EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA PEROXIDASE DO RABANETE EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO E ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS ÍONS CÁLCIO, COBALTO (II) E COBRE (II) NO CRESCIMENTO IN VITRO.

Natalia Bispo Lima¹; Heiddy Márquez Alvarez ²; Maria Antônia Carvalho Lima de Jesus ³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: natalialima732@gmail.com
2. Orientador, Departamento Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheiddy@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: airamcarvalho@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Peroxidase; Atividade enzimática; Rabanete.

INTRODUÇÃO

As peroxidases se destacam no cenário biotecnológico, por serem encontradas em diversas fontes na natureza, não dependerem de co-fatores e atuarem sobre um amplo número de substratos. Podem ser consideradas enzimas bifuncionais, pois catalisam a oxidação de uma ampla variedade de compostos por meio de peróxido de hidrogênio, mas também produzem espécie reativa de oxigênio (MOHAMED et al., 2011).

Uma das reações mais conhecidas é a desidrogenação oxidativa onde a enzima atua como catalisador. Um exemplo típico é a oxidação do guaiacol, via radicalar, comumente utilizada no monitoramento da atividade de peroxidases vegetais (DOERGE et al., 1997).

As peroxidases são muito utilizadas na indústria para descolorar tecidos. Esta capacidade oxidativa das peroxidase faz com que sejam também utilizadas no setor ambiental para o monitoramento de contaminantes em efluentes provenientes das indústrias de óleo, tintas, polímeros e medicamentos. PARVULESCU et al., (2011).

O rabanete é uma cultura de ciclo curto e o ambiente exerce grande interferência na qualidade de suas raízes. Segundo Leite (1976) variações nas condições de temperatura e umidade do solo durante o desenvolvimento das plantas podem prejudicar a produtividade e a qualidade das raízes. Considerando este fato o trabalho visa conhecer a influência dos íons cálcio (Ca), cobalto Co (II) e cobre Cu (II) na atividade peroxidásica do rabanete e o período em que se encontra maior atividade.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Germinação das sementes de rabanete: As sementes do rabanete foram colocadas para germinar em um meio que continha apenas água e ágar, mas este meio não ofertava a planta os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, então esse meio foi substituído pelo meio Muraschige e Skoog MS que possui sais e vitaminas necessários para o desenvolvimento da planta, esses sais e vitaminas estão divididos em soluções de A a I. As substâncias utilizadas no meio são: nitrato de amônio 82,5 g/L, que compõe a solução A (20 mL da solução para 1L de meio), nitrato de potássio 95

g/L, que compõe a solução B (20mL da solução para 1L de meio), fosfato de potássio 34g/L, ácido bórico 1,24g/L, molibdato de sódio 0,05g/L, cloreto de cobalto 0,005g/L, iodeto de potássio 0,166g/L que compõe a solução C (5 mL da solução para 1L de meio), cloreto de cálcio 8,8g/L compõe a solução D (50 mL para 1L de meio), sulfato de magnésio 74g/L, sulfato de mangânes 4,46g/L, sulfato de zinco 1,72g/L, sulfato de cobre 0,005g/L compõe a solução E(5 mL da solução para 1L de meio) , sulfato ferro 5,57g/L, EDTA de sódio 7,45g/L compõe a solução F (5 mL para 1L de meio), tiamina 0,1g/L, piridoxina HCl 0,05g/L, ácido nicotínico 0,05g/L compõe a solução G(10mL para 1L de meio), mio-inositol (2g/L) solução H(50mL para 1L de meio), glicina 0,08g/L solução I (25 mL da solução pra 1L de meio), no meio também é acrescentado sacarose 30g/L e Agar 7g/L. Neste meio foram adicionadas soluções com diferentes concentrações (10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) de Ca, Co(II) e Cu(II).

Preparação do meio MS/2: Em um frasco de vidro coloca-se um litro de água destilada e se adicionam os sais e vitaminas que estão preparadas em soluções nas concentrações descritas acima. Com a ajuda de um agitador magnético dissolvesse a sacarose e o agar na solução, depois que todo o material está homogeneizado ajustasse o pH da solução para 5,7 e leva-se a mesma ao forno micro-ondas até fervura. O meio é distribuído em frascos de vidro, cerca de 60 mL por frasco. Os frascos são vedados com papel alumínio e depois papel filme e levados a autoclave durante 30 minutos.

Desinfestação das sementes: coloca-se as sementes durante um minuto no etanol a 70 %, quinze minutos no hipoclorito de sódio (2,5%) e depois se lavam as semente com água destilada.

Inoculação das sementes: todos os frascos com meio são umidificados com etanol a 70 % antes colocar-los na cabine de fluxo onde as sementes são inoculadas. As pinças são flambadas a cada inoculação de semente. Após a inoculação das sementes os frascos são vedados novamente e levados a sala de crescimento com temperatura controlada em 25 °C.

