

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Samuel Henrique Pereira Fonseca

Purificação e caracterização parcial de enzimas de peroxidase em raízes de *Raphanus sativus*

Uberlândia

2021

Samuel Henrique Pereira Fonseca

Purificação parcial e caracterização de enzimas de peroxidase em raízes de *Raphanus sativus*

Projeto apresentado ao Instituto de Biologia do
Curso de graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Jair Pereira da Cunha Júnior

Uberlândia

2021

RESUMO

As peroxidases são enzimas essenciais para o metabolismo do peróxido de hidrogênio e sinalização celular, além de oxidorreduções ubíquas, presentes em todos os reinos da biologia. As enzimas peroxidases que o grupo heme pertencem a 4 grandes superfamílias de proteínas, denominadas de superfamília das peroxidases-catalases que evoluíram independentemente, superfamília das peroxidases-ciclooxigenases, superfamília das peroxidases-clorito dismutases e a superfamília peroxidases-peroxygenases. A HRP peroxidase (Horseradish peroxidase) ou isoenzimas peroxidase de rábano (*Armoracea rusticana*), é uma isoenzima vegetal pertencente à classe III (peroxidases de plantas secretoras clássicas) da superfamília de peroxidase catalase que é amplamente purificada e caracterizada bioquimicamente. Este grupo de enzimas pode ser utilizado biotecnologicamente em vários processos que incluem descolorizar corantes, análises laboratoriais e produção de medicamentos. Assim na presente monografia, frações enriquecidas da isoenzima peroxidase obtidas a partir de raízes de *Raphanus sativus* foi purificada e caracterizada parcialmente. Os resultados obtidos demonstram que foi possível produzir uma fração enriquecida em atividade peroxidase (S3) a partir de passos de centrifugação e precipitação por acetona. A fração S3 obtida foi enriquecida em uma banda polipeptídica e apresentou intensa atividade enzimática de peroxidase. Essa atividade enzimática descrita foi inibida na presença de íons K^+ e Zn^{++} e foi estimulada na presença de íons NH_4^+ e Cu^{++} , se mantendo inalterada na presença de Ca^+ e Na^+ . Portanto nesse trabalho monográfico descrevemos a produção de uma fração enriquecida em atividade peroxidase que poderá ser uma alternativa viável a ser utilizada como fonte enzimática para uso laboratorial de forma semelhante à peroxidases isoladas de outros exemplares vegetais. Esta abordagem poderá fornecer conhecimentos para a produção e isolamento de enzimas de peroxidases com potencial aplicação biotecnológica a partir de novas fontes vegetais cultiváveis em condições tropicais.

ABSTRACT

Peroxidases are essential enzymes for the metabolism of hydrogen peroxide and cell signaling, in addition to ubiquitous oxidoreductases, present in all kingdoms of biology. The peroxidase enzymes that contain the heme group belong to 4 large protein superfamilies, called the peroxidase-catalase superfamily that evolved independently, the peroxidase-cyclooxygenase superfamily, the peroxidase-chlorite dismutases superfamily and the peroxidase-peroxygenase superfamily. The HRP peroxidase (Horseradish peroxidase) or horseradish peroxidase isoenzymes (*Armoracea rusticana*), is a plant isoenzyme belonging to class III (classic secretory plant peroxidases) of the peroxidase catalase superfamily that is widely purified and biochemically characterized. This group of enzymes can be used biotechnologically in several processes that include decolorizing dyes, laboratory analysis and drug production. Thus, in the present monograph, fractions enriched in the peroxidase isoenzyme obtained from *Raphanus sativus* roots were purified and partially characterized. The results obtained demonstrate that it was possible to produce a fraction enriched in peroxidase activity (S3) from steps of centrifugation and precipitation by acetone. The S3 fraction obtained was enriched in a polypeptide band and showed intense enzymatic activity of peroxidase. The peroxidase enzymatic activity was inhibited in the presence of K^+ and Zn^{++} ions and was stimulated in the presence of NH_4^+ and Cu^{++} ions, remaining unchanged in the presence of Ca^+ and Na^+ . Therefore, in this monographic work we describe the production of a peroxidase activity-enriched fraction that could be a viable alternative as an enzymatic source for laboratory use similarly peroxidases isolated from other plant specimens. This approach may provide knowledge for the production and isolation of peroxidase enzymes with potential biotechnological application from new plant sources cultivable in tropical conditions.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Enzimas peroxidases	4
1.2. Enzimas peroxidases em plantas.	8
1.3 Aplicações e estudos acerca de peroxidase em biotecnologia.	10
2. HIPÓTESES	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Materiais	13
4.2. Extração de enzimas	14
4.3. Precipitação por Acetona [C ₃ H ₆ O].....	14
4.4. Dosagem de proteínas.....	14
4.5. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS–PAGE).....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
REFERENCES	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas peroxidases

Há diversas enzimas que desempenham uma gama de funções garantindo o funcionamento do complexo aparato biológico dos seres vivos. Um grupo de enzimas em específico, as peroxidases estão presentes nas mais variadas espécies incluindo plantas, animais, fungos, bactérias e protozoários. Estes grupos de enzimas apresentam uma variedade de forma que estão presentes em diferentes compartimentos subcelulares e até mesmo em diferentes tipos de tecidos em metazoários. (HAMED et al., 1998)

A descoberta dessas enzimas remonta até o século XIX. Sendo a primeira reação catalisada por peroxidase de rábano registrada por Louis Antoine Planché em um estudo sobre resina de “jalap” importada da França para uso medicinal. Foi realizada uma série de testes para determinar se certa remessa particular fora adulterada com resina “gaiac” (guaiacum). Planché então pode observar que a resina de gaiac apresentava um distinto tom azulado ao entrar em contato com raízes de rábano. Esta reação se deu pela peroxidase contida nas raízes que ao catalisar a oxidação do 2,5-di- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -3,4-dimetilfurano (um constituinte em menor quantidade na resina, também conhecido na literatura como ácido α -guaiacônico) resultou em bis-metilenoquinona, uma substância de tom azulada conhecida como “guaiacum blue”. (VEITCH, 2004).

O termo “peroxidase” foi empregado apenas ao final do século XIX através do trabalho de Robert Chodat (1865–1934) e Alexei Nikolaevich Bach (1857–1946) na Universidade de Genebra. No início do século XX, pesquisas acerca da peroxidase da raiz de rábano e outras fontes vegetais tiveram um impulso, o que levou ao estudo mais aprofundado desse grupo de izoenzimas (VEITCH, 2004). As observações decorrentes destes estudos levaram a um vigoroso debate sobre a natureza das oxidases e peroxidases que posteriormente foi registrado em um livro de David Keilin (1887- 1963), Keilin também foi um importante contribuinte para o campo de pesquisa sobre peroxidase (KEILIN 1966). Apesar dos estudos de Bach e Chordat permitirem uma preparação de peroxidase de rábano, a enzima pura só foi isolada posteriormente por Richard Willstätter e Hugo Theorell. Entre 1920 e 1945 novos avanços no campo de pesquisa foram feitos, incluindo a demonstração de diferentes isoformas

das peroxidases (isoenzimas), a presença do grupo heme e de carboidratos como componentes da peroxidase de rábano, a primeira observação dos intermediários catalíticos conhecidos como compostos I e II e a primeira análise cinética da reação com peróxido de hidrogênio. (VEITCH, 2004).

