

QUIMIOMETRIA COMO FERRAMENTA ANALITICA PARA DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO DA ENZIMA PEROXIDASE DE SOJA

Santos, M.C.¹, Tognolli, J.O.¹, Oliveira, O.M.M.F.^{1*}

¹UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, C.P. 355, 14800-010, Araraquara-SP, Brasil;

*autor para correspondência: Fone: +55=16-3301-6672. e-mail: olgamascarenhaso@gmail.com

Resumo: Enzimas Peroxidases são heme-proteínas encontradas nos diferentes organismos vivos, especialmente vegetais, apresentam importante papel fisiológico/bioquímico como proteção contra microorganismos invasores. A soja, um dos mais importantes produtos para o agronegócio brasileiro apresenta na casca de suas sementes (subproduto) alta atividade de peroxidase, denominada *soybean peroxidase*, com potencial de utilização em métodos analíticos clínicos. A proposta do trabalho foi aplicar o planejamento fatorial para otimização das condições extração da enzima, definição das condições ótimas de atividade (pH e temperatura), utilizando metodologia de superfície de resposta. Os dados obtidos com clara definição foram: i) extração em pó cetônico, ii) meio reacional: pH 3,3, volume da amostra contendo a enzima 330 μL - 340 μL , peróxido de hidrogênio 4,2 mmol.L^{-1} 150 μL , tempo de reação 20 segundos, temperatura 50° C, substrato guaiacol 30 mmol.L^{-1} 300 μL , e 0,1 mol.L^{-1} de NaCl. O uso da dessa metodologia para definição das condições de extração e estudos cinético-enzimáticos da peroxidase de soja foram eficientes e mais precisos, comparado a metodologia de variações/repetições (tentativa e erro).

Palavras-chave: peroxidase de soja; temperatura ótima; pH ótimo; extração; parâmetros cinéticos.

Introdução

A técnica quimiométrica, que usa regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), área multidisciplinar do conhecimento, envolve a matemática e a estatística na análise de dados obtidos em processos químicos, de natureza multivariada. Tal técnica visa o delineamento e a análise de experimentos, estudando e identificando as variáveis, denominadas variáveis latentes, analisando com as relações existentes entre os dados físico-químicos e o sistema em estudo, através de um planejamento fatorial e de superfície de resposta [1].

O planejamento experimental tem como objetivo reduzir o número de experimentos a serem realizados, sem prejuízo da confiabilidade dos resultados [1]. Maciel et al em 2007, concluíram que o

planejamento experimental é aplicável ao estudo da peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. apresentando resultados similares aos estudos convencionais [2]. Com o estudo das variáveis envolvendo adsorção e eluição de *Horseradish peroxidase* (HRP) e peroxidase de soja (SBP) pela cromatografia concanavalina A-Agarose, foi indicado que a melhor condição para peroxidase de soja foi pH 5,0 e 1m mol.L^{-1} $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ na ausência de sal [3]. Para o monitoramento da atividade da enzima HRP verificaram as condições experimentais ótimas de pH 5,0 [4]. Assis et al [5] estudando enzima de acerola definiram condições de ensaio da enzima pectina metilesterase (PME) de acerola, utilizando a metodologia de planejamento fatorial e a análise de superfície de resposta. Leite, et al [6], usando o planejamento fatorial definiram também as condições

reacionais de catálise da PME de goiaba [6]. Os dados da literatura indicam a importância e a eficiência do uso da técnica de planejamento fatorial para sistemas enzimáticos, o que poderia ser utilizado para estudos de extração e purificação de enzimas.

As peroxidases são enzimas classificadas como (doador: H_2O_2 oxidoreductase (EC 1.11.1.7) pertence a uma classe de proteínas que tem como função oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio com consumo de peróxido de hidrogênio ou oxigênio molecular, assim como receptor de elétrons em reações de oxidação [7]. Estas enzimas são encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados [8]. Peroxidase de soja (SBP) pertence à classe III da superfamília de peroxidase de plantas. Peroxidase de soja e a isoenzima HRP-C possuem grande similaridade em suas estruturas tridimensionais, com uma homologia seqüencial de 57% [9]. Suas características em comum incluem ferriprotoporfirina IX como grupo prostético e mecanismo de catalise.

Casca de semente de soja, considerada um subproduto do processamento de soja, pode ser importante fonte de peroxidase. A padronização de uma metodologia extrativa acessível desta enzima pode levar a um maior valor agregado das cascas. Associado a isso, com os estudos cinéticos de caracterização enzimática e de aplicação analítica, pode-se constatar se a SBP apresenta especificidade catalítica análoga à peroxidase HRP, o que poderá indicar potencial da SBP como fonte alternativa de peroxidase em substituição a HRP.