Os rabanetes foram coletados em diferentes período do crescimento, 15 dias, 30 dias e 45dias respectivamente e congelados até a análise.

Extração da enzima e análise da atividade peroxidásica: O tecido vegetal foi lavado, fracionado em porções de 0,1000 g para obter o extrato bruto. Cada amostra foi macerada no almofariz com 10 mL de tampão fosfato (0,05 mol/L), pH 6,5. Posteriormente esse extrato foi filtrado.

A atividade enzimática da peroxidase de rabanete (RAP) foi determinada por método colorimétrico, baseado na mudança de absorvância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol. HIRATA *et al.*, (1998).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

O rabanete apresentou maior atividade peroxidásica (1,0) ao decimo quinto dia após germinação no meio de cultura Muraschige e Skoog (MS) sem a influência dos demais íons utilizados na pesquisa. O meio Ms possui os nutrientes e vitaminas necessárias para o desenvolvimento da planta, dentre deles estão o íon cobre (II) na concentração de 20 μ M, íon cobalto (II) na concentração de 21 μ M e o íon cálcio na concentração de 60 mM. Pode-se observar também que após 15 dias a atividade enzimática neste meio nutritivo teve uma redução drástica de 0,11 em 30 dias, 0,10 em 45dias, mantendo uma atividade semelhante entre o trigésimo e quadragésimo quinto dia após germinação.

A atividade peroxidásica encontrada ao sétimo dia foi irrelevante e por isso não foi abordada no trabalho. Observou-se também que maiores concentrações de íon cobre (II) 100 μM e 1000 μM inibiram a germinação e o crescimento do rabanete.

O íon cobalto (II) na concentração de 1000 μM interferiu no crescimento do rabanete fazendo com que os mesmos morressem após o decimo quinto dia após o plantio. A atividade peroxidásica encontrada no rabanete plantado no meio MS sob a influência do íon cobalto (II) na concentração 10 μM aos 30 dias foi o melhor resultado obtido na pesquisa, Figura 1.

Figura 1. Influência dos íons Cu(II), Co(II) e Ca na atividade peroxidásica do rabanete segundo o tempo de crescimento.

A influência do íon cobalto (II) na concentração de 10 μM no meio MS, fez com que diminui-se a atividade peroxidásica nos primeiros 15 dias, mas teve um aumento da mesma aos 30 dias de crescimento, quando comparado a atividade peroxidásica encontrada no rabanete aos 30 dias plantado no meio MS, Figura 2. Pode-se concluir que o íon cobalto (II) na concentração de 10 μM melhora o desempenho da atividade peroxidásica, e que aos 30 dias é o tempo ideal para colheita e extração da enzima.

Figura 2. Influência do íon cobalto (II) no período de 30 dias, em diferentes concentrações

A influencia do íon cálcio também fez com que houvesse uma redução da atividade peroxidásica no período de 15 dias, mas obteve aumento da atividade nos períodos de trinta e quarenta e cinco dias quando comparado ao meio MS. O cálcio foi o único íon que teve respostas positivas na atividade enzimática nas três concentrações (10 μM , 100 μM , 100 μM) Figura3.

Figura 3. Influencia da concentração de íons cálcio em vários períodos de crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O rabanete apresentou maior atividade peroxidásica (1,0) ao decimo quinto dia após germinação no meio de cultura Muraschige e Skoog. Verificou-se que maiores concentrações de íon cobre (II) (100 µM, 1000 µM) inibem a germinação, o crescimento do rabanete e a produção de peroxidase. O íon cobalto (II) na concentração de 10 µM após 30 dias de crescimento do rabanete favorece a produção de peroxidase, indicando o tempo ideal para a extração da enzima. O íon cálcio melhora a atividade peroxidásica nos períodos de 30 e 45 dias.

REFERÊNCIAS

- DOERGE, D. R.; DIVI, R. L.; CHURCHWELL, M. I. Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 250, p. 10-17, 1997.
- MOHAMED, S.A.; ABULNAJA, K. O.; ADS, A.S.; KHAN, J. A.; KUMOSANI, T.A. Caracterisation of na anionic peroxidase from horseradish cv. *Food Chemistry*, v. 128, 725-730, 2011.
- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the culture cells of *Nicotianatabacum*, *Tetrahedron*, 54, p.15993 - 16003, 1998.
- LEITE IC. 1976. Estudos ecológicos de *Raphanus sativus* L. Crimson Giant no efeito do comportamento térmico do solo. 122 f. Monografia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PARVULESCU, V. I.; BALA, C; STAN, R.; TEODORESCU, CRISTIAN.; MAHALU, DIANA.;TUDORACHE, M. Biocatalyticmicroreactor incorporating HRP anchored on micro-/nano-lithographic patterns for flow oxidation of phenols, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, p. 133–139, 2011.