



# EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PEROXIDASES DE VEGETAIS: UMA REVISÃO



## EXTRACTION AND PURIFICATION OF VEGETABLE PEROXIDASE: A REVIEW

HAAS, Aline<sup>1</sup>; VAZ, Cleiton<sup>2</sup>; KEMPKA, Anieli Pinto<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Centro de Ciências Agroveterinárias Av. Luiz de Camões, 2090, Conta Dinheiro, cep 88520-000, Lages – SC, Brasil (fone: +55 49 99156 4295)

<sup>2</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, Rua Fernando de Noronha, BR 282 Km 573, cep 89870-000, Pinhalzinho – SC, Brasil (fone: +55 49 2449 9684; fax: +55 49 2049 9593)

<sup>3</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, Rua Fernando de Noronha, BR 282 Km 573, cep 89870-000, Pinhalzinho – SC, Brasil (fone: +55 49 2049 9594; fax: +55 49 2049 9593)

\* *Autor correspondente*  
*e-mail: aniel.kempka@udesc.br*

Received 10 September 2018; received in revised form 11 December 2018; accepted 13 December 2018

### RESUMO

Peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de vários substratos, mantendo a sua atividade enzimática em amplas faixas de pHs e temperaturas. São empregadas em processos para degradação de corantes e compostos fenólicos. As peroxidases estão presentes nos tecidos de diversas plantas, e a busca por novas fontes desta enzima é necessária. Esta revisão de literatura objetiva compilar informações acerca da extração e/ou purificação de peroxidases contidas em diferentes tecidos vegetais, apresentando métodos de extração, processos de purificação, atividades enzimáticas e seus incrementos, de acordo com os processos químicos e físicos aplicados. Diversas fontes vegetais podem ser matéria-prima para a obtenção destas enzimas, através de diferentes formas de extração, onde predominam os processos de cominuição na presença de solução tampão. Para purificação parcial, são utilizadas a precipitação com solventes (acetona e etanol) e sais (sulfato de amônio) e a centrifugação. Para purificação, são utilizados processos cromatográficos, onde se destacam as cromatografias de exclusão molecular e de afinidade. Conclui-se que existe uma ampla gama de possibilidades para obtenção da enzima peroxidase de vegetais, com variabilidade na atividade enzimática quando aplicados métodos de extração distintos. Os métodos de purificação comumente utilizados levam a aumentos da atividade específica das peroxidases.

**Palavras-chave:** *enzima, plantas, métodos físicos e químicos, atividade enzimática.*

### ABSTRACT

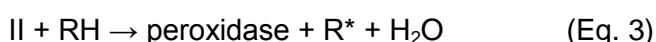
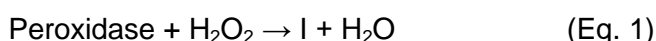
Peroxidases are enzymes that catalyze the oxidation of various substrates, maintaining their enzymatic activity in wide ranges of pH and temperatures. These enzymes are used in processes for the degradation of dyes and phenolic compounds. Peroxidases are present in the tissues of several plants, and the search for new sources of this enzyme is necessary. This literature review aims to compile information about the extraction and/or purification of peroxidases contained in different plant tissues, presenting extraction methods, purification processes, enzymatic activities and their increments, according to the chemical and physical processes applied. Several plant sources can be raw material to obtain these enzymes, through different forms of extraction, where the processes of comminution predominate in the presence of buffer solution. For partial purification, are used precipitation with solvents (acetone and ethanol) and salts (ammonium sulfate) and centrifugation. For purification, chromatographic processes are used, in which molecular exclusion and affinity chromatography are prominent. It is concluded that there is a wide range of possibilities for obtaining the enzyme peroxidase from

plants, with variability in the enzymatic activity when different extraction methods are applied. The purification methods used provide increases in the specific activity of the peroxidases.

**Keywords:** enzyme, plants, physical and chemical methods, enzymatic activity.

## INTRODUÇÃO

As peroxidases (E.C.1.11) são enzimas que pertencem à classe das óxido-redutases, sendo predominantemente proteínas heme, que utilizam o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou outro peróxido orgânico como acceptor de elétrons para catalisar a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (Šekuljica *et al.*, 2015). Segundo Dunford (2010) o ciclo catalítico realizado pelas peroxidases ocorre em etapas, sendo:



Na Eq. 1, ocorre a reação entre o sítio ativo da enzima e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), com a redução deste, geração de água e formação do radical da enzima (denominado I), uma forma intermediária reativa cujo estado de oxidação é considerado mais elevado em comparação com a enzima nativa. Na Eq. 2, I oxida uma molécula de poluente (RH), gerando um poluente radical ( $R^*$ ) e o composto II. Finalmente, na Eq. 3, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, gerando outro produto polimérico e fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial, completando assim o ciclo. O peróxido de hidrogênio em excesso na reação implica na inibição da enzima, por outro lado, a ausência do peróxido de hidrogênio durante a reação limita a sua velocidade (Dunford, 2010; Hofrichter *et al.*, 2010).

Durante a reação, os radicais livres formados deslocam-se do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Estes radicais são altamente reativos e produzem espontaneamente uma reação, formando polímeros insolúveis que podem ser removidos por técnicas de filtração ou sedimentação simples (Regalado *et al.*, 2004).

A peroxidase extraída de plantas superiores é uma glicoproteína que se difere na composição de seus aminoácidos e carboidratos, contendo como grupamento prostético, a ferriprotoporfirina III (Röling *et al.*, 2000). São enzimas solúveis em água e, por isso, são

facilmente extraídas homogeneizando a fonte de enzima com água e filtrando o homogeneizado. O filtrado obtido é uma fonte de enzima de baixa pureza que pode ser utilizado diretamente ou pode ser tratado para remover parte das impurezas antes da sua utilização (Reed, 1975).

As peroxidases estão amplamente encontradas em animais, plantas e microorganismos (Chiong *et al.*, 2016) e podem ser classificadas em três classes com base em homologia de aminoácidos e capacidades de ligação de metal. A classe I compreende as peroxidases intracelulares, a classe II compreende as enzimas fúngicas secretoras e a classe III consiste na peroxidase de plantas secretoras (Gui *et al.*, 2006). Neste sentido este trabalho de revisão de literatura tem como objetivo reunir informações de pesquisas sobre os métodos de extração, purificação, atividades enzimáticas e incremento de atividade de peroxidases obtidas a partir de diferentes tecidos vegetais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Delineamento do estudo

O Delineamento do estudo baseou-se em uma revisão bibliográfica narrativa, realizada em livros e em base de dados eletrônicas, buscando-se capítulos com o tema específico, artigos científicos, dissertações e teses. As línguas utilizadas na pesquisa foram português e inglês, sendo os termos delimitados em: 1 - *Peroxidase extraction*; 2 - *Peroxidase purification*; 3 - *Extração Peroxidase*; 4 - *Purificação peroxidase*; 5 - *Enzyme purification*; 6 - *Enzyme extraction*; 7 - *Extração enzima*; 8 - *Purificação enzima*.