Heme peroxidases e catalases são enzimas essenciais para o metabolismo do peróxido de hidrogênio e sinalização, além de oxidoredutases ubíquas, presentes em todos os reinos da vida. (ZÁMOCKÝ et al., 2014). As heme peroxidases catalisam a oxidação de um ou dois doadores de elétrons pelo peróxido de hidrogênio. Existe uma grande variabilidade em relação à natureza de um doador de elétrons, variando de cátions metálicos, compostos alifáticos ou aromáticos e proteínas. Normalmente, doadores de dois elétrons podem ser haletos (como Cl^- , Br^- ou I^-) ou tiocianato (SCN^-) que são oxidados em conforme os ácidos hipoácidos correspondentes (HOX). Apenas algumas subfamílias heme peroxidase são capazes de dismutar o peróxido de hidrogênio na ausência de doadores de elétrons como típica catalases (monofuncional). Vale observar que, o mecanismo de dismutação do peróxido de hidrogênio por essas peroxidases se difere de heme catalases típicas e, portanto, deve ser designado como pseudo catalático.

As enzimas peroxidases contendo o grupo heme pertencem a 4 grandes superfamílias de proteínas, denominadas de superfamília das peroxidases-catalases que evoluíram independentemente, superfamília das peroxidases-ciclooxigenases, superfamília das peroxidases-clorito dismutases e a superfamília peroxidases-peroxygenases (ZÁMOCKÝ et al., 2015).

A superfamília peroxidase-catalase é de fato a superfamília de peroxidase mais abundante e presente nos mais diversos bancos de dados de genes e proteínas dos seres vivos. Representantes desta superfamília se fazem presentes não apenas nos domínios de Bacteria, Archaea, reinos eucarióticos de Fungi e Plantae, mas também em numerosas espécies de protozoários e algas (Chromistas) sendo encontradas também dentro do reino Animália. Em 1992, Welinder reconheceu a relação filogenética e estrutural entre heme peroxidases de plantas, fungos e bactérias. Nos anos subsequentes, as denominações de “superfamília de peroxidase tipo planta” ou “superfamília de heme peroxidases de plantas, fungos e bactérias” ou “Superfamília de heme peroxidase não animal” passaram a serem usadas na literatura. Nesse ínterim, vários outros representantes dos reinos de Archaea, Fungi, Protista e Plantae, até mesmo em alguns representantes do grupo dos Metazoa (animais multicelulares). Assim esta superfamília representa um excelente exemplo para demonstrar a evolução divergente de

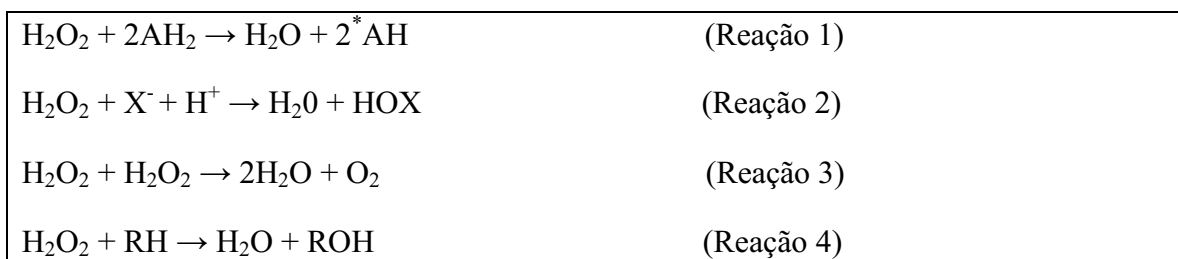
um gene de preoxidase que ao longo de sua história evolutiva adquiriu diversas funções em diferentes genomas (ZÁMOCKY et al., 2015). Nesse grupo é possível distinguir três classes diferentes (Classe I, II e III) dos quais muitos dados físicos e bioquímicos foram coletados em estudos nas últimas décadas. A classe I desta superfamília compreende sequências de várias catalase-peroxidases, ascorbato peroxidases, citocromo c peroxidases e também subfamílias de tipo híbrido de descobertas recentes. A classe II é constituída principalmente por manganês-peroxidases, lignina-ligninas peroxidases e peroxidases versáteis de fungos que participam da degradação de lignina. Fazem parte deste grupo numerosas novas sequências heme peroxidase de fungos, que são incapazes de degradar madeira. Por último, a Classe III é formada por grandes famílias multigênicas de peroxidases secretoras de plantas, incluindo as bem conhecidas peroxidase de rábano [Horseradish peroxidase – HRP] (ZÁMOCKY et al., 2015)

Os membros da superfamília peroxidase-ciclooxigenase são amplamente distribuídos entre todos os grupos de seres vivos. Sua antiga denominação de “animal peroxidases dependentes de heme” se tornou obsoleta uma vez que foi observado que outros grupos de outras espécies não pertencentes ao reino animalia também expressam peroxidase-ciclooxigenase (ZÁMOCKY et al., 2014). Em contraste com a superfamília da peroxidase-catalase, que apresentam uma única cadeia polipeptídica ligada ao grupo heme, os membros da superfamília peroxidase-ciclooxigenase na maioria dos casos são proteínas de múltiplas cadeias e domínios, com um domínio heme peroxidase predominantemente α -helicoidal e com um núcleo central contendo heme de cinco α -hélices. Além disso, esta superfamília se destaca pela presença do grupo protético heme modificado por mecanismos de pós-tradução (ZÁMOCKY et al., 2014). A heme é ligada covalentemente à proteína por meio de duas ligações éster formada por resíduos conservados de ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu). Os representantes deste grupo enzimático catalisam ambas as reações do tipo 1 e 2 (figura 01) mas pelo o que foi observado em estudos, a maioria dos membros tem a atividade enzimática fisiológica dominante por oxidação de haleto. Um dos representantes dessa superfamília, a mieloperoxidase possui um terceiro heme ligado à proteína. Como consequência dessas modificações, a heme é distorcida e essas peroxidases exibem um único espectro e propriedades redoxes. Todos os representantes desse grupo possuem a capacidade de catálise de ambas as Reações 1 e 2 mas com a maioria dos membros estudados até agora, a oxidação de haleto demonstra ser a atividade enzimática fisiológica dominante (ZÁMOCKY et al., 2014).

A superfamília peroxidase-clorito dismutase originalmente descrita por (GOBLIRSCH et al., 2011) reuniu sequências de três famílias de proteínas distintas que compartilhavam uma dobra em comum e possivelmente desempenhavam funções essenciais com relação ao metabolismo dependente de ferro. Esta nova superfamília foi definida com base em uma estrutura comum de ligação ao grupo heme denominadas em clorito dismutase e também identificadas em sequências evolutivas intermediárias (deferroquelatase / peroxidases e proteínas semelhantes a Cld) previamente descritas. Esta superfamília originalmente era designada como superfamília CDE (clorito dismutase-DyP-EfeB). Uma atualização da filogenia demonstrou que o EfeB pertence aos DyPs. No local distal do grupo heme DyPs, as peroxidases de descoloração de corantes e os ClDs mostram uma arginina completamente conservada, além disso, possui um aspartato catalítico, enquanto em proteínas Cld-like há uma escassez de ambos os resíduos. Nos membros da superfamília peroxidase-clorito dismutase o ligante proximal é sempre uma histidina, que em ClDs é hidrogênio ligado a um glutamato, em DyPs é ligado a um aspartato (ZÁMOCKY et al., 2014).

