

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA  
POLIFENOLOXIDASE (PPO) EM FRUTO DA FAMÍLIA ANONÁCEA  
- PINHA (*Annona squamosa* L.).**

**ELIZA DOROTEA POZZOBON DE ALBUQUERQUE LIMA**

Farmacêutico-Bioquímico em Tecnologia de Alimentos

**Prof. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE**

Orientadora

**PARECER**

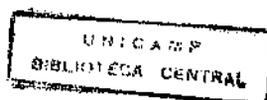
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Eliza Dorotea Pozzobon de Albuquerque Lima aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de março de 1999.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas, 25 de março de 1999

  
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
Presidente da Banca

**CAMPINAS**  
Estado de São Paulo - Brasil  
1999



UNIDADE BC  
N.º CHAMADA :  
V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 37521  
PROC. 229199  
C  D   
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 01/05/99  
N.º CPD \_\_\_\_\_

CM-00122822-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

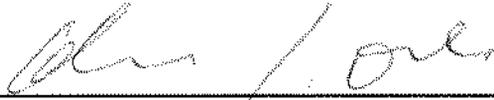
L628p

Lima, Eliza Dorotea Pozzobon de Albuquerque  
Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase  
(PPO) em fruto da família anonácea pinha (*Annona squamosa*  
L.) / Eliza Dorotea Pozzobon de Albuquerque Lima.  
- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Gláucia Maria Pastore  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

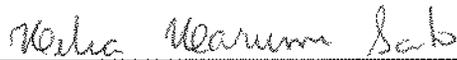
1. Anona. 2. *Annona squamosa* L. 3. Polifenoloxidase  
4. Purificação. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
Orientadora



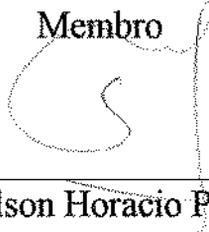
---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Membro



---

Dra. Vera Lúcia S. Baldini  
Membro

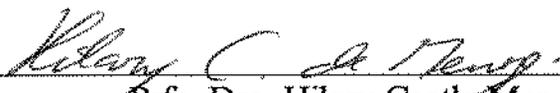


---

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa Garcia  
Membro

---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Membro



---

Prfa. Dra. Hilary Castle Menezes  
Membro

---

Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra  
Membro

Campinas, de de 1999

*Dedico*

À **Carlos** meu esposo, companheiro de todas as horas e aos filhos **Thalita**, **Gustavo** e **Rodrigo** pela compreensão nos momentos de ausência.

À meus **pais** e **irmãos** pelo estímulo ao longo da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu esposo e filhos pela compreensão e incentivo em todos os momentos.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela orientação e desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Délia Rodriguez-Amaya por ter conseguido a Bolsa junto ao CNPq e pelo respeito com seus alunos.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela amizade e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso por ter autorizado o laboratório para a realização das análises de eletroforese e amizade.

À Liana pela prestimosa colaboração nas análises de eletroforese e amizade.

À Mercedes, pelo auxílio durante a realização da purificação da enzima e pela amizade.

À pesquisadora do ITAL, Vera Lúcia Baldini, pela determinação da composição dos aminoácidos.

Ao Engenheiro Agrônomo do CATI, pelo auxílio da obtenção das amostra de pinhas provenientes de Lins-SP.

Aos membros da banca examinadora pela gentileza e sugestões.

Ao Masaharu e Severino pelo auxílio na execução dos softwares e pela amizade.

Aos amigos, Lilian, Gisele, Roseli, Heinz, Gabriela, Roseli, Contado e Danielle pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Dora, Bia e Marcelo pelos momentos de convívio e amizade.

Ao Adailson do CPQBA pelas análises de densitometria.

Aos funcionários de outros Laboratórios, Carla e Rosinha.

Ao CNPq, pela Bolsa concedida e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

## ÍNDICE GERAL

	páginas
ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xvi

### ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1- Polifenoloxidase (PPO) e sua importância.....	10
2.2- Extração da enzima.....	12
2.3- Purificação e caracterização bioquímica.....	16
2.4- Inibidores.....	24
2.5- Peso molecular.....	28
2.6- Presença de cobre.....	30
2.7- Uso da PPO.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1- MATERIAIS.....	33
3.1.1- EQUIPAMENTOS.....	33

3.1.2- REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS.....	34
3.2- MÉTODOS.....	35
3.2.1- Coleta das amostras de pinhas.....	35
3.2.2- Estudos preliminares .....	35
3.2.2.1- Efeito do tipo de solução de extração sobre a enzima PPO do extrato bruto obtido da casca e da polpa de pinha verde e madura .....	35
3.2.2.2- Determinação da atividade da PPO nos extratos brutos das diferentes partes dos frutos, cascas e polpas em diferentes estágios de maturação verdes e maduros.....	36
3.2.2.3- Efeito do pH do tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura.....	37
3.2.2.4- Caracterização bioquímica da PPO no extrato bruto da polpa de pinha madura.....	37
3.2.2.4.1- Efeito do pH na atividade da PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura.....	38
3.2.2.4.2- Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura.....	38
3.2.2.4.3- Influência da composição do tampão de extração na atividade da PPO das polpa de pinha madura.....	39
3.2.3- Determinação da atividade de PPO do extrato bruto, da solução de enzima parcialmente purificada e nos eluatos de enzimas purificadas a partir da polpa de pinha madura.....	40
3.2.4- Obtenção da PPO bruta de polpa de pinha madura.....	41

3.2.4.1- Fracionamento com sulfato de amônio do sobrenadante do extrato enzimático da polpa de pinha madura.....	41
3.2.5- Caracterização bioquímica da PPO parcialmente purificada.....	42
3.2.5.1- Efeito da concentração da enzima PPO parcialmente purificada.....	42
3.2.5.2- Influência dos diferentes substratos na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	42
3.2.5.3- Efeito do pH na atividade da enzima PPO parcialmente purificada.....	43
3.2.5.4- Efeito do pH na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada....	43
3.2.5.5- Efeito da temperatura na atividade da enzima PPO parcialmente purificada.....	44
3.2.5.6- Efeito da temperatura na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada.....	44
3.2.5.7- Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO parcialmente purificada.....	44
3.2.5.8- Efeito de compostos químicos e tratamento térmico usado na indústria de alimentos para controle da atividade da PPO parcialmente purificada.....	45
3.2.6- Purificação da PPO de polpa de pinha madura.....	46
3.2.6.1- Cromatografia da PPO em coluna de DEAE-Toyopearl-650M.....	46
3.2.6.2- Cromatografia da enzima PPO em coluna de gel Toyopearl HW-55F....	48
3.2.7- Estudo das características da PPO purificada.....	49
3.2.7.1- Determinação do pH ótimo de atividade da PPO purificada.....	49
3.2.7.2- Determinação do pH de estabilidade da PPO purificada.....	50
3.2.7.3- Determinação da temperatura ótima de atividade da PPO purificada.....	50
3.2.7.4- Determinação da temperatura de estabilidade da PPO purificada.....	50
3.2.7.5- Inativação térmica da PPO purificada.....	51

3.2.8- Determinação do peso molecular da PPO.....	51
3.2.8.1- Cromatografia em coluna de Sephadex G-200.....	51
3.2.8.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	52
3.2.9- Eletroforese da PPO purificada de pinha em gel de poliacrilamida.....	53
3.2.9.1- Eletroforese da PPO purificada de pinha e detecção da atividade enzimática.....	53
3.2.9.2- Efeito do dodecil sulfato de sódio - SDS na eletroforese da PPO purificada de pinha.....	54
3.2.10- Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_m$ e $V_{max}$ .....	55
3.2.11- Efeito de inibidores na atividade da PPO purificada.....	55
3.2.12- Efeito de compostos químicos e tratamento térmico usados na indústria de alimentos, para controle da atividade da PPO purificada.....	56
3.2.13- Composição de aminoácidos.....	57
3.2.14- Determinação de cobre.....	57
3.2.15- Influência do armazenamento sobre a atividade da PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura.....	58
3.2.16- Determinação quantitativa de proteínas.....	58
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1- Estudos preliminares.....	59
4.1.1- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da enzima PPO do extrato bruto obtido de casca de pinha verde e madura.....	59
4.1.2- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da enzima PPO do extrato bruto obtido da polpa de pinha verde e madura.....	61

4.1.3- Atividade da enzima PPO em casca e polpa do fruto nos estágios de maturação verde e maduro.....	63
4.1.4- Efeito do pH do tampão de extração na atividade e estabilidade da PPO de polpa de pinha madura.....	64
4.1.5- Caracterização bioquímica da PPO no extrato bruto.....	65
4.1.5.1- Efeito do pH na atividade da enzima PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura para realização das análises.....	65
4.1.5.2- Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura.....	66
4.1.5.3- Influência da presença de aditivos no tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura.....	67
4.2- Obtenção da enzima PPO parcialmente purificada .....	69
4.3- Caracterização bioquímica da PPO parcialmente purificada .....	69
4.3.1- Estudo da concentração da enzima PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	70
4.3.2- Ação da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura sobre diferentes substratos.....	71
4.3.3- Efeito do pH na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	73
4.3.4- Efeito do pH na estabilidade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	75
4.3.5- Efeito da temperatura na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	76

4.3.6- Efeito da temperatura na estabilidade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	77
4.3.7- Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	78
4.3.8- Estudo comparativo dos tratamentos de inativação enzimática da PPO parcialmenre purificada de polpa de pinha madura.....	80
4.4- Purificação da enzima PPO.....	82
4.4.1- Cromatografia da PPO em colunas de DEAE-Toyopearl 650M e Toyopearl HW55F.....	82
4.5- Caracterização da enzima PPO purificada.....	87
4.5.1- Efeito do pH na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura....	87
4.5.2- Determinação do pH de estabilidade da PPO purificada.....	88
4.5.3- Determinação da temperatura ótima de atividade da PPO purificada.....	89
4.5.4- Determinação da temperatura de estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura.....	90
4.5.5- Inativação térmica da enzima PPO purificada.....	91
4.5.6- Efeito de inibidores sobre a atividade da enzima PPO purificada.....	93
4.5.7- Efeito dos tratamentos de inibição sobre a enzima PPO purificada de polpa de pinha madura.....	95
4.5.8- Determinação do peso molecular da PPO por filtração em gel em coluna de Sephadex G-200.....	97
4.5.9- Determinação do peso molecular através de eletroforese em SDS-PAGE..	98
4.5.10- Eletroforese - Atividade da enzima PPO.....	102
4.5.11- Influência do dodecil sulfato de sódio - SDS.....	107

4.5.12- Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_m$ e $V_{max}$ de PPO de pinha..	109
4.6- Teor de cobre.....	112
4.7- Composição de aminoácidos da PPO purificada de polpa de pinha madura..	113
4.8- Influência do tempo de armazenamento sobre a atividade da enzima PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura.....	115
5- CONCLUSÕES.....	116
6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	118
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

páginas

Figura 1- <i>Annona squamosa</i> L. : pinha, ata ou fruta-do-conde.....	3
Figura 2- Ação da enzima polifenoloxidase em polpas de pinhas ( <i>Annona squamosa</i> L.) congeladas.....	5
Figura 3- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em extrato bruto obtido de casca de pinha verde.....	60
Figura 4- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em extrato bruto obtido de casca de pinha madura.....	60
Figura 5- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em polpa de pinha verde.....	62
Figura 6- Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO de polpa de pinha madura.....	62
Figura 7- Atividade da enzima PPO determinada na casca e polpa do fruto de pinha nos estágios de maturação verde e maduro, extraída em tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,5).....	63
Figura 8- Efeito do pH dos tampões na extração da PPO em polpa de pinha madura.....	64
Figura 9- Efeito do pH na determinação da PPO no extrato bruto em polpa de pinha madura.....	65
Figura 10- Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura.....	66

Figura 11- Efeito da concentração da enzima PPO parcialmente purificada na atividade enzimática.....	70
Figura 12- Ação de diferentes substratos preparados na concentração de 15,0 mM em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,5), à temperatura de 20°C sobre a enzima PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.....	71
Figura 13- Efeito do pH na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	74
Figura 14- Efeito do pH na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.....	75
Figura 15- Efeito da temperatura na atividade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.....	76
Figura 16- Efeito da temperatura na estabilidade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.....	77
Figura 17- Efeito comparativo dos tratamentos de inibição com a PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.....	81
Figura 18- Cromatografia da PPO de polpa de pinha madura em coluna de DEAE-Toyopearl 650M.....	83
Figura 19- Cromatografia da Fração I da PPO de polpa de pinha madura em coluna de Toyopearl HW 55F.....	83
Figura 20- Efeito do pH na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura.....	87
Figura 21- Efeito do pH na estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura.....	88

Figura 22- Efeito da temperatura na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura.....	89
Figura 23- Efeito da temperatura na estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura.....	90
Figura 24- Termoestabilidade da enzima PPO purificada de polpa de pinha madura, (a) comportamento da PPO pelos dados de absorbância ; (b) comportamento da PPO, em atividade relativa.....	92
Figura 25- Efeito comparativo dos tratamentos de inibição enzimática sobre a enzima PPO purificada de polpa de pinha madura.....	96
Figura 26- Determinação do peso molecular da PPO purificada em coluna de Sephadex-G200.....	97
Figura 27- Eletroforese de PPO purificada em gel SDS-PAGE. P = padrões de proteína: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da) e $\alpha$ lactoalbumina (14.400 Da). 1- PPO (FraçãoI) DEAE Toyopearl 650M; 2- PPO (Fração II) DEAE-Toyopearl 650M; 3-PPO Toyopearl HW 55F.....	100
Figura 28- Especificidade da enzima PPO de polpa de pinha madura frente à ação dos substratos catecol, L-dopa, pirogalol, ácido caféico e 4-metilcatecol.....	104
Figura 29- Peso molecular da PPO de pinha determinado através de fotodensitometria, da eletroforese em gel de poliacrilamida corado com substrato catecol.....	105

Figura 30- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, ilustrando a atividade de PPO de polpa de pinha madura corado com solução de substrato catecol e L-dopa.....	106
Figura 31-Enzima PPO purificada de polpa de pinha madura, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. (1a e 1b) formas da enzima submetida à separação e coloração para atividade da PPO na ausência de SDS. (2a e 2b) formas da enzima submetida à separação na ausência de SDS e coloração na presença de 0,1% de SDS. (3a e 3b) formas da enzima submetidas à separação e coloração na presença de 0,1% de SDS.....	109
Figura 32- Determinação do $K_m$ e $V_{max}$ de PPO de polpa de pinha madura com o substrato catecol.....	109
Figura 33- Determinação do $K_m$ e $V_{max}$ de PPO de polpa de pinha madura com L-dopa como substrato.....	110
Figura 34- Influência do tempo de armazenamento sobre a atividade da enzima PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura.....	115

## ÍNDICE DE TABELAS

páginas

Tabela 1- Propriedades e composição química da polpa de pinha ( <i>Annona squamosa</i> L.).....	4
Tabela 2- Influência da composição do tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura.....	68
Tabela 3- Especificidade da enzima PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura frente a diferentes substratos.....	72
Tabela 4- Efeito de inibidores sobre a atividade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.....	79
Tabela 5- Purificação da enzima PPO.....	85
Tabela 6- Efeito de inibidores sobre a atividade da PPO purificada em polpa de pinha madura.....	94
Tabela 7- Valores de $K_m$ e $V_{max}$ da enzima PPO de polpa de pinha madura.....	110
Tabela 8- Composição de aminoácidos da enzima PPO de polpa de pinha madura.....	113

## RESUMO

As enzimas polifenoloxidasas (PPO) são amplamente distribuídas na natureza, sendo primeiramente relacionadas com o escurecimento enzimático dos vegetais “in natura”, ocasionando perda da cor dos produtos de frutas e hortaliças processados e ou congelados, diminuição do valor nutricional, modificando as propriedades organolépticas, resultando na maioria dos casos em produtos com aparência ruim, os quais são rejeitados pelos consumidores. Por outro lado, a PPO tem papel importante no desenvolvimento do sabor e cor dos alimentos como por exemplo do chá preto, diminuição do amargor e adstringência dos produtos do cacau e formação de aldeídos de aminoácidos.

O objetivo do presente trabalho foi extrair, purificar e estudar as características bioquímicas da PPO (EC 1.10.3.2) de polpas de pinhas maduras (*Annona squamosa* L.), com a finalidade de obter informações necessárias à sua conservação com melhor qualidade organoléptica, bem como estudar a utilização da enzima no processamento de alimentos.

O pH ótimo de atividade encontrado para a PPO parcialmente purificada foi 6,5 e para a enzima purificada 7,0, com pH de estabilidade entre 6,5 e 7,5. A temperatura ótima de atividade para a enzima parcialmente purificada e purificada foi 20°C. A enzima purificada apresentou rápida inativação em temperaturas acima de 50°C, quando incubada por 30 minutos, utilizando catecol como substrato.

A PPO foi purificada 411 (Fração I) e 118 (Fração II) vezes após cromatografia em coluna de troca iônica em DEAE-Toyopearl 650M e 566 vezes em coluna de Toyopearl HW 55F. A enzima da fração mais ativa foi caracterizada bioquimicamente. A atividade enzimática, tanto da PPO parcialmente purificada como purificada, foi fortemente inibida pelos reagentes químicos glutathione,  $\beta$ -mercaptoetanol, L-cisteína, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio e com menor intensidade para KCN e tiouréia nas concentrações de 1,5, 5,0 e 10,0 mM em relação ao volume final da mistura de reação, na temperatura de 20°C. Pouca inibição foi constatada com KCl, NaCl, ácido cítrico e EDTA nestas mesmas concentrações. No estudo comparativo entre tratamentos de inibição da PPO parcialmente purificada e purificada com concentrações de acordo com as permitidas pela legislação, o tratamento com ácido ascórbico 10mM e temperatura de 70°C durante dois minutos foi muito eficaz e adequado para substituir o uso de sulfitos.

As enzimas parcialmente purificada e purificada utilizaram os orto-difenóis como substrato, não sendo detectado nenhum nível de atividade para monofenóis. Quanto aos parâmetros cinéticos, a enzima purificada apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 7,14 mM e 302,0 unidades/min/ml para catecol e 25,0 mM e 180,2 unidades/min/ml para L-dopa respectivamente, substratos que demonstraram maior especificidade. O peso molecular foi estimado em 90.000 daltons através de filtração em gel Sephadex G-200 e ao redor de 79.000 a 84.000 daltons através de SDS-PAGE. O teor de cobre da enzima purificada encontrado foi de 11ppm/peso da amostra liofilizada. Quanto à composição de aminoácidos, a PPO apresentou maiores teores de ácido aspártico, ácido glutâmico e lisina e menores teores de metionina, arginina e tirosina, com ausência de cisteína. As enzimas parcialmente

purificada e purificada apresentaram-se bastante estáveis quando armazenadas durante o período de 6 meses a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

## SUMMARY

Polyphenoloxidases (PPO) are widely distributed in nature, being firstly related to the enzymatic browning of vegetables “in natura”, causing a loss of color in fruit products and processed or frozen vegetables, decrease in nutritional value and modification of the organoleptic properties, resulting in products with bad appearance, which are rejected by the consumers. On the other hand, PPO has an important role in the flavor and color of black tea, in the decrease of bitterness and astringency of cocoa products and in the formation of aldehydes from amino acids.

The objective of the present work was to extract, purify and study the biochemical characteristics of the PPO (EC 1.10.3.2) of ripe custard apple (*Annona squamosa* L.) pulps, with the purpose of obtaining the necessary information for the conservation of fruits pulps with better organoleptic properties, as well as to study the use of the enzyme in food processing.

The optimum pH for activity of the partially purified PPO was 6.5 and for the purified enzyme 7.0, with pH stability between 6.5 and 7.5. The optimum temperature for activity of the partially purified and purified enzyme was 20°C. The purified enzyme showed fast inactivation at temperatures above 50°C, when incubated for 30 minutes with catechol substrate.

PPO was purified 411 (Fraction I) and 118 (Fraction II) fold in an ion exchange column of DEAE-Toyopearl 650M, and 566 fold in a gel column of Toyopearl HW 55F. The enzyme of the most active fraction was characterized

biochemically. The enzymatic activity of both the partially purified and purified PPO was strongly inhibited by the following reagents at concentrations of 1.5, 5.0 and 10.0 mM with respect to the final volume of the reaction mixture, at a temperature of 20°C: glutathione,  $\beta$ -mercaptoethanol, L-cysteine, ascorbic acid and sodium metabisulfite, and to a lesser extent by KCN and thiourea. Little inhibition was verified by KCl, NaCl, citric acid and EDTA. In a comparative study amongst the inhibition treatments for the partially purified and purified PPO, with concentrations in accordance with the limits permitted by the legislation, the treatment with 10mM ascorbic acid + temperature of 70°C for two minutes was effective and adequate to substitute the use of SO<sub>2</sub>. The partially purified and purified enzyme used the o-diphenols as substrates and no activity towards monophenols was detected. With respect to the kinetic parameters, the purified enzyme presented values for K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of 7.14 mM and 302.0 units/min/ml for catechol and 25.0 mM and 180.2 units/min/ml for L-dopa respectively, substrates which demonstrated greater specificity. The molecular weight was estimated as 90.000 daltons using gel filtration on Sephadex G-200 and about 79.000 to 84.000 daltons on SDS-PAGE. In the analysis of copper, the purified enzyme gave a value of 11ppm by weight of the lyophilized sample. The amino acid composition of the custard apple fruit PPO, presented greater amounts of aspartic acid, glutamic acid and lysine and smaller amounts of methionine, arginine and tyrosine, with an absence of cysteine. Partially purified and purified PPO was stable during the period of 6 months of storage at -10°C.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se encontra entre os grandes produtores de frutas do mundo, porém, cerca de um terço de nossa produção anual é perdida. As perdas pós-colheita de frutos, quer ocasionadas por fitopatógenos quer por problemas fisiológicos, de manuseio, armazenamento ou comercialização, são responsáveis pelo enorme desperdício verificado. Em nosso país pouca pesquisa básica nas áreas de bioquímica e fisiologia, mesmo nos seus mais simples aspectos, tem sido realizada em frutas nacionais o que inviabiliza na maioria das vezes, um maior aproveitamento industrial e comercialização das nossas frutas tropicais. A redução das perdas pós-colheita continuará sendo, por muito tempo, o modo mais econômico e viável de se elevar a oferta de alimentos, principalmente em países em desenvolvimento.

As anonáceas, fruteiras tipicamente de clima tropical e subtropical, apresentam boas perspectivas para a região Nordeste. Além de serem plantas altamente adaptadas às condições locais e produzirem os seus frutos a partir do mês de janeiro, vindo a suprir parte da capacidade ociosa da indústria do suco de caju, apresentam uma boa perspectiva de comercialização de seus frutos para consumo "in natura", nas regiões sul e sudeste do país bem como em outros países.

A pinha pertencente à espécie *Annona squamosa* L., é originária da América Tropical sendo seu fruto um sincarpo arredondado, ovóide, esférico ou cordiforme, com 5 a 10 cm de diâmetro, formado por carpelos muito proeminentes na maioria dos cultivares, coberto externamente de saliências achatadas em forma de tubérculos e regularmente dispostos (COUCEIRO,1973;

GUZMAN et alii,1985). É também denominada de ata e fruta-do-conde (Figura 1) e em inglês conhecida como custard apple e sugar apple. Apresenta polpa branca ou amarela, com aroma agradável, muito doce, o que a torna importante para o consumo da fruta fresca e para a industrialização, sendo apropriada para elaboração de bebidas fermentadas e muito aceita na fabricação de sorvetes. Os plantios mais organizados de pinha estão localizados atualmente, no oeste do Estado de São Paulo e interior da Bahia, Pernambuco e Alagoas. De acordo com KAVATI (1997), a situação atual de produção desta fruta no Brasil a coloca como a principal da família, sendo importante em vários estados do Nordeste e em São Paulo. Boa parte da produção brasileira provem de plantas de pés francos, ou seja mudas obtidas por sementes, praticamente inexistindo variedades melhoradas.