### 2.2. Critérios de inclusão e exclusão de referências

Os estudos que foram incluídos na revisão foram os que apresentaram dados relevantes sobre métodos de extração de peroxidases de tecidos vegetais e atividades obtidas e purificação parcial ou purificação da peroxidase, com descrição de métodos e incrementos nas atividades, com 90% das publicações a partir do ano 2000. Estudos que

não atenderam o tempo cronológico, mas que apresentaram dados relevantes, foram incluídos no limite de 10% de referências cujo ano de publicação foi anterior a 2000. Peroxidases produzidas por microrganismos foram excluídas do resumo.

### 2.3. Fontes de informação

Os livros foram retirados da biblioteca do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina. Os artigos foram acessados nas seguintes bases de dados: ScienceDirect (Elsevier) e Scielo (Scientific Electronic Library Online), Google Acadêmico e Bancos de Teses e Dissertações de Universidades Públicas. Os termos foram pesquisados separadamente como descritos no item 2.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Peroxidases de vegetais

As peroxidases são encontradas em diversas espécies do reino vegetal, e a mais importante, do ponto de vista comercial, é a enzima isolada da raiz forte (*Armoracia rusticana*) também conhecida como raiz ardida, rábano de cavalo ou rábano rusticana, na forma purificada (Horseradish peroxidase - HRP). A raiz forte é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio (Maciel *et al.*, 2007). Cooper e Nicell (1996) verificaram uma atividade específica da HRP purificada de  $83,0 \pm 4,5 \text{ U.mg}^{-1}$ . A atividade enzimática de  $29,85 \text{ U.mL}^{-1}$  para HRP foi obtida por Souza *et al.* (2007), sendo empregado como substrato enzimático a siringalzida.

Nos últimos anos, novas fontes de peroxidases estão sendo estudadas, para atender à crescente demanda por esta enzima, que pode ser encontrada em uma série de espécies do reino vegetal e em diversas partes destas espécies como cascas, folhas, frutos e raízes. A obtenção da enzima peroxidase da casca da soja está sendo estudada por diversos pesquisadores. Chagas *et al.* (2015) determinaram a atividade enzimática para a peroxidase, livre e imobilizada em pérolas de quitosana reticulada, extraída da casca da soja, obtendo atividade enzimática para a enzima livre e uma atividade específica para a enzima imobilizada de  $31,01 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $2,51 \text{ U.mg}^{-1}$ , respectivamente, sendo utilizado como substrato

enzimático o guaiacol ( $97\% \text{ v.v}^{-1}$ ). O mesmo substrato foi utilizado por Silva *et al.* (2013) para determinar a atividade enzimática da peroxidase extraída da casca da soja, obtendo  $31,87 \text{ U.mL}^{-1}$  de atividade enzimática. Em contraponto, Chiong *et al.* (2016) caracterizaram a enzima obtida da casca da soja e do fruto da Luffa, utilizando o guaiacol como substrato enzimático para determinar a atividade, e obtiveram resultados inferiores aos demais autores, sendo a atividade de  $0,373 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,355 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os substratos 4-aminoantipirina e fenol foram empregados por Ghaemmaghami *et al.* (2010) para determinar a atividade enzimática da peroxidase de casca da soja e de flocos da soja, sendo obtidas atividades enzimáticas de  $52,6 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $17,3 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente.

A peroxidase também é encontrada nos tecidos vegetais como no bulbo do alho (*Allium sativum*), tubérculo da batata doce (*Ipomoea batatas*), tubérculo do rabanete (*Raphanus sativus*) e na semente do sorgo bicolor (*Sorghum bicolor*). Diao *et al.* (2011) determinaram a atividade enzimática do extrato bruto destes vegetais, monitorando o tetraguaiacol formado na reação enzimática devido a oxidação do substrato guaiacol. As quatro espécies apresentaram diferentes níveis de atividade enzimática específica, variando de  $22,1$  a  $294,6 \text{ U.mg}^{-1}$ . O tecido vegetal que apresentou uma atividade específica mais elevada foi o tubérculo do rabanete, seguido da semente do sorgo e do tubérculo da batata doce, o bulbo do alho mostrou-se significativamente inferior as outras três espécies.

Kurnik *et al.* (2015) determinaram a atividade enzimática em diferentes massas da polpa da batata com o objetivo de verificar a relação do aumento da massa do tecido vegetal e a formação do produto *purpurogallin*, gerado na reação enzimática utilizando o pirogalol como substrato enzimático. As massas de polpa de batata utilizadas para obter o extrato enzimático foram de 5, 10, 20, 40 e 60 mg e a atividade da peroxidase da polpa da batata variou de 0,3 a  $2,0 \mu\text{mol de purpurogallin.min}^{-1}$ , apresentando um aumento progressivo da produção de *purpurogallin* com o aumento da massa utilizada.

Outra fonte de enzima vegetal mencionada na literatura é a raiz do nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*), Silva *et al.* (2012) determinaram a atividade enzimática do extrato parcialmente purificado, observando a

sua capacidade de oxidar o guaiacol em tetraguaiacol na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), obtendo uma atividade enzimática de 17,5 U.mL<sup>-1</sup>.

As folhas da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) apresentaram potencial para obtenção da enzima peroxidase, como demonstrado no estudo de Maciel *et al.* (2007), que obtiveram uma atividade para o extrato bruto de 65.10<sup>3</sup> U.mL<sup>-1</sup> sendo utilizado o guaiacol como substrato enzimático. Cai *et al.* (2012) avaliaram a afinidade da enzima peroxidase obtida do pinhão manso (*Jatropha curcas*) pelos substratos guaiacol, o-fenilenodianoamina, o-dianisidina, ABTS, pirogalol e ácido ferúlico, sendo obtidas atividades específicas de 24800, 24600, 19100, 16300, 6070, 4800 (mol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>), respectivamente, sugerindo uma ampla especificidade de substratos para a enzima proveniente do pinhão manso. As folhas do capim Mombaça (*Megathyrsus maximus*) foram estudadas por Centeno *et al.* (2017) como fonte da enzima peroxidase, apresentando uma atividade enzimática do extrato purificado de 263 U.mg<sup>-1</sup>, utilizando o guaiacol como substrato.