A superfamília peroxidase peroxygenase se destaca, pela capacidade de seus membros em incorporar peróxidos derivados de oxigênio em moléculas de substrato de forma eficiente (também realizando a atividade peroxidática típica). Além disso, o ligante proximal do grupo heme dessa superfamília é a cisteína ao invés do aminoácido histidina. Na última década outros membros desta superfamília foram descobertos e caracterizados, demonstrando que estas oxidoredutases se diferem de todas as heme peroxidases conhecidas, portanto são híbridos funcionais entre uma heme peroxidase “clássica” e uma P450-monooxygenase. Essas metaloproteínas são versáteis enzimas secretadas e altamente glicosiladas capazes de catalisar a oxidação de heteroátomos orgânicos e haletos inorgânicos, oxidações de um elétron e também hidroxilações, epoxidações e desalquilações. Por isso o emprego do termo peroxidase peroxygenase ao se referir a esta superfamília. Atualmente esta é a menor superfamília dentre as heme peroxidases, no entanto, uma considerável parte da extensão filogenética desse grupo ainda está por ser descoberta. Por agora não é possível definir ainda os subgrupos dessa superfamília, sendo que a atual reconstrução filogenética compreende apenas a divisão em clados principais deste grupo enzimático. Na atualidade foi reconstruída uma filogenia parcial para grupos de sequências isoladas de fungos basidiomicetos (*Fungi*). (ZÁMOCKY et al., 2014).

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis tipos de reações bioquímicas envolvendo os grupos de enzimas de peroxidases.



Fonte: O próprio autor.

1.2. Enzimas peroxidases em plantas.

Em plantas as enzimas peroxidases podem ser divididas em duas classes de heme peroxidases, sendo as I- peroxidases intracelulares relacionadas com peroxidases bacterianas (classe I) (JESPERSEN et al. 1997) e as II- peroxidases direcionadas à via secretora (classe III). A HRP peroxidase (Horseradish peroxidase) ou isoenzimas peroxidase de rábano, é uma isoenzima vegetal pertencente à classe III (peroxidases de plantas secretoras clássicas) da superfamília de peroxidase catalase, superfamília que também inclui peroxidases de origem bacteriana, fúngica e vegetal, segundo (VEITCH, 2004). As demais classes, que compreendem o citocromo C peroxidase de levedura, peroxidases bacterianas duplicadas e ascorbato peroxidases (classe I) além de peroxidases fúngicas (classe II). (VEITCH, 2004). Esta classificação foi originalmente construída usando comparações de sequência de aminoácidos como base, esta também é apoiada pelos dados estruturais tridimensionais obtidos para as enzimas de cada uma das classes testadas.

Na forma estrutural dessas isoenzimas, exemplos como a do HRP C e de outras peroxidases de planta de classe III se destacam pela presença de três α -hélices que são acrescentadas a dobra de peroxidase central (GAJHEDE et al., 1997). A ligação de dissulfeto de Cys177 para Cys209 mantém a integridade geral da estrutura nesta região específica. No caso do HRP C são os resíduos localizados na hélice F0 que se envolve no substrato de acesso e vinculação. É especulado por alguns autores que esta região estrutural possui grande

importância para a estabilização ou retenção de espécies radicais produzidas em reações de catálise por peroxidases vegetais (GAJHEDE et al., 1997).

A HRP C pode também ser considerada uma enzima protótipo das peroxidases, sendo a mais extensivamente estudada nas últimas décadas. Uma das propriedades desta enzima é seu mecanismo catalítico (SMITH ; VEITCH, 1998) que envolve a redução do peróxido de hidrogênio em água seguido pela oxidação subsequente de pequenas moléculas como as de hidrogênio aromáticos doadores. (DUROUX, WELINDER, 2003)

As plantas também fazem uso de enzimas como ascorbato peroxidase (classe I), a qual permite a regulação dos níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002; SHIGEOKA et al., 2002). Apesar do conhecimento limitado acerca das peroxidases ascorbato em raízes de rábano, estudos recentes sugerem que o acúmulo de H₂O₂ em plantas de *Arabidopsis thaliana* ocorre em indivíduos deficientes em ascorbato peroxidase citosólica (Apx1) (PNUELI et al., 2003). É notável que nocautes para o gene Apx1, que ocorre em plantas, induzem codificação de transcritos para duas outras peroxidases de classe III de vegetais, presumivelmente para compensar a redução da habilidade de neutralizar peróxidos mediada por ApX1 (VEITCH, 2004).

A detecção de produtos catalíticos formados por reações de HRP podem ser tidos como indicação de possíveis funções em vitro nas plantas. O que pode envolver reações ligação cruzada (“*cross-linking*”), como a formação de ligações diferulatos em polímeros de polissacarídeos vegetais ou pectinas, a formação de ligações de ditrosina, a reticulação de monômeros fenólicos na formação de suberina e o acoplamento oxidativo de compostos fenólicos como parte da biossíntese de lignina (VEITCH, 2004). Peroxidases que catalisam reações de reticulação podem ser expressas em resposta a fatores externos, como ferimentos no tecido vegetal. Perda de água e invasão por patógenos, portanto, pode ser limitada pela formação de uma barreira polimérica protetora, como suberina. Ainda assim não foram determinados os papéis in vivo para isoenzimas HRP, o que se pode afirmar é que a atividade peroxidase é induzida em resposta a ferimentos nas folhas de rábano. (KAWAOKA et al., 1994)

No trabalho de Veitch (2004) cerca de quinze isoenzimas de peroxidase foram isoladas de raízes de rábano por meio do método de purificação de proteína clássica, tendo sido classificadas por códigos baseados em seu valor de ponto isoeletrico, exemplos como HRP A1-A3 (ácido), B1-B3 e C1-C2 (neutro ou neutro-básico) e D e E1-E6 (básico). Um número ainda maior de isoformas peroxidase puderam ser detectadas através de metodologia de

focalização isoeletrica, no entanto, sua identificação se mostrou controversa, pois algumas formas proteicas talvez tenham sido detectadas por vieses metodológicos na detecção de moléculas modificadas por desamidação e/ou reticulação outros grupos químicos de vegetais. Por outro lado, as sequências de aminoácidos determinadas para as proteínas HRP A2 e E5, mostram apenas 54 e 70% identidade com HRP C, respectivamente, indicando a evidência da existência de isoenzimas de peroxidase distintas em raiz de rábano (VEITCH, 2004).

