , com o uso de eletrodos específicos
- O surgimento de duplas conjugadas, primeira etapa da reação, pode ser medido por absorbância a 232,5 nm
- A formação de hidroperóxidos pode ser quantificada por método titulométrico, tendo-se como titulante iodo (I_2) em meio saturado de iodeto de potássio (KI). Este

O principal substrato para detecção de peroxidases é o guaiacol, na presença de peróxido de hidrogênio.

É possível detectar a atividade de lipo-oxigenases em um sistema composto pelo substrato da enzimas – ácido linolênico – e um indicador colorido – β -caroteno –, que perde a cor pelo ataque dos hidroperóxidos formados na reação.

método apresenta a desvantagem de não ser contínuo, isto é: a reação deve ser paralisada e seu produto quantificado depois

- É possível estimar a atividade de lipo-oxigenase pela destruição de carotenos (desaparecimento da cor) em meio reacional contendo ácido linolênico e O_2 , espectrofotometricamente. No entanto, o resultado não é linear em relação à atividade da enzima. Serve como determinação qualitativa.

Catalases

.....
Pode-se detectar a atividade de catalase pela formação de borbulhamento, pela liberação de oxigênio, ao se adicionar peróxido de hidrogênio ao meio.

Sua atividade pode ser quantificada pelo desaparecimento do substrato – destruição de H_2O_2 (leitura em espectrofotômetro a 235 nm), pelo surgimento do produto – formação de O_2 (eletrodos específicos) ou pela quantificação de substrato residual, após tempo determinado de reação – titulação de H_2O_2 remanescente no meio (uso de permanganato de potássio em meio ácido).

Glicose-oxidases

Em reatores fechados, pode-se determinar o consumo de O_2 pelo uso de eletrodos. Há ainda a possibilidade de se quantificar a formação de H_2O_2 pelos métodos espectrofotométrico ou titulométrico anteriormente mencionados ou, ainda, pelo uso conjugado de peroxidases, na presença de guaiacol.

Xantina-oxidases

Sua atividade pode ser avaliada de diferentes formas; as mais simples são: espectrofotometricamente, pela quantificação da formação de ácido úrico (que absorve a 290 nm) pela oxidação da xantina ou hipoxantina e fluorimetricamente, pela quantificação de isoxantopterinina (que absorve a 345 nm e emite a 390 nm) usando pterina como substrato.

Ascorbato-oxidase

O método mais comum determina o consumo do ácido ascórbico, na presença da enzima, por sua quantificação

espectrofotométrica a 245 nm. A atividade pode também ser estimada pelo consumo de oxigênio ao longo da reação, em ambiente fechado, usando eletrodos específicos.

Bibliografia

- ESKIN, N. A. M; SHAHIDI, F. *Biochemistry of Foods*. 3. ed. London: Academic Press, Inc., 2012. 584 p.
- FENNEMA, O. R. Food Chemistry. In: Parkin, K. L. *Enzymes*, 357-466. CRC Press, New York, 2017.
- GARDNER H. W. Lipoxygenase pathways in cereals. In: POMERANZ, Y. (Ed.) *Advances in cereal science and technology*, v. 9. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, p. 161-215, 1988.
- GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. Melanosis in crustaceans: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 791-799, 2016.
- HAYWARD, S.; CILLIERS, T.; SWART, P. Lipoxygenases: from isolation to application. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 199-211, 2017.
- LOEW, O. A New enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, 11, n. 279: 701-702, 1900. doi:10.1126/science.11.279.701. PMID 17751716. May, 1900
- MORGAN, E. J.; STEWART, C.P.; HOPKINS, F. G. On the anaerobic and aerobic oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and by milk. *Proceedings of the Royal Society of London*. Series B, v. 94, n. 657, p. 109-131, 1922.
- MULLER, D. Oxidation von glukose mit extrakten aus *Aspegillus niger*. *Biochem. Z.* 199: 136-170, 1928.
- PANDEY, V. P.; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U. N. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6: 1-16, 2017.
- PROTEIN DATA BASE. Catalase. Disponível em: <http://pdb101.rcsb.org/motm/57>.
- QUEIROZ, C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24:4, 361-375, 2008.
- ROBINSON, D. S. Peroxidases and catalases in foods. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. *Oxidative Enzymes in Foods*, 11-47. Elsevier, London. 1995.
- SCOTT, D. Applications of Glucose Oxidase. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing*, 519-548. Academic Press, New York. 1975.
- SCOTT, D. Oxidoreductases. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing*, 222-254. Academic Press, New York. 1975.

Leitura recomendada:
Gonçalves; Oliveira, 2016;
Hayward; Cilliers; Swart, 2017;
Pandey et al., 2017;
Queiroz et al., 2008;
Robinson, 1995.