Estudos anteriores (LIAO et alii, 1983) apresentaram-na como um fruto climatérico, cuja maturação em condições ambientais (20-25°C) e 80% de umidade relativa se processa de forma muito rápida, de 3-5 dias após a colheita, ocorrendo mudanças de textura e aroma, com conseqüente perda de aspecto e qualidade. O critério utilizado para colheita do fruto da pinha é o afastamento dos carpelos e coloração verde amarelada dos tecidos intercarpelares.

Apesar da crescente demanda pelos frutos de pinha (*Annona squamosa* L.), tanto para consumo “in natura” quanto para a indústria, existe escassez de conhecimentos sobre sua composição química, caracterização bioquímica e fisiologia de pós-colheita.



**Figura 1. *Annona squamosa* L. : pinha, ata ou fruta-do-conde.**

Dados sobre as propriedades e composição química de polpa de pinha estão apresentadas na Tabela 1. Deste modo, a busca de resultados para o aproveitamento industrial da mesma, assim como a aplicação de métodos eficientes na pós-colheita, tendo em vista sua alta perecibilidade, são necessárias. Há um grande mercado potencial para exportação da pinha “in natura”, porém um dos obstáculos a ser vencido é a facilidade de escurecimento enzimático que a fruta apresenta, sendo este catalisado pela enzima polifenoloxidase (PPO), ilustrado na Figura 2. A PPO catalisa a reação oxidativa por sua habilidade em utilizar o oxigênio molecular durante a oxidação de substratos fenólicos produzindo cor escura (MAYER, 1987).

**Tabela 1. Propriedades e composição química da polpa de pinha (*Annona squamosa* L.).**

<b>Propriedades</b>	
pH	5,2-6,1
Acidez	0,29-0,14
°Brix	29,0-33,0
<b>Composição química (%)</b>	
Umidade	70,0
Proteínas	2,2
Açúcares redutores	14,5
Açúcares não redutores	4,9
Extrato etéreo	0,2
Cinzas	0,9

Fonte: GUZMAN et alii (1985)



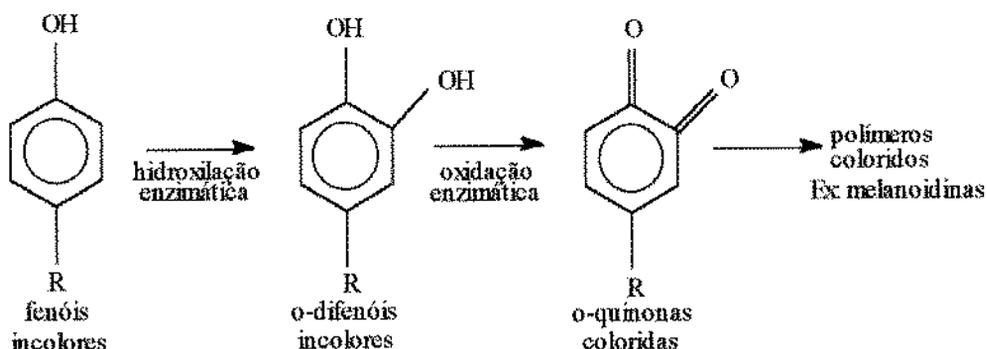
**Figura 2. Ação da enzima polifenoloxidase em polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) congelada.**

MAYER & HAREL (1979) concluíram que a grande importância das polifenoloxidasas está baseada no fato de que as propriedades de palatabilidade e resistência são modificadas pela presença de enzimas oxidativas de plantas.

Alguns estudos enfatizam as características bioquímicas, concentração e intensidade de escurecimento da enzima durante o amadurecimento de frutas e hortaliças após colheita e nos diferentes estágios de desenvolvimento após a floração; outros abrangem o controle do escurecimento enzimático, a especificidade do substrato, extração, purificação e sua caracterização (WISSEMANN & LEE, 1981, MAYER, 1987, NICOLAS, 1994, FUJITA et alii, 1995; OKTAY et alii, 1995).

O período de utilização de frutas e hortaliças frescas, pode ser limitado pelo escurecimento enzimático durante a pós-colheita, manuseio e processamento. As consequências desse efeito são: mudanças na cor, transformações indesejáveis no aroma e sabor e perdas nutricionais (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Denomina-se escurecimento enzimático a transformação dos compostos fenólicos em polímeros coloridos, freqüentemente marrom ou negro.

Dois tipos de reações catalisadas pela PPO são hidroxilação de monofenóis para orto-difenóis devido à atividade de cresolase (E.C. 1.14.18.1) e a oxidação de orto-difenóis devido à atividade de catecolase (E.C. 1.10.3.2). As fases de sua transformação são as seguintes:



O escurecimento enzimático ocasiona importantes problemas de coloração com algumas frutas e hortaliças, em particular quando os tecidos dos vegetais são injuriados ou danificados por golpes durante o processo de descascamento, corte, trituração para preparação de sucos, congelamento, desidratação e descongelamento (CHEFTEL & CHEFTEL, 1976).

Nas reações de escurecimento enzimático de frutas, observa-se que as oxidações de compostos fenólicos se devem à ação das polifenoloxidasas, que na presença de oxigênio, são transformados em quinonas. Estas quinonas coloridas participam, posteriormente, das reações de polimerização para dar origem às melanoidinas, caracterizadas pelo aparecimento de uma coloração marrom escura na superfície das frutas.

Portanto, três componentes são indispensáveis a este tipo de reação: a enzima, que requer a presença de cobre (grupo prostético) podendo ser mono ou divalente, os substratos fenólicos e o oxigênio molecular. Dentre os compostos naturais mais susceptíveis a esse tipo de reação se destacam o catecol, a tirosina, os ácidos clorogênico, caféico, gálico, ascórbico, a hidroquinona, as antocianinas, os flavonóides, etc.

O escurecimento enzimático pode ocorrer durante o desenvolvimento natural da fruta ou quando esta sofre alguma avaria no tecido. O escurecimento enzimático pela ação da polifenoloxidase quando ocorre danos ao tecido do fruto ou hortaliça é de grande importância quando se deseja obter um produto comercial congelado, uma vez que esse processo não inativa as enzimas responsáveis pela reação.

O problema requer alguma atenção, uma vez que o escurecimento enzimático geralmente é acompanhado por mudanças na cor, no aroma e no valor nutritivo, que depreciam grandemente a qualidade do produto final. Industrialmente, o controle das oxidações pode ser realizado com os seguintes métodos: (a) Remoção do oxigênio, elemento indispensável às reações enzimáticas oxidativas; (b) emprego de inibidores tais como: dióxido de enxofre, tanto na forma de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), como na forma gasosa ( $\text{SO}_2$ ) ou de ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ). O cloreto de sódio também pode inibir o escurecimento enzimático; (c) adição de antioxidantes como: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico e compostos que contenham sulfidril; (d) metilação enzimática do substrato da polifenoloxidase. O tratamento dos tecidos das plantas com catecol-o-metiltransferase e um metil doador, como iodeto de adenosil-metionina, bloqueia completamente a reação de escurecimento em pH fracamente alcalino. O

emprego do calor deve ser efetuado de tal modo que inative completamente as enzimas com o mínimo de degradação do produto. Este método é utilizado para sucos, purês de frutas e outros produtos. O tempo exigido para completa inativação depende da quantidade de enzima presente na fruta e da presença ou não de polpa durante o tratamento.

O presente trabalho teve como objetivo estudar as características bioquímicas da polifenoloxidase encontrada na polpa de pinha, tanto na enzima parcialmente purificada como após purificação através de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular, tendo em vista que a enzima da polpa desta anonácea não ter sido ainda estudada. Foram estudadas as condições ótimas de atividade, estabilidade, inativação e o efeito de compostos inibidores visando o aproveitamento comercial de polpa congelada de pinha. Estudou-se também a ação da PPO de pinha sobre diferentes substratos visando a aplicação da enzima para melhoria de sabor em alimentos processados, como exemplo a oxidação de compostos fenólicos indesejáveis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Polifenoloxidase (PPO) e sua importância

A enzima PPO é encontrada na maioria das plantas, estando presente particularmente em altas concentrações em batatas, pêssegos, maçãs, peras, cogumelos, bananas, abacate e berinjela (ESKIN et alii, 1971; VAMOS-VIGIÁZÓ, 1981; ZAWISTOWSKI et alii, 1991 e NICOLAS, 1994). O termo “polifenoloxidases” o qual é comumente utilizado, se refere a muitas enzimas cuja principal característica é sua capacidade para utilizar oxigênio molecular durante a oxidação de compostos fenólicos. A enzima tem recebido nomes diferentes, associados com o substrato de atuação. As polifenoloxidases podem ser divididas em dois grupos principais, relacionados com a especificidade do substrato. Catecoloxidase ou o-difenol; é uma oxigênio oxireductase (o-DPO), responsável por duas reações diferentes, primeiramente hidroxilação de um monofenol freqüentemente referida como atividade de cresolase (EC 1.14.18.1) e oxidação dos o-difenóis quando se refere à atividade de catecolase (EC 1.10.3.2), também denominada de fenolase ou polifenoloxidase. Lacase (EC 1.10.3.1) ou p-difenol oxigênio oxireductase, responsável pela oxidação de numerosos substratos, podendo oxidar p-difenol (ESKIN, 1990).

A localização da enzima na célula vegetal depende da espécie, idade e grau de maturidade. A distribuição da atividade da PPO em diferentes partes das frutas e hortaliças tem sido objetivo de pesquisa de diversos autores. Ao realizarem estudo sobre a atividade da PPO, VAMOS-VIGIÁZÓ & NÁDUDVARI-MARKUS (1982), verificaram que a distribuição da sua atividade enzimática nos tecidos se dá de forma não homogênea em vários cultivares de

pera e pêssegos, e que tal falta de uniformidade se deve à estrutura fibrosa do mesocarpo.

COSETENG & LEE (1987), reportaram sobre as reações de escurecimento em diferentes cultivares de maçãs, como sendo um processo complexo envolvendo vários fatores, demonstrando que em alguns cultivares estudados a atividade da PPO foi diretamente relacionada com o grau de escurecimento, enquanto que em outros foi relacionada com a concentração dos compostos fenólicos. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos compostos fenólicos demonstrou que o tipo de compostos em todos cultivares foram semelhantes e que nenhum, em particular, poderia ser responsabilizado pela diferenças observadas no escurecimento.

Segundo MACHEIX et alii (1990), três situações podem causar escurecimento em frutas. Primeiro, em poucos casos devido à evolução fisiológica relacionada com a maturação; segundo, por certas desordens às quais podem ocorrer durante o armazenamento a frio; e terceiro, por vários processos tecnológicos os quais envolvem injúria, esmagamento e extração. Os problemas podem aumentar com as colheitas com equipamentos mecânicos, empacotamento ou acondicionamento dos frutos, hortaliças e produtos de preparo rápido como vegetais cortados e polpas de frutas congeladas, havendo o contato entre os compostos fenólicos com predominância de localização em vacúolos e oxidação por enzimas localizadas no citoplasma. A tendência de uma fruta se tornar marrom (escura) resulta da ação de parâmetros os quais estão naturalmente envolvidos limitando o escurecimento e sua intensidade tais como: natureza, quantidade de substrato, atividade oxidativa da enzima, disponibilidade de oxigênio e compartimento da enzima e substrato.

## 2.2. Extração da enzima

O polietilenoglicol (PEG) é freqüentemente usado na obtenção de polifenoloxidase bruta em pó pela precipitação com acetona a baixa temperatura. De acordo com BADRAN & JONES (1965), o polietilenoglicol (PEG) foi preferido na extração da enzima devido à sua solubilidade em acetona. Outros polímeros têm sido usados com sucesso para remover fenóis, como resinas de troca iônica.

VÁMOS-VIGIÁZÓ (1981) relatou que três problemas podem interferir na extração de PPO de amostras de plantas e separação dos compostos fenólicos endógenos: latência, solubilização da enzima e prevenção da oxidação e subsequente polimerização e precipitação da enzima. A latência, segundo o autor, é o menor problema com PPO de plantas, pois em muitas espécies a enzima está presente na forma ativa. A enzima latente ligada, pode ser ativada e ao mesmo tempo solubilizada por cafeína-benzoato de sódio.

KAHN (1977) trabalhando com preparações de PPO bruta e parcialmente purificada de abacate conseguiu ativá-las com dodecil sulfato de sódio (SDS), ocorrendo dissociação da forma ativa. A solubilização foi realizada com detergentes como Tween-80 ou Triton X-100, que são eficientes para retirar cloroplastos. A grande dificuldade na obtenção da preparação da PPO solúvel consiste em prevenir oxidação enzimática de fenóis e formação de pigmentos durante a pulverização e extração do material de plantas. Pigmentos podem precipitar a enzima e torná-la insolúvel, podendo ocorrer reação de inativação irreversível da enzima. Para minimizar esses problemas, todos os passos de extração devem ser conduzidos em temperaturas abaixo de 0°C, onde não ocorre

nenhuma reação. Na pulverização e homogeneização são utilizados nitrogênio líquido ou nitrogênio atmosférico.

ZAWISTOWSKI et alii (1991) relataram que a extração de PPO de origem vegetal está associada com muitos problemas, tornando seu isolamento extremamente difícil, devido à ocorrência simultânea de enzima e substrato, lado a lado em células intactas. A PPO está localizada exclusivamente nos plastídeos dos tecidos de plantas saudáveis. Em contraste, a maioria dos compostos fenólicos em plantas superiores está localizada nos vacúolos distintos dos plastídeos. Quando o conteúdo dos plastídeos e vacúolos são misturados, seguido de ruptura celular, a organização interna é prejudicada e como consequência, compostos fenólicos endógenos são oxidados para quinonas e são polimerizados até polifenóis responsáveis pelo escurecimento enzimático. Polifenóis apresentam ligações cruzadas com as moléculas de proteínas incluindo PPO, por interação hidrofóbica e pontes de hidrogênio produzindo agregados e ou precipitados (LOOMIS, 1974; McMANUS et alii, 1985).

Entretanto, os fenóis são facilmente transformados em quinonas, podendo reagir com grupamentos nucleofílicos como SH e NH<sub>2</sub> da proteína, formando produtos covalentes (MATHEIS & WHITAKER, 1984). Desta forma, os compostos fenólicos podem inativar a PPO ou reagir com proteínas e produzir múltiplas formas adicionais às quais não estão presentes no tecido intacto (SMITH & MONTGOMERY, 1985).

De acordo com o exposto, é importante selecionar cuidadosamente métodos de extração e isolamento de PPO os quais minimizem ou eliminem algumas mudanças na estrutura e atividade da enzima durante a purificação.

Muitos cuidados têm sido tomados para minimizar a interação de compostos fenólicos e proteínas. A polivinilpirrolidona insolúvel (PVP) tem sido utilizada para remover os fenóis durante a separação de frações subcelulares e nos passos iniciais da purificação da enzima de tecidos de plantas. No entanto, conforme SMITH & MONTGOMERY (1985), esta técnica tem desvantagem por requerer grande quantidade de PVP e pH ácido durante a extração, podendo inibir a atividade da PPO. Portanto, para prevenir a oxidação de fenóis e a posterior polimerização durante a extração da enzima, é possível remover os substratos do meio por ligação com um polímero insolúvel. Um dos aditivos mais largamente utilizado é o polivinilpirrolidona (PVP), um forte acceptor de próton em pH neutro ou ácido, onde os fenóis não são ionizados. Ao mesmo tempo, PVP é inibidor competitivo da PPO, podendo ser eliminado por lavagem da preparação de enzima.

KAHN, (1975), FLURKEY & JEN (1978), ODA et alii (1989) entre outros pesquisadores, relataram que a precipitação da enzima com acetona após a extração com tampão é um método muito utilizado como passo inicial no isolamento da PPO, demonstrando que a precipitação com acetona não produz artefatos e a atividade encontrada pode ser em torno de 20 vezes maior, como foi verificado em pêssegos e abacate. Entretanto, com folhas de chá a PPO não pode ser extraída como pó cetônico, perdendo 40% de sua atividade (GREGORY & BENDALL, 1966).

Muitas vezes, a extração com tampões apropriados precedem a etapa de precipitação com acetona. Uma enorme variedade de tampões podem ser usados para extração, cujos valores de pH variam com a origem da enzima, mas geralmente são ajustados para garantir um meio fracamente alcalino. O pH do

tampão pode influenciar na forma de obtenção da enzima. JANOVITZ-KLAPP et alii (1989), para prevenir inativação durante a extração da PPO, utilizaram agente redutor ou acoplador de quinonas e inibidores reversíveis de enzimas, incorporados ao meio, como o ácido ascórbico, cisteína, metabissulfito de sódio e DIECA (dietil-ditiocarbamato de sódio).

WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990a,b) estudaram a extração e caracterização parcial da PPO de morango, com o objetivo de entender a perda de coloração devido à degradação da antocianina. Desenvolveram um procedimento para a extração da PPO de morango usando agentes protetores poliméricos como, polivinilpirrolidona (PVP), Dowex AG 2-X28 e Amberlite XAD.

NICOLAS (1994) relatou que dois problemas são encontrados na otimização das condições de extração da PPO, sendo eles a solubilização completa da membrana ligada e proteção contra a oxidação de compostos fenólicos durante e após a extração. Para muitos casos, a extração com atividade total necessita do uso de detergentes, tais como: Triton X-100, Triton X-114 ou SDS. Porém, o uso de detergentes pode causar alguns problemas durante a posterior purificação, resultando em modificações nas propriedades da enzima. O segundo problema aparece da presença simultânea de quinonas no extrato bruto da enzima e seus substratos fenólicos, tornando-se essencial evitar ou minimizar a formação de quinonas que reagem com proteínas. Tais reações podem resultar na perda de atividade e formação de novas formas enzimáticas artificiais através de ligações covalentes, hidrofóbicas e iônicas entre proteínas, compostos fenólicos e quinonas. Os métodos para prevenir as reações da PPO com fenóis incluem o uso de agentes de ligação com o fenol como o polietilenoglicol (PEG), polivinil (poli)

pirrolidona (PVP e PVPP) solúvel e insolúvel e resinas hidrofóbicas e de troca-iônica. Entretanto, como todas as plantas têm diferentes tipos e quantidade variáveis de fenóis, não existe um método universal efetivo para remover fenóis. No entanto, é admissível a adição de compostos ao meio de extração, para prevenir a formação de quinonas ou prendê-las tão logo sejam formadas. Os compostos mais frequentemente usados são dietilcarbamato (forte quelante do cobre) e agentes redutores como ácido ascórbico, mercaptoetanol e cisteína. Finalmente, inibidores de proteases podem ser adicionados para prevenir a formação de múltiplas formas artificiais de PPO por enzimas proteolíticas endógenas. Em extratos brutos de PPO de preparados de maçã foram usados PEG, PVP, cisteína e ácido ascórbico para evitar os problemas citados acima.

### **2.3. Purificação e caracterização bioquímica**

VAMOS-VIGYÁZÓ (1981) relatou que existem vários métodos para a purificação de extratos brutos de PPO, que variam de acordo com a fonte da enzima e o grau de pureza a ser obtido. A precipitação da enzima pode ser realizada pela adição de sulfato de amônio com diferentes saturações e os outros passos, pela utilização de cromatografia por filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 ou G-200, cromatografia de troca-iônica com DEAE-Celulose ou DEAE-Sephadex, ou combinações destes métodos com diálises ou cromatografia em Sephadex G-25, para remoção de impurezas de baixo peso molecular. Em alguns casos, um ou mais métodos são repetidos como por exemplo, no procedimento de purificação da PPO de cogumelo, onde existe a necessidade de precipitação por duas vezes com sulfato de amônio, purificar através de cromatografia por adsorção com fosfato de cálcio seguida por cromatografia de adsorção com hidroxiapatita. Com a enzima de pêssegos e

cerejas foram utilizadas repetidas cromatografias em DEAE-Celulose e DEAE-Celulose e DEAE-Sephadex respectivamente, bem como, tem sido usada também a purificação por cromatografia hidrofóbica em coluna de Fenil-Sepharose Cl-4B.

TONO et alii (1986) purificaram polifenoloxidasas de peras japonesas utilizando coluna de DEAE - Toyopearl 650M, obtendo uma purificação de 61,0 vezes, e Sephadex G-100 com 93 vezes de purificação. Esta enzima apresentou melhor especificidade por substratos o-difenóis como ácido clorogênico e L-epicatequina, não oxidando monofenóis. A enzima apresentou atividade ótima em pH 4,2 quando a análise foi realizada com substratos o-difenóis como ácido clorogênico e catecol. Esta enzima foi considerada estável em altas temperaturas após tratamento a 80°C durante 30 minutos.

FUJITA & TONO (1988) purificaram e verificaram as propriedades da PPO de berinjela (*Solanum melongena*). A purificação foi realizada pelo fracionamento com sulfato de amônio, por cromatografia em colunas de DEAE-Celulofine e Toyopearl, com filtração em Sephadex G-100. A purificação da PPO de berinjela foi realizada em seis etapas e entre elas utilizou-se DEAE - Toyopearl 650M e Sephadex G-100 obtendo-se purificação de 15,3 e 111,0 vezes respectivamente. A enzima purificada oxidou rapidamente o ácido clorogênico, apresentando pH ótimo de 4,0 e sendo completamente inativada após tratamento a 75°C por 30 minutos. Metabissulfito de sódio, cianeto de potássio e fluoreto de sódio foram os inibidores que mais atuaram.

A PPO de morango foi extraída e caracterizada parcialmente por WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990b), apresentando diferença no

pH ótimo e na temperatura de estabilidade da máxima atividade da enzima de acordo com o substrato utilizado, sendo que o pH ótimo para catecol e 4-metilcatecol foram 5,5 e 4,5, respectivamente. Para a estabilidade térmica da PPO de morango, a perda da atividade da enzima com o substrato 4-metilcatecol foi mais rápida do que com catecol em todas as temperaturas. A PPO de morango não apresentou nenhuma atividade de cresolase, no entanto, apresentou alta atividade com D-catequina, composto naturalmente presente no fruto, indicando o alto potencial da ocorrência de escurecimento enzimático. Os inibidores mais efetivos neste trabalho foram dietilcarbamato, KCN, ditioneitol e metabissulfito de sódio. Para WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990a,b), a purificação da PPO de morango foi realizada através da cromatografia de troca iônica utilizando resina de DEAE-Celulose. As isoenzimas de PPO purificadas foram caracterizadas através de eletroforese e seu peso molecular determinado por filtração em gel. Efeitos do pH, temperatura, substratos e inibidores sobre a atividade da enzima também foram relatados.

FUJITA et alii (1991) estudaram a PPO presente na alface (*Lactuca sativa* L.) a que foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Os autores relataram a purificação da PPO de alface em seis etapas e entre elas utilizaram DEAE - Toyopearl 650M obtendo uma purificação de 13,0 vezes e com Toyopearl HW 55F, 69,7 vezes de purificação. A enzima purificada oxidou rapidamente os substratos ácido clorogênico e epicatequina, apresentando pH ótimo de 4,5 e 7,8, respectivamente.