A considerável atenção biotecnológica pela peroxidase de soja (SBP) deve-se a sua alta estabilidade, e altas concentrações na casca do grão de soja [10]. Do ponto de vista tecnológico, as peroxidases em geral tem características interessantes que incluem alta estabilidade térmica, estabilidade ao pH, atuação em solventes orgânicos, e propriedades catalíticas bem definidas [11].

Para estudo de enzima deve-se estabelecer as condições de pH, temperatura, natureza do tampão, entre outros, parâmetros estes que afetam a velocidade de reação. Peroxidase de diferentes fontes foram estudadas e suas condições de ensaio bem estabelecidas. Para isso os estudos são realizados variando cada parâmetro, na forma de *tentativa e erro*, após muitas curvas cinéticas, até se ter as condições definidas. [2; 12-16]. A busca por uma metodologia que auxilie numa definição precisa dos parâmetros cinéticos para o estudo de enzima, minimizando o número de cinéticas e tempo, constitui o anseio de enzimologistas.

A proposta deste trabalho foi utilizar o planejamento fatorial e de superfície de resposta como ferramenta analítica para obter as condições ótimas do meio reacional da peroxidase de casca de soja (SBP), um subproduto do processamento industrial de grãos de soja brasileira.

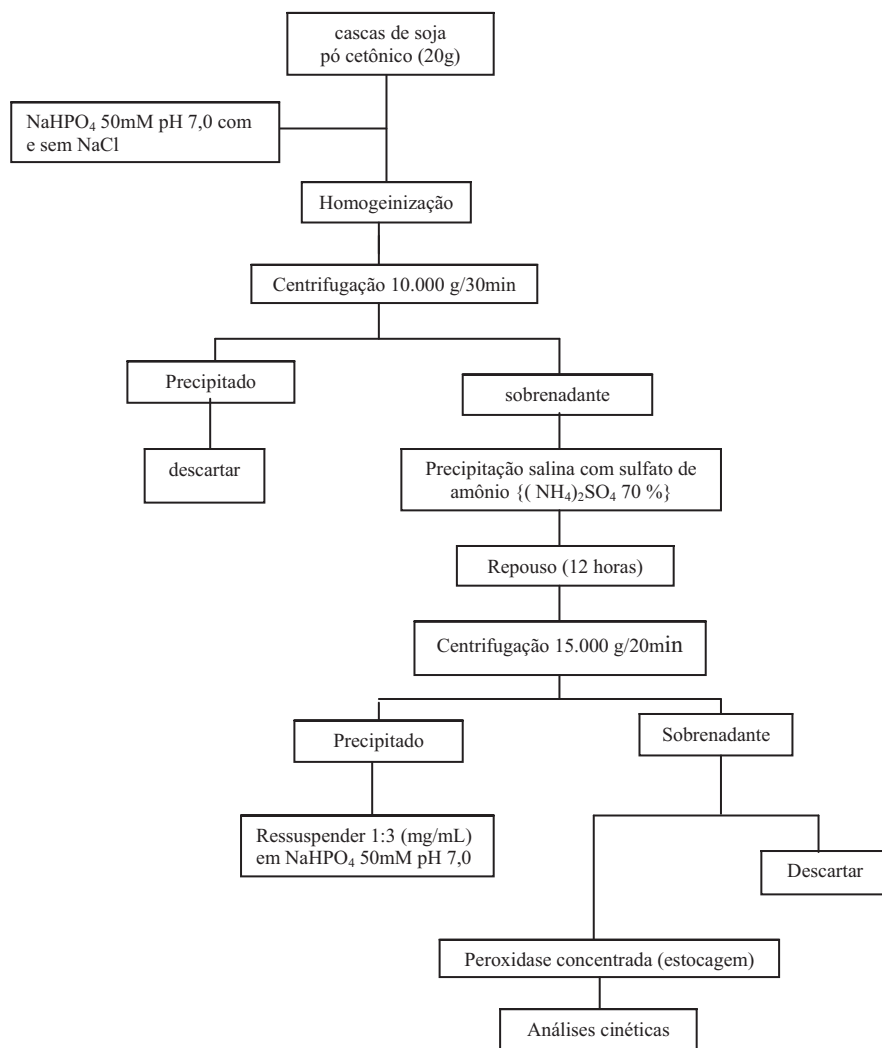
Materiais e Métodos

Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados em espectrofotômetro UV/VIS HP 8452, *diode array*, acoplado a um microcomputador HP – PC III.