É notável que peroxidase extraída das raízes de rábano seja a mais utilizada comercialmente. Ainda assim existe uma variedade de peroxidases isoladas de diferentes espécies de plantas, fontes animais, fúngicas e bacterianas. A bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, expressa uma única heme peroxidase intracelular tendo uma dupla atividade de catalase-peroxidase. A espécie *Arabidopsis thaliana* que pertence a mesma família que o rábano também possui hme peroxidase de classe III (WELINDER et al., 2002)

1.3 Aplicações e estudos acerca de peroxidase em biotecnologia.

A peroxidase de rábano é comumente utilizada como um reagente para síntese orgânica e biotransformação, especificamente a peroxidase HRP C essa enzima é a mais utilizada em laboratório, também em ensaios de enzimas acopladas, ensaios quimioluminescentes, imunoenaios e no tratamento de águas residuais. Por meio de aprimoramentos da enzima, exemplos como sua estabilidade relativamente boa em sistemas solventes aquosos e não aquosos são resultados desejáveis se tratando de estudos de evolução dirigida a mutagêneses específicas. Entre as aplicações de HRP C na síntese de produtos orgânicos de pequena escala inclui a N- e O-desalquilação, acoplamento oxidativo, hidroxilação seletiva e reações que envolvam a transferência de oxigênio. A mutagênese dirigida nas regiões de HRP C em Phe41 e His42 vem sendo usadas para melhorar a enantiosseletividade de oxidações de arilmetilsulfeto. Entre os exemplos do uso de HRP C em síntese natural de produto ou biotransformação a peroxidase catalisada pelo acoplamento oxidativo de metil-(E)-sinapato com o modelo composto de siringil lignina, 1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) etanol resultou em uma nova espirociclohexadienona junto a um produto secundário de dimerização. (VEITCH 2004). O acoplamento de catarantina e vindoline para produzir α -3',4'-anhydrovinblastine é uma reação catalisada por HRP C, sendo assim um potencial interesse como uma etapa semissintética na produção de drogas anticâncer vinblastina e vincristina a partir de *Catharanthus Roseus* (vinca-de-gato) (SOTTOMAYOR et

al., 1997). No tocante de processos de análise laboratorial, a reprodutibilidade e sensibilidade de uma ELISA dependem principalmente do tipo de enzima designada e a técnica de conjugação usada para o acoplamento de anticorpos ou antígenos. A peroxidase de rábano e fosfatase alcalina são as duas enzimas mais comumente utilizadas dentre a variedade de enzimas disponíveis comercialmente. (BEYZAVI et al., 1987). A disponibilidade de raízes de rábano por vezes dificulta a obtenção da enzima, especialmente em áreas tropicais. (COURTER, RHODES; 1968) Assim é pertinente à busca por alternativas viáveis para a extração de peroxidase para uso laboratorial e biotecnológico.

As espécies de rabanete (*Raphanus sativus*) contém duas isoenzimas de peroxidase principais. Estas ambas peroxidases possuem propriedades físico-químicas e catalíticas idênticas enquanto que as propriedades moleculares em ambas as enzimas diferem parcialmente entre si. Estas possuem uma estabilidade elevada em uma ampla faixa de pH. Estudos sobre a especificidade do substrato demonstram que ambas as peroxidases oxidam uma ampla variedade de substratos fenólicos (DIAO et al., 2018).

Nesse trabalho monográfico descrevemos a produção de uma fração enriquecida em atividade peroxidase derivada de *Raphanus sativus* que poderá ser uma alternativa viável a ser utilizada como fonte enzimática para uso laboratorial de forma semelhante à peroxidases isoladas de outros exemplares vegetais. Esta abordagem poderá fornecer conhecimentos para a produção e isolamento de enzimas de peroxidases com potencial aplicação biotecnológica a partir de novas fontes vegetais cultiváveis em condições tropicais.

2. HIPÓTESES

Diante do exposto temos as seguintes hipóteses a serem investigada neste trabalho monográfico

- H0 – Espécies de *Raphanus sativus* expressam enzimas peroxidases que não podem ser isoladas utilizando metodologia de fracionamento, em razão da composição e natureza química destas enzimas presentes nestas espécies vegetais.
- H1 – Espécies de *Raphanus sativus* expressam enzimas peroxidases que podem ser isoladas utilizando metodologia de fracionamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Purificar parcialmente e caracterizar frações enriquecidas na enzima peroxidase obtidas de raízes de *Raphanus sativus*.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar parcialmente frações enriquecidas de enzima peroxidase obtidas por precipitação com acetona a partir de raízes de *Raphanus sativus*.
- Dosar o conteúdo proteico das frações enriquecidas em enzimas de peroxidase por meio do método de Bradford.
- Determinar a atividade especificada peroxidase obtido nas frações enriquecidas nestas enzimas
- Avaliar o efeito de íons (sódio, potássio, cálcio, amônio, zinco e cobre) na atividade específica nas frações enriquecidas em atividade enzimática de peroxidase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Raízes de rabanete *Raphanus sativus* foram adquiridas de um mercado local. Entre os reagentes, fosfato de sódio padrão analítico (P.A), Acetona, citrato de sódio, fosfato de sódio P.A, cloreto de sódio P.A, ortofenilenodiamina (OPD), coomassie brilliant blue G-50 P.A, ácido orto-fosfórico P.A, etanol P.A, Trizma base P.A, Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) P.A, glicerol P.A e Dodecil sulfato de sódio (SDS) P.A, β -mercaptoetanol (β ME) P.A. Cloreto de Sódio (NaCl) P.A, Cloreto de Potássio (KCl) P.A, Cloreto de Amônia

(NH₄Cl) P.A, Cloreto de Cálcio (CaCl) P.A, Sulfato de Cobre (CuSO₄) P.A e Sulfato de Zinco (ZnSO₄) P.A.

4.2.Extração de enzimas

Raízes de rabanete *Raphanus sativus* foram adquiridas de um mercado local e mantidas em freezer -20° C até o momento da purificação. Os 25g de raízes foram cortadas em pedaços. Os pedaços de raízes foram diluídos em 100 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e em seguida foram homogeneizados por 5 minutos em liquidificador. O homogeneizado foi coletado e submetido à filtração em filtro de prolipropileno. A fração filtrada foi denominada de “extrato bruto” e a seguir foi submetido a centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após esse processo, duas frações foram obtidas, sendo uma o sobrenadante do soluto (S1) e fração precipitada (P1). O sobrenadante S1 resultante da centrifugação, rico em enzimas, fora submetido à precipitação por acetona. (HAMED, MAHAREM, et al.; 1997).

4.3. Precipitação por Acetona [C₃H₆O]

O sobrenadante S1 resultante da centrifugação, rico em enzimas, foi submetido à precipitação pela adição lenta de 58,5 ml de acetona 65%. As proteínas foram precipitadas por 30 minutos na geladeira (8° C). Terminado este tempo a fração S1 tratada com acetona foi novamente centrifugada a 5.000 x g por 15 minutos. As frações resultantes desse processo foram o sobrenadante (S2) e o precipitado rico em enzimas peroxidases (P2). A fração P2 foi ressuspendida em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0. Por fim, a fração P2 foi novamente submetida a centrifugação (5000 x g por 15 minutos) separando o sobrenadante (S3) e o precipitado (P3). (HAMED, MAHAREM, et al.; 1997).

4.4. Dosagem de proteínas.

As frações proteicas obtidas durante a preparação de enzimas com atividade de peroxidase foram mensuradas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tal, as proteínas (20 µl) foram incubadas com reagente de Bradford (180 µl), constituído de 25 mg de coomassie brilliant blue G-50 diluído em solução de 25ml de ácido orto-fosfórico P.A e 12,5 ml de etanol P.A. para 250 ml de água purificada. Paralelamente, uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA) e incubada com

reagente de Bradford, nas mesmas condições realizadas com as frações. As determinações de absorvância (densidade óptica - OD) foram realizadas em duplicatas e monitoradas a 595 nm. O conteúdo proteico de cada fração foi determinado pela comparação das OD obtidas a partir da curva padrão. A concentração proteica foi expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). (BRADFORD, 1976) (SANTANA et al.; 2012).