ZAWISTOWSKI et alii (1991), em ampla revisão bibliográfica, o pH ótimo de atividade de PPO de muitas fontes de plantas, incluindo maçã, pera,

pessego, cereja, banana, abacate, batata, cogumelo, trigo e outros, está geralmente entre 5,0 e 7,0, podendo ocorrer exceções, bem como aparecem dois pH ótimos como no caso da uva, por exemplo, pH 5,0 e 7,3 (HAREL & MAYER, 1971) e no trigo pH 5,3 e 5,9 (INTERESSE & RUGGIERO, 1980). Frequentemente a PPO é inativada em pH abaixo de 4,0, resultando num método de controle do escurecimento enzimático pelo abaixamento do pH. Foi demonstrado que o perfil do pH de atividade pode variar com o cultivar, estágio de maturação do fruto ou vegetal, pureza da enzima, natureza dos compostos fenólicos e formas de isoenzimas. Em relação à temperatura a que a enzima é submetida, dependendo da fonte, a PPO tem baixa termoestabilidade e varia com os mesmos fatores que influenciam o pH ótimo. A temperatura ótima da PPO varia entre 10°C e 40°C. Tratamentos térmicos de curta duração a 70-90°C são suficientes para reduzir substancialmente ou eliminar completamente a atividade de PPO em produtos vegetais, porém, foi relatado que a enzima é relativamente estável quando armazenada em temperaturas abaixo de zero. Em relação à especificidade do substrato as PPO de plantas superiores e fungos, podem agir em muitos compostos fenólicos, podendo ser em mono ou o-difenóis. Tem sido encontrada grande diferença nos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) para os mesmos substratos, dependendo da fonte de enzima. Os substratos fenólicos mais importantes da PPO, naturalmente encontrados em frutas e vegetais são catequinas, ésteres do ácido cinâmico como ácido clorogênico, 3,4-dihidroxifenilalanina (dopa) e tirosina. A afinidade da PPO de várias fontes de plantas por vários substratos fenólicos é relativamente baixa, como pode ser evidenciado pelos valores de  $K_m$  que estão geralmente entre 0,5-10,0mM. As afinidades mais altas foram valores de 0,01-0,02mM de substrato, relatadas por MAYER & HAREL (1979) com PPO de bananas, e por BATISTUTI & LOURENÇO (1985) em PPO de batatas.

MURATA et alii (1992) purificaram a PPO de maçãs por fracionamento com sulfato de amônio a 70% e cromatografia em colunas. Na primeira etapa, a enzima foi purificada 15,6 vezes após cromatografia em DEAE-Toyopearl em seguida foi obtido purificação de 131,0 e 470,3 vezes respectivamente, após cromatografia em Toyopearl HW55 e DEAE-Toyopearl 650M. A enzima apresentou atividade ótima em pH 4,0 e estabilidade na faixa de pH 6,0-8,0. A estabilidade térmica foi medida pela atividade residual após tratamento por 5 ou 30 minutos, sendo que a PPO purificada foi muito instável ao tratamento térmico quando incubada a 30°C durante 5 minutos, tendo sido observado perda completa da atividade a 50°C.

SIDDIQ et alii (1992) caracterizaram a polifenoloxidase de cinco cultivares de ameixas, sendo que a cultivar Stanley apresentou maior atividade de PPO. A atividade da enzima bruta foi 3,5 vezes maior na polpa do que na casca do fruto. O pH e temperatura ótimo de atividade foram de 6,0 e 20°C, respectivamente. Entre os substratos, 4-metilcatecol foi oxidado mais rapidamente, contudo, catecol dopamina, pirogalo e ácido caféico foram bons substratos. A enzima foi fortemente inibida por metabissulfito de sódio, L-cisteína e ácido ascórbico.

NICOLAS (1994) relata que inúmeros trabalhos foram desenvolvidos com relação à purificação da PPO e somente poucos métodos utilizados tem purificado a enzima com aparente homogeneidade, provavelmente devido à dificuldade de se encontrar na preparação, extratos brutos ativos e estáveis da enzima. A etapa inicial mais frequentemente usada é a precipitação fracionada com sulfato de amônio seguida da purificação que envolve uma ou mais etapas cromatográficas. Além dos métodos cromatográficos mais rotineiros de separação

como adsorção, filtração em gel e troca-iônica, outros como, cromatografia hidrofóbica, focalização isoeétrica e imobilização com metais quelantes têm sido aplicados na purificação de PPO de várias origens. A PPO da casca de maçã foi parcialmente purificada usando cromatografia em coluna de DEAE-Celulose, coluna de adsorção por fosfato de cálcio e em coluna hidrofóbica, usando-se o córtex do fruto, e a PPO do fruto inteiro foi purificada através de filtração em gel. Após a purificação, a amostra foi submetida à eletroforese e o número de isoformas variou de uma, duas ou três, as quais HAREL & MAYER (1973) demonstraram ser devido a vários graus de subunidades agregadas à mesma enzima.

SIDDIQ et alii (1994) estudaram a polifenoloxidase de peras “bosc” e “red”, determinando suas propriedades bioquímicas com o objetivo de pesquisar sua inibição. Neste estudo verificou-se que a atividade de PPO, a concentração dos compostos fenólicos totais e ácido clorogênico foi influenciada pelos diferentes cultivares. O pH e a temperatura ótimo de atividade da PPO de peras “bosc” e “red”, foram 5,0 e 5,5, e 20°C e 23°C, respectivamente. Os compostos 4-metilcatecol, catecol e dopamina foram bons substratos para PPO de ambos cultivares de peras. Ácido ascórbico, L-cisteína, metabissulfito de sódio e tiouréia foram inibidores efetivos.

FUJITA et alii (1995) purificaram e caracterizaram bioquimicamente a PPO de repolho (*Brassica oleraceae* L.), utilizando nas duas últimas etapas de purificação a cromatografia em filtração em gel em colunas de Toyopearl HW 55F obtendo-se 401,5 vezes de purificação. Para a medida de atividade foi usado floroglucinol como substrato. A enzima purificada foi considerada homogênea, por produzir uma única banda em eletroforese em gel de poliacrilamida-PAGE e

SDS-PAGE, sendo seu peso molecular estimado ao redor de 39.000 daltons em filtração em gel e 40.000 daltons em SDS-PAGE. O pH e a temperatura ótimo de atividade relatados foram de 7,6 e 40°C, respectivamente. A atividade da enzima foi testada quanto ao efeito de inibidores, apresentando inibição com dietilditiocarbamato de sódio, cianeto de potássio, EDTA e sulfato de cobre. As etapas de purificação da PPO de repolho foram: fracionamento com sulfato de amônio 40 e 70% , diálise contra tampão fosfato 0,001M pH 7,0 e cromatografia em colunas de DEAE-celulose , CM-Sephadex C50, Toyopearl 650M e Toyopearl HW 55F.

OKTAY et alii (1995) purificaram parcialmente PPO de maçã “Amasya” através da precipitação com sulfato de amônio e diálise. A enzima desta fruta apresentou diferentes valores de pH e temperatura ótimo de atividade com diferentes substratos, sendo de 7,0 e 18°C para catecol, 9,0 e 56°C para 4-metilcatecol, 8,6 e 58°C para pirogalol, 6,6 e 70°C para L-dopa. O inibidor que apresentou maior eficiência foi L-cisteína. Na separação por eletroforese três isoenzimas foram detectadas com os substratos catecol e L-dopa.

CHAZARRA et alii (1996) em recente estudo, apresentaram a purificação parcial e a caracterização da polifenoxidase latente em alface “iceberg”, usando duas fases fracionadas com Triton X-114. A PPO latente foi caracterizada e sua ativação foi efetuada com dodecil sulfato de sódio (SDS). A estabilidade da enzima bem como a caracterização relacionada com a temperatura e pH de atividade foram estudados na presença e ausência de SDS. A PPO foi cineticamente caracterizada com dois substratos fenólicos, 4-ter-butilcatecol e ácido clorogênico em ambas as formas, latente e ativada.

SAKIROGLU et alii (1996) purificaram e caracterizaram a enzima PPO de Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.). A enzima foi extraída e purificada através da precipitação com sulfato de amônio, diálises, filtração em gel e cromatografia de troca-iônica com DEAE-Sephacel. Porém, a amostra de enzima obtida após precipitação com sulfato de amônio e diálise foi usada na caracterização da PPO. Dentre os substratos estudados, o que apresentou maior especificidade para a PPO da fruta Dog-rose foi 4-metilcatecol e atividade atividade muito baixa com p-cresol, apresentando valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 8,64mM e 431,96U/ml/min para 4-metilcatecol e 7,41mM e 41,66U/ml/min para p-cresol. No estudo, os autores relataram o mesmo pH ótimo de 8,5 com os substratos 4-meticatecol e catecol, com temperatura ótima de 20°C e 25°C, respectivamente.

Vários pesquisadores têm observado grande diferença nos valores de pH ótimo de atividade para PPO de plantas com seus respectivos substratos de maior especificidade. O pH ótimo da PPO de cerejas (BENJAMIN & MONTGOMERY, 1973) e goiabas (AUGUSTIN et alii,1985) usando pirocatecol foi 7,0 e 7,2, respectivamente. A PPO de trigo tem dois valores pH ótimo de atividade, sendo de 5,3 e 5,9 com 4-metilcatecol (INTERESSE et alii, 1980). A PPO de pera japonesa (TONO et alii, 1986) tem pH ótimo de 4,2 para oxidação do ácido clorogênico. O pH ótimo encontrado para a PPO purificada de berinjela foi 4,0 com ácido clorogênico, para a enzima bruta, pH ótimo de atividade foi de 5,0 (KNAPP, 1965). ROUDSARI et alii (1981) verificaram que a PPO purificada de berinjela apresentou pH ótimo de 6,4 com catecol como substrato. A diferença entre o pH ótimo de atividade da PPO de berinjela bruta e purificada pode ser devido à mudança de formas de isoenzimas de PPO durante a purificação. A grande variação de valores de pH encontrados na literatura se

deve ao cultivar, estágio de maturação, grau de purificação, natureza dos substratos fenólicos e forma de isoenzimas. Estudos sobre o efeito do pH na atividade da PPO têm demonstrado que a enzima é inativada em valores de pH abaixo de 4,0 sendo portanto, um meio para controle da reação de escurecimento dos vegetais através do abaixamento do pH (ZAWISTOWSKI et alii, 1991).

Os estudos descritos na literatura relacionados com o grau de purificação da PPO utilizando cromatografia de troca-iônica e filtração em gel pelas resinas descritas anteriormente mostram resultados diferenciados dependendo da origem da planta, e a forma como a PPO é extraída, podendo influenciar nos resultados finais.

#### **2.4. Inibidores**

Segundo MAYER & HAREL (1979) os inibidores que atuam diretamente sobre a enzima polifenoloxidase podem ser dividida em dois grupos de acordo com a forma de ação. O primeiro grupo inclui inibidores que interagem com íon cobre e o segundo aqueles que atuam no sítio ativo. Os inibidores que atuam como quelante ou através de interação com íon metálico incluem azida, cianeto, monóxido de carbono, tropolene e dietilcarbamato de sódio os quais são menos específicos para o cobre. No segundo grupo, encontram-se ácidos aromáticos como carboxílico, benzóico e cinâmico, considerados como inibidores competitivos da PPO, devido à similaridade estrutural com os substratos fenólicos, o que muitos autores indicam como uma inibição dependente do substrato usado, podendo ser competitivo ou não competitivo ou ambos.

De acordo com LERCH (1981) a velocidade de inativação da PPO é dependente do pH, temperatura, concentração da proteína, força iônica e natureza e concentração da cor. A foto-oxidação se processa por mecanismo do radical livre, envolvendo oxigênio ativo o qual oxida aminoácidos chaves da enzima. O autor sugeriu também, que a inativação da tirosinase é causada por ligação de  $\text{OH}^-$  pela interação do  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{OH}^-$ , o qual pode oxidar a His-306 do sítio ativo da enzima e levar à perda de atividade.

Segundo VAMOS-VIGIÁZÓ (1981), a inibição da PPO e a prevenção do escurecimento enzimático são frequentemente tratados com um único objetivo. Entretanto, o escurecimento pode ser prevenido não somente pela inativação da enzima, mas também por eliminar um ou dois substratos necessários para a reação ( $\text{O}_2$  e os polifenóis), ou por reação com produtos da ação da enzima para inibir a formação de compostos coloridos, produzidos em etapas secundárias e reações não enzimáticas. Em muitos casos, é difícil distinguir os diferentes mecanismos fundamentais da ação de inibição de escurecimento e muitos inibidores atuam simultaneamente sobre a enzima, substratos ou produtos.

Para IKEDIABI & OBASUYI (1982), a inibição da PPO de inhame por compostos com grupos tióis pode ser devido à reação de adição com as quinonas, para formar tioésteres que combinam com o cobre requerido para a atividade enzimática devido a atuação como agente redutor. O ácido ascórbico age como antioxidante e inibe a reação por redução de quinonas, inicialmente formadas pela ação da enzima, antes que as quinonas se polimerizem por reações secundárias levando ao escurecimento. A PPO de inhame não apresentou praticamente inibição com o uso de EDTA, demonstrando que a estabilidade do

complexo de cobre com a enzima é mais forte do que o complexo de cobre com o EDTA, na análise em pH 6,8.

LANGDON (1987), recomendou colocar frutas e vegetais em banho com mistura de solução ácida (ácido cítrico e ascórbico mais sorbato de potássio para inibir crescimento de leveduras e fungos) no controle de escurecimento enzimático. O ácido cítrico exerce um duplo efeito inibitório devido ao abaixamento do pH e por ser quelante com o cobre, sendo estabilizado pelo ácido ascórbico, evitando a oxidação. Este tipo de tratamento é bastante efetivo quando combinado com o empacotamento das frutas em atmosfera modificada, onde o O<sub>2</sub> é removido.

MACHEIX et alii (1990) relataram que a formação de quinonas catalisadas por fenoloxidasas, é reversível na presença de agentes redutores tais como ácido ascórbico, entretanto a subsequente polimerização é uma reação não enzimática e irreversível.

ZAWISTOWSKI et alii (1991) demonstraram que o estudo da inibição de PPO e o controle do escurecimento enzimático tem sido objetivo de interesse devido as mudanças provocadas nos alimentos processados. Os autores se referem ao escurecimento enzimático como prejudicial à aparência, propriedades organolépticas, qualidade nutricional e sanidade dos produtos. Uma grande quantidade de compostos podem inibir a PPO, entretanto, a eficiência no controle das reações de escurecimento, depende da natureza e concentração do inibidor, fonte da PPO, disponibilidade de substratos (O<sub>2</sub> e fenóis), pH e temperatura (MAYER & HAREL, 1979).

NICOLAS (1994) sugere que há grande necessidade de estudos da ação enzimática na mistura de fenóis e de reações não enzimáticas com formação de o-quinonas. Estes estudos fornecem melhor entendimento da relação entre a intensidade do escurecimento e a composição da fruta ou vegetal. Estudos adicionais são requeridos para encontrar novos compostos inibidores, otimizando tratamentos com a combinação de compostos já existentes, verificando sua sanidade e demonstrando sua disponibilidade comercial, afim de obter substitutos para os sulfitos.

O uso de inibidores do escurecimento em alimentos processados está restrito a requerimentos de não toxidez, salubridade, efeito no sabor, aroma, textura, etc. Bons resultados têm sido obtidos com misturas de compostos químicos. O modo de ação pode variar, e em muitos casos existe a dificuldade de se determinar um simples mecanismo específico da ação de um inibidor. Por exemplo, alguns inibidores agem simultaneamente sobre a enzima, substrato e alguns produtos. Entretanto, ao lado de alguns economicamente disponíveis, o uso de inibidores de escurecimento efetivos em alimentos processados é restrito devido aos problemas de toxicidade, efeito no sabor, textura e sanidade do alimento produzido. Com relação a ação do inibidor diretamente sobre a enzima, tem sido discutido de várias formas. A PPO é uma metaloproteína podendo ser inibida por agentes quelantes tais como: cianeto, monóxido de carbono, dietil-ditiocarbamato de sódio (DIECA), tropolene, 2-mercaptobenzotiazol, azida e EDTA (MAYER & HAREL, 1979 ; VAMOS-VIGIÁZÓ, 1981; KANH & ANDRAWIS, 1985). Os sulfitos (sulfito de sódio, bissulfito de sódio e metabissulfito de sódio e potássio) são inibidores efetivos de PPO, mas são frequentemente re-examinados em relação à saúde pública devido ao fato de que

algumas pessoas, principalmente os asmáticos, apresentarem sintomas alérgicos por estes reagentes.

Recentemente, ARSLAN et alii (1997) relataram forte inibição da PPO de *Allium sp* por ácido ascórbico, 2-mercaptoetanol e metabissulfito de sódio. DAS et alii (1997) inibiram a PPO de abacaxi da Índia pela adição de ácido ascórbico, L-cisteína e metabissulfito de sódio e ARSLAN et alii (1998) obtiveram inibição da PPO de damasco (*Prunus armeniaca* L.) com do ácido ascórbico, 2-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e tiouréia.

Em 1998, JIANG & FU extraíram PPO de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) e estudaram os efeitos da combinação de glutatona e ácido cítrico no controle do escurecimento do fruto, inibindo 80 a 85 % da enzima analisada.

## 2.5. Peso molecular

ANOSIKE & AYAEBENE (1981) estudando a PPO de inhame estimou o peso molecular da enzima em 115.000 daltons em coluna de gel Sephadex G-100. Os autores relataram que os pesos moleculares variam dependendo da fonte, método de extração e procedimento de determinação. Como a PPO é obtida de diferentes fontes, tem sido demonstrado estar presente em diferentes formas moleculares. O número destas formas depende da fonte da enzima e dos métodos aplicados para extração e separação da mesma.

VAMOS-VIGYÀZÒ (1981) relata alguns exemplos de enzimas, dando idéia da complexidade do problema do polimorfismo da PPO. A enzima PPO como é extraída de várias fontes, está presente em diferentes formas moleculares.

O número dessas formas dependem, portanto, da fonte na qual a enzima se encontra, do método aplicado na extração e na separação. Algumas das formas moleculares são devido ao fenômeno de associação-dissociação como pode ser visto por suas massas moleculares. O fenômeno tem sido atribuído à associação de vários graus de polimerização de subunidades similares, a várias combinações de diferentes subunidades, à mudança conformacional de uma proteína simples ou à combinação das três possibilidades mencionadas. Segundo o autor, as formas moleculares diferem em relação a especificidade do substrato, ao pH ótimo de atividade, temperatura de estabilidade e ação do inibidor. Muitos estudos partem da relação de atividade da enzima por reação de dehidrogenação e hidroxilação (catecolase : cresolase), demonstrando que em geral, somente parte de múltipla forma apresentam atividade de monofenóis. Tem sido estabelecido que a atividade de hidroxilação está associada ao alto grau de associação e requer pelo menos quatro subunidades para ocorrer. Entretanto, em pH alcalino as formas predominantes de massa molecular perdem mais suas atividades de hidroxilação, às quais são menos estáveis sob estas condições. Além destas formas, existem outras formas de massas moleculares idênticas, diferindo somente em propriedades eletroforéticas. Muitas apresentam formas monoméricas diferentes com diferentes pontos isoelétricos, podendo ser detectados por PAGE, como observado por HAREL & MAYER (1973) em PPO solúvel de batatas.

GOODENOUGH et alii (1983), JANOVITZ-KLAPP et alii (1989) e WANG et alii (1991), apresentaram resultados de pesos moleculares de PPO de maçã obtidos por filtração em gel, detectando um único pico de atividade com peso molecular de 26 kDa ou 46 kDa. Porém, no trabalho de WANG et alii (1991), foram observados pesos moleculares de 32, 39 e 77 kDa estimados por eletroforese. Muitos resultados inicialmente parecem ser controvertidos,

necessitando maiores estudos das propriedades moleculares das enzimas, para permitir o conhecimento do mecanismo fundamental de suas mudanças.

Segundo ZAWISTOWSKI et alii (1991), os pesos moleculares de múltiplas formas de PPO, determinadas por eletroforese com SDS ou filtração em gel, apresentam uma ampla faixa de valores de 12.000-400.000 daltons. Esses valores refletem a aparente multiplicidade da enzima, devido ao fenômeno de associação-dissociação, proteólise, bem como as técnicas e as condições dos solventes empregados na determinação do peso molecular, variando também dentro de uma mesma espécie com o período de colheita e condições de armazenamento das plantas em estudo.

## **2.6. Presença de cobre**

Para BENDALL & GREGORY (1963), a PPO para ser ativa necessita da presença do grupo prostético cobre e oxigênio. Algumas fontes de PPO de plantas apresentam o cobre monovalente, como em cogumelos e divalente no caso de batatas.

FLICK et alii (1977) estudaram a PPO de três variedades de berinjelas e a relação do teor de cobre e a atividade da enzima. Os autores constataram maior atividade enzimática quanto maior o teor de íons cobre.

VAMOS-VIGYÁZÓ (1981) em estudo de revisão, relatou que assume-se que o monômero tem massa molecular ao redor de 30.000 daltons e contém um átomo de cobre. ESKIN (1990), apresentou revisão onde o modelo proposto para a ação da PPO está no sítio de interação com o substrato fenólico, sendo que

o mono ou difenol está no centro binuclear do cobre. A unidade molecular funcional básica para enzima de fungos parece ser uma ligação simples da proteína com dois átomos de cobre por molécula, ligadas em parte por histidina.

De acordo com ROBINSON (1991), as polifenoloxidasas têm uma característica comum à todas elas. Essa característica é a presença dos átomos de cobre em cada centro ativo, na forma de um complexo binuclear  $E(\text{Cu}^{2+})$ , com uma distância de 0,6 nm entre os átomos, sendo classificadas como metaloenzimas contendo 0,2% de cobre elemento, que pode ser separado por diálise com EDTA (CHEFTEL & CHEFTEL, 1976)

## 2.7. Uso da PPO

MOTODA (1979) observou a formação de aldeídos, acetaldeídos, isobutialdeído, isovaleraldeído, 2-metilbutanal, metional e fenilacetoaldeído provenientes de aminoácidos como alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina e fenilalanina respectivamente, na presença de d-catequina e de polifenoloxidase purificada microbiana de *Alternaria tenuis* em extratos de chá, cacau e café.

JAIN & TAKEO (1984) demonstraram em ampla revisão sobre as enzimas do chá e seu papel no processamento, a importância da polifenoloxidase em relação ao desenvolvimento do sabor durante o processamento, devido às transformações bioquímicas pela presença da enzima nas folhas.

MAHANTA et alii (1993) estudaram a atividade específica da PPO e peroxidase, responsáveis pela formação de compostos escuros conhecidos como teoflavinas que ocorrem em chá preto. A maior atividade de ambas as enzimas foi

observada na laminação, resultado da injúria mecânica, levando à polimerização oxidativa (escurecimento enzimático) do chá preto fermentado.

BUCHELI & ROBINSON (1994), verificaram a contribuição da enzima no escurecimento enzimático, através da formação da cor do caldo de cana-de-açúcar de diferentes variedades. Observando os níveis de atividade de PPO, compostos fenólicos e o aparecimento da cor, demonstraram que houve correlação entre a cor do caldo e o conteúdo de compostos fenólicos, sendo a PPO a mais envolvida no escurecimento.