Para obtenção do pó cetônico, estudos foram feitos com as cascas (tegumento) de soja fornecido pela UNISOJA, Unidade Auxiliar da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara-SP, que produz leite de soja e iogurte de soja para Prefeituras Municipais de Araraquara e região. Neste caso a soja é proveniente de diferentes fornecedores, e não tem soja transgênica. Com as amostras das cascas de soja foi obtido o pó cetônico da seguinte maneira: uma certa quantidade de tegumento de soja é congelada com nitrogênio líquido, triturada em almofariz até a obtenção de um pó, que em seguida deve ser lavado várias vezes com acetona a $-20^{\circ}C$ até que a última lavagem saia sem coloração. O pó cetônico de tegumento de soja obtido foi mantido sob congelamento para posterior estudos de extração da enzima peroxidase (SBP).

Para otimização da extração (esquema 1) e condições de ensaio da SBP foram realizados testes exploratórios para obtenção do pó cetônico e da otimização das condições de extração, através de planejamento experimental, utilizando metodologia de superfície de resposta, compreendendo-se o planejamento estatístico fatorial 2^7 , resultando 128 experimentos com três repetições. Os valores dos efeitos principais e de interação foram calculados empregando o programa estatístico MINITAB Statistical Software Release 13. Após determinar os parâmetros cinéticos qualitativamente, estabeleceu-se o planejamento estatístico utilizando a metodologia de superfície resposta.

Para extração da enzima SBP, partindo-se gramas de cascas de soja adicionou-se tampão extrator na razão de 1:5 (grama de cascas de soja/mL de tampão), na ausência e na presença de NaCl nas concentrações $0,1 mol.L^{-1}$; $0,03 mol.L^{-1}$, e $0,05 mol.L^{-1}$ de NaCl, com o objetivo de obter SBP na forma de extrato bruto concentrado, conforme esquema 1. A



Esquema 1. Procedimento para extração de peroxidase

saturação com sal de sulfato de amônio foi feita segundo o nomograma de Dixon [12]. O precipitado obtido contendo a enzima foi ressuspensão com o tampão extrator na razão de 1:3 (g de extrato/mL de tampão).

Para determinação da atividade de peroxidase, utilizou-se como meio de reação: 1218 μL de tampão fosfato-citrato de sódio 50mmol.L^{-1} pH 3,3; 300 μL de guaiacol (30mmol.L^{-1}); 332 μL amostra enzimática e 150 μL H_2O_2 ($4,2\text{mmol.L}^{-1}$). A reação foi seguida 470 nm, durante 20 segundos, a 50°C , no espectrofotômetro UV/VIS HP 8452, diode array,

acoplado a um microcomputador HP – PC III, utilizando como substrato o guaiacol [13, 14, 15].

Para determinação da Unidade de Atividade (U.A.) e da Atividade Específica (A.E.) definiu-se que uma unidade de atividade é a quantidade de enzima, que leva a uma variação de 0,010 de absorbância em um minuto, nas condições ótimas de ensaio. Com os dados de unidade de atividade e do conteúdo protéico total (mg/mL) das amostras, a atividade específica foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$A.E. = U.A. / MG \text{ proteína}$$

Para a determinação das condições ótimas de atividade (pH e temperatura) utilizou-se soluções tampão citrato-fosfato de sódio, com valores de pH entre 3,0 e 5,0; fosfato de sódio com valor de pH 7,0 e Glicina-NaOH com valor de pH 9,0.

Resultados e Discussão

A extração de SBP a partir do pó cetônico proporcionou uma maior atividade enzimática, ou seja, obtenção de maior quantidade de enzima ativa em relação à técnica de extração salina, partindo-se de cascas de soja congeladas.

A atividade da SBP em função da temperatura foi realizada entre 25° C e 40° C, partindo-se de dados da literatura onde indica que a temperatura ótima da SBP é 40° C (10).

Os estudos de otimização das condições de extração consistiram da verificação de alguns parâmetros na extração, tais como: concentração de NaCl, efeito do pH da solução tampão, obtenção do pó cetônico e temperatura. Cada extração realizada nos estudos de otimização se obteve a partir de uma relação massa:volume de 1g:3ml de tampão fosfato

de sódio 50mmol.L⁻¹ pH 7,0. Foi realizada também a extração clássica salina (sulfato de amônio 70%). Nos estudos preliminares observou-se que nas concentrações de sulfato de amônio entre 85 e 90% de saturação, atividade da peroxidase no sobrenadante diminuiu cerca de 85 % . A Tabela 1 relaciona os dados de Atividade Específica (AE) da SBP com as seguintes diluições.

Realizaram-se estudos com concentrações de NaCl tais como: 0,1 mol.L⁻¹; 0,03 mol.L⁻¹; 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl e sem NaCl. A concentração adotada como ideal foi 0,1 mol.L⁻¹ de NaCl.

Os experimentos cinéticos foram realizados, com os dados da velocidade inicial de reação, foram construídos os gráficos de superfície resposta (figura....), que forneceram as condições ótimas de: pH, temperatura, peróxido de hidrogênio, tempo, guaiacol, quantidade da enzima (extrato bruto) e concentração de NaCl.