A atividade específica do extrato purificado do melão amargo (*Momordica charantia*) foi determinada através da oxidação do substrato o-dianisidina-HCl na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentando uma atividade de 99 U.mg<sup>-1</sup> (Akhtar *et al.*, 2005). A gramínea *Echinolaena inflexa* pode ser considerada como uma fonte alternativa para obtenção da enzima peroxidase de tecidos vegetais. Ramalho *et al.* (2015) obtiveram uma atividade específica de 6.250 U.g<sup>-1</sup> para a peroxidase proveniente da farinha dos frutos da gramínea, utilizando como substrato o pirogalol na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.2. Métodos para extração de peroxidases de tecidos vegetais

Para a obtenção de peroxidases de tecidos vegetais, é necessária a realização do rompimento da parede celular em meio líquido, sendo utilizados, para tanto, métodos físicos, químicos e enzimáticos. A parede celular é uma característica intrínseca as células vegetais, sendo responsável pela resistência mecânica das estruturas vegetais, promoção da junção das células, controlando a forma e permitindo altas pressões de turgor e proteção contra agressões físicas e químicas (Paiva *et al.*, 2009). As células dos tecidos vegetais são rodeadas por paredes celulares, sendo elas fisicamente rígidas,

fornecendo suporte mecânico aos diferentes tecidos. Nas plantas superiores, a parede celular é formada por três camadas denominadas lamela média, parede primária e parede secundária, sendo que a sua composição química e a estrutura física variam entre espécies e cultivares (Fernandes e Rodrigues, 2011).

Os métodos de rompimento celular podem ser classificados em quatro classes: mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, prensa francesa e ultrassom); não mecânicos ou físicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, aquecimento, secagem); químicos (álcalis, solventes, detergentes, ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular). Para a escolha da técnica de rompimento celular devem ser considerados fatores como, tamanho da célula, tolerância a tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação e rendimento do processo (Pessoa Junior e Kilikian, 2005).

Variáveis como tempo de extração, pH, tipo de solvente, tipo de enzima usada na maceração, potência de sonicação, dentre outros, também são objeto de estudo dos pesquisadores para maximizar a extração das peroxidases. Ramalho *et al.* (2015) avaliaram o efeito combinado entre o pH e o tempo de extração sobre a atividade de peroxidase de *Echinolaena inflexa*, uma gramínea nativa do cerrado brasileiro, utilizando tampões fosfato de sódio (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) e borato de sódio (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) como fase líquida para extração da enzima. Os pesquisadores obtiveram uma atividade enzimática elevada quando utilizados os tampões pHs 7,5 a 8,5 e, por esta razão, o pH 8,0 foi considerado como ótimo, associado ao tempo de 60 minutos de extração.

Somtürk *et al.* (2014) realizaram a extração da enzima peroxidase das raízes do repolho roxo (*Brassica oleracea* var. Capitata f. rubra) com a adição de nitrogênio líquido e homogeneização em almofariz, seguida da adição de 50 mL de fosfato monopotássico 0,3 M (pH 7,0). A mistura foi centrifugada a 9.000 rpm por 60 min à 4°C e o extrato bruto armazenado a -20°C, sendo obtida uma atividade enzimática de 24,72 U.mL<sup>-1</sup>.

Duas diferentes formas de extração da peroxidase foram estudadas por Ghaemmaghami *et al.* (2010) e consistiram em embeber as cascas da soja em tampão fosfato de sódio (pH 6,0)

durante 24 horas (método 1) e em tampão fosfato de sódio (pH 8,0) durante 22 horas (método 2). A atividade enzimática foi avaliada para os dois métodos, sendo obtidos valores de 52,6 U.mL<sup>-1</sup> e 17,3 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo escolhido o método 1 como o melhor método de extração da enzima e utilizado na sequência do estudo.

A extração de peroxidase através da homogeneização em tampões também foi reportada em estudos com casca de nabo (*Brassica campestris*) (Silva *et al.*, 2012), folhas de capim-colonião (*Panicum maximum*) (Centeno *et al.*, 2017), alho (*Allium sativum*) (Diao *et al.*, 2011), carambola (*Oxalidacia averrhoa*) (Laurenti e Clemente, 2005), guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) (Carneiro *et al.*, 2003), girassol (*Helianthus annuus*) (Jha *et al.*, 2013), casca de Luffa (*Luffa acutangula*) (Chiong *et al.*, 2016), batata doce (*Ipomoea batatas*) (Zeraik *et al.*, 2008) e pimenta amarela (*Capsicum annuum*) (Jiang e Penner, 2015).

As Tabelas 1 e 2 mostram os diferentes vegetais de onde foram extraídas peroxidases, o substrato utilizado na determinação da atividade e as etapas utilizadas para a extração.

### 3.3. Métodos para purificação peroxidases vegetais

A purificação é uma etapa que proporciona uma melhor eficiência da enzima em seu papel catalítico. Existem diversos métodos de fracionamento para que ela seja purificada, como a precipitação por adição de sais neutros ou solventes orgânicos, além da purificação cromatográfica através da cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de afinidade (Al-Senaidy e Ismael, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Kalin *et al.*, 2014; Rusdi *et al.*, 2014).

A designação do processo de purificação depende da aplicação final da molécula-alvo, suas características físico-químicas, bem como a das impurezas, pois há produtos cuja aplicação não necessita de um elevado grau de pureza, portanto operações cromatográficas não são necessárias, entretanto há produtos, como as enzimas, que requerem maior grau de pureza, de modo que o processo de purificação escolhido seja de complexidade elevada (Pessoa Junior e Kilikian, 2005).

A precipitação de proteínas por adição de sais remove a camada de hidratação das

proteínas, devido a competição dos íons salinos com a proteína pelas moléculas de água, sendo favorecida a agregação e a precipitação dos resíduos hidrofóbicos (Ghosh, 2006).

Segundo Pessoa Junior e Kilikian (2005), o sal mais comumente utilizado para esta técnica é o sulfato de amônio, pois apresenta características importantes como alta solubilidade em água, baixa densidade, além de apresentar como vantagem a ação estabilizante sobre as proteínas. Uma solução saturada de sulfato de amônio corresponde a cerca de 4,05 M (533 g. L<sup>-1</sup> a 20°C) e a densidade de 1,235 g.cm<sup>-3</sup>.