4.5. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

As frações obtidas da purificação de peroxidases foram analisadas em gel de poliacrilamida na presença de duodecilsulfato de sódio (SDS), conforme descrito por Laemmli (método de SDS-PAGE). As frações foram resolvidas em sistema unidimensional fazendo uso do tampão descontínuo segundo o método de Laemmli. Os géis de poliacrilamida nas concentrações de 8 e 10% foram montados nas placas para o sistema de eletroforese, nas dimensões 8 x 10 x 0,1 cm. As amostras preparadas e solubilizadas em tampão contendo Tris 50 mM pH 6,8, EDTA 10 mM, glicerol 10% e SDS 10% foram tratadas previamente na presença de 10% de β -mercaptoetanol (β ME) a 95°C por 5 minutos. As proteínas tratadas foram eletroforéticamente separadas por meio de uma corrente de 20 mA por uma hora. Após a corrida, os géis foram corados em solução de coomassie brilliant blue R-50 e descorados em solução contendo 7% de ácido acético e 30% de metanol. (LAEMMLI, 1970) (CARRARO, CATANI, 1983).

4.6. Determinação da atividade enzimática de peroxidase.

A atividade de peroxidase foi determinada em triplicata utilizando 10 μL de cada fração da preparação, ensaiada em reação contendo tampão fosfato 50 mM pH 6,0 na presença de ortofenilenodiamina (OPD) 1mg/mL e H_2O_2 0,03% a 37 °C (290 μL), totalizando um volume final de reação de 300 μL . A reação enzimática foi desenvolvida durante 3 minutos à 37° C e interrompida após este período de tempo com a adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N. As amostras em triplicata foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços e a leitura das absorvâncias foram monitoradas a 492 nm utilizando em leitor de placas (Molecular Devices Corp.).

4.7. Caracterização da interferência de íons na atividade enzimática de peroxidase

A fração S3, enriquecida na atividade peroxidase foi caracterizada quanto à capacidade de sofrer interferência na presença dos seguintes reagentes: Cloreto de Sódio NaCl, Cloreto de Potássio KCl, Cloreto de Amônia NH₄Cl, Cloreto de Cálcio CaCl₂, Sulfato de Cobre CuSO₄ e Sulfato de Zinco ZnSO₄. Para tal, a reação foi conduzida, em triplicata, com 10 uL da fração S3 ensaiada em 140 uL do solução de reação (tampão fosfato 50 mM pH 6,0, ortofenilenodiamina (OPD) 1mg/mL e H₂O₂ 0,03%) suplementado com 150 uL os respectivos sais na concentração final do volume de reação (300 uL) de 0,5 mM, 5 mM e 50 mM. A reação enzimática também foi desenvolvida por 3 minutos à 37° C e interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. As amostras foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços e a leitura das absorbâncias foram monitoradas a 492 nm utilizando um leitor de placas (Molecular Devices Corp.). Uma unidade enzimática (unit) foi definida como a mudança de 0,1 de OD do composto OPD a 492 nm. A atividade enzimática específica foi definida como o valor da atividade enzimática (units) dividida pela concentração proteica e o tempo de reação enzimática e expressa em unidade enzimática. mg⁻¹. min⁻¹.

4.8. Análise estatística de dados.

As diferenças entre a atividade enzimática da fração S3 em cada condição de tratamento com diferentes sais (íons) foram analisadas utilizando análise estatística de ANOVA com pós-teste de comparações múltiplas de Bonferoni. Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

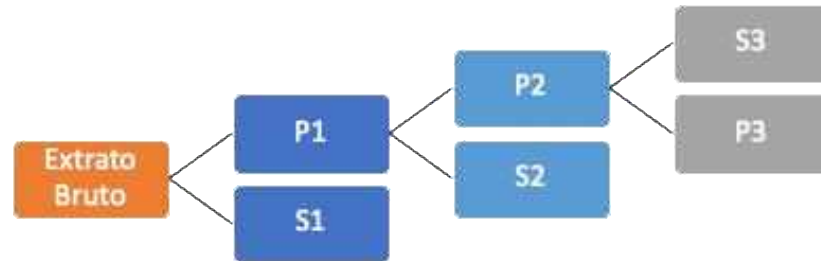
5.1. Frações obtidas do isolamento protéico de *Raphanus sativus*

O processo para a obtenção de frações foi executado conforme previamente descrito para a extração de isoenzimas como peroxidase de *Armoracia rusticana* (HARDIN 1968), com algumas modificações. A figura 2A, demonstra o esquema de purificação realizado e cada etapa de purificação. Já a figura 2B, mostra o perfil eletroforético proteico das amostras obtidas. Como observado nesta figura o extrato bruto é composto por múltiplas bandas de proteínas e ao final do processo (fração S3) é observada uma banda predominante de 40 kDa. A aplicação desse método para a obtenção de uma fração enriquecida em atividade peroxidase

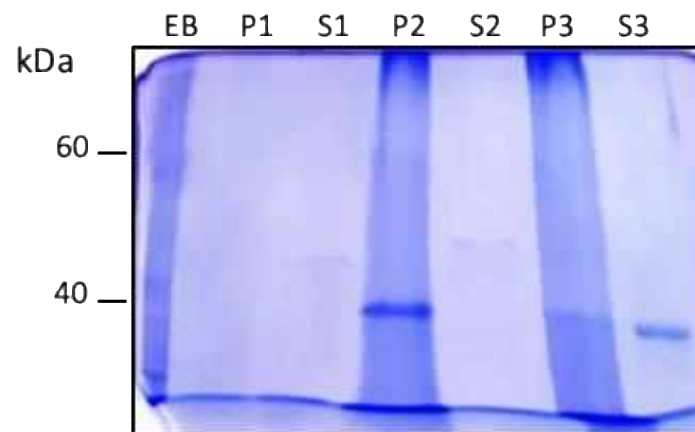
de *Raphanus sativus* provou ser eficaz na obtenção das amostras utilizadas para os ensaios que confirmam a reação de isoenzima peroxidase, O extrato de *Raphanus sativus* se mostra como uma opção viável na obtenção de peroxidase para aplicação em processo biotecnológicos, como por exemplo para produção de imunocombinados enzimáticos. A banda apresenta peso molecular aproximado de 40 kDa, peso molecular similar ao obtido para peroxidase de *Armoracia rusticana* (DELINCEE; RADOLA, 1974).

Figura 2 - Frações proteicas obtidas de *Raphanus sativus*.

A



B



(A) Representação esquemática do fracionamento proteico de *Raphanus sativus*. No esquema é representado o extrato bruto e as frações sobrenadantes (S1, S2 e S3) e precipitadas (P1, P2 e P3) em cada etapa do isolamento proteico. (B) Análise eletroforética realizada em SDS-PAGE do extrato bruto (EB) e frações proteicas obtidas (S1, S2, S3, P1, P2 e P3) de *Raphanus sativus*.