No planejamento fatorial completo 2⁷ mostra os 7 fatores estudados com seus respectivos níveis +1 e -1, resultando 128 experimentos o qual fornecerá as condições ótimas para pH, temperatura, peróxido de hidrogênio, tempo, guaiacol, quantidade de enzima (extrato bruto) e concentração de NaCl (tabela 2).

Tabela 1. Relação entre AE da SBP, extrato com pó cetônico, e diluições da amostra.

Diluições	Atividade Específica	Unidade de Atividade	Proteína*
enzima : tampão	AE [#]	UA*	(mg/mL)
1:1	12,3	10,45	0,85
1:2	66,8	12,02	0,18
1:3	110,9	8,87	0,08

Tabela 2. Planejamento Fatorial Completo.

Fatores	Nível -1	Nível +1
pH	4	5
tempo	20segundos	40segundos
temperatura	30° C	40° C
guaiacol	100µL	300µL
NaCl	Sem	com
Peróxido	40µL	100µL
Volume da amostra (Enzima)	50µL	200µL

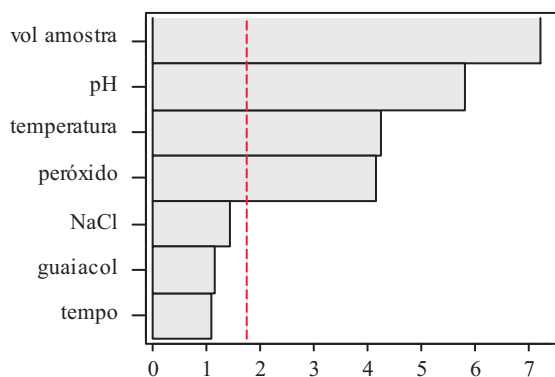


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos investigados.

No gráfico de Pareto (figura.1), pode-se observar os efeitos investigados. Aqueles que ultrapassaram a linha tracejada são significativos (enzima, pH, temperatura, e peróxido), enquanto que os fatores que não ultrapassaram a linha não são significativos (NaCl, guaiacol e tempo), portanto não influenciaram a atividade da enzima ao nível de significância de 95%.

A Figura 2 apresenta os efeitos principais (similar ao gráfico de Pareto) dos fatores acima apontados, na qual os segmentos de reta com maiores inclinações são mais significativos, enquanto que os segmentos de reta com menores inclinações são pouco significativos. Para cada fator também se pode observar no topo a indicação -1 e +1 (indicado os dois

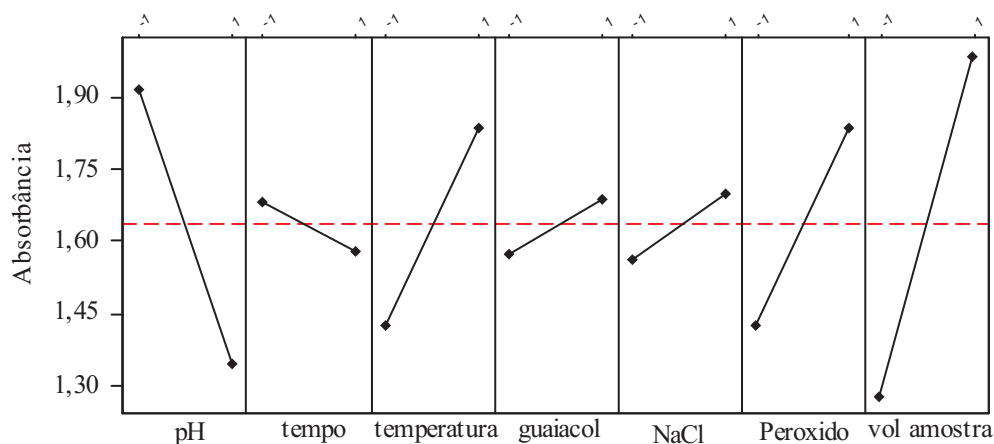


Figura 2. Efeitos principais para absorbância.

Tabela 3. Análise de variância para planejamento fatorial completo.

Fatores	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Blocos	2	0,1906	0,1906	0,09532	1,66	0,225
Efeitos principais	7	7,2535	7,2535	1,03621	18,05	0.000
Erro residual	14	0,8037	0,8037	0,05741		
Total	23	8,2478				

Limite de confiança 95%.

DF - grau de liberdade.

SS - soma dos quadrados entre os grupos (fatores) e a soma dos quadrados com grupos (erro).

MS - média dos quadrados (dividindo a soma dos quadrados pelo grau de liberdade).