A precipitação da peroxidase extraída do alho (*Allium sativum*) utilizando sulfato de amônio foi estudada por Osuji *et al.* (2014). O extrato bruto foi saturado com sulfato de amônio, sendo realizada, em seguida, diálise durante 18 h, e o dialisado aplicado em uma coluna cromatográfica de filtração de gel. A atividade da peroxidase aumentou simultaneamente com a aplicação de diferentes etapas de purificação, sendo os valores de atividade enzimática para o extrato bruto, do extrato que passou por precipitação com sulfato de amônio, do extrato que passou por precipitação e diálise e do extrato que passou por precipitação, diálise e cromatografia em gel de 4,094 U.mg<sup>-1</sup>, 4,886 U.mg<sup>-1</sup>, 15,766 U.mg<sup>-1</sup> e 25,256 U.mg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Rathnamsamy *et al.* (2014) estudaram a aplicação do sulfato de amônio na purificação de peroxidases provenientes de rabanete, tomate, nabo e repolho. No processo de precipitação, nenhum precipitado foi observado quando utilizado de 0 a 20% de saturação, porém, a peroxidase começou a precipitar a partir de 30% de saturação, alcançando atividade específica máxima em 80% de saturação para todas as fontes vegetais. A utilização do sulfato de amônio para a purificação da peroxidase de tecidos vegetais também foi reportada em estudos com a casca da tangerina (*Citrus reticulata*) (Nouren *et al.*, 2013), folhas de rabanete (*Raphanus sativus*) (Bhatti *et al.*, 2012), cascas de limão (*Citrus limon*) (Nouren e Bhatti, 2015), broto de bambu (*Bambusa oldhamii*) (Hsu *et al.*, 2012) e batata verde (*Trichosanthes dioica*) (Jamal *et al.*, 2010).

A acetona, o etanol e o metanol são os solventes mais utilizados para a purificação de enzimas (Biazus *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2012) realizaram a purificação do extrato enzimático da casca do nabo (*Brassica campestris*) utilizando a acetona como solvente orgânico e a peroxidase

purificada mostrou-se eficiente na remoção da cor de importantes corantes industriais em fase aquosa. A purificação da enzima proveniente das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como Copaíba, foi realizada utilizando o etanol, acetona e sulfato de amônio como agentes precipitantes. O sulfato de amônio foi o agente precipitante mais eficiente, mas a acetona foi escolhida como agente precipitante por ser mais eficiente que o etanol e apresentar eficiência semelhante à do sulfato de amônio (Maciel *et al.*, 2007).

A cromatografia tem como finalidade isolar e purificar o metabólito de interesse em relação aos demais, levando-o à pureza adequada a seu uso e pode ser dividida em dois grandes grupos: líquida e gasosa, sendo a cromatografia líquida a de interesse as purificações de metabólitos celulares (Pessoa Junior e Kilikian, 2005). A cromatografia por troca-iônica se baseia no princípio da reversibilidade das atrações eletrostáticas de uma molécula carregada em relação a uma matriz sólida com grupos com cargas opostas e ligados covalentemente à matriz (Levison, 2003).

Segundo Bjurström (1985), a cromatografia de exclusão é uma técnica que separa proteínas moleculares com base no tamanho utilizando o princípio de que pequenas moléculas irão penetrar a estrutura porosa do meio gel em maior extensão do que moléculas maiores, tendo desta forma um tempo de retenção mais longo. É possível também utilizá-la para estimar o tamanho de uma proteína que está sendo purificada (Nelson e Cox, 2014).

A cromatografia de afinidade é uma técnica de separação que depende das interações altamente específicas, onde os grânulos na coluna que têm um grupo químico covalentemente ligado chamado de ligante – um grupo ou molécula que se liga a uma macromolécula, tal como uma proteína. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, qualquer proteína com afinidade para esse ligante se liga aos grânulos, e sua migração através da matriz é retardada (Nelson e Cox, 2014).

Johri *et al.* (2005) reportaram a utilização das técnicas de cromatografia de troca-iônica, interação hidrofóbica e de afinidade para a purificação da peroxidase obtida a partir das raízes da cereja de inverno (*Withania somnifera*). A enzima a ser purificada foi aplicada primeiramente em uma coluna de DEAE–

*Sepharose* (cromatografia de troca-iônica) em seguida em uma coluna cromatográfica de interação hidrofóbica contendo *Phenyl–Sepharose*, em sequência, as frações contendo atividade foram agrupadas e aplicadas na coluna de cromatografia de afinidade contendo *concanavalin A* (ConA– *Sepharose*), obtendo-se um incremento na atividade específica de 1,91; 20,29 e 142,55 vezes, respectivamente, em relação a atividade específica bruta.

A purificação da peroxidase obtida do caule macio de uma leguminosa arbórea conhecida popularmente como Leucena (*Leucaena leucocephala*) foi realizada através da aplicação das técnicas de precipitação por adição de sais e cromatografia, onde o uso de 50% de sulfato de amônio apresentou um incremento de 3,69 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto. A cromatografia de troca-iônica, utilizando com resina o *dietilaminoetilcelulose* (DEAE- C), levou a um incremento de 8,64 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto, a cromatografia com a coluna de *Sephadex G-200*, levou a um aumento de 46,2 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto e a cromatografia de afinidade com *Concanavalin A* (ConA– *Sepharose*) levou a um aumento de 89,3 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto (Pandey e Dwivedi, 2011).

O emprego das técnicas de precipitação com sulfato de amônio e a cromatografia por afinidade para precipitação da peroxidase das folhas da árvore Neem (*Azadirachta indica*) também foram relatadas por Pandey *et al.* (2017). A saturação de 80-100% de sulfato de amônio apresentou um aumento de 2,35 vezes na atividade específica, em relação ao extrato bruto, e com a aplicação na coluna de ConA– *Sepharose* houve um incremento de 16,8 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto.

A aplicação das técnicas combinadas de precipitação com sulfato de amônio e a cromatografia de exclusão foram estudadas por Mall *et al.* (2013) para a precipitação da peroxidase das folhas da cidra (*Citrus medica*), sendo obtido um incremento de 6,22 e 15,10 vezes na atividade específica em relação ao extrato bruto.

As Tabelas 3 e 4 mostram diferentes vegetais de onde foram extraídas peroxidases, etapas utilizadas na purificação das enzimas e o incremento na atividade específica em relação ao

extrato bruto.

## CONCLUSÕES

A partir deste estudo, foi verificada a existência de uma ampla gama de possibilidades para obtenção da enzima peroxidase proveniente de tecidos vegetais, mas ocorre grande variabilidade na atividade enzimática das peroxidases obtidas, até mesmo, de uma mesma planta, quando aplicados métodos de extração distintos. Os métodos de purificação parcial comumente utilizados levam a aumentos da atividade específica das peroxidases, que, para alguns casos já é satisfatório. Os métodos de purificação incluem processos de maior complexidade, mas que aumentam ainda mais a pureza do extrato, com melhora significativa na eficiência catalítica da enzima. A literatura é vasta em metodologias de extração e purificação parcial ou total das peroxidases, podendo cada metodologia ser adequada dependendo do tecido vegetal utilizado como meio de extração.