Para YOSHIYAMA & ITO (1996), a enzima PPO de fonte microbiana de *Coriolus versicolor* foi bem efetiva na diminuição da adstringência de sementes de cacau pelos compostos fenólicos como flavonóides e proantocianidinas, bem como diminuindo consideravelmente os compostos fenólicos totais, naturalmente presentes no cacau.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAIS**

##### **3.1.1. EQUIPAMENTOS**

- Balança analítica Mettler, modelo H-10
- Balança eletrônica digital ACATEC BEC 1000
- Medidor de pH Digimed DMPH-2
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J2-21
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70
- Liofilizador - Marca LALCONCO, modelo LYPH.LOCK 18
- Coletor de frações - Marca ISCO
- Sistema de ultrafiltração em membrana, modelo TCF2A (Amicon Co.)
- Banhos de água calibrados de 15°C a 80°C (Sarge)
- Aparelho de eletroforese - Mini Protean II- BIORAD
- Fotodensitômetro - Programa Image Master 1D da Pharmacia Biotech.
- Espectrofotômetro de absorção atômica - VARIAN AAG

### 3.1.2. REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS

- Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais e solventes PA (Merck, Carlo Erba, Riedel, Ecibra ou equivalente)

- Reagentes específicos : catecol, 4-metilcatecol, L-dopa, ácido caféico, ácido clorogênico, p-cresol ( Sigma, Merck e Pharmacia)

- Kit de calibração para determinação do peso molecular por eletroforese, da Pharmacia

- Kit de calibração para determinação do peso molecular em coluna de gel Sephadex G-200, da Sigma

- Resinas:

Sephadex G- 200

DEAE- Toyopearl 650 M

Toyopearl HW 55 F

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Coleta das amostras de pinhas**

Pinhas cultivadas na região de Lins-SP, foram colhidas em dois estágios de desenvolvimento após a floração. Frutos com  $\pm 65 - 85$  dias de desenvolvimento, no estágio de maturação “verde”, e frutos com  $\pm 100$  dias, prontas para o aproveitamento industrial e consumo “in natura”, no estágio de maturação “maduro”. Frutos nos dois estágios de maturação foram separados em casca (epicarpo) e polpa (mesocarpo), congelados em gelo seco e mantidos à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **3.2.2. Estudos preliminares**

#### **3.2.2.1. Efeito do tipo de solução de extração sobre a PPO do extrato bruto obtido da casca e da polpa de pinha verde e madura**

A princípio foi verificado o efeito da solução de extração sobre a enzima PPO, levando-se em consideração o pH e a concentração (molaridade), nas diferentes partes dos frutos cascas e polpas, nos estágios de maturação verde e maduro.

Para a preparação do extrato bruto do estudo preliminar, 15g de amostra foram homogeneizados com 75 ml tampão fosfato de potássio com as concentrações molares de 0,025 e 0,05 M, em pH 7,0 e 8,0, e água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$  em liquidificador durante 3 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a  $11.000 \times g$  durante 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ . No

extrato bruto foi medido a atividade de PPO a 420 nm em espectrofotômetro, sendo a análise conduzida a 20°C.

Após o estudo preliminar em que se verificou em qual solução de extração e em que parte e estágio de maturação foi obtido maior atividade, prosseguiu-se o estudo tendo em vista a sua utilização industrial, e aplicação da enzima em outros segmentos no processamento de alimentos.

### **3.2.2.2. Determinação da atividade da PPO nos extratos brutos das diferentes partes dos frutos, cascas e polpas em diferentes estágios de maturação verdes e maduros**

Para medir a atividade de PPO nos extratos brutos das cascas de pinhas verdes e maduras, a mistura de reação foi composta por, 0,5 ml de extrato bruto, 1,2 ml de substrato catecol 0,4% em tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 6,5) e 1,3 ml de tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 6,5), perfazendo um total de 3,0 ml. Para o branco foi misturado o tampão de análise mais solução de catecol. A reação foi iniciada pela adição do catecol seguida pelo registro das alterações na absorbância a 420 nm por 5 minutos.

Na medida da atividade de PPO nos extratos brutos das polpas de pinhas verde e maduras, a mistura de reação consistiu de 0,1 ml de extrato bruto, 1,2 ml de solução de catecol 0,4 % em tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 6,5) e 1,7 ml de tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 6,5), perfazendo um total de 3,0 ml. Para o branco foi usado a mistura de solução tampão mais solução do substrato. A reação foi iniciada pela adição do catecol seguida, do registro das alterações na absorbância a 420 nm por 5 minutos.

A atividade da enzima foi calculada pela inclinação linear da curva. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como a quantidade da enzima que ocasiona um aumento na absorvância de 0,001/min/ml (OKTAY et alii,1995).

### **3.2.2.3. Efeito do pH do tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura**

O efeito do pH do tampão de extração da enzima foi determinado utilizando-se 100g de amostra de polpas de pinhas maduras, que foram homogeneizados com 200 ml de tampão citrato-fosfato 0,1M, (pH 3,0 a 5,5) e tampão fosfato de potássio 0,025M, (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl 0,1M (pH 8,5 a 9,0) a 4°C, em liquidificador durante 3 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 x g durante 15 minutos a 0°C e o sobrenadante mantido a 4°C. A atividade de PPO nos extratos brutos foi medida a 420 nm em espectrofotômetro, sendo a análise conduzida a 20°C, de acordo com o item 3.2.2.2.

### **3.2.2.4. Caracterização bioquímica da PPO no extrato bruto da polpa de pinha madura**

A caracterização bioquímica da PPO no extrato bruto da polpa de pinha madura, foi realizado preliminarmente como descrito a seguir:

#### **3.2.2.4.1. Efeito do pH na atividade da PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura**

O efeito do pH na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura foi estudado na faixa de 3,0 a 9,0, utilizando os sistemas de tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 3,0 a 5,5), fosfato de potássio 0,05M (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl 0,1M, (pH 8,5 a 9,0).

Em tubos de ensaio foram preparados sistemas de reação compostos de 0,1 ml de solução enzimática, obtida na extração inicial de acordo com o item 3.2.2.3, 1,7 ml de tampão fosfato 0,05M (pH 6,5) e 1,2 ml de solução de catecol 0,4 %, perfazendo um total de 3,0 ml. Para o branco, foi utilizado a mistura de solução tampão mais solução do substrato. A análise foi conduzida na faixa de temperatura ótima a 20°C.

#### **3.2.2.4.2. Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura**

Para a determinação da temperatura ótima de atividade de PPO do extrato bruto, foi utilizado o sistema de reação constituído de: 0,1 ml do extrato enzimático, 1,2 ml da solução do substrato e 1,6 ml da solução tampão, submetido à temperatura de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, por 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm como descrito no item 3.2.2.2.

### **3.2.2.4.3. Influência da composição do tampão de extração na atividade da PPO da polpa de pinha madura**

Após o estudo preliminar das condições da melhor solução tampão de extração da enzima PPO, quanto ao reagente, pH e a concentração, nas diferentes partes do fruto, foi estudado mais detalhadamente a extração da PPO na polpa de pinha madura para posterior caracterização da enzima.

O extrato enzimático da polpa de pinha madura foi obtido, utilizando-se 10g de amostra em 50 ml das diferentes soluções extratoras contendo aditivos com a função de solubilizar a PPO das membranas como Triton X-114, sequestrantes de fenóis (PVP e PEG), antioxidantes (ácido ascórbico) e quelantes (L-cisteína). A extração foi feita a 4°C em liquidificador, durante 3 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 x g durante 15 minutos a 0°C, e o sobrenadante mantido a 4°C. As análises de atividade foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.3. As soluções de extração da PPO utilizadas foram:

a)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5)

b)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,5) + 0,5% de polivinilpirrolidona (PVP)

c)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de PVP + 0,5% de Triton X-114

d)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de polietilenoglicol (PEG)

e)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de PEG + 0,5% de Triton X-114

- f)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de Triton X-114
- g)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de Triton X-114 + ácido ascórbico 10 mM
- h)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + 0,5% de PEG + ácido ascórbico 10 mM
- i)-Solução tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,5) + L-cisteína 10mM

Foram realizadas medidas de pH relacionadas aos diferentes tratamentos e determinação de proteína pelo método de LOWRY et alii (1951).

### **3.2.3. Determinação da atividade de PPO no extrato bruto, na solução de enzima parcialmente purificada e nos eluatos de enzimas purificadas a partir da polpa de pinha madura**

A atividade da PPO foi determinada nos extratos enzimáticos brutos, na solução de enzima parcialmente purificada em pó, e nos eluatos da enzima purificada.

A mistura de reação continha 0,1 ml de extrato bruto ou solução da enzima parcialmente purificada ou enzima purificada, 1,2 ml de substrato catecol 15 mM em tampão fosfato de potássio 0,025M, pH 6,5 para o extrato bruto e enzima parcialmente purificada e pH 7,0 para a enzima purificada, mais 1,7 ml do mesmo tampão fosfato de potássio 0,025M, com diferentes valores de pH, dependendo da amostra, perfazendo um total de 3,0 ml. Para o branco foi usado foi usado a mistura de solução tampão mais solução do substrato.

A atividade da enzima foi calculada pela inclinação linear da curva. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como a quantidade da enzima que ocasiona um aumento na absorvância de 0,001/min/ml (OKTAY et alii,1995).

### **3.2.4. Obtenção da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura**

#### **3.2.4.1. Fracionamento com sulfato de amônio do sobrenadante do extrato enzimático da polpa de pinha madura**

Ao sobrenadante do extrato enzimático bruto, descrito anteriormente no item 3.2.2.4.3, obtido somente com tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,5), foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu em repouso por 24 horas a 4°C para precipitação da enzima. A mistura foi centrifugada a 11.000 x g por 15 minutos a 0°C, reservando-se o precipitado. O precipitado foi dialisado contra água destilada em membrana de acetato de celulose por 24 ou 48 horas a 4°C.

Após a diálise, a fração protéica foi precipitada com álcool etílico a 70%, e sua separação realizada por centrifugação a 11.000 x g durante 15 minutos a 0°C, sendo posteriormente seca a temperatura entre 10 e 15°C e pulverizada. O material em pó foi denominado de enzima parcialmente purificada.

### **3.2.5. Caracterização bioquímica da PPO parcialmente purificada**

O estudo das características bioquímicas da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura tais como: determinação da atividade, pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, concentração e especificidade do substrato, efeito de inibidores e período de armazenamento, foram efetuados com a enzima em pó obtida de acordo com o item 3.2.4.1.

#### **3.2.5.1. Efeito da concentração da enzima PPO parcialmente purificada**

Foram preparados soluções da enzima bruta de polpas de pinhas maduras obtidas de acordo com o item 3.2.4.1, em diferentes concentrações, desde 0,5mg a 5,0mg / 10ml de tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 6,5), e a determinação da atividade da enzima seguiu o método descrito no item 3.2.3.

#### **3.2.5.2. Influência dos diferentes substratos na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura**

O estudo da influência dos diferentes substratos foi realizado pela determinação da atividade de PPO parcialmente purificada com catecol, pirogalol, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, L- dopa, L- tirosina, 4-metilcatecol, guaiacol e p- cresol.

A influência da ação dos diferentes substratos e sua concentração na atividade da PPO foi verificada através do sistema de reação constituído de 0,1 ml de solução enzimática parcialmente purificada (2,0mg / 10ml de tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 6,5), 1,2 ml de solução de substrato de

concentração variável entre 3,0 a 15,0 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 6,5) e 1,6 ml de tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 6,5).

#### **3.2.5.3. Efeito do pH na atividade da enzima PPO parcialmente purificada**

O efeito do pH na atividade da PPO de polpa de pinha madura foi estudado na faixa de pH de 3,0 a 8,5, utilizando os sistemas tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 3,0 a 5,5), fosfato de potássio 0,05M (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl 0,1M, (pH 8,5). As misturas de reação foram incubadas a 20°C durante 60 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.2.3.

Em tubos de ensaio foram preparados sistemas de reação compostos de solução enzimática obtida com a enzima em pó, solução tampão de diferentes valores de pH, e solução de substrato perfazendo um total de 3,0 ml. Para o branco foi usado a mistura de solução tampão mais solução do substrato. A análise foi conduzida na faixa de temperatura ótima.

#### **3.2.5.4. Efeito do pH na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada**

O efeito do pH na estabilidade da atividade da PPO foi estudado na faixa de pH 3,0 a 10,0. A solução enzimática foi misturada com tampão de diferentes pH incubada na temperatura ótima por 20 horas de acordo com FUJITA et alii (1988) e FUJITA et alii (1991). Foram utilizados os sistemas tampões citrato-fosfato 0,1M (pH 3,0 a 5,5), fosfato de potássio 0,05M (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl 0,1M (pH 8,5 a 10,0). A atividade enzimática residual de PPO foi determinada de acordo como descrito anteriormente no item 3.2.3.

### **3.2.5.5. Efeito da temperatura na atividade da enzima PPO parcialmente purificada**

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da PPO parcialmente purificada, foi utilizado o sistema de reação constituído por: 0,1 ml da solução de enzima, 1,2 ml da solução do substrato catecol 15 mM e 1,7 ml da solução tampão fosfato 0,05M (pH 6,5), submetido a temperaturas de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, por 5 minutos (FUJITA et alii,1988). A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.2.3.

### **3.2.5.6. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada**

Para o estudo da estabilidade térmica da PPO parcialmente purificada tratou-se uma solução de enzima 1%, colocando-se alíquotas em tubos de ensaio com tampas e pré-incubando a temperaturas de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos, de acordo com FUJITA et alii (1988). Após o tempo de tratamento, as soluções foram resfriadas imediatamente e a atividade enzimática residual foi determinada como descrito no item 3.2.3.

### **3.2.5.7. Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO parcialmente purificada**

O efeito de substâncias químicas inibidoras foi verificado utilizando-se os seguintes compostos : L-cisteína, KCN, KCL, NaCl, ácido ascórbico, ácido cítrico, metabissulfito de sódio, tiouréia, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol e glutathione, nas concentrações finais de 1,5, 5,0 e 10,0 mM.

Sistemas de reação constituído de PPO parcialmente purificada, obtida conforme item 3.2.4.1, e soluções dos reagentes nas concentrações de 1,5, 5,0 e 10,0 mM, foram incubados a 20°C durante 5 minutos, de acordo com SIDDIQ et alii (1992). A atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.3.

### **3.2.5.8. Efeito de compostos químicos e tratamento térmico usados na indústria de alimentos para controle da atividade da PPO parcialmente purificada**

Os tratamentos foram selecionadas de acordo com a utilização em processamento industrial de frutas e hortaliças.

O estudo do efeito do uso de compostos químicos e tratamento térmico com a finalidade de controlar a atividade da PPO parcialmente purificada são descritos abaixo.

T<sub>1</sub> - Sem aditivo

T<sub>2</sub>- Ácido ascórbico 0,1%

T<sub>3</sub>- Ácido cítrico 0,1%

T<sub>4</sub>- Metabissulfito de sódio 0,05%

T<sub>5</sub>- Tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)

T<sub>6</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1%

T<sub>7</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%

T<sub>8</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + EDTA 30 ppm

T<sub>9</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%

T<sub>10</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)

- T<sub>11</sub>- Ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%
- T<sub>12</sub>- Ácido cítrico 0,1% + EDTA 30ppm
- T<sub>13</sub>- Ácido cítrico 0,1% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)
- T<sub>14</sub>- Ácido cítrico 0,1% + ácido ascórbico 0,1% + EDTA 30ppm
- T<sub>15</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)
- T<sub>16</sub>- EDTA 30ppm

Para a determinação da atividade residual da PPO bruta foi constituído o seguinte sistema de reação: 1,6 ml de tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 6,5), 1,2 ml de solução de catecol 14mM, 0,1 ml de extrato enzimático bruto (2,0mg / 5ml de tampão ) e 0,1 ml de solução inibidora, perfazendo 3 ml. O branco constou de solução tampão e solução catecol.

### **3.2.6. Purificação da PPO da polpa de pinha madura**

Após o fracionamento da PPO com sulfato de amônio, realizado como descrito no item 3.2.4.1, foi realizada uma purificação posterior através de cromatografia em coluna de DEAE-Toyopearl 650M e Toyopearl HW-55F.

#### **3.2.6.1. Cromatografia em coluna de DEAE-Toyopearl-650M**

Para preparo da resina seguiu-se as instruções do manual do fabricante. Na montagem da coluna foram aplicados 35 ml da resina de DEAE- Toyopearl 650M previamente tratada com tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0), em

coluna de vidro (Pharmacia) com 1,5 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento, sendo o equilíbrio da coluna efetuado pela adição de 5 a 10 vezes o volume da coluna de solução tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0), não havendo necessidade do tratamento com solução ácida ou alcalina (KATO et alii, 1983).

Após o equilíbrio da coluna, aplicou-se uma quantidade de 5 ml da amostra referente ao sobrenadante da enzima parcialmente purificada obtida conforme o item 3.2.4.1, contendo 0,4g de amostra dissolvidos em 10ml de tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,0), permanecendo em extração durante uma hora, seguido de centrifugação a 11.000 x g durante 15 minutos a 0°C. A amostra foi aplicada em coluna de 1,5 cm x 30 cm, mantida a  $\pm 15^{\circ}\text{C}$ . Foram coletadas frações de 2 ml na vazão de 20 ml/hora. A amostra foi eluída inicialmente com o mesmo tampão de equilíbrio e posteriormente aplicou-se solução tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0) com solução gradiente de NaCl de 0,1 M, 0,2M, 0,3M e 0,5M, utilizando-se coletor de frações com registrador automático. O curso da eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro, e a atividade da enzima PPO foi determinada de acordo com o item 3.2.3, nas frações que apresentarem picos de absorbância nesse comprimento de onda.

As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas e dialisadas contra água destilada por 24 horas a 4°C, em seguida, foi determinado o teor de proteína pelo método de LOWRY et alii (1951) e a atividade da PPO pelo item 3.2.3, para posterior aplicação em coluna de Toyopearl HW-55F.

### 3.2.6.2. Cromatografia da PPO em coluna de gel Toyopearl HW-55F

A preparação do gel de polímero hidrofílico poroso de pérolas de polivinil, Toyopearl HW-55 seguiu o manual de empacotamento da TOYOPEARL e dados de pesquisa de KATO et alii (1981 a,b,c).

A resina foi ressuspensa com agitação vigorosa e a quantidade de suspensão desejada foi transferida para um bequer. Foram adicionados 4 vezes o volume de água destilada, misturando-se bem e deixando-se acomodar até formar uma camada estável e firme, repetindo este passo por três vezes. O tempo de acomodação depende do tamanho da partícula do gel (grau), sendo utilizado o grau fino (F), com tempo de acomodação de 30-45 minutos. Descartou-se o sobrenadante contendo as partículas finas. Quando caracterizado o final da suspensão, adicionou-se o tampão fosfato de potássio 0,025 (pH 7,0) para equilibrar a coluna.

Utilizou-se coluna de vidro da Pharmacia (1,5 x 80 cm) empacotando-se o gel de maneira rápida e contínua por gravidade. A amostra de 10 ml, proveniente da purificação em coluna DEAE-Toyopearl 650M foi eluída com tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,0). As frações de 5ml foram coletadas a cada 15 minutos em coletor de frações com registrador automático. A eluição das proteínas foi monitorada espectrofotometricamente, através de leitura da absorbância a 280 nm, e a atividade determinada conforme item 3.2.3, nas frações que apresentaram picos de absorbância nesse comprimento de onda. Os eluatos obtidos nas colunas cromatográficas foram congelados e uma parte liofilizados para estudos posteriores.

### **3.2.7. Estudo das características da PPO purificada**

Após a realização da extração da enzima em tampão apropriado, precipitação em sulfato de amônio, diálise, separação por cromatografia de troca-iônica em colunas de DEAE-Toyopearl 650M e colunas de separação em gel de Toyopearl HW-55F e Sephadex G-200 , foi realizada a caracterização bioquímica da PPO.

O estudo das características bioquímicas da PPO purificada, foi efetuado com relação ao seu pH, temperatura ótima de atividade, pH, temperatura de estabilidade, peso molecular, efeitos de inibidores na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos de  $K_m$  e  $V_{max}$ , realizado com a solução enzimática purificada.

#### **3.2.7.1. Determinação do pH ótimo de atividade da PPO purificada**

Para a determinação do pH ótimo de atividade da PPO purificada, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da solução enzimática purificada, 1,2 ml de solução de catecol 15 mM e 1,7 ml do sistema tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 3,0 a 5,5), fosfato de potássio 0,05M (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (pH 8,5). As misturas de reação foram incubadas a 20°C durante 60 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.2.3.

### **3.2.7.2. Determinação do pH de estabilidade da PPO purificada**

Para o estudo da influência do pH na estabilidade da enzima, tubos de ensaio com tampa, contendo 0,1 ml de solução enzimática purificada foram pré-incubados em diferentes soluções tampão (pH 3,0 a 10,0), a 20°C durante 20 horas (FUJITA et alii, 1988). Foram utilizados os sistemas tampão: citrato-fosfato (pH 3,0 a 5,5), fosfato de potássio (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (pH 8,5 a 10,0). A atividade residual foi determinada conforme item 3.2.3.

### **3.2.7.3. Determinação da temperatura ótima de atividade da PPO purificada**

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da PPO purificada, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da solução enzimática purificada, 1,2 ml do substrato catecol 15 mM e 1,7 ml de tampão fosfato 0,05M (pH 7,0). Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados em diferentes temperaturas entre 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, durante 5 minutos (FUJITA et alii, 1988), sendo a atividade enzimática determinada como descrito no item 3.2.3.

### **3.2.7.4. Determinação da temperatura de estabilidade da PPO purificada**

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade enzimática da PPO purificada, alíquotas da solução enzimática em tampão de análise, foram colocadas em tubos de ensaio com tampa, pré-incubadas a 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C durante 30 minutos (MURATA et alii 1992). A atividade residual da PPO foi determinada de acordo com a metodologia descrita anteriormente, no item 3.2.3.

### **3.2.7.5. Inativação térmica da PPO purificada**

Para o estudo da inativação térmica da enzima PPO purificada foi utilizado o sistema de reação constituído de 0,1 ml da solução enzimática purificada, 1,7 ml de tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0) e 1,2 ml do substrato catecol 15 mM, colocados diretamente na cubeta do espectrofotômetro, mantendo temperaturas constante de 20, 40, 50, 60 e 75°C durante 30 minutos e registrando as leituras de absorbância a 420 nm. A atividade residual foi determinada de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.

### **3.2.8. Determinação do peso molecular da PPO**

#### **3.2.8.1. Cromatografia em coluna de Sephadex G -200**

A enzima purificada teve seu peso molecular estimado por filtração em coluna em gel Sephadex G-200, de acordo com WHITAKER (1963) e ANDREWS (1965), utilizando-se como padrões as seguintes proteínas (SIGMA MW-GF 200): álcool desidrogenase (150.000 daltons), soro albumina bovina (66.000 daltons), anidrase carbônica (29.000 daltons) e citocromo C (12.400 daltons). A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH 7,0). Os padrões e a enzima purificada foram aplicados e percolados em coluna de Sephadex G-200 ( 100 cm x 2,5 cm), utilizando-se um coletor de frações com registrador automático. Todos os padrões de peso molecular foram dissolvidos em 2 ml do tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,0), contendo 5% de glicerol. Utilizou-se como frente de eluição 10 mg de Blue Dextran 2.000 diluído em tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,0), com 5% de glicerol. Uma amostra de 10 ml de solução de PPO purificada de acordo com

os itens 3.2.6.1. e 3.2.6.2, contendo ao redor de 1,0 mg de proteína, foi eluída na mesma coluna, com uma vazão de 10 ml/hora, coletando-se frações do eluente de 2 ml, sendo monitoradas a 280 nm em espectrofotômetro. O peso molecular da enzima foi estimado pela regressão linear obtida da curva de calibração  $V_e/V_o$  (volume de eluição das proteínas padrões/volume vazio, o qual é o volume de eluição do Blue Dextran) X log do peso molecular destas proteínas.