F - F calculado dividindo o fator MS e pelo erro MS.

p - valor de $p < 0,05$.

níveis investigados) para avaliar qual o melhor nível para cada fator. Assim tem-se:

- pH => melhor no nível -1-> pH 4,0
- temperatura => melhor no nível +1-> 40° C
- peróxido => melhor no nível +1-> 100µL
- volume amostra => melhor no nível +1-> 200µL
- Quanto aos menos significativos:
- tempo => melhor no nível -1-> 20segundos
- guaiacol => melhor no nível +1-> 300µL
- NaCl => melhor no nível +1-> com NaCl (0,1 mol.L⁻¹)

A tabela 3 apresenta a análise de variância, onde são estudados os blocos e os efeitos principais, planejamento fatorial completo (ANOVA), mostrando o valor p para cada efeito, sendo que valores de p<0,05 os efeitos principais são significantes.

Após a obtenção dos dados, elaborou-se o planejamento fatorial completo - segunda etapa - para análise de superfície de resposta, ver Tabela 4.

Os dados da segunda etapa do planejamento demonstra que os 4 fatores investigados são

significantes (Figura 4). Fica evidente que o volume da amostra (fator D) é o mais significativo, seguido pelo pH (fator A), enquanto que o temperatura e peróxido (fatores B e C) apesar de serem significantes são os de menor importância entre os

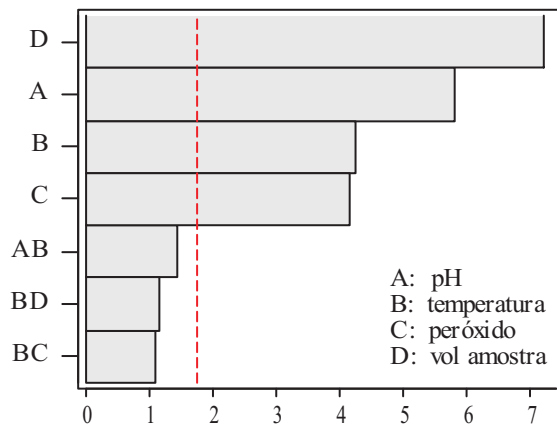


Figura 3. Gráfico de Pareto dos efeitos investigados.

Tabela 4. Planejamento Experimental.

Fatores	Nível-1	Nível+1
pH	3,5	4,5
temperatura	40° C	50° C
Peróxido	100µL	150µL
Volume da amostra (Enzima)	200µL	350µL

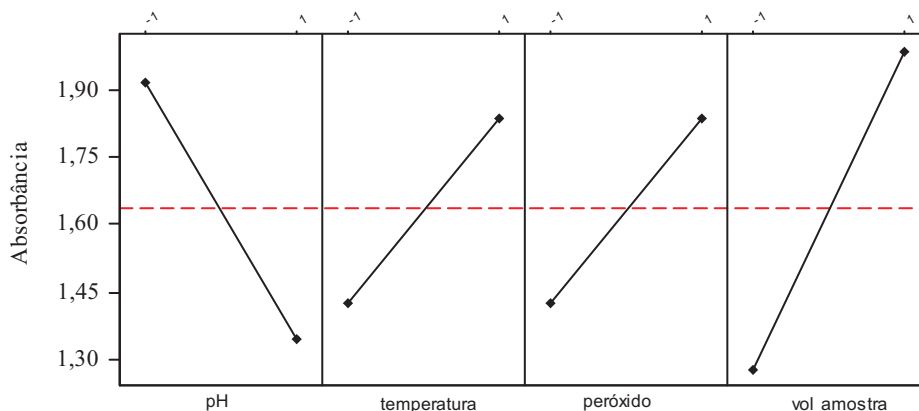


Figura 4. Efeitos principais para absorvância.

quatro fatores considerados e comportam-se de forma similar (Figura 3).

O gráfico dos efeitos principais para absorvância (Figura 4) demonstra (pelas inclinações dos segmentos de reta) que todos os fatores são importantes. As melhores condições obtidas para maiores leituras de absorvância são quando o pH está em -1; enquanto que a temperatura, peróxido e volume da amostra estão em +1.

O gráfico das interações entre os fatores investigados (Figura 5) as linhas tracejadas são para

o nível +1 e as contínuas para o nível -1. Quando os dois segmentos são paralelos ou quase paralelos entre si a interação entre os fatores envolvidos não existe ou é de pequena importância. Quando os segmentos se cruzam, a interação entre os fatores envolvidos existe.

Na Tabela 5 de análise de variância (ANOVA) pode-se ver o valor p para cada efeito, com base no qual foi determinado se o efeito é significativo ou não.