## REFERÊNCIAS

1. Adewale, I.O., Adekunle, A.T. *Biocatal Agric Biotechnol*, **2018**, 14,1.
2. Akhtar, S., Khan, A.A., Husain, Q. *Bioresour Technol*, **2005**, 96 (16), 1804.
3. Al-Senaidy, A.M., Ismael, M.A. *Saudi J Biol Sci.*, **2011**, 18(3), 293.
4. Bhatti, H.N., Kalsoom, U., Habib, A. *J Chem Soc Pakistan*, **2012**, 34(2), 257.
5. Biazus, J.P.M., Santana, J.C.C., Souza, R.R., Tambourgi, E.B. *Ciênc Tecnol Aliment*, **2010**, 30(1), 218.
6. Bjurstrom, E. *Chem. Eng.* **1985**, 92(4), 126.
7. Boucherit, N., Abouseoud, M., Adour, L. *J Environ Sci (China)*, **2013**, 25(6), 1235.
8. Cai, F., Ouyang, C, Duan, P., Gao, S., Xu, Y., Chen, F. *J Mol Catal B Enzym*, **2012**, 77, 59.
9. Carneiro, C.E.A., Rolim, H.M.V., Fernandes, K.F. *Acta Sci Biol Sci*, **2003**, 25(1), 189.
10. Centeno, D.A., Solano, X.H., Castilho, J.J. *Bioelectrochemistry*, **2017**, 116, 33.
11. Chagas, P.M.B., Torres, J.A., Silva, M.C., Corrêa, A.D. *Int J Biol Macromol*, **2015**, 81, 568.
12. Chiong, T., Lau, S.Y., Lek, Z.H., Koh, B.Y., Danquah, M.K. *J Environ Chem Eng*, **2016**, 4(2), 2500.
13. Cooper, V.A., Nicell, J.A. *Water Res*, **1996**, 30(4), 954.
14. Diao, M., Ouédraogo, N., Baba-Moussa, L., Savadogo, P.W., N'Guessan, A.G., Bassolé, I.H., Dicko, M.H. *Biodegradation*, **2011**, 22 (2), 389.
15. Dunford, H. B. *Peroxidases and catalases: biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology*. 2. ed, Wiley: New York, 2010.
16. Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S., Law, C.L., Mujumdar, A.S. *Food Bioprocess Tech*, **2011**, 4(2), 163.
17. Freitas, A.A., Francelin, M.F., Hirata, G.F., Clemente, E.; Schmidt, F.L. *Food Sci Technol*, **2008**, 28(1), 172-177.
18. Fricks, A.T., Souza, D.P.B., Oestreicher, E.G., Antunes, O.A.C., Girardi, J.S., Oliveira, D., Dariva, C. *J Supercrit Fluids*, **2006**, 38(3), 347-353.
19. Fritzen-Garcia, M.B., Oliveira, I.R.W.Z., Zanetti-Ramos, B.G., Fatibello-Filho, O., Soldi, V., Pasa, A.A., Creczynski-Pasa, T.B. *Sens. Actuator B-Chem.*, **2009**, 139(2), 570.
20. Galende, P.P., Cuadrado, N.H., Arellano, J.B., Gavilanes, F., Kostetsky, E.Y., Zhadan, G.G., Villar, E., Roig, M.G., Kennedy, J.F., Shnvrov, V.L. *Int J Biol Macromol*, **2015**, 72, 718.
21. Ghaemmaghami, F., Alemzadeh, I., Motamed, S. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, **2010**, 7(2), 28- 38.
22. Ghosh, R. *Principles of bioseparations engineering*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: Canada, 2006.
23. Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., Wang, W. *LWT-Food Sci Technol.*, **2015**, 60(2), 1095.
24. Gui, F., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. *Food Chem*, **2006**, 97(3), 480.
25. Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T. *Appli Microbiol*

- Biotechnol*, **2010**, 87(3), 871-897.
26. Hsu, S-K., Chung, Y-C., Chang, C-T., Sung, H-Y. *Int J Food Sci Technol*, **2012**, 47, 1.
  27. Hu, Y., Wu, J., Luo, P., Mo, Y. *Afr J Biotechnol*, **2012**, 11(11), 2752.
  28. Jamal, F., Pandey, P.K., Qidwai, T. *J Mol Catal B Enzym*, **2010**, 66(1-2), 177.
  29. Jha, P., Jobby, R., Kudale, S., Modi, N., Dhaneshwar, A., Desai, N. *Int Biodeterior Biodegradation*, **2013**, 77, 106.
  30. Jiang, S., Penner, M.H. *Anal. Biochem.*, **2015**, 476, 20.
  31. Johri, S., Jamwal, U., Rasool, S., Kumar, A., Verma, V., Qazi, N.G. *Plant Sci.*, **2005**, 169(6), 1014.
  32. Kalin, R., Atasever, A., Ozdemir, H. *Food Chem.*, **2014**, 150, 335.
  33. Kumar, R., Singh, K.A., Sing, V.K., Jagannadham, M.V. *Process Biochem.*, **2011**, 46(6), 1350.
  34. Kurnik, K., Treder, K., Skorupa-Klaput, M., Tretyn, A., Tyburski, J. *Water Air Soil Pollut*, **2015**, 226(8), 254.
  35. Laurenti, C., Clemente, E. *Acta Sci. Agron.*, **2005**, 27(1), 159.
  36. Levison, P.R. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 790(1-2), 17.
  37. Maciel, H.P.F., Gouvêa, C.M.C.P., Pastore, G.M. *Ciênc. Tecnol Aliment.*, **2007**, 27(2), 221.
  38. Mall, R., Naik, G., Mina, U., Mishra, S.K. *Prep Biochem Biotechnol*, **2013**, 43(2), 137.
  39. Márquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R.M., Pardo, V.T. *LWT-Food Sci Technol*, **2008**, 41(8), 1372.
  40. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6 ed., Artmed: Porto Alegre, 2014.
  41. Nouren, S., Bhatti, H.N. *Biochem Eng J.*, **2015**, 95, 9.
  42. Nouren, S., Bhatti, H.N., Bhatti, I.A., Asgher, M. *J. Anim. Plant Sci.*, **2013**, 23(2), 430.
  43. Osuji, A.C., Eze, S.O.O., Osayi, E.E., Chilaka, F.C. *ScientificWorldJournal*, **2014**, 2014, 1.
  44. Paiva, E.P., Lima, M.S., Paixão, J.A. *Rev Iberoam Polim*, **2009**, 10(4), 196.
  45. Pandey, V.P., Dwivedi, U.N. *J Mol Catal B Enzym*, **2011**, 68(2), 168.
  46. Pandey, V.P., Rani, J., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., Shasany, A.K., Tiwari, S., Dwivedi, U.N. *Int J Biol Macromol*, **2017**, 104b, 1713.
  47. Pessoa Junior, A., Kilikian, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Manole: Barueri, SP, 2005.
  48. Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. *LWT-Food Sci Technol*, **2004**, 37(2), 199.
  49. Ramalho, R.P.R.S., Scalize, P.S., Caramori, S.S. *Rev. Ambient. Água*, **2015**, 10(4), 50.
  50. Rathnamsamy, S., Singh, R., Auxilia, R., Vedhahari, B.N. *Biotechnol Ind J.*, **2014**, 9(4), 160.
  51. Reed, G. *Enzymes in food processing: a series of monographs*. New York Academic, 1975.
  52. Regalado, C., Garcia-Almendarez, B., Duarte-Vasquez, M.A. *Phytochem Rev*, **2004**, 3(1-2), 243.
  53. Roling, M.S., Moura, V.M., Clemente, E. *Acta Sci Agron*, **2000**, 22(5), 1157.
  54. Rusdi, B., Mulyanti, D., Rodiyah, M. *Procedia Chem*, **2014**, 13, 170.
  55. Šekuljica, N.Z., Prlainović, N.Z., Stefanović, A.B., Žuža, M.G., Čičkarić, D.Z., Mijin, D.Z., Knežević-Jugović, Z.D. *ScientificWorldJournal*, **2015**, 2015, 1.
  56. Silva, M.C., Correa, A.D., Torres, J.A., Amorim, M.T.S.P. *Quim Nova*, **2012**, 35(5), 889.
  57. Silva, M.C., Torres, J.A., Sá, L.R.V. de, Chagas, P.M.B., Ferreira-Leitão, V.S., Corrêa, A.D. *J Mol Catal B Enzym*, **2013**, 89, 122.
  58. Somtürk, B., Kalin, R., Özdemir, N. *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**, 173(7), 1815.
  59. Souza, S.M.A.G.U. de, Forgiarini, E., Souza, A.A.U. de. *J Hazard Mat*, **2007**, 147(3), 1073.
  60. Srinivas, N.D., Rashmi, K.R.,