Fonte: o próprio autor.

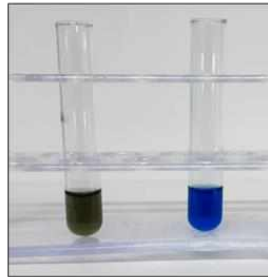
5.2. Determinação da concentração proteica das frações

Conforme demonstrado na figura 3A, a solução reagente de Bradford (1mL) foi testada previamente na ausência e presença de BSA (1,2 mg de BSA), respectivamente. Como pode ser observado nesta figura; a solução de Bradford, na presença da BSA, adquiriu uma coloração fortemente azulada, indicando que a solução reage quimicamente com as proteínas transformando a forma do corante na sua forma ácida, que está em tom esverdeado para uma

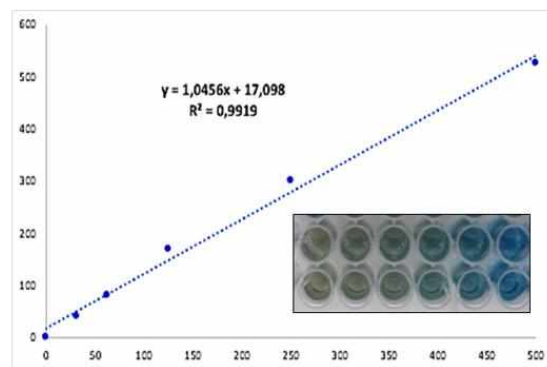
forma conjugada com proteína, fortemente azulada. Estes dados indicam que a solução de Bradford preparada no laboratório pode ser utilizada para a determinação do conteúdo proteico de amostras biológicas diversas. A Figura 3B, é demonstrada a curva de padrão de BSA preparada com concentrações crescentes de BSA (0-500 ug/mL) na presença de solução de Bradford (OD 595 nm). Neste gráfico é apresentada a equação da reta ($y = 1,0456x + 17,098$) e valor de coeficiente de Person (0,9919). Os valores proteicos das frações obtidas de *Raphanus sativus* foi de respectivamente, 0,301 mg/mL para extrato bruto (EB), 0,068 mg/mL para S1, 0,037 mg/mL para P1, 0,002 mg/ml para S2, 0,386 mg/mL para P2, 0,113 mg/mL para S3 e 0,275 para P3. Valores de R2 similares também foram descritos por outros autores utilizando a metodologia de Bradford (SANTANA et. al 2012).

Figura 3. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

A



B



(a) Reação teste realizada com a solução de Bradford na ausência e presença de BSA, respectivamente. (b) Curva padrão de BSA na reação de dosagem proteica pelo método de Bradford. No gráfico é representada a equação $y = a x + b$ e coeficiente de Person (R^2). Inseto no gráfico demonstra a reatividade de concentrações crescentes de BSA (0 a 500 µg/L). A cor azulada aparece de forma mais intensa nos poços em que há maior concentração de proteína BSA.

Fonte: Próprio autor

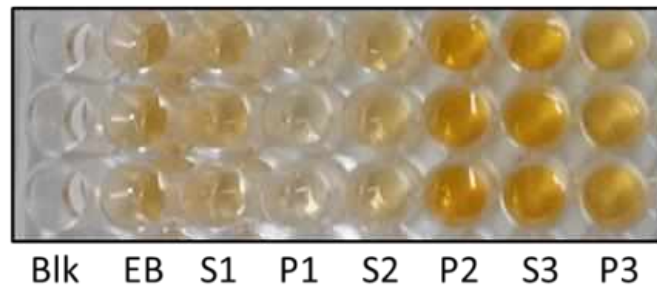
5.3. Fração S3 é enriquecida na enzima peroxidase.

Reação de atividade peroxidase foi determinada por ensaio enzimático na presença de H_2O_2 e do cromógeno OPD, em amostras obtidas do fracionamento de *Raphanus sativus* (Figura 4). Como observado na figura 4A, as frações com maior atividade enzimática de peroxidase apresentaram coloração laranja mais intensa, representando maior conversão de OPD (incolor) na sua forma química oxidada (laranja). Na figura 4B, são demonstrados os valores de OD a 492 nm obtidos de cada fração ensaiada na presença a H_2O_2 e do cromógeno (OPD). As frações EB, S1, P1, S2, P2, S3 e P3 apresentaram os seguintes valores médio de OD 0,764; 0,349, 0,148; 0,351; 1,435; 1,219 e 0,74, respectivamente. As frações com maior

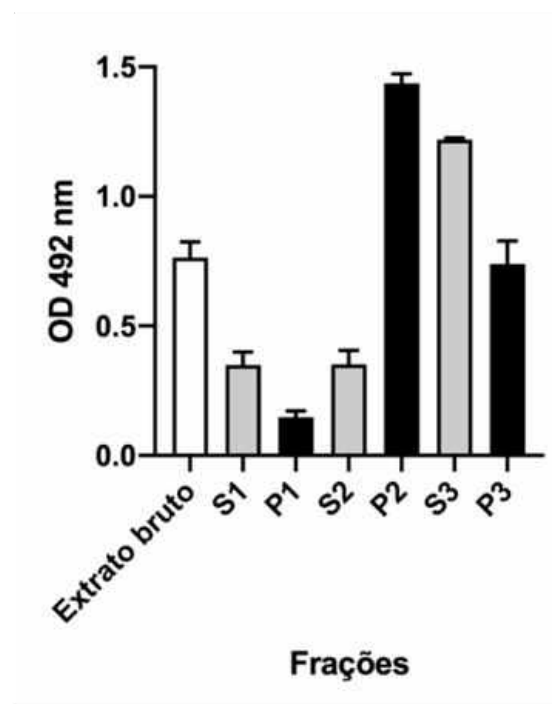
atividade enzimática de peroxidase foram as frações P2 e S3. Como a fração S3 é solúvel e enriquecida na atividade peroxidase, utilizamos esta fração para os ensaios subsequentes de caracterização enzimática. As fortes reações em P2, P3 e S3 demonstram a alta concentração de isoenzimas peroxidase nestas frações, demonstrando a eficácia do processo de enriquecimento de peroxidases baseado em precipitação por acetona a 65%. Dados similares de enriquecimento de atividade de peroxidase também foram observadas quando folhas de *Copaifera langsdorffii* foram tratadas com a acetona nesta mesma concentração (MACIEL et al. 2007). Portanto, no nosso estudo também demonstramos que este tipo de precipitação pode ser aplicado em turbérculos de rabanete (*Raphanus sativus*). Nossos dados estão em acordo com os resultados publicados por Diao et al. (2018), que usando resinas de troca iônica e interação hidrofóbicas, isolaram duas peroxidases de *Raphanus sativus*, denominadas de POX1 e POX2.

Figura 4. Avaliação da atividade de peroxidase nas frações proteicas obtida *Raphanus sativus*.

A



B



(a) Placa com a reação de atividade peroxidase determinada por ensaio enzimático na presença de OPD e H_2O_2 , em amostras obtidas do fracionamento de *Raphanus sativus* (extrato bruto, EB; S1; P1; S2; P2; S3 e P3). Frações com maior atividade de peroxidase apresentam coloração laranja mais intensa. (b) Atividade de peroxidase detectada nas amostras de diferentes estágios de fracionamento protéico de *Raphanus sativus*. Os valores foram expressos em média das ODs obtidas 492 nm da triplicata e os respectivos desvios padrões são apresentados para cada fração.