A análise de variância os efeitos principais estudados - pH, temperatura, peróxido e volume da

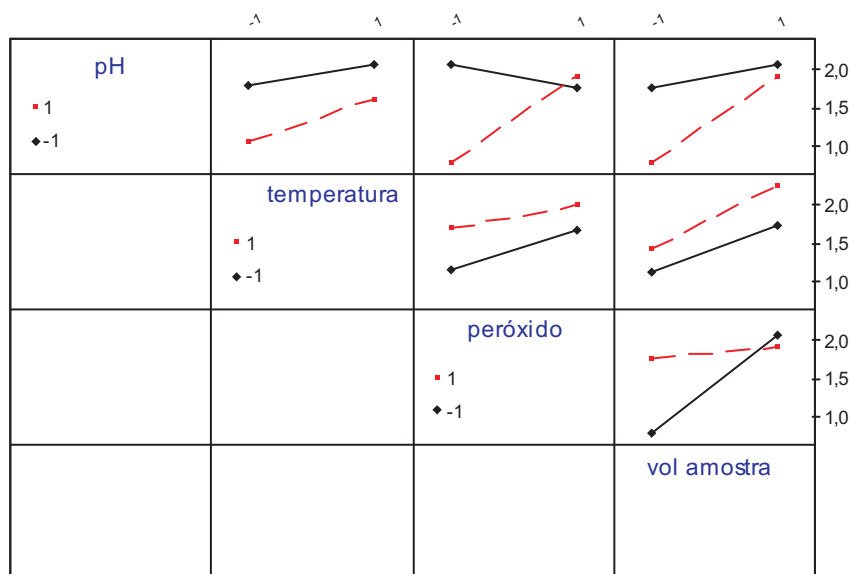


Figura 5. Interações entre os fatores investigados.

Tabela 5. Análise de variância para planejamento experimental (ANOVA).

Fatores	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocos	2	0,1906	0,1906	0,09532	1,66	0,225
Efeitos principais	4	6,9905	6,9905	1,74763	30,44	0,000
Interações	3	0,2629	0,2629	0,08764	1,53	0,251
Erro residual	14	0,8037	0,8037	0,05741		
Total	23	8,2478				

Limite de confiança 95 %.

DF - grau de liberdade.

SS - soma dos quadrados entre os grupos (fatores) e a soma dos quadrados com grupos (erro).

MS - média dos quadrados (dividindo a soma dos quadrados pelo grau de liberdade).

F - F calculado dividindo o fator MS e pelo erro MS.

P - valor de $p < 0,05$.

Tabela 6. Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais ótimos.

Fatores	Nível -1	Nível +1
Ph	3,5	
Tempo	20segundos	
Temperatura		50° C
Guaiacol		300µL
NaCl		Com
Peróxido		150µL
Volume da amostra (Enzima)		350µL

Tabela 7. Relação dos fatores investigados com os níveis experimentais para superfície de resposta e gráfico de contorno.

Valor de pH	Volume da amostra (µL)
3,0	279
3,5	300
2,8	350
4,0	400
4,2	421

amostra – apresentada na tabela 5, mostra valores de $p < 0,05$ (nível de significância adotado), onde se pode ver que os efeitos principais são significantes. Enquanto que os blocos e as interações - pH / temperatura, temperatura / volume da amostra e temperatura / peróxido - apresentaram valor de $p > 0,05$. Portanto, as interações não são significantes.

Em resumo pode-se dizer que a condição que apresenta atividade (absorbância) corresponde a que tem o pH em nível -1 e os demais fatores em nível +1 (Tabela 6).

Para finalizar, realizou-se outro estudo de superfície de resposta envolvendo novos ensaios

Tabela 8. Análise de variância para Contorno (ANOVA).

Fatores	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regressão	5	1,4031	1,4031	0,28061	2,62	0,121
Linear	2	0,2038	0,4530	0,22652	2,11	0,191
Quadrático	2	1,0144	1,0144	0,50720	4,73	0,050
Interação	1	0,1849	0,1849	0,18490	1,73	0,230
Erro Residual	7	0,7502	0,7502	0,10717	1,71	0,302
Lack-of-fit*	3	0,4217	0,4217	0,14056		
Repetições	4	0,3285	0,3285	0,08213		
Total	12	2,1533				

Limite de confiança 95 %.

DF - grau de liberdade.

SS - soma dos quadrados entre os grupos (fatores) e a soma dos quadrados com grupos (erro).

MS - média dos quadrados (dividindo a soma dos quadrados pelo grau de liberdade).

F - F calculado dividindo o fator MS e pelo erro MS.

P - valor de $p < 0,05$.

Lack-of-fit* este método identifica curvatura nos dados e interações entre os indicadores que podem afetar o ajuste do modelo. Sempre que os dados de subdivisão de p-valor é menor que o α -nível: curvatura possíveis na variável x (valor de $p = 0,006$).