Raghavarao, K.S.M.S. *Process Biochem*, **1999**, 35(1-2), 43.

Filho, O., Leite, O.D. *Quim Nova*, **2008**, 31(4), 731.

61. Steevensz, A., Madur, S., Feng, W., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., Biswas, N. *Enzyme Microb Technol*, **2014**, 55(5), 65.

62. Zeraik, A.E., Souza, F.S. de; Fatibelo-

**Tabela 1.** Vegetal ou parte da planta utilizada na extração, substratos e atividades das peroxidases.

Vegetal / parte de onde foi extraída a enzima	Substrato / atividade*	Referência
Soja ( <i>Glycine max</i> )(casca) Luffa ( <i>Luffa acutangula</i> ) (fruto)	Guaiacol / 0,373 U.mL <sup>-1</sup> e 0,355 U.mL <sup>-1</sup> , respectivamente.	Chiong <i>et al.</i> , 2016
Soja ( <i>Glycine max</i> ) (casca)	Guaiacol / 31.01 U.mL <sup>-1</sup>	Chagas <i>et al.</i> , 2015
Soja ( <i>Glycine max</i> ) (casca de 65 variedades)	Fenol e 4-aminoantipirina / 68,1 U.g <sup>-1</sup> e 62,2 U.g <sup>-1</sup>	Steevensz <i>et al.</i> , 2014.
Guariroba ( <i>Syagrus oleracea</i> Becc) (hastes divididas em cabeça e coração)	Guaiacol / 730,3 UE.g <sup>-1</sup> para a cabeça e 464 UE.g <sup>-1</sup> para o coração	Carneiro <i>et al.</i> , 2003.
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.) variedades Benitaka e Rubi (fruto)	o-dianisidina 1% em metanol / 2,63 U.min <sup>-1</sup> .ml <sup>-1</sup> para peroxidase solúvel e 2,97 U. min <sup>-1</sup> .ml <sup>-1</sup> para a peroxidase ionicamente ligada - Benitaka 2,65 U.min <sup>-1</sup> .ml <sup>-1</sup> para peroxidase solúvel e 2,83 U. min <sup>-1</sup> .ml <sup>-1</sup> para a peroxidase ionicamente ligada – Rubi	Freitas <i>et al.</i> , 2008.
Baunilha ( <i>Vanilla planifolia</i> ) (fava)	Guaiacol / 8714,8x10 <sup>3</sup> U.mg <sup>-1</sup>	Márquez <i>et al.</i> , 2008.
Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> L.) (raiz)	Guaiacol/ 46,2 U.mL <sup>-1</sup>	Fricks <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cola nítida</i> ( frutos das variedades branca e vermelha) e <i>Cola acuminata</i> (fruto)	o-dianisidina (0,025Mm )/ <i>Cola nítida</i> variedade branca - A e B sem atividade, C: 52,0±4,0 U.mg <sup>-1</sup> ; <i>Cola nítida</i> variedade vermelha: A sem atividade, B 2,0±0,01 U.mg <sup>-1</sup> e C 50,0±0,001 U.mg <sup>-1</sup> <i>Cola acuminata</i> : A sem atividade, B 1,63±0,01 U.mg <sup>-1</sup> , 0,35±0,15 U.mg <sup>-1</sup>	Adewale e Adekunle, 2018.
Acelga ( <i>Beta vulgaris</i> ), espinafre ( <i>Spinacia oleracea</i> ), alface romana ( <i>Lactuca sativa</i> var longifolia), alface manteiga ( <i>Lactuca sativa</i> ), repolho ( <i>Brassica oleracea</i> var. capitata) (folhas)	Guaiacol / acelga: 1258,38 U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> , espinafre: 1745,87 U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> , alface romana: 1014,53 U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> , alface manteiga 2175,86 U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> , repolho = 3175 U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>	Ponce <i>et al.</i> , 2004.
Caqui ( <i>Diospyros kaki</i> L.), carambola ( <i>Averrhoa carambola</i> L.), inhame ( <i>Dioscorea</i> sp.), açafraão ( <i>Crocus sativus</i> L.), yacon ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> ), feijão de ervilha ( <i>Pisum sativum</i> L.), pinhão do pinheiro-do-paraná ( <i>Araucaria angustifolia</i> ) (fruto ou o vegetal sem a casca)	Guaiacol/caqui: 24,05 U.mL <sup>-1</sup> , carambola: 72,15 U.mL <sup>-1</sup> , inhame: 794 U.mL <sup>-1</sup> , açafraão: 1010 U.mL <sup>-1</sup> , yacon: 1766 U.mL <sup>-1</sup> , feijão de ervilha: 2428 U.mL <sup>-1</sup> , pinhão: 3246 U.mL <sup>-1</sup>	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2009.

\*Atividades expressas em U.mL<sup>-1</sup> definido como unidade de atividade enzimática por mL de extrato; UE.g<sup>-1</sup> e U.g<sup>-1</sup> são definidas como aumento de 0,1 unidade de absorbância por minuto por g de amostra; U.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup> é definida como à variação de uma unidade de absorbância por minuto por mL de amostra e Unidade/mg proteína é definida como unidade de atividade enzimática por casda mg de proteína; U.mg é uma unidade de atividade enzimática por mg de proteína, U.min.g onde uma unidade de atividade é definida como uma mudança na absorbância de 0,001 min<sup>-1</sup> por g de vegetal.