### **3.2.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

O peso molecular da enzima PPO purificada foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando-se gel de separação a 10 %, conforme método descrito por WEBER & OSBORN (1969) e LAEMMLI (1970) com eventuais modificações.

As amostras liofilizadas referentes às frações ativas, provenientes das colunas cromatográficas, foram preparadas pela mistura de tampão Tris-HCl (pH 8,8), solução de glicerina 20% e azul de bromofenol 0,001%, em condições não desnaturadas com aplicação de 20  $\mu$ l.

Foi utilizado mistura de proteínas de calibração para eletroforese na determinação do peso molecular (LMW-Pharmacia) consistindo das seguintes proteínas padrão: fosforilase b (94.000 daltons), soro albumina bovina (67.000 daltons), ovoalbumina (43.000 daltons), anidrase carbônica (30.000 daltons), inibidor de tripsina (20.100 daltons) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400 daltons). Para coloração das proteínas utilizou-se o corante Coomassie brilliant blue G-250. As determinações foram realizadas por fotodensitometria através do programa Image

Master 1D da Pharmacia Biotech., onde as mobilidades das bandas foram plotadas em função dos pesos moleculares das proteínas em escala logarítmica.

### **3.2.9. Eletroforese da PPO purificada de pinha em gel de poliacrilamida**

#### **3.2.9.1. Eletroforese da PPO purificada de pinha e detecção da atividade enzimática**

Foram realizados análises por eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com os métodos de DAVIS (1964), WEBER & OSBORN (1969) e LAEMMLI (1970), com modificações, para separação de possíveis isoenzimas presentes nas soluções enzimáticas purificadas, em condições não desnaturantes. O experimento foi conduzido usando-se tampão Tris/glicina (pH 8,3), gel de concentração 3,0% e gel de separação a 7,5% de poliacrilamida, em cuba vertical (sistema Mini Protean II-BIORAD), empregando-se corrente de 100V, 21mA, 2W/placa de gel por cerca 2 horas a 4°C. As amostras provenientes das colunas cromatográficas foram concentradas por liofilização e posteriormente preparadas para eletroforese por mistura com tampão Tris-HCl (pH 8,8), solução de glicerina 20% e azul de bromofenol 0,001%. Foram aplicados 20 µl de amostras em condições não desnaturante. Após o término da corrida, o gel foi cortado em partes semelhantes e imersos nos diferentes substratos.

Para verificar a atividade e a especificidade da enzima PPO em relação a diferentes substratos em gel de poliacrilamida foram utilizados, catecol 10 mM, L-dopa 5 mM, pirogalol 10 mM, L-tirosina, ácido clorogênico 10 mM e ácido caféico 10 mM, todos dissolvidos em tampão fosfato 0,05M (pH 7,0). Na imersão do gel em solução de catecol 10 mM foi adicionado 0,05% de o-

fenilendiamina e após o aparecimento da banda, lavou-se o gel com solução de ácido ascórbico 1mM, durante 5 minutos. Todos os géis corados foram colocados em água destilada e posteriormente em etanol 30% para serem fotografados (WESCHE-EBELING & MONTGOMERY 1990a).

### **3.2.9.2. Efeito do dodecil sulfato de sódio - SDS na eletroforese da PPO purificada de pinha**

O estudo foi conduzido de acordo com o método de ANGLETON & FLURKEY (1984) baseado na metodologia para SDS-PAGE desenvolvida por LAEMMLI (1970), e aplicado por LIMA et alii (1998). As amostras provenientes das colunas cromatográficas foram concentradas por liofilização e posteriormente preparadas para eletroforese por mistura com tampão Tris pH 8,8, solução de glicerina 20% e azul de bromofenol, aplicadas em gel poliacrilamida a 7,5 %, não sendo desnaturadas antes da aplicação. As análises foram conduzidas por 2 horas e realizadas em um sistema Mini-Protean II da Bio-Rad.

Foi analisada a influência da adição de SDS no gel de poliacrilamida e tampão de eletroforese, conforme ANGLETON & FLURKEY (1984) e FERRER et alii (1989) com algumas modificações. Para o estudo foram utilizados géis onde as quantidades de amostras aplicadas eram iguais, contendo ao redor de 0,02 mg de proteína. No primeiro gel (1) não houve adição de SDS no gel de separação e no gel de concentração, sendo incubado em tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0) durante 30 minutos e corado com catecol 2,0 mM e L-dopa 0,5 mM em tampão fosfato de potássio 0,05M (pH6,5). O segundo gel (2), feito sem a adição de SDS no gel de separação e no gel de concentração, foi incubado em tampão fosfato de potássio 0,05M (pH6,5) contendo 0,1% de SDS

por 30 minutos e corado com os substratos catecol 2,0 mM e L-dopa 0,5 mM em tampão fosfato de potássio 0,05M com 0,1 % de SDS. Ao terceiro gel (3), foi adicionado 0,1% de SDS no gel de separação, no gel de concentração e nos tampões utilizados na corrida, no tampão de incubação, juntamente com os substratos para a revelação da atividade.

### **3.2.10. Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_m$ e $V_{max}$**

O efeito da concentração dos substratos catecol e L-dopa (4mM a 25mM) na atividade da PPO purificada, foi investigado a 20°C, pH 7,0, conforme item 3.2.3. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934).

### **3.2.11. Efeito de inibidores na atividade da PPO purificada**

Foram testados os efeitos de substâncias químicas como cianeto de potássio, metabissulfito de sódio, L-cisteína, cloreto de sódio, ácido ascórbico, ácido cítrico, tiouréia e  $\beta$ -mercaptoetanol na atividade enzimática da PPO purificada.

Sistemas de reação constituídos de PPO purificada, obtida conforme item 3.2.6.2 e soluções de reagentes químicos nas concentrações de 1 e 10 mM, foram incubados à temperatura de 20°C durante 30 minutos. A atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.3.

### **3.2.12. Efeito de compostos químicos e tratamento térmico usados na indústria de alimentos, para controle da atividade da PPO purificada**

O estudo do efeito do uso de compostos químicos e tratamento térmico com a finalidade de controlar a atividade da PPO na solução enzimática purificada estão descritos abaixo.

Os tratamentos foram selecionadas de acordo com a utilização em processamento industrial de frutas e hortaliças.

Tratamentos utilizados para inibição da PPO purificada:

- T<sub>1</sub> - Sem aditivo
- T<sub>2</sub>- Ácido ascórbico 0,1%
- T<sub>3</sub>- Ácido cítrico 0,1 %
- T<sub>4</sub>- Metabissulfito de sódio 0,05%
- T<sub>5</sub>- Tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)
- T<sub>6</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1%
- T<sub>7</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%
- T<sub>8</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + EDTA 30 ppm
- T<sub>9</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%
- T<sub>10</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)
- T<sub>11</sub>- Ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05%
- T<sub>12</sub>- Ácido cítrico 0,1% + EDTA 30ppm
- T<sub>13</sub>- Ácido cítrico 0,1% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)

T<sub>14</sub>- Ácido cítrico 0,1% + ácido ascórbico 0,1% + EDTA 30ppm

T<sub>15</sub>- Ácido ascórbico 0,1% + ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05% + tratamento térmico durante dois minutos (temperatura 70°C)

T<sub>16</sub>- EDTA 30ppm

A determinação da atividade residual da PPO purificada foi constituída pelo sistema de reação: 1,6 ml de tampão fosfato de potássio 0,05M (pH 7,0), 1,2 ml de solução de catecol 14 mM, 0,1ml da solução de enzima purificada, 0,1ml de solução inibidora. O branco constou de 3,0 ml de uma mistura de solução tampão e solução de catecol.

### **3.2.13. Composição de aminoácidos**

A composição de aminoácidos da enzima purificada, foi analisada após hidrólise ácida com HCl 6N à vácuo na temperatura de 110 °C durante 22 horas. A amostra foi recuperada no diluente pH 2,2 (Pickering). A separação dos aminoácidos foi realizada em coluna de troca-iônica e reação pós coluna com ninidrina. Os aminoácidos foram quantificados em analisador DIONEX DX-300, utilizando-se mistura padrão de aminoácidos (PIERCE) como referência.

### **3.2.14. Determinação de cobre**

O conteúdo de cobre presente na PPO foi determinado em amostras de enzima purificada, obtidas de acordo com o item 3.2.6.3. A técnica analítica utilizada foi absorção atômica por atomização em chama, tendo como procedimento a abertura da amostra por digestão ácida, seguida da quantificação

do metal por absorção por atomização com chama, usando parâmetros do equipamento conforme manual de instrução do fornecedor do equipamento “VARIAN AAG”.

### **3.2.15. Influência do armazenamento sobre a atividade da PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura**

Amostras da enzima PPO parcialmente purificada e purificada, foram armazenadas em freezer à temperatura de -10°C. A influência do armazenamento sobre a atividade das enzimas, foi determinada mensalmente, durante 6 meses. Para a determinação da atividade de PPO foi utilizada a metodologia de acordo com o item 3.2.3.

### **3.2.16. Determinação de proteínas**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de LOWRY et alii (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

## **4.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

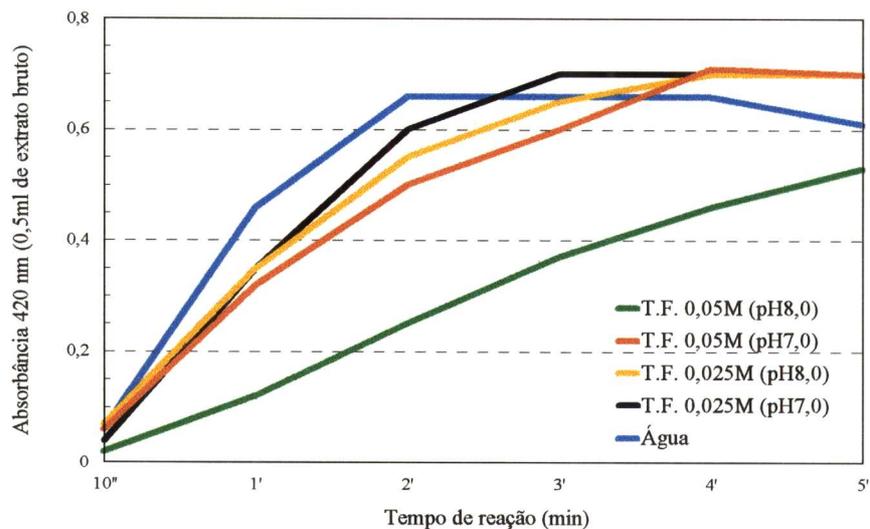
### **4.1. Estudos preliminares**

#### **4.1.1. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da enzima PPO do extrato bruto obtido da casca de pinha verde e madura**

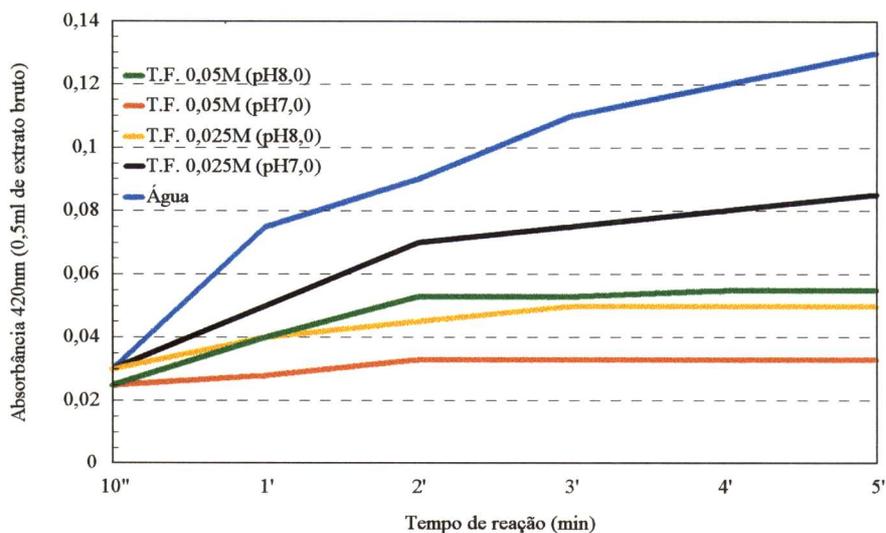
Os estudos preliminares foram realizados de acordo com o item 3.2.2.1, para verificar a modalidade de extração inicial mais adequada em amostras de casca verde e madura. As Figuras 3 e 4, ilustram as condições iniciais utilizadas na extração da PPO da casca de pinha verde e madura.

Nesta etapa, a enzima foi extraída e sua atividade determinada pela variação de absorbância a 420nm durante 5 minutos. De acordo com os resultados obtidos, demonstrou-se que tanto nas amostras obtidas de casca verde como madura a maior extração ocorreu quando a água foi utilizada como solução extratora, aparecendo em segundo lugar a solução de tampão fosfato 0,025M (pH 7,0). Na amostra de casca de pinha verde, a atividade da enzima foi maior do que em casca de pinha madura, em condições idênticas de análise.

Estes resultados evidenciam a necessidade de estudos posteriores, tendo em vista, que pesquisadores têm relatado que os valores de atividade da PPO é dependente da parte do fruto em que a enzima se encontra bem como a sua localização no tecido e seu grau de maturação pós colheita (MAYER & HAREL, 1981; NICOLAS, 1994).



**Figura 3. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em extrato bruto obtido da casca de pinha verde.**

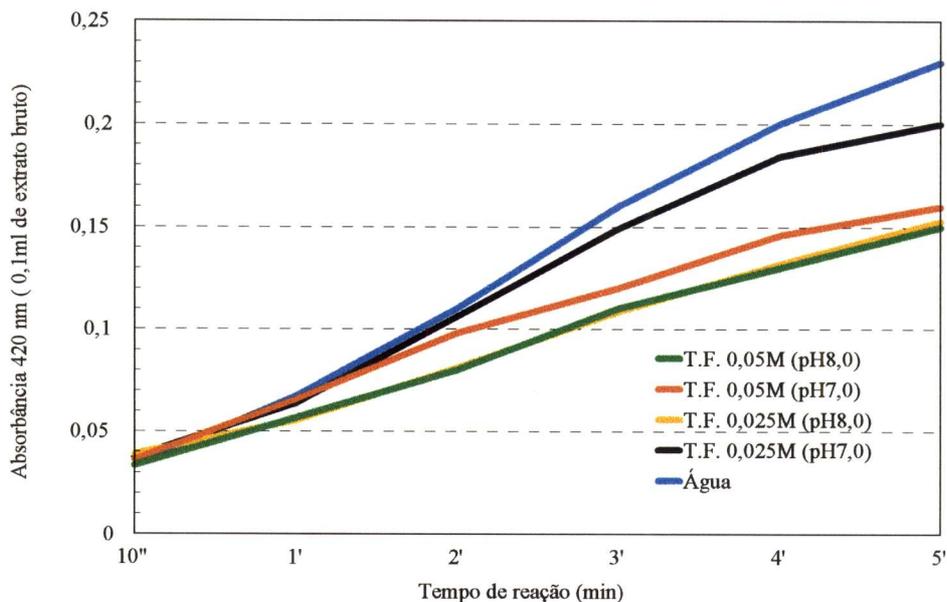


**Figura 4. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em extrato bruto obtido da casca de pinha madura.**

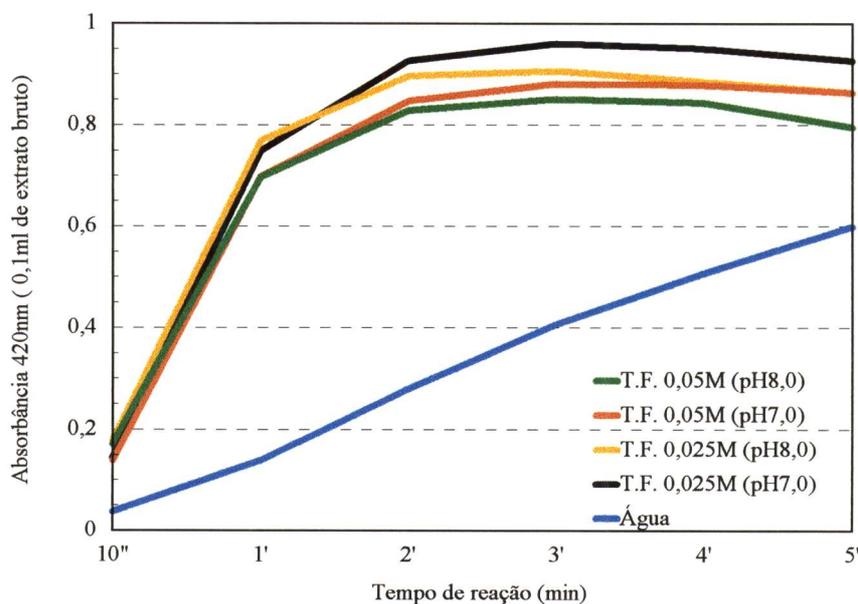
#### **4.1.2. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da enzima PPO do extrato bruto obtido da polpa de pinha verde e madura**

O efeito do tipo de solução de extração relativo ao estudo preliminar de extração de PPO em polpa de pinha verde e madura foi efetuado de acordo com o item 3.2.2.1. A Figura 5 ilustra que a extração da enzima PPO da polpa de pinha verde foi mais eficiente utilizando-se água do que com soluções tampão fosfato de pH 7,0 ou 8,0 de baixa molaridade. Ao contrário, no caso da enzima da polpa de pinha madura, ilustrada na Figura 6, foi obtido maior extração utilizando-se soluções tampão fosfato de pH 7,0 ou 8,0 de baixa força iônica do que comparada com água.

A quantidade da enzima PPO extraída da polpa de pinha madura foi cerca de 3 a 4 vezes maior do que polpa de pinha verde, estando, portanto, em conformidade com dados citados na literatura por MACHEIX et alii (1990) e NICOLAS (1994) que a fração solúvel da PPO aumenta, e sua atividade é maior durante o amadurecimento de alguns cultivares de maçã e uva.



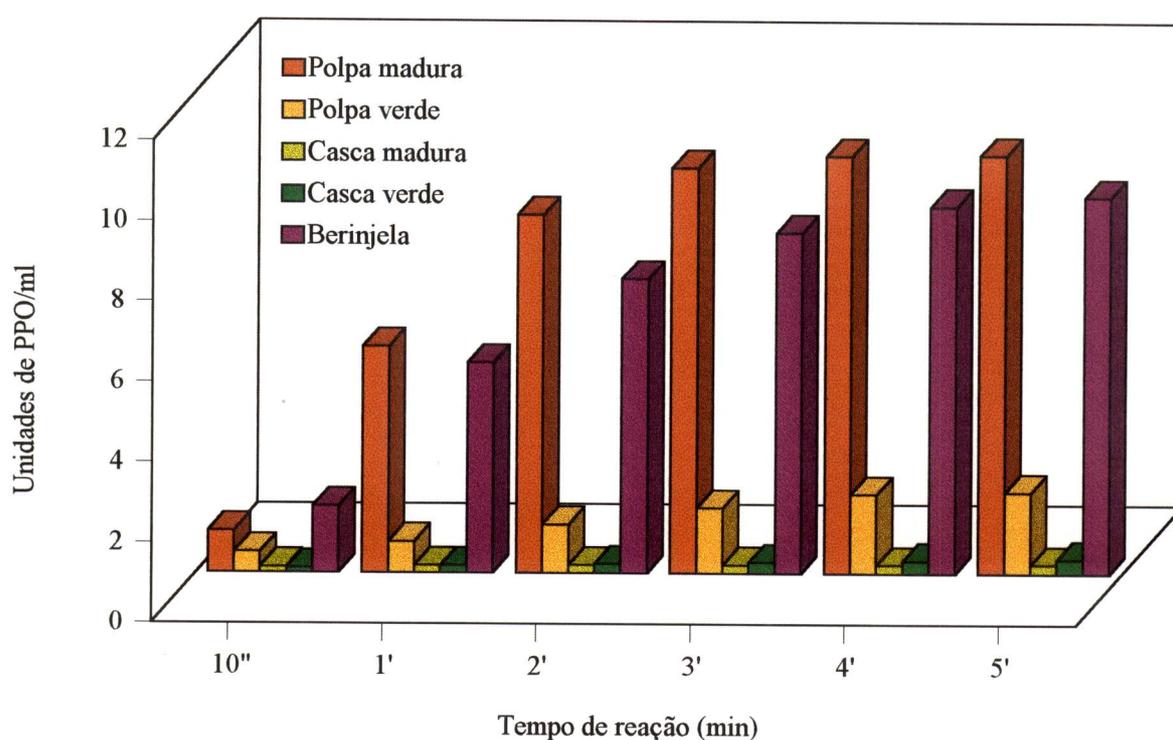
**Figura 5. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em polpa de pinha verde.**



**Figura 6. Efeito do tipo de solução de extração sobre a atividade da PPO em polpa de pinha madura.**

### 4.1.3. Atividade da enzima PPO em casca e polpa do fruto nos estágios de maturação verde e maduro

Na Figura 7 pode-se verificar nitidamente que a maior atividade de PPO foi encontrada em polpas de pinhas maduras, sendo que a atividade de PPO nas demais amostras foi baixa nesta condição de extração e determinação. A comparação com a atividade de PPO de berinjela neste estudo preliminar serviu como testemunho da presença e atividade da enzima. Nestas condições de trabalho, o estágio de maturação dos frutos influenciou a resposta de atividade da enzima.

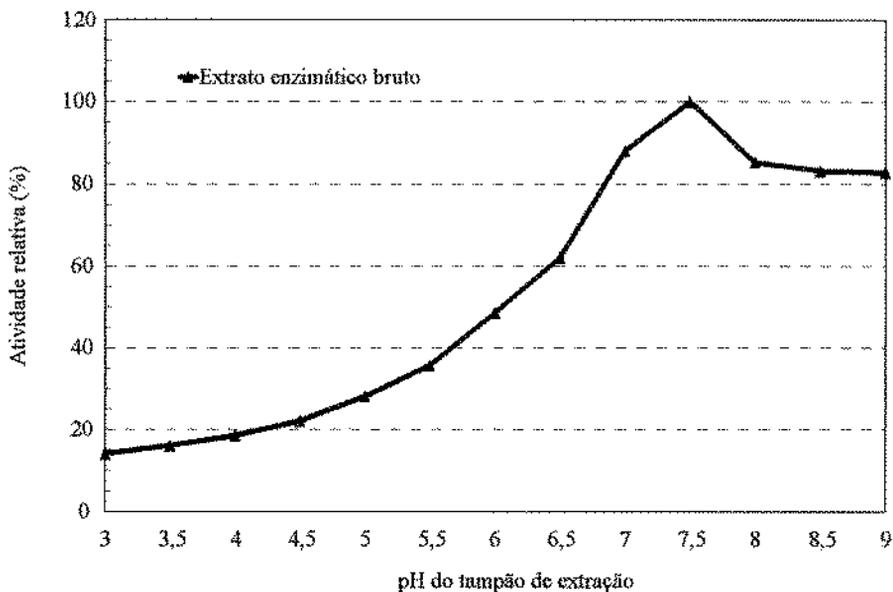


**Figura 7. Atividade da enzima PPO determinada na casca e polpa do fruto de pinha nos estágios de maturação verde e maduro, extraída em tampão fosfato de potássio 0,025M (pH 7,5).**

#### 4.1.4. Efeito do pH do tampão de extração na atividade e estabilidade da PPO de polpa de pinha madura

Os resultados do estudo referente à influência do pH do tampão de extração na máxima atividade de PPO de polpa de pinha madura realizado de acordo com o item 3.2.2.3, são apresentados na Figura 8. A extração máxima de enzima foi obtida com tampão fosfato pH 7,5 quando testado com catecol como substrato. Utilizando-se tampões para extração na faixa de pH 7,0 a 9,0 foram obtidos valores de atividade relativa superiores a 80%.

WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990b) apresentaram resultados bem diferentes com PPO de morangos, cujo pH do tampão de extração que apresentou atividade máxima foi de 4,5, determinado com catecol como substrato, o que confirma a necessidade de um estudo individualizado da PPO das diferentes fontes de plantas.



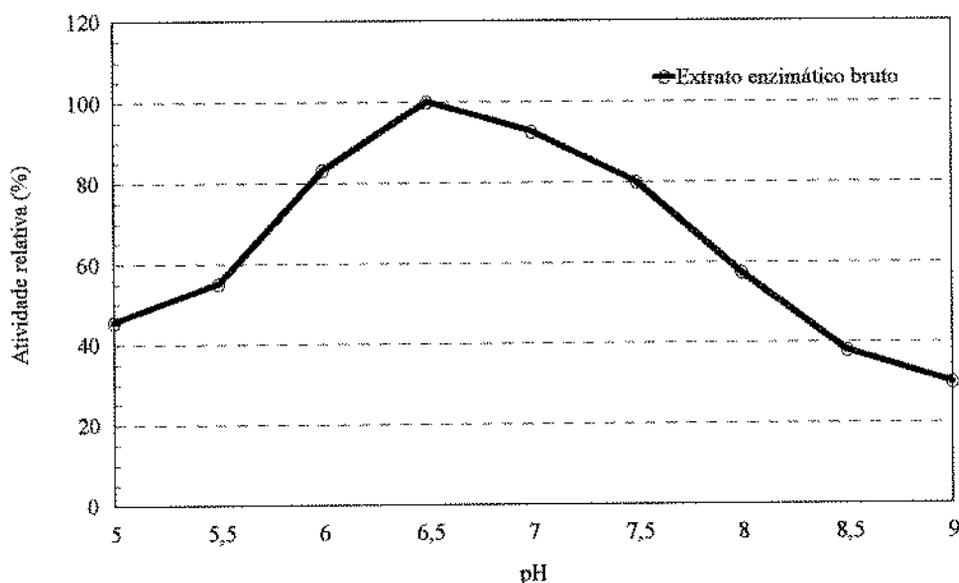
**Figura 8. Efeito do pH dos tampões na extração da PPO em polpa de pinha madura.**

CHAZARRA et alii (1996), obtiveram a extração da PPO de alface com máxima atividade em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,3) e SIDDIQ et alii (1996) extraíram a PPO de ameixas em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0).

#### 4.1.5. Caracterização bioquímica da PPO no extrato bruto

##### 4.1.5.1. Efeito do pH na atividade da enzima PPO do extrato bruto da polpa de pinha madura para realização das análises

O estudo do efeito do pH na atividade da PPO do extrato bruto foi realizado de acordo com o item 3.2.2.4.1. A Figura 9, demonstra que a enzima apresentou atividade máxima em pH 6,5. Este dado foi de grande importância para a realização dos estudos posteriores.



**Figura 9. Efeito do pH na determinação da PPO no extrato bruto em polpa de pinha madura.**

#### 4.1.5.2. Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura

O estudo do efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura, foi determinado de acordo com a metodologia constante do item 3.2.2.4.2. Em relação à temperatura, a enzima apresentou atividade máxima a 20°C, demonstrado na Figura 10, idêntica, portanto, a PPO da ameixa e pera descrita por SIDDIQ et alii (1992) e SIDDIQ et alii (1994).

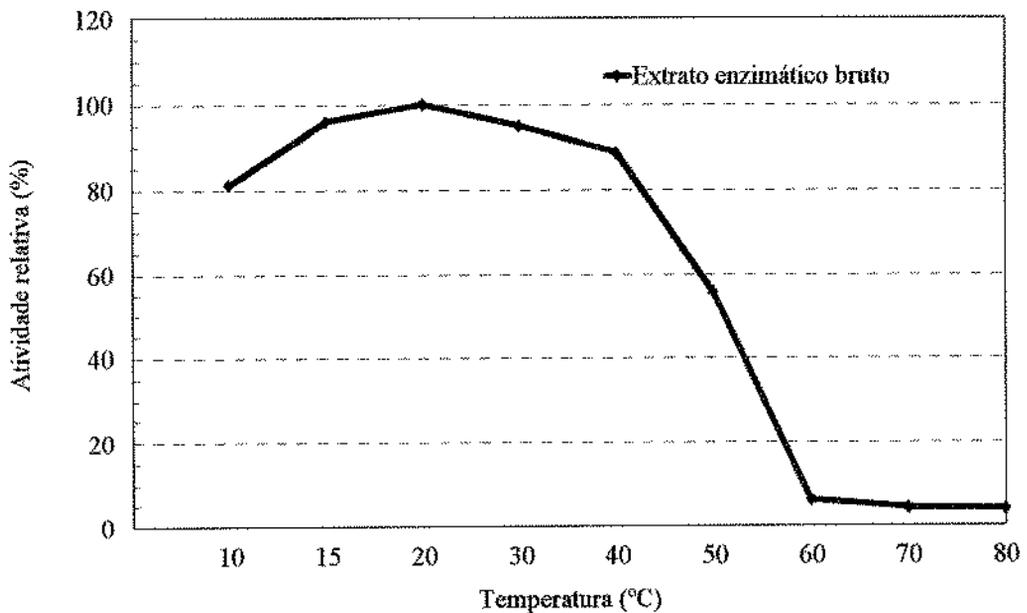


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da PPO do extrato bruto de polpa de pinha madura.

#### **4.1.5.3. Influência da presença de aditivos no tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura**

A influência da adição de aditivos na solução de tampão de extração da PPO de polpa de pinha madura foi verificada de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.4.3, e a atividade através do item 3.2.3.

O aumento de atividade de PPO de polpa pinha madura foi obtido com a adição de aditivos. Porém, quando se determinou o teor de proteínas, a atividade específica foi maior para a PPO extraída sem aditivos, como pode ser observado na Tabela 2.

Os aditivos, polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG), são sequestradores de fenóis e o Triton X-114, um detergente solubilizante. E reagentes influenciaram na extração da enzima de forma diferente dos aditivos ácido ascórbico, um antioxidante, e da L-cisteína, um quelante, que pode formar complexos estáveis com o cobre devido ao seu grupo tiol. Com os primeiros aditivos houve aumento de atividade na extração da PPO. O uso de PVP insolúvel tem sido relatado produzir bons resultados na extração de PPO de diferentes tecidos vegetais tais como, morangos (WESCHE-EBELING & MONTGOMERY, 1990a,b) e mamão (CANO, 1996). Para SIDDIQ et alii (1992), o uso de PVP na extração da enzima PPO de ameixa foi pouco efetivo no aumento de atividade, não removendo fenóis do extrato bruto, prosseguindo os seus estudos sem a adição dos aditivos.

**Tabela 2. Influência da composição do tampão de extração na atividade da PPO de polpa de pinha madura.**

Solução de extração	Atividade (U/min/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg prot.x10 <sup>3</sup> )	Atividade específica total	pH final	volume de extrato (ml)
T. fosfato 0,025M (pH 7,5)	13490	0,76	17,75	710,0	6,96	40
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + PVP 0,5%	22850	1,7	13,44	470,4	6,88	35
T. fosfato 0,025M (pH7,5) PVP 0,5% + Triton X-114 0,5%	25430	2,2	11,56	369,9	6,92	32
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + PEG 0,5%	24150	1,5	16,10	563,5	6,92	35
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + PEG 0,5% + Triton X-114 0,5%	23290	1,9	12,26	306,5	6,92	25
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + Triton X-114 0,5%	24310	1,8	13,51	540,4	6,92	40
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + Triton X-114 0,5% + ácido ascórbico 10mM	19830	1,6	12,39	371,7	6,72	30
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + PEG 0,5% + ácido ascórbico 10mM	17180	1,9	9,04	361,6	6,43	30
T. fosfato 0,025M (pH 7,5) + L-cisteína	1300	3,9	0,33	9,9	6,72	40

CANO et alii (1996) investigaram o uso de diversos aditivos na extração da PPO de mamão (*Carica papaya* Cv. Sunrise e Solo) como PVP, Triton X-100 e NaCl, constatando o aumento da atividade com o uso destes aditivos.

As reações com taninos durante a extração da PPO podem causar inativação parcial da enzima. Para evitar estas reações, agentes redutores são frequentemente adicionados durante a extração, mas devem ser removidos antes das análises. Os substratos fenólicos podem ser removidos antes da análise utilizando PVP insolúvel de acordo com MAYER & HAREL (1979).

#### **4.2. Obtenção da enzima PPO parcialmente purificada**

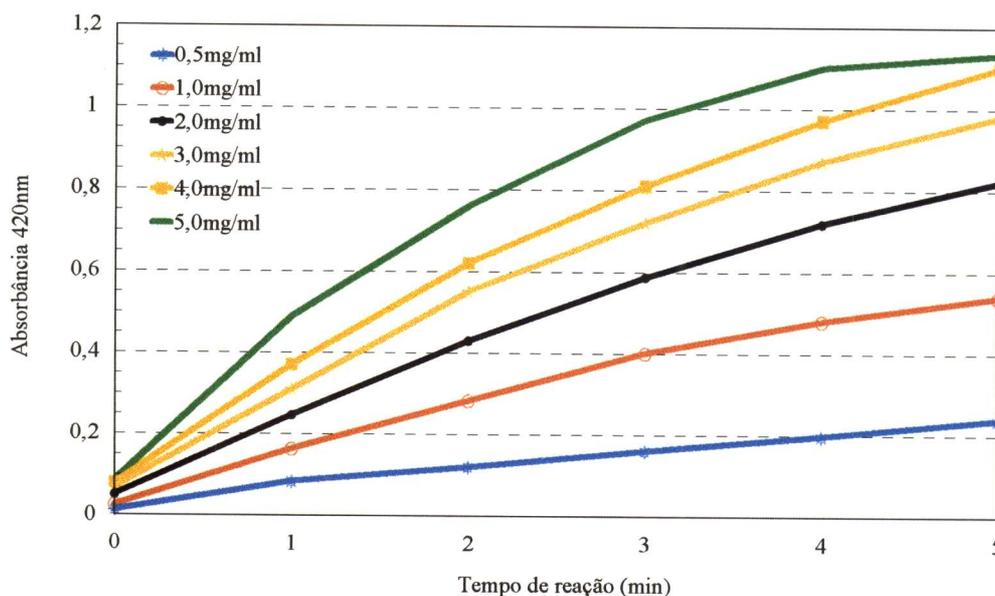
A obtenção da PPO parcialmente purificada foi realizada por fracionamento com sulfato de amônia de acordo com o item 3.2.4.1.

#### **4.3. Caracterização bioquímica da PPO parcialmente purificada**

O estudo das características bioquímicas da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura em relação ao pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, concentração e especificidade do substrato, efeito de inibidores e período de armazenamento, foram efetuados com a enzima em pó obtida de acordo com o item 3.2.4.1.

### 4.3.1. Estudo da concentração da enzima PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura

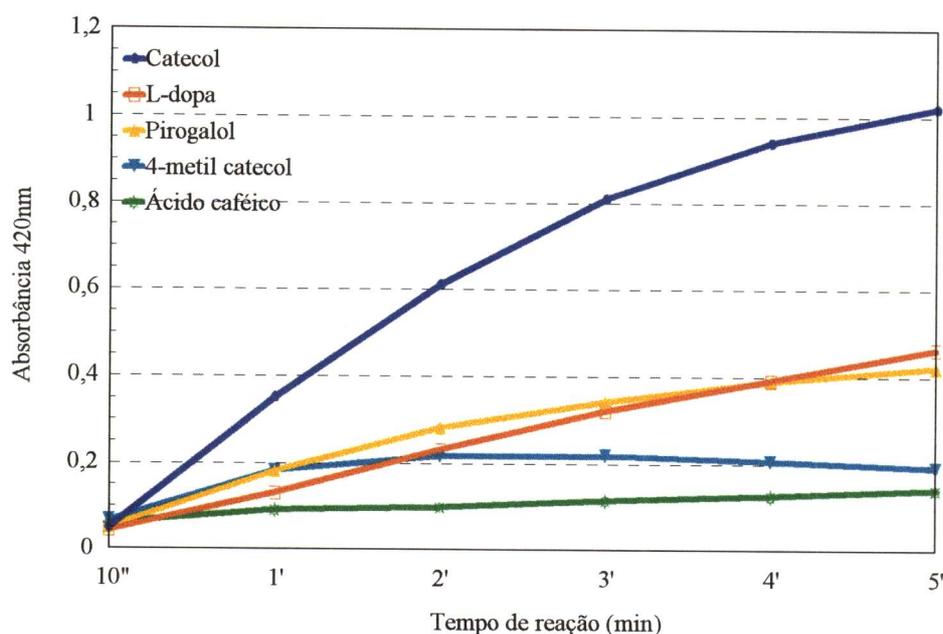
Os resultados obtidos no estudo da concentração da PPO parcialmente purificada de pinha podem ser observados na Figura 11, pelos dados de absorbância que está diretamente relacionados com a atividade da enzima. O maior valor encontrado foi para a concentração de 5,0 mg/ml, porém, para a obtenção de resultados com maior reprodutibilidade, estabeleceu-se a concentração de 2,0 mg/ml para a realização de todas as análises de atividade de PPO parcialmente purificada.



**Figura 11. Efeito da concentração da enzima PPO parcialmente purificada, na atividade enzimática.**

### 4.3.2. Ação da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura sobre diferentes substratos

Os compostos que foram substratos para a PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura foram catecol, L-dopa, pirogalol, 4-metilcatecol e ácido caféico, como ilustra a Figura 12.



**Figura 12. Ação de diferentes substratos preparados na concentração de 15,0 mM em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,5), à temperatura de 20 °C sobre a enzima parcialmente purificada em polpa de pinha madura.**

De acordo com a metodologia usada na determinação da atividade da PPO, os diferentes substratos foram testados em quatro concentrações diferentes (3,0, 6,0, 10,0 e 15,0 mM). No entanto, na Figura 12, são apresentados os resultados da atividade da enzima, correspondendo apenas a concentração de 15 mM, por apresentar maior atividade. Os resultados da oxidação dos substratos

foram expressos em absorvância a 420 nm de acordo com o exposto por TONO et alii (1986) em PPO de peras japonesas.

**Tabela 3. Especificidade da enzima PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura frente a diferentes substratos**

Substratos (15 mM)	Configuração	Atividade relativa (%)	
		1'	5'
Catecol	o-dihidroxifenol	100,0	100,0
L- dopa	o-dihidroxifenol	54,3	42,2
Pirogalol	trihidroxifenol	51,4	41,2
4-metilcatecol	o-dihidroxifenol	51,8	18,6
Ácido caféico	o-dihidroxifenol	25,7	13,7
Guaiacol	o-dihidroxifenol	1,8	1,8
Ácido clorogênico	o-dihidroxifenol	0	0
p-cresol	monohidroxifenol	0	0
Ácido p-cumárico	monohidroxifenol	0	0
L-tirosina	monohidroxifenol	0	0

A Tabela 3 mostra que a enzima parcialmente purificada oxidou fortemente o substrato catecol, e de forma menos acentuada L-dopa, pirogalol e 4-metilcatecol. Houve uma diminuição rápida da ação com ácido caféico e guaicol e não apresentou nenhuma atividade com ácido clorogênico, p-cresol, ácido p-cumárico e L-tirosina.

A PPO parcialmente purificada da polpa de pinha madura apresentou especificidade distinta pelo catecol em comparação aos demais substratos relacionados na Tabela 3. A enzima parcialmente purificada demonstrou atividade com substratos o-difenóis e nenhuma atividade para monofenóis, podendo evidenciar a sua ação como catecolase e nenhuma atividade como cresolase.

WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990b), caracterizando a PPO bruta de morango, verificaram que a atividade máxima da enzima foi alcançada com D-catequina como substrato, seguida por 4-metilcatecol e pirogalol, não apresentando atividade de cresolase. ARSLAN et alii (1997), na extração da PPO de *Allium* sp, uma erva utilizada para dar flavor aos queijos, verificaram que catecol e L-dopa foram oxidados pela enzima, porém não houve oxidação da L-tirosina. ARSLAN et alii (1998) estudando PPO de damasco, relataram que a mesma apresentou maior atividade com o substrato catecol seguido por L-dopa e ácido gálico, não apresentando atividade para monofenóis como L-tirosina.

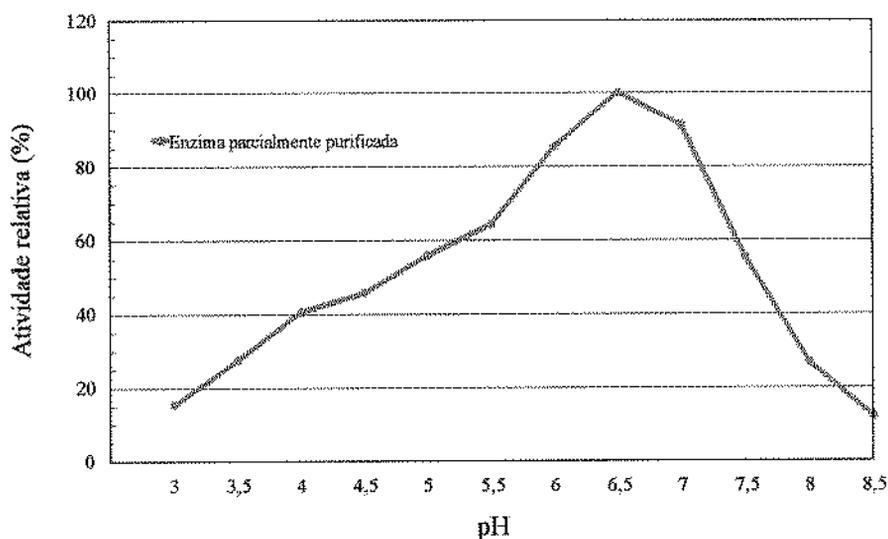
#### **4.3.3. Efeito do pH na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura**

O efeito do pH na atividade da PPO parcialmente purificada foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.5.3. A Figura 13 mostra que a enzima bruta apresentou maior atividade em pH 6,5, em tampão fosfato de potássio 0,05M. Estudos conduzidos por KNAPP (1965) apresentaram para a PPO parcialmente purificada da berinjela um pH 5,0. SIDDIQ et alii (1996), encontraram para PPO de ameixa pH de 5,8, 6,0 e 6,4 com ácido caféico,

catecol e 4-metilcatecol, respectivamente. ARSLAN et alii (1997), obtiveram um valor de pH de 7,5 para a PPO parcialmente purificada de *Allium* sp.

VAMOS-VIGYÁZÓ (1981) relata em sua revisão, que o pH ótimo de polifenoloxidasas de várias fontes de vegetais, incluindo maçã, pera, pêsego, uva, banana, abacate, batata e cogumelos, utilizando diferentes substratos pode variar em uma grande faixa entre 5,0 e 7,0, com exceção da cereja que apresenta um pH ótimo entre 4,0 e 4,5.

Em geral, muitas plantas apresentam o máximo de atividade em valores de pH próximos da neutralidade, no entanto, o pH ótimo de atividade da PPO tem varia com a origem da enzima e do substrato (OKTAY et alii, 1995).



**Figura 13. Efeito do pH na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.**

#### 4.3.4. Efeito do pH na estabilidade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura

O efeito do pH na estabilidade da PPO parcialmente purificada, foi determinado conforme método descrito no item 3.2.5.4. A Figura 14 indica que a enzima foi estável entre pH 6,0 a 7,5 e reteve ao redor de 90% de atividade na faixa de pH 6,0 a 8,0.

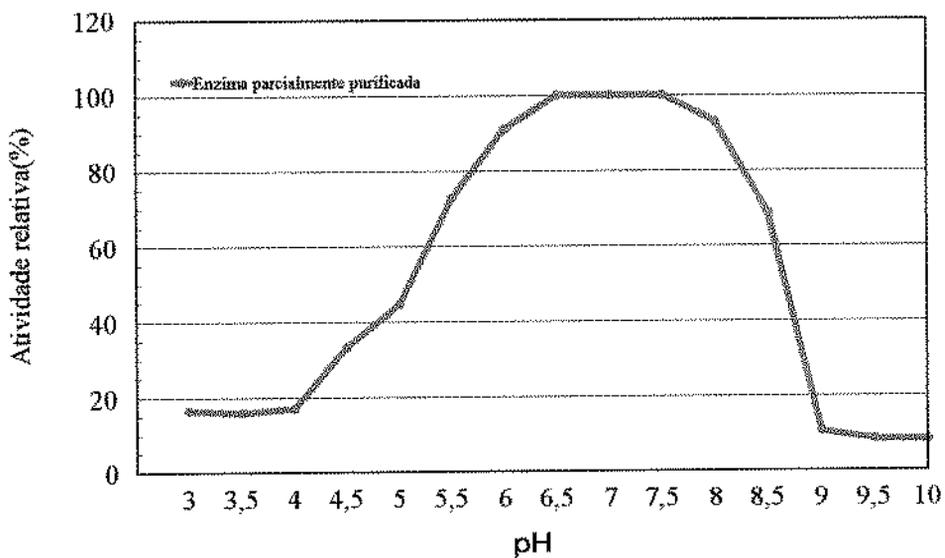
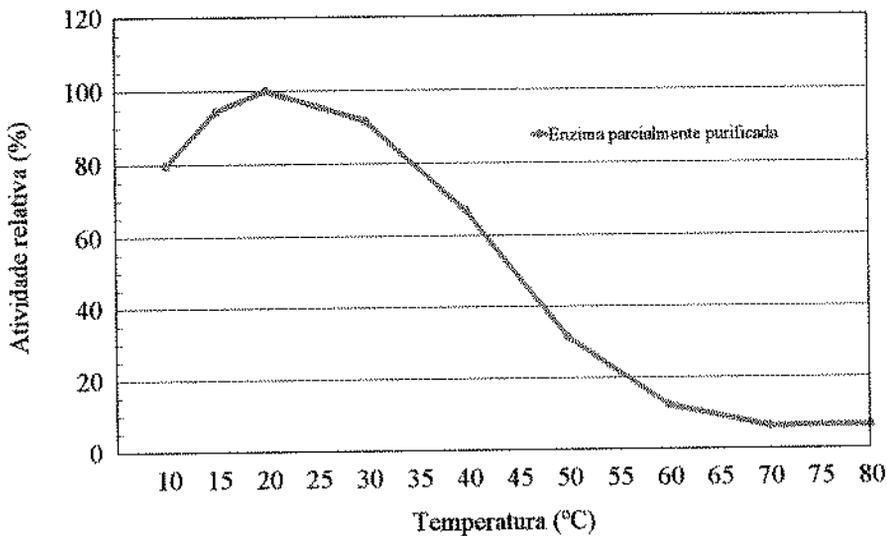


Figura 14. Efeito do pH na estabilidade da enzima PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.

#### 4.3.5. Efeito da temperatura na atividade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura

Estudo referente a influência da temperatura na atividade da PPO parcialmente purificada foi realizado de acordo com item 3.2.5.5. A Figura 15 apresenta a influência da temperatura na atividade da enzima, que apresentou atividade ótima a 20 °C, idêntica portanto, à PPO descrita por SIDDIQ et alii (1992), que apresentaram dados com um máximo de atividade da PPO bruta a 20 °C, com uma retenção de atividade de 80 %, numa ampla faixa de temperatura (10-50 °C).