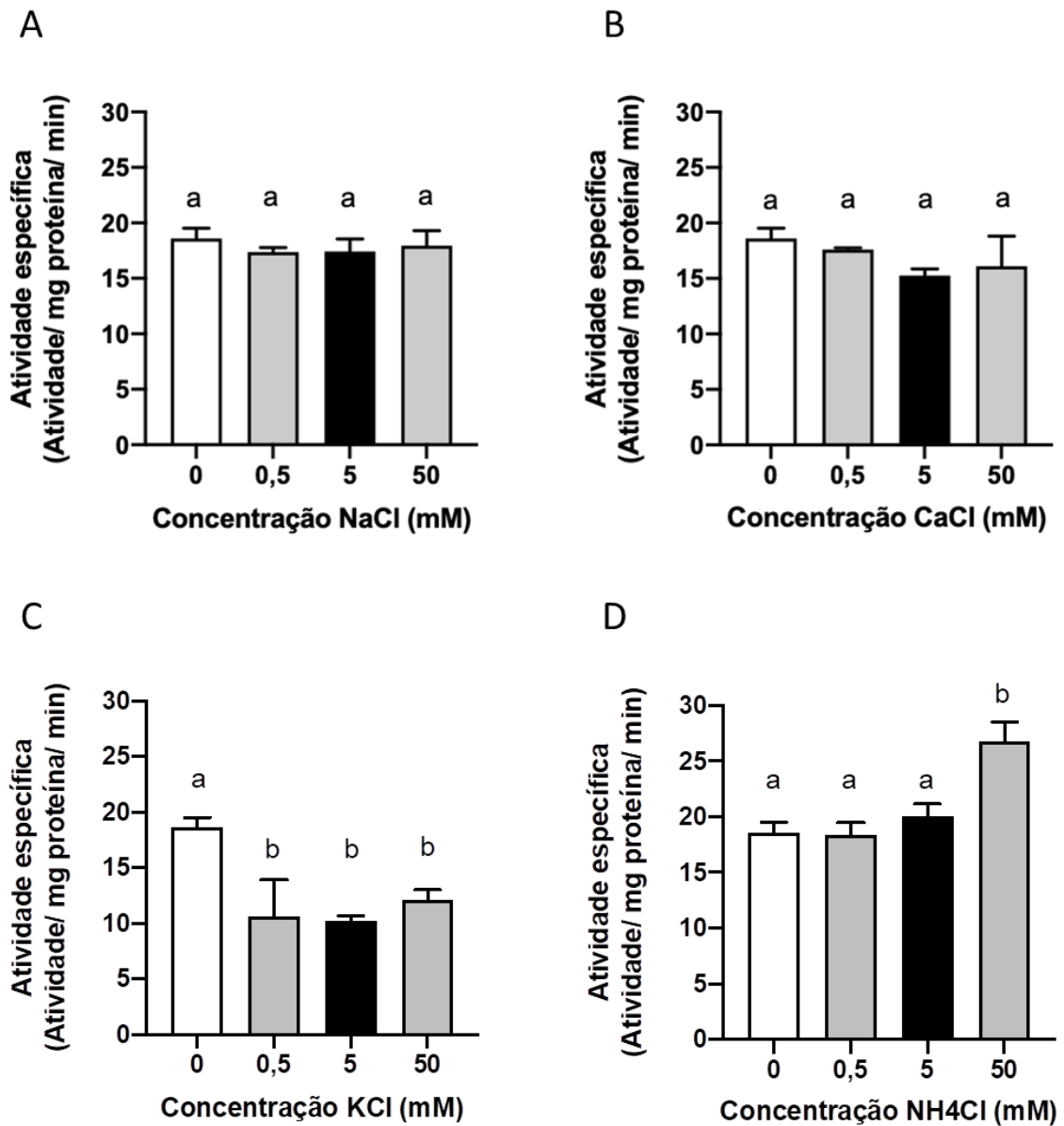
5.4 Caracterização enzimática da fração S3 na presença de íons.

Neste ensaio avaliamos o efeito do tratamento de diferentes sais de cloreto, nas concentrações 0,5; 5 e 50 mM, na atividade de peroxidase da fração S3 (Figura 5A e 5B). O tratamento da fração S3 com NaCl e CaCl não afetaram atividade enzimática de peroxidase em nenhuma das concentrações avaliadas. No entanto, Diao e colaboradores demonstraram uma inibição da atividade de peroxidase de 40,7% para a enzima POX1 e 46,5% para a enzima POX2 de *Raphanus sativus* (DIAO et al., 2018). Estas diferenças observadas entre os nossos dados e os publicados por Diao, podem ser resultados do nível de purificação obtidos nos diferentes trabalhos científicos.

Por outro lado, quando a fração S3 foi ensaiada com KCl uma redução significativa na atividade de peroxidase foi observada a partir da concentração 0,5 mM, sendo observadas também nas demais concentrações de KCl (Figura 5C). Nossos dados estão de acordo com os dados de Diao e colaboradores que descreveram uma redução significativa, de 50% de atividade de peroxidase, quando as duas enzimas POX1 e POX2 isoladas de *Raphanus sativus* foram tratadas com íons potássio (K^+) na concentração de 5 mM (DIAO et al., 2018). Interessantemente, nossos ensaios demonstramos que a inibição da atividade peroxidase de *Raphanus sativus* na fração S3 já ocorre com 0,5 mM de KCl, ou seja, 10 vezes menos aos descrito por Diao e colaboradores (2018). Portanto, ensaios imunoenzimáticos futuros utilizando esta enzima conjugadas à anticorpos devem evitar o uso de sais de potássio nas soluções tampão deste tipo de ensaio imunoenzimático, mesmo em baixas concentrações como demonstrado por nós neste trabalho usando 0,5 mM de KCl.

Já quando avaliamos o tratamento de NH_4Cl , um aumento significativo da atividade peroxidase da fração S3 foi observada somente na concentração de 50 mM, indicando que este íon apresenta um aumento enzimático em altas concentrações. Até o momento, não identificamos na literatura levantada para a execução desta monografia a descrição deste efeito de íons amônio para peroxidases de *Raphanus sativus*.

Figura 5. Efeito de diferentes íons em sais de cloreto na atividade enzimática de peroxidase na fração S3.



Efeito do tratamento de diferentes sais de cloreto na atividade de peroxidase determinada nas concentrações finais de 0,5 mM, 5 mM e 50 mM. Em (A), (B), (C) e (D) atividade determinada na presença de NaCl, CaCl, KCl e NH₄Cl, respectivamente. Os dados foram expressos em atividade específica (unidade enzimática. mg⁻¹. min⁻¹). As letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas.

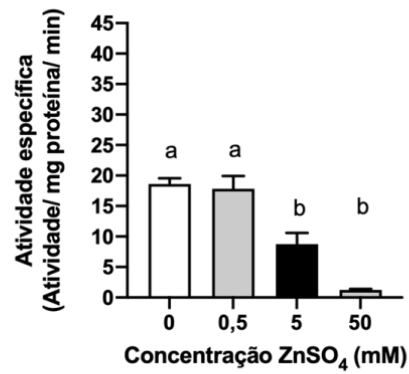
Fonte: Próprio autor.