**Tabela 2. Vegetal ou parte da planta utilizada na extração e etapas de extração das peroxidases.**

Vegetal / parte de onde foi extraída a enzima	Etapas de extração	Referência
Soja ( <i>Glycine max</i> )(casca) Luffa ( <i>Luffa acutangula</i> ) (fruto)	Esmagamento, homogeneização com solução tampão. filtração e centrifugação. Sobrenadantes - extrato bruto. Armazenamento dos extratos com maior atividade enzimática. Extração para os vegetais em separado.	Chiong <i>et al.</i> , 2016
Soja ( <i>Glycine max</i> ) (casca)	Imersão em água destilada, remoção das cascas, trituração em solução tampão, filtração e centrifugação. Sobrenadante = extrato enzimático bruto.	Chagas <i>et al.</i> , 2015
Soja ( <i>Glycine max</i> ) (casca de 65 variedades)	Imersão em água destilada, remoção e secagem das cascas, moagem, ressuspensão em água destilada, homogeneização em vórtex, repouso, homogeneização, centrifugação. Sobrenadante = extrato enzimático bruto.	Steevensz <i>et al.</i> , 2014.
Guariroba ( <i>Syagrus oleracea</i> Becc) (hastes divididas em cabeça e coração)	Maceração manual em tampão fosfato (50 mmol.L <sup>-1</sup> /sacarose 400 mmol.L <sup>-1</sup> pH 6,5) gelado. Agitação (40 min/4°C) e centrifugação (2800g/20 min/4°C). Sobrenadante = extrato enzimático bruto.	Carneiro <i>et al.</i> , 2003.
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.) variedades Benitaka e Rubi (fruto)	Mistura em tampão, homogeneização com adição de polivinilpirrolidona, filtração e recolhimento do filtrado em banho de gelo, centrifugação, congelamento do sobrenadante (fração enzimática solúvel). Precipitado homogeneizado em NaCl (1M) e solução tampão, centrifugação, congelamento do sobrenadante (extrato enzimático ionicamente ligado).	Freitas <i>et al.</i> , 2008.
Baunilha ( <i>Vanilla planifolia</i> ) (fava)	Lavagem com água destilada, corte em partes, liofilização, moagem, homogeneização em tampão adicionado de EDTA, DL-ditiotreitol e polivinilpirrolidona, filtração e lavagem do resíduo com tampão, centrifugação, armazenagem do sobrenadante. Material sólido suspenso em tampão e NaCl, homogeneização e agitação, centrifugação, obtenção da enzima ionicamente ligada. Diálise. Obtenção do extrato ionicamente ligado bruto.	Márquez <i>et al.</i> , 2008.
Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> L.) (raiz)	Homogeneização em tampão, filtração, centrifugação e armazenamento.	Fricks <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cola nitida</i> (frutos das variedades branca e vermelha) e <i>Cola acuminata</i> (fruto)	Tampão A: homogeneização em tampão fosfato, centrifugação, sobrenadante utilizado como extrato enzimático. Tampão B: homogeneização em tampão Tris-HCl contendo glicerol. Demais procedimentos como descrito anteriormente. Tampão C: homogeneização em tampão Tris-HCl contendo glicerol, PEG, ácido cítrico, L-cisteína e ácido ascórbico. Demais procedimentos como descrito anteriormente	Adele e Adekunle, 2018.
Acelga ( <i>Beta vulgaris</i> ), espinafre ( <i>Spinacia oleracea</i> ), alface romana ( <i>Lactuca sativa</i> var longifolia), alface manteiga ( <i>Lactuca sativa</i> ), repolho ( <i>Brassica oleracea</i> var. capitata) (folhas)	Cominuição, homogeneização, filtração e centrifugação. Sobrenadante = extrato enzimático bruto.	Ponce <i>et al.</i> , 2004.
Caqui ( <i>Diospyros kaki</i> L.), carambola ( <i>Averrhoa carambola</i> L.), inhame ( <i>Dioscorea</i> sp.), açafraão ( <i>Crocus sativus</i> L.), yacon ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> ), feijão de ervilha ( <i>Pisum sativum</i> L.), pinhão do pinheiro-do-paraná ( <i>Araucaria angustifolia</i> ) (fruto ou o vegetal sem a casca)	Homogeneização em solução tampão, filtração, centrifugação, armazenagem. Sobrenadante = extrato enzimático bruto.	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2009.

T<sub>amb</sub> significa temperatura ambiente.

**Tabela 3.** Vegetais de onde foram extraídas peroxidases, etapas de purificação e incremento na atividade enzimática em relação ao extrato bruto.