**Figura 15. Efeito da temperatura na atividade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.**

#### 4.3.6. Efeito da temperatura na estabilidade da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura

O efeito da temperatura na estabilidade da PPO parcialmente purificada foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.5.6. A Figura 16, ilustra que a PPO foi estável nas temperaturas de 10 a 30°C durante 1 hora, sendo inativada rapidamente em temperaturas superiores a 50°C.

Para SIDDIQ et alii (1992), a PPO de ameixas apresentou atividade em ampla faixa de temperatura (10-50°C), porém, acima de 50°C a enzima perdeu a atividade rapidamente. No entanto, não inativada completamente na temperatura de 70°C.

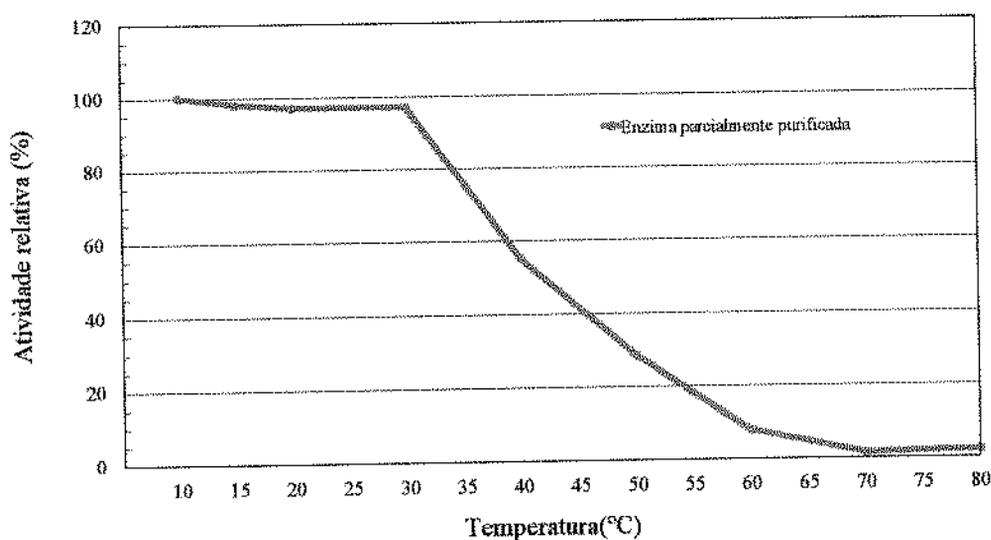


Figura 16. Efeito da temperatura na estabilidade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.

#### **4.3.7. Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura**

O efeito inibitório dos reagentes químicos, na atividade da PPO, foi estudado incubando-se a enzima e o substrato na presença dos reagentes químicos, nas concentrações de 1,5, 5,0 e 10,0 mM a 20°C durante 5 minutos, de acordo com metodologia descrita no item 3.2.5.7.

A Tabela 4 mostra o efeito de vários inibidores sobre a atividade da PPO parcialmente purificada, utilizando catecol com substrato. As substâncias que ocasionaram maior inibição foram:  $\beta$ -mercaptoetanol, glutathiona e ácido ascórbico, seguidas de L-cisteína, metabissulfito de sódio, KCN e tiouréia. Apresentaram menor inibição o ácido cítrico, EDTA, KCl e nenhuma inibição foi observada com NaCl.

Com relação ao uso do EDTA, foi constatado pouca inibição sob as condições de análise usada. Este fato foi também apresentado por SHARMA & ALI (1980) e IKEDIABI & OBASUYI (1982) com enzima PPO de batata e inhame. É provável que o cobre, grupo prostético está ligado sem a estrutura tridimensional da proteína, ou a estabilidade do complexo íon cobre com a enzima é muito mais forte do que o cobre com o EDTA na análise em pH 6,5. FUJITA & TONO (1988) e DAS et alii (1997) também obtiveram pequena inibição com EDTA no caso da PPO de berinjela e abacaxi, respectivamente.

**Tabela 4. Efeito de inibidores sobre a atividade da PPO parcialmente purificada em polpa de pinha madura.**

Inibidor	Concentração do inibidor (mM)	Atividade relativa(%)	Inibição(%)
Controle	Ausente	100,0	0
L-cisteína	10,0	0	100,0
	5,0	1,9	98,1
	1,5	4,6	95,4
KCN	10,0	1,7	98,3
	5,0	2,4	97,6
	1,5	8,3	91,7
KCl	10,0	78,0	22,0
	5,0	89,6	10,4
	1,5	98,5	1,5
NaCl	10,0	100,0	0
	5,0	100,0	0
	1,5	100,0	0
Ácido ascórbico	10,0	1,8	98,2
	5,0	2,0	98,0
	1,5	2,2	97,8
Metabissulfito de sódio	10,0	1,5	98,5
	5,0	3,2	96,8
	1,5	3,7	96,3
Tiouréia	10,0	4,3	95,7
	5,0	4,6	95,4
	1,5	8,0	92,0
Ácido cítrico	10,0	39,9	60,1
	5,0	60,9	39,1
	1,5	76,8	23,2
EDTA	10,0	69,4	30,6
	5,0	70,0	30,0
	1,5	71,0	29,0
Glutationa	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0
$\beta$ -mercaptoetanol	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0

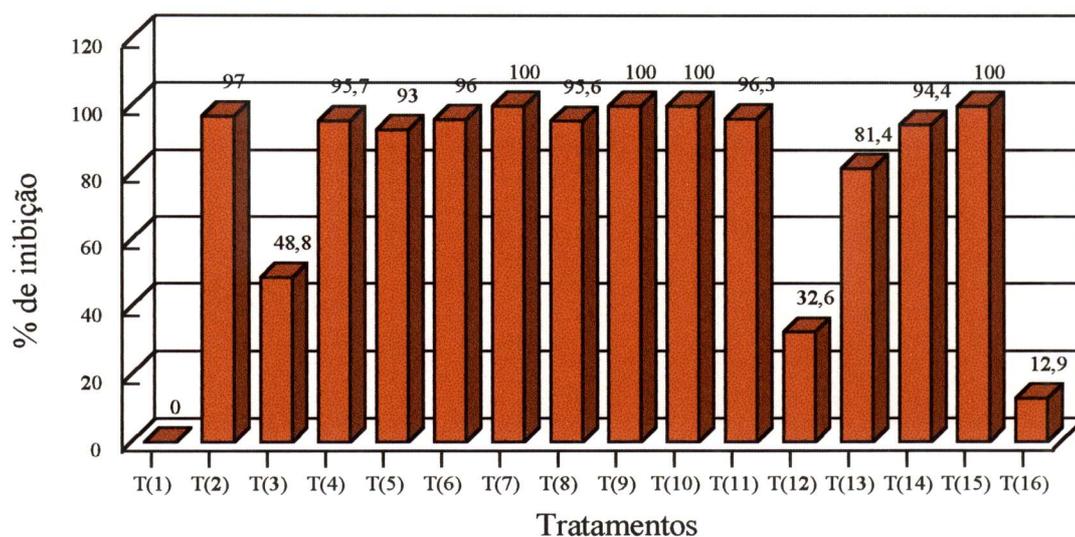
#### **4.3.8. Estudo comparativo dos tratamentos de inativação enzimática da PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura**

O efeito dos tratamentos para inibição enzimática da PPO parcialmente purificada, foi verificado de acordo com o item 3.2.5.8. Na Figura 17, são apresentados os valores da percentagem de inibição da atividade da PPO parcialmente purificada, e a comparação do efeito dos diversos tratamentos sobre a enzima.

A PPO parcialmente purificada, foi 100 % inibida pelos tratamentos com ácido ascórbico 0,1 % + ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05 % (T<sub>7</sub>); ácido ascórbico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05% (T<sub>9</sub>); ácido ascórbico 0,1 % + Temperatura 70°C (T<sub>10</sub>) e ácido ascórbico 0,1 % + ácido cítrico 0,1 % + metabissulfito de sódio 0,05 % + temperatura 70°C (T<sub>15</sub>). Os tratamentos menos eficazes foram com ácido cítrico 0,1 % (T<sub>3</sub>); ácido cítrico 0,1 % + EDTA 30 ppm (T<sub>12</sub>) e EDTA 30 ppm (T<sub>16</sub>). Os demais tratamentos apresentaram percentagem de inibição entre 80 e 97 %.

Com relação ao uso do EDTA, verifica-se que não houve ação sinérgica com os outros aditivos quando utilizados em associação, podendo-se notar que o uso isolado do ácido ascórbico e ácido cítrico foram mais eficazes. Esta observação coincide com aquelas encontradas por ALMEIDA (1990), em seu trabalho com inativação de PPO de diversas frutas e hortaliças.

O tratamento efetuado com ácido ascórbico 0,1% e temperatura 70°C durante dois minutos pode substituir o emprego dos sulfitos. Os tratamentos menos eficazes para a inativação da PPO parcialmente purificada em polpas de pinhas maduras foram com ácido cítrico 0,1% e EDTA 30 ppm.



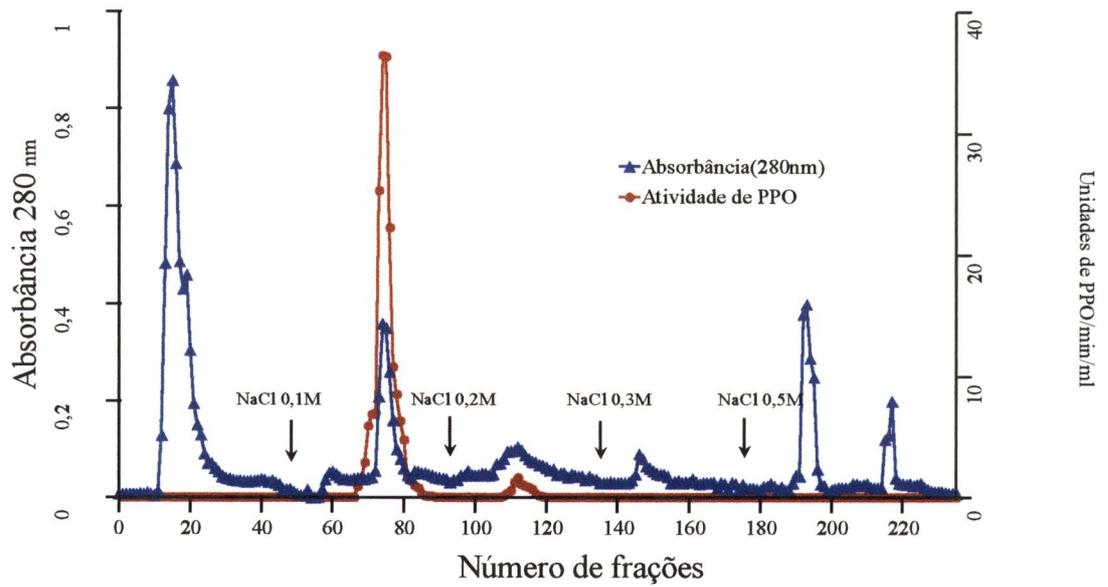
**Figura 17. Efeito comparativo dos tratamentos de inibição com a PPO parcialmente purificada de polpa de pinha madura.**

#### **4.4. Purificação da enzima PPO**

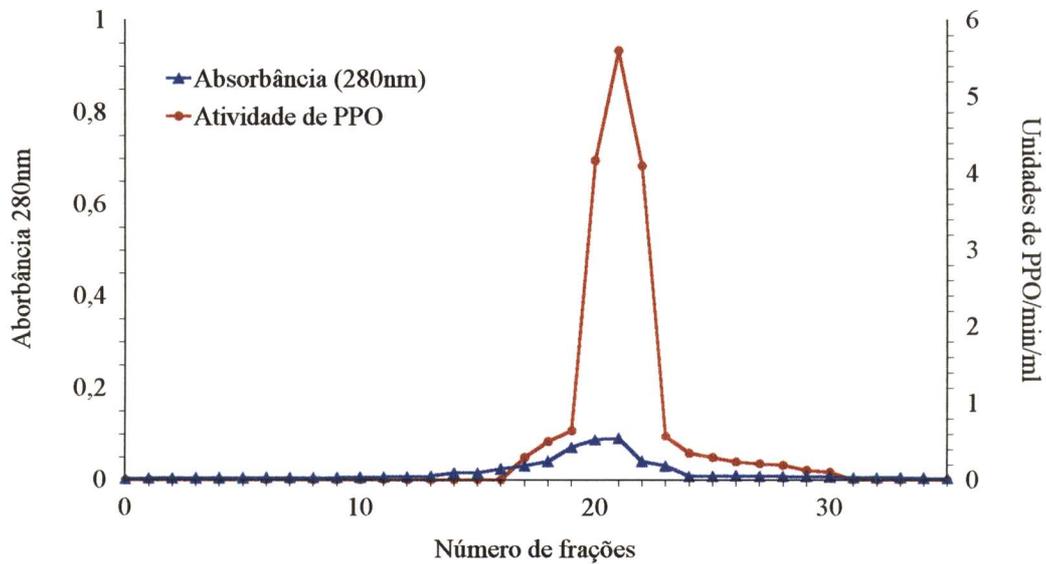
A purificação da PPO de polpa de pinha madura, foi realizada de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.2.4 e 3.2.6. Os processos de purificação, aos quais a enzima foi submetida, levaram a obtenção da enzima com um alto grau de pureza.

##### **4.4.1. Cromatografia da PPO em colunas de DEAE-Toyopearl 650M e Toyopearl HW55F**

O procedimento seguido nesta etapa, foi descrito no item 3.2.6.1. O perfil cromatográfico da coluna de DEAE-Toyopearl 650M apresentado na Figura 18, mostra que a atividade de PPO foi obtida em dois picos. A PPO adsorvida na resina eluída em tampão fosfato de potássio 0,025M pH 7,0 contendo 0,1M de NaCl, foi denominada de Fração-I, demonstrando elevada atividade; a fração eluída em tampão fosfato de potássio pH 7,0 contendo 0,2M de NaCl, de Fração-II, apresentou baixa atividade da enzima. As frações ativas do primeiro pico de atividade da enzima PPO foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C e aplicadas em coluna de Toyopearl HW 55F. As frações do segundo pico de atividade foram reunidas e dialisadas, porém não foram aplicadas em coluna de Toyopearl HW 55F devido o baixo teor de proteínas, sendo comprovado por resultados posteriores de eletroforese, pelo não aparecimento de bandas.



**Figura 18. Cromatografia da PPO de polpa de pinha madura em coluna de DEAE-Toyopearl 650M.**



**Figura 19. Cromatografia da Fração-I da PPO de polpa de pinha madura em coluna de Toyopearl HW 55F.**

As frações ativas reunidas obtidas na Fração-I em coluna de DEAE-Toyopearl 650M foram aplicadas na coluna de Toyopearl HW 55F, apresentando o perfil cromatográfico mostrado na Figura 19. A atividade da enzima foi obtida em um único pico, e as frações coletadas após separações em várias colunas foram reunidas e denominadas de enzima purificada.

De acordo com FUJITA et alii (1991), purificaram a PPO de alface em coluna semelhante, obtiveram o mesmo comportamento típico da coluna final de gel Toyopearl HW 55F com um único pico de atividade. Posteriormente, FUJITA et alii (1995) em estudos de purificação da PPO de repolho, utilizando na etapa final colunas cromatográficas de Toyopearl HW 55F, também obtiveram perfil cromatográfico idêntico com um único pico.

A Tabela 5 apresenta o sumário dos processos utilizados na purificação da PPO de polpa de pinha madura.

**Tabela 5. Purificação da enzima PPO**

Etapas	Volume (ml)	Atividade total (U/min/ml) ( $\times 10^3$ )	Proteína total (mg/ml)	Atividade específica (U/mg prot.) ( $\times 10^3$ )	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	850	16481,5	2133,5	7,73	1	100
Precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisado	200	10256,0	420,0	24,4	3,2	62,2
Cromatografia em coluna DEAE-Toyopearl 650M (Fração I)	40	634,8	0,2	3174,0	411	3,85
(Fração II)	19	27,3	0,03	910,0	118	0,17
Cromatografia em coluna Toyopearl HW55F	10	52,5	0,012	4375,0	566	0,32

A PPO na Fração-I foi purificada 411 vezes após cromatografia de DEAE - Toyopearl 650M, com 3,85% de recuperação e atividade específica de 3174,0 unidades/mg de proteína. Nessa fração a atividade foi maior e foi detectada por eletroforese SDS-PAGE (Figura 27).

A cromatografia em coluna Toyopearl HW 55F, correspondente à última etapa de purificação deste experimento, resultou num aumento de 566 vezes na atividade específica da PPO, equivalente a 4375,0 unidades/mg de proteína. Estes resultados demonstraram alto grau de purificação da enzima PPO,

quando submetida à cromatografia em colunas de DEAE-Toyopearl 650M e Toyopearl HW 55F.

FUJITA & TONO (1988) utilizaram coluna de DEAE - Toyopearl 650M nas etapas de purificação de PPO de berinjela, obtendo 15,3 vezes de purificação. FUJITA et alii (1991) relataram a purificação da PPO de alface em seis etapas e, entre elas, utilizaram coluna de DEAE - Toyopearl 650M obtendo purificação de 13,0 vezes e com coluna de Toyopearl HW 55F fator de 69,7 vezes.

MURATA et alii (1992) purificaram a PPO de maçãs, obtendo na primeira etapa com DEAE-Toyopearl um fator de purificação de 15,6 vezes, posteriormente, utilizaram Toyopearl HW 55 e DEAE - Toyopearl 650M com purificação de 131,0 e 470,3 vezes, respectivamente.

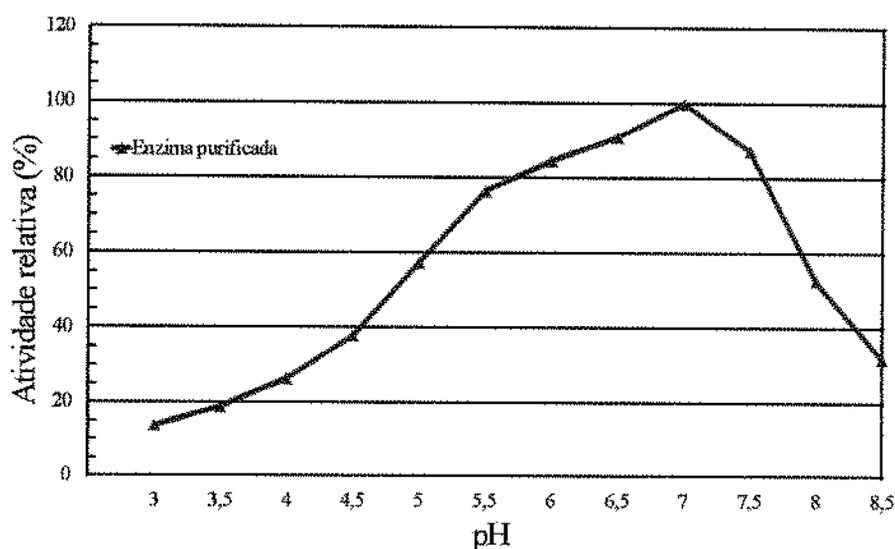
FUJITA et alii (1995) utilizaram nas duas últimas etapas de purificação da PPO de repolho cromatografia em Toyopearl HW 55F, obtendo 382,7 e 401,5 vezes de purificação, dados esses comparáveis aos obtidos na purificação de PPO de polpa de pinha madura.

Os estudos existentes na literatura relacionados com o grau de purificação da enzima PPO utilizando cromatografia de troca-iônica e filtração em gel com resinas empregadas neste trabalho, mostram resultados diferenciados dependendo da origem da planta e a forma como é extraída a PPO, podendo influenciar nos resultados finais.

## 4.5. Caracterização da enzima PPO purificada

### 4.5.1. Efeito do pH na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura

A Figura 20 apresenta o efeito do pH, na atividade enzimática da PPO purificada, demonstrando que mesma, possui uma atividade ótima em pH 7,0 usando catecol como substrato.



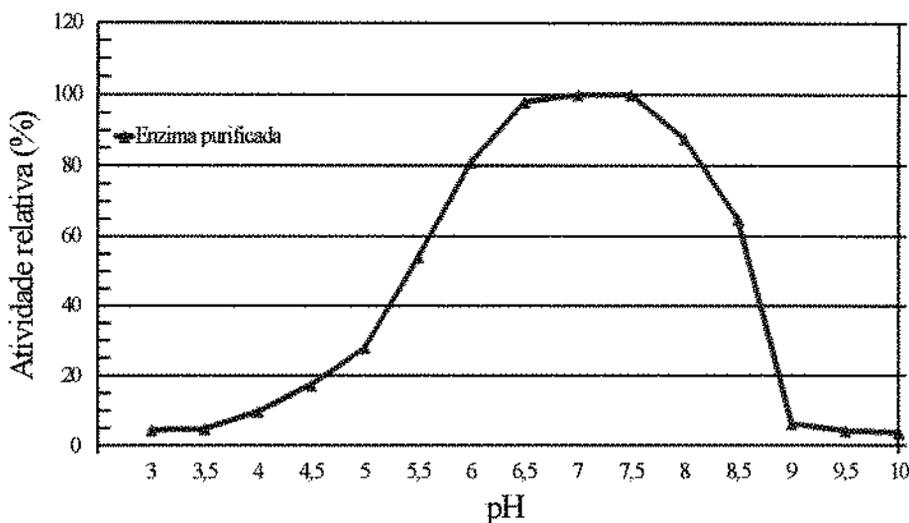
**Figura 20. Efeito do pH na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura.**

MURATA et alii (1992) verificaram que o pH ótimo para a atividade máxima da enzima de maçãs (*Malus pumila*) foi 4,0, utilizando ácido clorogênico como substrato. OTKAY et alii (1995) em estudos com maçãs Amasya, obtiveram de diferentes valores pH ótimo para cada substrato utilizado, obtendo o máximo de atividade em pH 7,0 para catecol, 9,0 para 4-metilcatecol, 8,6 para pirogalol e 6,6 para L-dopa. Em geral, a enzima encontrada em diferentes frutas

apresentam o máximo de atividade próximo do pH neutro. O pH também pode interferir com a estabilidade da enzima, condição para a sua utilização em processos industriais.

#### 4.5.2. Determinação do pH de estabilidade da PPO purificada

O estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.7.2. A Figura 21 ilustra o efeito do pH na estabilidade da enzima purificada, apresentando-se mais estável na faixa de pH 6,5 a 7,5.