5.5 Caracterização enzimática da fração S3 na presença de sulfatos.

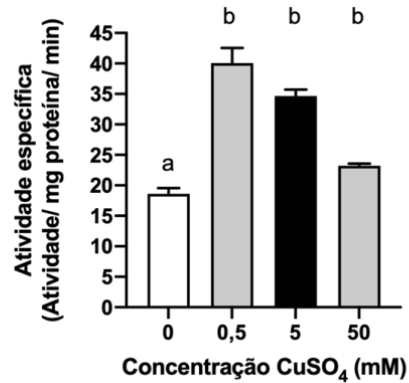
Para este ensaio, testamos concentrações de 0,5 mM, 5 mM e 50 mM de diferentes sulfatos, ZnSO₄ e CuSO₄, na fração S3 obtida (Figura 6A e 6B). O tratamento da fração S3 com ZnSO₄ produziu uma redução significativa da reação enzimática de peroxidase a partir de 5 mM, sendo pronunciada esta redução na concentração de 50 mM (Figura 6). Estes dados estão em acordo com os dados apresentados por Diao e colaboradores que demonstraram uma redução da atividade peroxidase de 69,3% para a enzima POX1 e 69,4% para POX 2 de *Raphanus sativus* quando tratadas com 5 mM de íons Zn (DIAO et al., 2018). Da mesma forma, os autores Diao e colaboradores demonstraram que íons de Zn também inibem a atividade da peroxidase HRPO isolada a partir de *Armoracea rusticana* (ZOLLNER H., 1993). No tratamento da fração com CuSO₄ a reação teve um forte aumento da atividade enzimática de peroxidase a partir da concentração de 0,5 mM. Este efeito de aumento na atividade enzimática foi mantido nas concentrações de 5 mM e 50 mM (Figura 6B). No entanto, este aumento foi menos expressivo na concentração final de 50 mM. Portanto, neste ensaio os nossos dados também concordam com Diao e colaboradores, que demonstraram que as enzimas POX 1 e POX2 são ativadas na presença de íons cobre (aumento de 61% e 65%, respectivamente). Estes autores sugerem que os íons cobre podem funcionar como cofatores enzimáticos, aumentando a atividade destas peroxidaes isoladas de *Raphanus sativus*.

Figura 6. Efeito de diferentes íons em sais de sulfato na atividade enzimática de peroxidase na fração S3

A



B



. Efeito do tratamento de diferentes sais de sulfato na atividade de peroxidase determinado nas concentrações finais de 0,5 mM, 5 mM e 50 mM. Em (A) e (B) atividade determinada na presença de ZnSO₄ e CuSO₄, respectivamente. Os dados foram expressos em atividade específica (unidade enzimática. mg⁻¹. min⁻¹). As letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas.

Fonte: Próprio autor.

Conclusão:

Assim na presente monografia purificamos e caracterizamos parcialmente uma fração enriquecidas na enzima peroxidase obtidas a partir de raízes de *Raphanus sativus*, que uma vez isolada, poderá ser utilizada como fonte enzimática para uso alternativo ao emprego de peroxidases isoladas de *Armoracia rusticana*. A fração S3 obtida foi enriquecida em uma banda polipeptídica e apresentou intensa atividade enzimática de peroxidase. Essa atividade enzimática foi inibida na presença de íons K^+ e Zn^{++} e foi estimulada na presença de íons NH_4^+ e Cu^{++} , se mantendo inalterada na presença de Ca^+ e Na^+ . Portanto esta enzima purificada é uma alternativa viável a ser utilizada como fonte enzimática para uso laboratorial de forma semelhante à outras enzimas peroxidases isoladas de outras espécies vegetais. Assim, abordagem descrita neste trabalho poderá fornecer conhecimentos para a produção e isolamento de enzimas de peroxidases com potencial aplicação biotecnológica a partir de novas fontes vegetais cultiváveis em condições tropicais.

REFERENCES

- BEYZAVI, K. *et al.* Comparison of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase-labelled antibodies in enzyme immunoassays. **Association of Clinical Biochemists**, [s.l.], v. 24, p. 145-152, 1987.
- COURTER, J. W.; RHODES, A. M. Historical notes on horseradish. **Economic Botany**, [s.l.], v. 23 n. 2, p. 156–164. abr./jun. 1969.
- DIAO, Mamounata *et al.* Biochemical characterization of Burkina red radish (*Raphanus sativus*) peroxidase. **Journal of Applied Biosciences**, [s.l.], v. 125, p. 12518-12530, 2018.
- DELINCEE, Henry; RADOLA, Bertold J. Fractionation of Horseradish Peroxidase by Preparative Isoelectric Focusing, Gel Chromatography and Ion-Exchange Chromatography. **European journal of biochemistry**, [s.l.], v. 52, p. 321 - 330, dec. 1975
- DUROUX, Laurent.; WELINDER, Karen G. The Peroxidase Gene Family in Plants. **A Phylogenetic Overview Journal of Molecular Evolution**, [s.l.], v. 57, p. 397–407, jan./abr. 2003.
- GAJHEDE, Michael *et al.* Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. **Nature Publishing Group**, [s.l.], v. 4, p. 1032–1038, 1997.

GOBLIRSCH, B. *et al.* Chlorite Dismutases, DyPs, and EfeB: 3 Microbial Heme Enzyme Families Comprise the CDE Structural Superfamily. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 3, p. 379-398, maio 2011.

HAMED, Ragaa R. *et al.* Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. **Phytochemistry**, v. 48, n.8, p. 1291-1294, ago. 1998

KAWAOKA, A.; KAWAMOTO, T.; OHTA, H. *et al.* Wound-induced expression of horseradish peroxidase. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 13, p. 149–154, 1994.

MITTLER, R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, [s.l.] v. 7, n. 9, sep. 2002.

PNUELI, L. *et al.* Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 34, p. 187–203, 2003.

SANTANA, Silas S. *et al.* Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, [s.l.], v.143, p.193 – 201, nov. 2012

SHIGEOKA, S. *et al.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 53, n. 372, p. 1305–1319, maio 2002.

SOTTOMAYOR, M.; DICOSMO, F.; ROS BARCELO, A. On the fate of catharanthine and vindoline during the peroxidase-mediated enzymatic synthesis of a-30,40-anhydrovinblastine. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 543-549, nov. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez34.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0141022997000677?via%3Dihub>. Acesso em: 03 dez. 2020.

TANDJAOUI, Nassima *et al.* Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 208-213, apr. 2015.

VEITCH, Nigel C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 65, p. 249–259, 2004.

WELINDER, Karen G. *et al.* Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **European journal of biochemistry**, [s.l.], v. 269, p. 6063–6081, 2002.

ZÁMOCKY, Marcel *et al.* Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 574, p. 108–119, nov./dez. 2015.

ZÁMOCKÝ, Marcel *et al.* Turning points in the evolution of peroxidase–catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 71, p. 4681–4696, mar./maio 2014.

ZOLLNER, H. Handbook of Enzyme Inhibitors Part A, Second revised and enlarged ed., **VCH Verlagsgesellschaft GmbH**, Germany, p. 367– 368, 1993.