Vegetal/ parte de onde foi extraída a enzima	Método de purificação	Resumo da execução do método de purificação	Referência
Batata doce ( <i>Ipomoea batatas</i> ) (tubérculo sem casca)	Precipitação seguida de cromatografia de exclusão molecular	1ª purificação: saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , repouso, separação do sobrenadante, adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , repouso, centrifugação, ressuspensão do precipitado em tampão, diálise, obtenção do extrato concentrado. 2ª purificação: cromatografia por exclusão molecular com <i>Sephadex</i> G-100, eluição com tampão fosfato, monitoramento das concentrações de proteína por espectrofotometria.	Zeraik <i>et al.</i> , 2008
Abobrinha ( <i>Cucurbita pepo</i> ) (vegetal fresco)	Precipitação	Precipitação com acetona, centrifugação, precipitado suspenso em tampão fosfato, obtenção da peroxidase parcialmente purificada.	Boucherit <i>et al.</i> , 2013
Espinafre de água ( <i>Ipomoea aquatica</i> Forssk.) (folhas)	Precipitação	Fracionamento do extrato com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas concentrações de 0-10%, 10-20%, 20-40% e 40-65%, obtenção de quatro frações, diálise de cada fração.	Rusdi <i>et al.</i> , 2014
Palmeira tamareira ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) (folhas)	Resina de troca iônica/ cromatografia de exclusão	Aplicação do extrato em coluna DEAE- <i>Sephadex</i> , lavagem com tampão de equilíbrio, eluição em tampão de equilíbrio, obtenção de frações. Frações que mostraram atividade da peroxidase: agrupadas e concentradas por ultrafiltração. Enzima concentrada carregada em coluna de filtração de gel equilibrada com tampão. Frações com atividade agrupadas.	Al-Senaidy e Ismael, 2011
Alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) (hastes)	Precipitação, filtração em gel e cromatografia de afinidade	1ª purificação: precipitação por saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , centrifugação, sobrenadante reunido e adicionado de sulfato de amônio, repouso, centrifugação, precipitado dissolvido em água destilada e dialisado. 2ª purificação: filtração em gel em coluna <i>Sephadex</i> G-100 equilibrada com tampão Tris-HCl, coluna eluída no mesmo tampão, coleta das frações proteicas eluídas, atividade da peroxidase e homogeneização das frações que apresentaram elevada atividade. 3ª purificação: cromatografia de afinidade com <i>Concanavalin A</i> equilibrada com tampão Tris-HCl, $\text{CaCl}_2$ , $\text{MnCl}_2$ e NaCl, eluição com tampão contendo glicose e manose.	Hu <i>et al.</i> , 2012
Corriola ( <i>Ipomoea palmata</i> ) (folhas)	Extração seguida de filtração em gel	1ª purificação: extração aquosa bifásica (polietilenoglicol e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), formação de duas fases ao longo do tempo, atividade enzimática e da concentração de proteína das fases. 2ª purificação: filtração em gel (coluna de <i>Sephadex</i> G-100). equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio, determinação da absorbância ( $\lambda=280$ nm) e da atividade da peroxidase.	Srinivas <i>et al.</i> , 1999
Vassoura espanhola branca ( <i>Cytisus multiflorus</i> ) (hastes)	Extração seguida de cromatografia de troca iônica.	1ª purificação: extração aquosa bifásica (polietilenoglicol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , formação de duas fases, centrifugação da fase inferior. 2ª purificação: titulação da fase inferior, aplicação em coluna de <i>Phenyl-Sephadex</i> equilibrada com tampão fosfato, eluição com tampão fosfato e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , diálise contra tampão acetato de sódio, concentração em membrana, aplicação em coluna TSK-Gel DEAE-5PW equilibrada com tampão acetato de sódio-acético, eluição com NaCl no mesmo tampão, frações atividade enzimática recolhidas, diálise contra tampão acetato de sódio-ácido acético. 3ª purificação: concentração em membrana, aplicação em coluna HiTrap SP™ HP equilibrada com tampão acetato de sódio-ácido acético, eluição com solução fosfato com NaCl, recolhimento das frações, diálise contra tampão acetato de sódio-ácido acético. 4ª purificação em <i>Superdex</i> -200 equilibrado com tampão fosfato, eluição pelo mesmo	Galende <i>et al.</i> , 2015.

		tampão, frações contendo peroxidase recolhidas após o último passo de purificação, concentradas e armazenadas.	
Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> L.), Nabo ( <i>Brassica rapa</i> L.) (raiz)	Precipitação seguida de cromatografia de afinidade	Extrato bruto aplicado à coluna de afinidade ( <i>Sephrose-4B-L</i> -tirosina-4-aminobenzohidrazida equilibrada com tampão fosfato), lavagem do gel de afinidade, peroxidase eluída em solução de NaCl e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , diálise.	Kalin <i>et al.</i> , 2014.
Castanha ( <i>Castanea molíssima</i> )	Precipitação	1ª purificação: precipitação com de sulfato de amônio, centrifugação, redissolução, diálise contra tampão fosfato. Solução dialisada coletada e condensada em tubos de corte de 10 kDa com polietileno glicol, liofilização (pó de enzima bruto). 2ª purificação: pó de enzima bruto dissolvido em tampão, carregamento em coluna de troca de íons DEAE-52, pré-equilibrada com tampão, eluição com o mesmo tampão, coleta de frações para atividade enzimática.	Gong <i>et al.</i> , 2015
Pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ) (folhas)	Precipitação	1ª purificação: saturação com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , centrifugação, sobrenadante saturado com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , centrifugação, sedimento dissolvido em tampão. 2ª purificação: dessalinização em coluna de <i>Sephadex G-25</i> . pré-equilibrada com tampão, eluição com o mesmo tampão, recolhimento das frações com atividade. 3ª purificação: frações injetadas em coluna HiTrap Q HP, eluição, frações que mostraram atividade foram recolhidas.	Cai <i>et al.</i> , 2012.

**Tabela 4.** Vegetais de onde foram extraídas peroxidases e incremento na atividade enzimática em relação ao extrato bruto.

Vegetal/ parte de onde foi extraída a enzima	Método de purificação	Incremento na atividade em relação ao extrato bruto	Referência
Batata doce ( <i>Ipomoea batatas</i> ) (tubérculo sem casca)	Precipitação seguida de cromatografia de exclusão molecular	1º purificação: 5,79 vezes; 2º purificação: 8,57 vezes.	Zeraik <i>et al.</i> , 2008
Abobrinha ( <i>Cucurbita pepo</i> ) (vegetal fresco)	Precipitação	1,34 vezes.	Boucherit <i>et al.</i> , 2013
Espinafre de água ( <i>Ipomoea aquatica</i> Forssk.) (folhas)	Precipitação	Fração 1: 1,87 vezes; Fração 2: 1,64 vezes; Fração 3: 1,18 vezes; Fração 4: 3,32 vezes.	Rusdi <i>et al.</i> , 2014
Palmeira tamareira ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) (folhas)	Resina de troca iônica/ cromatografia de exclusão	1ª purificação: 1,4 vezes; 2ª purificação: 3,5 vezes; 3ª purificação: 17 vezes.	Al-Senaidy e Ismael, 2011
Alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) (hastes)	Precipitação, filtração em gel e cromatografia de afinidade	1ª purificação: 1,32 vezes; 2ª purificação: 2,71 vezes; 3ª purificação: 17,92 vezes.	Hu <i>et al.</i> , 2012
Corriola ( <i>Ipomoea palmeta</i> ) (folhas)	Extração seguida de filtração em gel	1ª purificação: fase superior – zero; fase inferior: 2,18 vezes; 2ª purificação: 48,6 vezes.	Srinivas <i>et al.</i> , 1999
Vassoura espanhola branca ( <i>Cytisus multiflorus</i> ) (hastes)	Extração seguida de cromatografia de troca iônica.	1ª purificação: 7,9 vezes; 2ª purificação: 66,9 vezes; 3ª purificação: 274,5 vezes; 4ª purificação: 1167,8.	Galende <i>et al.</i> , 2015.
Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> L.), Nabo ( <i>Brassica rapa</i> L.) (raiz)	Precipitação seguida de cromatografia de afinidade	Rabanete: 40,3 vezes. Nabo: 269,13 vezes.	Kalin <i>et al.</i> , 2014.
Castanha ( <i>Castanea molíssima</i> )	Precipitação	1ª purificação: 4,01 vezes; 2ª purificação: 9,52 vezes.	Gong <i>et al.</i> , 2015
Pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ) (folhas)		1ª purificação: 22,2 vezes; 2ª purificação: 24,1; 3ª purificação: 216 vezes.	Cai <i>et al.</i> , 2012.