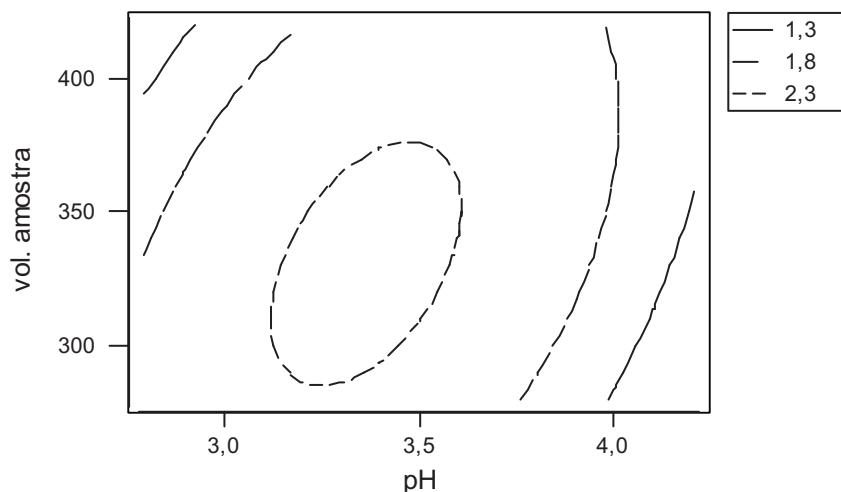
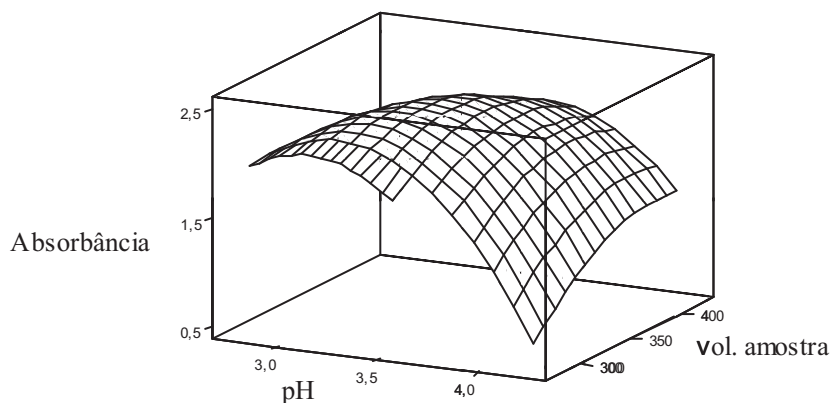


Figura 6. Gráficos de Contorno de Absorbância e de Superfície.



Equação da superfície de resposta:

$$\text{Absorbância} = -13,22 + 8,40 \text{ pH} + 0,0 \text{ volume amostra} - 1,75 (\text{pH})^2 - 0,0 (\text{volume amostra})^2 + 0,01 (\text{pH} + \text{volume amostra}).$$

Figura 7. Gráfico de Superfície da Absorbância.

com os dois principais fatores: pH e volume de amostra como pode ser verificado na Tabela 7. E, fez-se a análise de variância que apresentou valor de p (0,05) no efeito quadrático, observando-se o valor significativo (Tabela 8).

Pelos gráficos de contorno (Figura 6) e de superfície de resposta (Figura 7) pode-se obter as melhores condições experimentais para os dois fatores analisados (pH e volume de amostra). A

região de melhor reposta é observada de forma mais nítida pelo gráfico de contorno. Assim, as melhores condições estão dentro do elipsóide menor. Isto corresponde a pH entre 3,1 a 3,6 e volume de amostra de 290 μL a 380 μL , mas as melhores condições estariam no centro do elipsóide com $\text{pH}=3,3$ e volume de amostra de 330 μL a 340 μL .

A Tabela 9 apresenta os valores de p na análise de variância de superfície de resposta para cada efeito

Tabela 9. Análise de variância de superfície de resposta (ANOVA).

Fatores	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regressão	5	1,74509	1,74509	0,34902	4,85	0,031
Linear	2	0,20378	0,55860	0,27930	3,88	0,073
Quadrático	2	1,35641	1,35641	0,67820	9,42	0,010
Interação	1	0,18490	0,18490	0,18490	2,57	0,153
Erro Residual	7	0,50380	0,50380	0,07197		
Lack-of-fit*	3	0,42168	0,42168	0,14056	6,85	0,047
Repetições	4	0,08212	0,08212	0,02053		
Total	12	2,24889				

Limite de confiança 95 %.

DF - grau de liberdade.

SS - soma dos quadrados entre os grupos (fatores) e a soma dos quadrados com grupos (erro).

MS - média dos quadrados (dividindo a soma dos quadrados pelo grau de liberdade).

F – F calculado dividindo o fator MS e pelo erro MS.

P – valor de $p < 0,05$.

Lack-of-fit* este método identifica curvatura nos dados e interações entre os indicadores que podem afetar o ajuste do modelo. Sempre que os dados de subdivisão de p-valor é menor que o α -nível: curvatura possíveis na variável x (valor de $p = 0,006$).

estudado. Verificou-se que os efeitos como: Regressão, Quadrático e Lack-of-Fit apresentaram os valores de $p < 0,05$. Esses valores p apresentados foram significantes.

Conclusões

Pelos dados obtidos pode-se concluir que esse estudo também evidencia a grande utilidade de planejamento experimental, utilizando a metodologia de superfície resposta, para selecionar as melhores condições para peroxidase de soja (SBP). Assim, conclui-se que as melhores condições de ensaio com a SBP/Guaiacol/H₂O₂, são:

- pH 3,3;
- Volume da Amostra (Enzima) entre 330 μ L; a 340 μ L;
- Peróxido de hidrogênio (4,2 mmol.L⁻¹) 150 μ L;
- Tempo 20 segundos;
- Temperatura 50° C;
- Guaiacol (30mmol.L⁻¹) 300 μ L; e
- 0,1 mol.L⁻¹ de NaCl.

Após o estabelecimento dessas condições experimentais foi possível constatar que o rendimento obtido foi adequado para o estudo cinético enzimático de peroxidase de soja.

Santos, M.C. , Tognolli, J.O. , Oliveira, O.M.M.F. Chemometrics as analytical tool for definition of the conditions of assay of soybean peroxidase.

Abstract: Peroxidases enzymes are heme-proteins found in the different organisms living creature, especially vegetal, present in important physiological paper/biochemist as protection against microorganisms. The soy, one of the most important products for the Brazilian agribusiness, presents in the rind of its seeds (by-product) where has high activity of peroxidase, called *soybean peroxidase*, with potential of use in clinical analytical methods. The proposal of the work was to apply the factorial planning for optimization of the conditions extraction of this enzyme, definition of the conditions of kinetic-enzyme assay conditions (pH and temperature), using methodology of reply surface. The data obtained: i) extraction in cetonico power, ii) reactional medium: pH 3,3, volume of the sample contend enzyme 330 μL - 340 μL , hydrogen peroxide 4,2 mmol.L^{-1} 150 μL , time of reaction 20 seconds, temperature 50° C, substrate guaiacol 30 mmol.L^{-1} 300 μL , and 0.1 mol.L^{-1} of NaCl. This chemometric methodology used to definition of the extraction conditions and parameters kinetic assay of soybean peroxidase was very efficient, compared the classical methodology of variations/repetitions (attempt and error).

keywords: soybean peroxidase; optimum temperature; optimum pH; enzyme extraction; kinetic parameters

Referências

- [1] Marco Flôres Ferrão, Claudia Wollmann Carvalho, Edson Irineu Müller, Celso Ulysses Davanzo. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(3): 333-340, jul.-set. 2004.
- [2] H. P. F. Maciel, C. M. C P. Gouvêa, G. M. Pastore, *Ciências Tecnologia Alimentos*. 27 (2007) 225.
- [3] M. V. Miranda, M. L. Magri, A. A. Navarro del Canizo, O. Cascone, *Process Biochemistry*. 38 (2002) 543.
- [4] C. V. Uliana, C. S. Riccardi, H. Yamanaka, *Eclética Química*. 33 (2008) 62.
- [5] Assis et all
- [6] Leite...2007,....
- [7] R. A. Vierling, J. R.; Wilcox, *Seed Science & Technology*. 24 (1996) 494.
- [8] J. H. Dawson, *Science*. 240 (1988) 439.
- [9] A. Henriksen, O. Mirza, C. Indiani, K. Teilum, G. Smulevich, K. G. Welinder, M. Gajhede, *Protein Science*. 10 (2001) 115.
- [10] M. A. Gijzen, *The Plant Journal*. 12 (1997) 998.
- [11] L. Z. Munir, J. S. Dordick, *Enzyme Microbiology Technology*. 26 (2000) 341
- [12] H. Wright, Nicell, A, *Bioresource Technology*. 70 (1999) 79.
- [13] T. Suzuki, Y. Honda, Y. Mukasa, S-ju. Kim, *Phytochemistry*. 67 (2006) 224.
- [14] C. L. Zanatta, M. F. Zotarelli, E. Clemente, *Ciências Tecnologia Alimentos*. 26 (2006) 708.
- [15] M. Dixon, E.L. Webb, Academic Press. (1979) 47.
- [16] K. K. Makinen, J. Tenovuo, *Analytical Biochemistry*. 126 (1982) 108.
- [17] I. G. Gazarian, L. Lagrimini, *Phytochemistry*. 41 (1996) 1034.
- [18] N. M. Khalil, *Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP-Araraquara* (2002).
- [19] A. E. Zeraik, F. S. Souza, Fatibello-Filho, O, *Química Nova*. 31 (2008) 734.