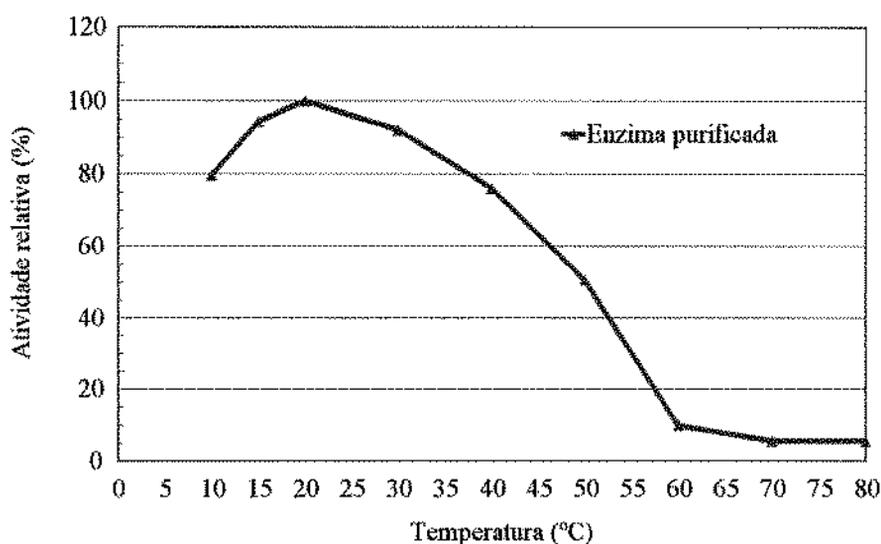
**Figura 21. Efeito do pH na estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura.**

MURATA et alii (1992), verificaram que o pH de estabilidade da enzima de maçãs da variedade Fuji, foi de 6,0 a 8,0. FUJITA et alii (1995), em

trabalho com PPO de repolho, encontraram pH de estabilidade na faixa de 6,0 a 11,0.

#### 4.5.3. Determinação da temperatura ótima de atividade da PPO purificada

O efeito da temperatura na atividade da enzima PPO de polpa de pinha foi determinado medindo-se a sua atividade nas temperaturas de 10 a 80 °C, de acordo com o método descrito no item 3.2.7.3. Na Figura 22 esta representado que a atividade enzimática da PPO purificada foi máxima a 20 °C.



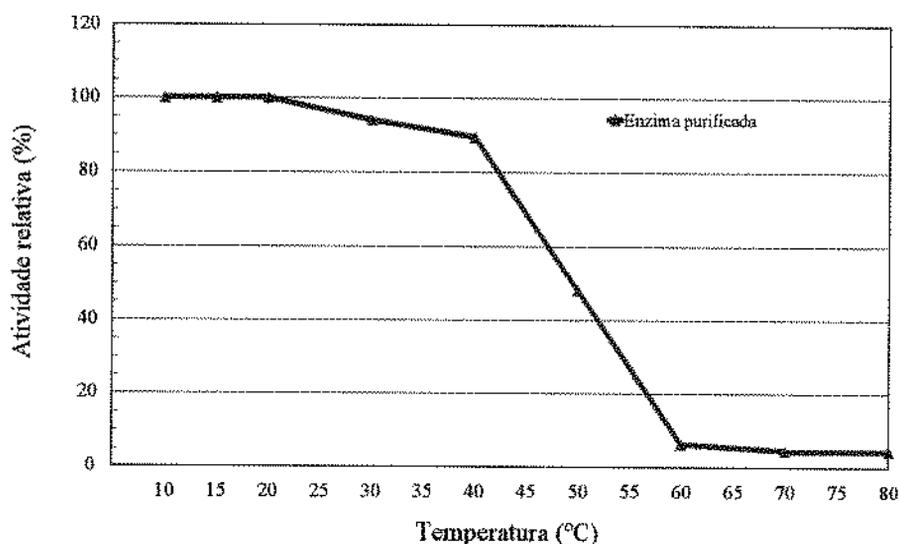
**Figura 22. Efeito da temperatura na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura.**

Resultados semelhantes foram descritos por SIDDIQ et alii (1994), para PPO de peras, obtendo uma temperatura ótima de 20 a 23°C, usando 4-metilcatecol como substrato.

Segundo OKTAY et alii (1995), a PPO purificada de maçãs Amasya apresentou temperatura ótima de atividade a 15°C, tendo o catecol como substrato. A atividade decresceu gradualmente com o aumento da temperatura, não acusando atividade acima de 60 °C.

#### 4.5.4. Determinação da temperatura de estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura

Estudo referente à influência da temperatura na estabilidade da PPO purificada de polpas de pinhas maduras foi realizado de acordo com as condições descritas no item. 3.2.7.4. A PPO mostrou-se estável após tratamento térmico a 20°C durante 30 minutos. A 30°C, observou-se uma perda de 6% em sua estabilidade. Após tratamento térmico a 60, 70 e 80°C durante 30 minutos, verificou-se uma inativação enzimática de 93,6 e 95,5 % conforme demonstra a Figura 23.



**Figura 23. Efeito da temperatura na estabilidade da PPO purificada de polpa de pinha madura.**

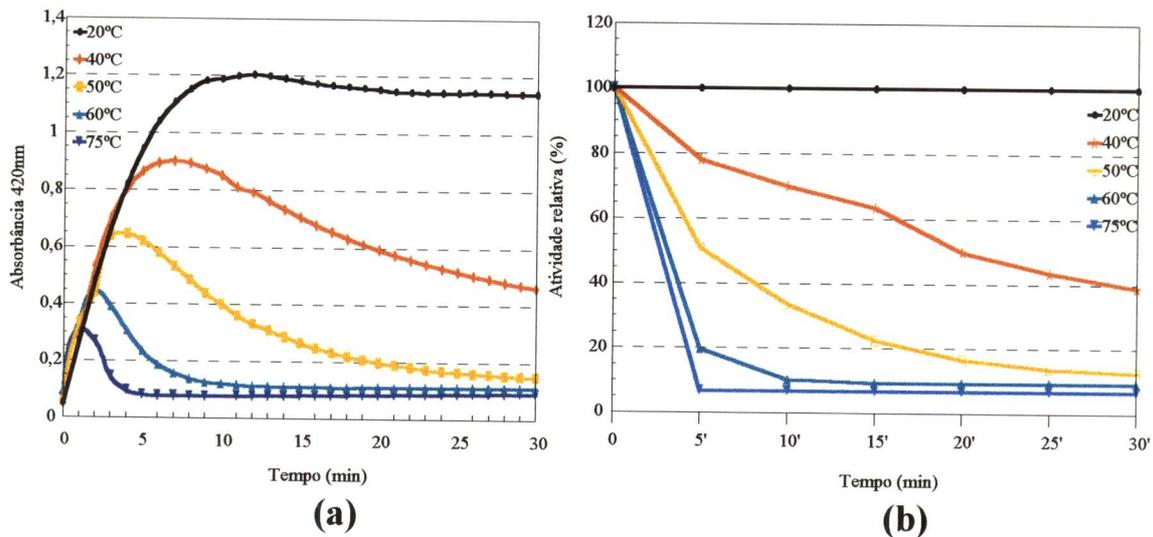
Dados semelhantes foram encontrados por SACHDE, et alii (1989), quando caracterizaram a PPO de Barhee e Zahdi frutas do Iraque, obtendo estabilidade térmica para a enzima entre 20 e 35°C.

MURATA et alii (1992) afirmaram que a enzima PPO purificada de maçãs foi instável ao aquecimento quando submetida a 30°C por 5 minutos, perdendo atividade que foi reduzida a 75%, apresentando perda completa de atividade a 50°C.

VAMOS-VIGYÁZO (1981) relatou que, dependendo da origem, a PPO é considerada uma enzima de baixa termoestabilidade. A estabilidade térmica difere entre cultivares e múltiplas formas de PPO da mesma fonte como tecidos de frutas homogeneizados e seus respectivos sucos. Demonstrou também, que o tratamento térmico de curta duração a 70-90 °C é suficiente para reduzir substancialmente ou eliminar completamente a atividade da PPO em produtos de origem vegetal. Ao contrário do exposto, a enzima é relativamente estável quando armazenada em temperaturas abaixo de zero.

#### **4.5.5. Inativação térmica da enzima PPO purificada**

A Figura 24 (a) e (b) ilustra nitidamente o comportamento da PPO de pinha quando submetida as temperaturas de 20 a 75°C durante 30 minutos. A 40°C observou-se uma perda de 20% com 5 minutos de incubação e 60% com 30 minutos, sendo completamente inativada a 75 °C durante 5 minutos.



**Figura 24. Termoestabilidade da enzima PPO purificada de polpa de pinha madura, (a) comportamento da PPO pelos dados de absorbância ; (b) comportamento da PPO, em atividade relativa.**

A Figura 24 (a) e (b) ilustra nitidamente o comportamento da PPO de pinha quando submetida a temperaturas na faixa de 20 a 75°C, durante 30 minutos. A 40°C observou-se uma perda de 20% da atividade após 5 minutos de tratamento térmico e 60% com 30 minutos, sendo que a enzima foi completamente inativada a 75 °C durante 5 minutos.

#### **4.5.6. Efeito de inibidores sobre a atividade da enzima PPO purificada**

O efeito dos reagentes químicos na atividade da PPO purificada de polpa de pinha madura foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.2.5.7.

A Tabela 6 mostra os efeitos de vários inibidores sobre a atividade da PPO purificada tendo o catecol como substrato. A atividade de PPO foi fortemente inibida na presença de L-cisteína, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, glutathione e  $\beta$ - mercaptoetanol em todas as concentrações, seguida por KCN e tiouréia. Por outro lado, sofreu menor inibição por ácido cítrico, KCl, e EDTA. A atividade enzimática da PPO não foi influenciada pela presença de NaCl na concentração 1,5 mM em relação ao volume final. EDTA praticamente não inibiu a enzima nas condições de análise usadas, o que foi constatado também por IKEDI OBI & OBASUYI (1982) e SHARMA & ALI (1980) com PPO de inhame e batata, demonstrando que a estabilidade do complexo ion cobre com a enzima é muito mais forte do que o cobre com o EDTA na análise em pH 6,5. FUJITA & TONO (1988) também obtiveram resultados de pouca inibição com EDTA quando aplicado a PPO de berinjela.

De acordo com os dados obtidos, a inibição foi maior na enzima purificada do que na enzima parcialmente purificada, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 6.

**Tabela 6. Efeito de inibidores sobre a atividade da PPO purificada em polpa de pinha madura.**

Inibidor	Concentração do inibidor (mM)	Atividade relativa(%)	Inibição(%)
Controle	Ausente	100,0	0
L-cisteína	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0
KCN	10,0	0	100,0
	5,0	1,6	98,4
	1,5	4,8	95,2
KCl	10,0	62,0	38,0
	5,0	70,8	29,2
	1,5	85,0	15,0
NaCl	10,0	92,0	8,0
	5,0	97,0	3,0
	1,5	100,0	0
Ácido ascórbico	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0
Metabissulfito de sódio	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0
Tiouréia	10,0	2,7	97,3
	5,0	3,1	96,9
	1,5	6,4	93,6
Ácido cítrico	10,0	35,4	64,6
	5,0	52,3	47,7
	1,5	68,1	31,9
EDTA	10,0	59,1	40,9
	5,0	67,7	32,3
	1,5	70,0	30,0
Glutationa	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0
$\beta$ -mercaptoetanol	10,0	0	100,0
	5,0	0	100,0
	1,5	0	100,0

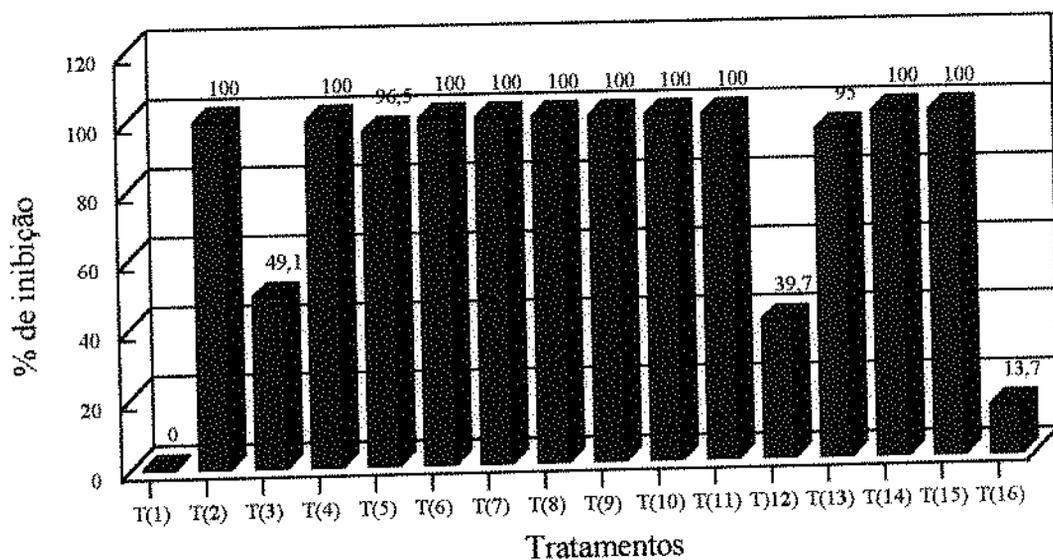
#### 4.5.7. Efeito dos tratamentos de inibição sobre a enzima PPO purificada de polpa de pinha madura

O estudo dos tratamentos comumente utilizados na indústria de processamento de frutas e hortaliças na inibição da PPO purificada foi realizado de acordo com o item 3.2.12. A Figura 25 apresenta os resultados desta inibição, podendo-se constatar que a PPO purificada foi mais sensível aos tratamentos de inibição do que a PPO parcialmente purificada (Figura 17).

A PPO purificada foi inibida em 100 % com ácido ascórbico 0,1 % (T<sub>2</sub>), metabissulfito de sódio 0,05 % (T<sub>4</sub>), ácido ascórbico 0,1 % + ácido cítrico 0,1 % (T<sub>6</sub>), ácido ascórbico 0,1 % + ácido cítrico 0,1 % + metabissulfito de sódio 0,05 % (T<sub>7</sub>), ácido ascórbico 0,1 % + EDTA 30 ppm (T<sub>8</sub>), ácido ascórbico 0,1 % + metabissulfito de sódio 0,05 % (T<sub>9</sub>), ácido ascórbico 0,1 % + temperatura 70°C (T<sub>10</sub>), ácido cítrico 0,1% + metabissulfito de sódio 0,05 % (T<sub>11</sub>), ácido cítrico 0,1 % + ácido ascórbico 0,1 % + EDTA 30 ppm (T<sub>14</sub>) e ácido ascórbico 0,1 % + ácido cítrico 0,1 % + metabissulfito de sódio 0,05 % + temperatura 70°C (T<sub>15</sub>).

Os tratamentos menos eficazes sobre a inibição da PPO purificada foram semelhantes aos submetidos à enzima PPO parcialmente purificada, porém com valores de inibição um pouco mais elevados. De acordo com as Figuras 17 e 25, o tratamento com ácido ascórbico + temperatura (T<sub>10</sub>) e ácido cítrico + ácido ascórbico + EDTA (T<sub>14</sub>) inibiram 100 % a atividade das duas enzimas, podendo ser considerado um método alternativo bastante indicado para substituir o tratamento com SO<sub>2</sub> que, embora seja um ótimo inibidor, tem sido evitado seu uso pelos danos comprovados causados a saúde do consumidor.

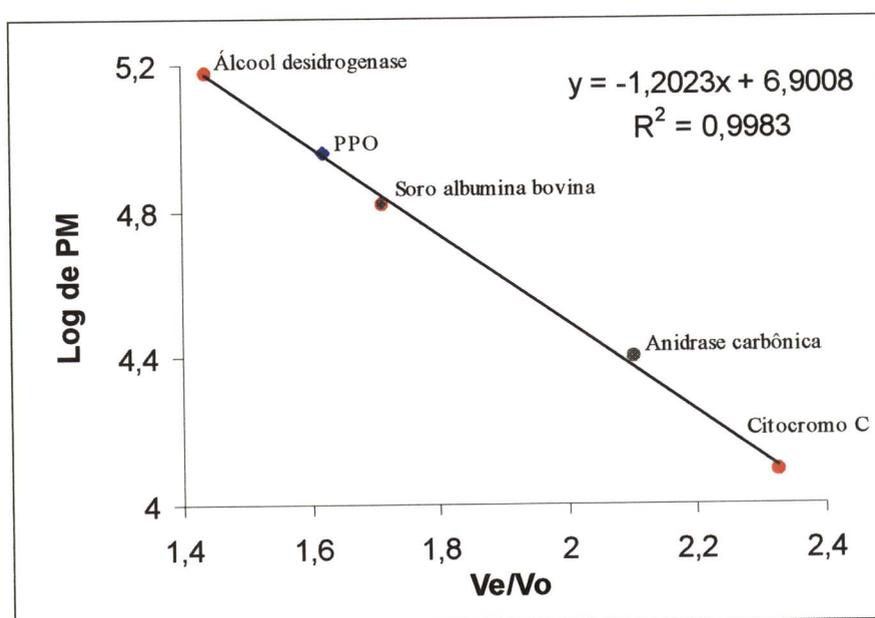
ALMEIDA (1991) relatou a importância das interações entre o emprego de compostos químicos (SO<sub>2</sub>, ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA) com o calor para o controle do escurecimento enzimático em frutas e hortaliças.



**Figura 25. Efeito comparativo dos tratamentos de inibição enzimática sobre a enzima PPO purificada de polpa de pinha madura.**

#### 4.5.8. Determinação do peso molecular da PPO por filtração em gel em coluna de Sephadex G-200

A Figura 26 ilustra a relação entre o volume de eluição e o peso molecular das proteínas padrões e da enzima PPO purificada em coluna de Sephadex G-200, sendo observado um único pico de atividade, indicando tratar-se de um monômero. O peso molecular da PPO purificada de polpa de pinha madura foi estimado em 90.700 daltons através da filtração em gel de Sephadex G-200, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1.



**Figura 26. Determinação do peso molecular da PPO purificada em coluna de Sephadex-G200.**

O peso molecular estimado para a enzima PPO de pinhas em filtração em gel, foi maior do que os encontrados em outras fontes da enzima, como repolho (FUJITA et alii, 1995), Satsuma mandarin (FUJITA & TONO, 1979) e nabo (FUJITA & TONO, 1980), estimados ao redor de 29.000 a 40.000 daltons.

KINDRON et alii (1977) relataram que o peso molecular da PPO de uva foi de 80.000 daltons, ANOSIKE & AYAEBENE (1981) em pesquisa com inhame, encontraram peso molecular de 115.000 para a PPO com coluna de Sephadex G-100. Os mesmos autores relatam que os pesos moleculares variam dependendo da fonte do vegetal, método de extração e procedimentos de determinação.

Para ROUDSARI et alii (1981), o peso molecular aparente da PPO de berinjela estimado por filtração em gel Sephadex G-100 foi  $79.000 \pm 5.000$  daltons, valor este frequentemente citado na literatura.

#### **4.5.9. Determinação do peso molecular através de eletroforese em SDS-PAGE**

Para identificar e monitorar proteínas durante as etapas de purificação, além de verificar a homogeneidade das frações utilizou-se SDS-PAGE.

O peso molecular da PPO purificada de polpa de pinha madura foi estimado por eletroforese em gel SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.2.8.2. A enzima apresentou-se como uma única banda de proteína ilustrado na Figura 27, com peso molecular ao redor de 81.000 daltons determinado por fotodensitometria. Conforme mostra a Figura 27, a PPO foi homogênea pelo

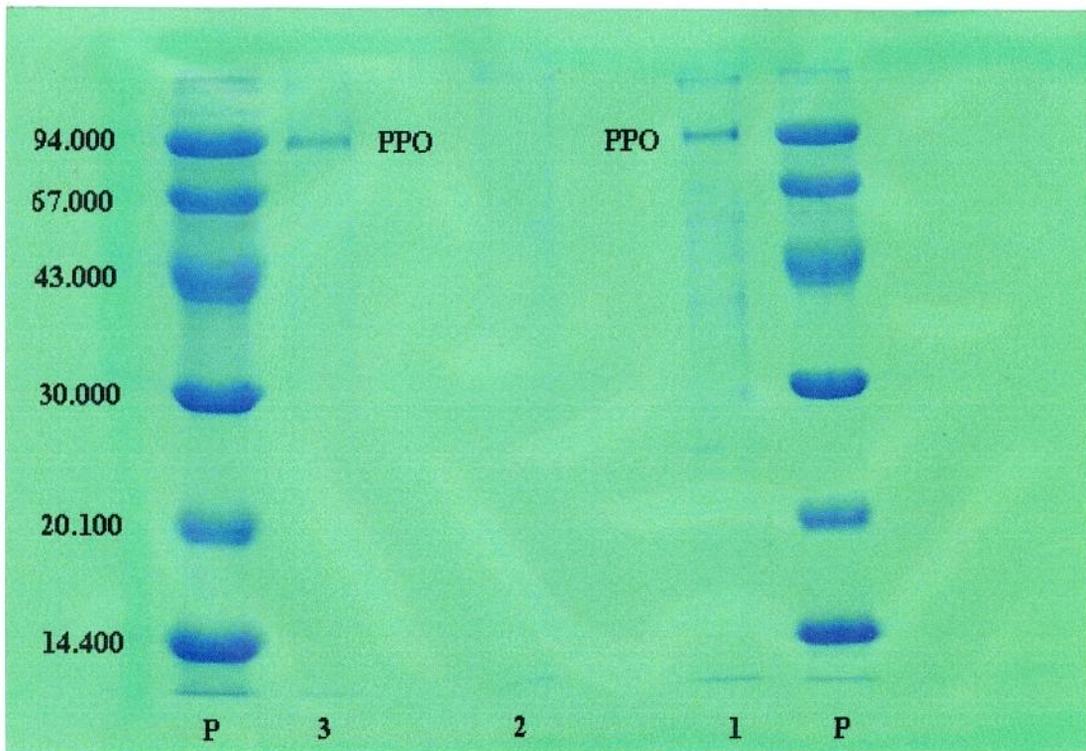
aparecimento de uma única banda na última etapa de purificação em coluna de Toyopearl HW 55F, quando corou-se o gel em Coomassie brilliant blue G-250.

IKEDIABI & OBASUYI (1982) em purificação de o-difenolases de inhames, detectaram uma única banda usando eletroforese (PAGE), a qual coincidiu com a banda de atividade.

De acordo com FUJITA et alii (1991), a enzima purificada de alface foi homogênea, pelo aparecimento de uma única banda no gel de eletroforese (PAGE), apresentando peso molecular de 56.000 daltons.

MURATA et alii (1992) relataram que a enzima PPO de maçã purificada com resinas semelhantes e tendo o peso molecular determinado por SDS-PAGE, apresentou uma única banda correspondendo ao peso molecular de 65.000 daltons, com resultados semelhantes aos obtidos com gel TSK, demonstrando tratar-se de um monômero. A enzima se mostrou relativamente estável.

FUJITA et alii (1995) purificaram a PPO de repolho em colunas de Toyopearl HW 55F e os resultados de eletroforese em SDS-PAGE onde foi constatado uma banda com o peso molecular estimado em 40.000 daltons.



**Figura 27. Eletroforese de PPO purificada em gel SDS-PAGE. P = padrões de proteína: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da) e  $\alpha$  lactoalbumina (14.400 Da). 1- PPO (Fração I) DEAE Toyopearl 650M; 2- PPO (Fração II) DEAE-Toyopearl 650M ; 3- PPO Toyopearl HW 55F.**

De acordo com ZAWISTOWSKI et alii (1991), em estudos de revisão, relataram que os pesos moleculares de múltiplas formas de PPO, determinadas tanto por SDS-PAGE como filtração em gel, variam entre 12.000 a 400.000 daltons. A aparente multiplicidade da enzima reflete frequentemente o fenômeno de associação-dissociação e das condições de solventes empregados para a determinação do peso molecular. Os autores relataram que frequentemente, as amostras que apresentam múltiplas formas variam dentro da mesma espécie e nos cultivares, dependem do período de colheita e das condições de armazenamento, produzindo resultados diferentes. HAREL & MAYER (1968) observaram três formas de catecoloxidases de maçã e JANOVIKZ-KLAPP et alii (1989), encontraram para a PPO da mesma fruta, um único valor de peso molecular.

#### 4.5.10. Eletroforese - Atividade da enzima PPO

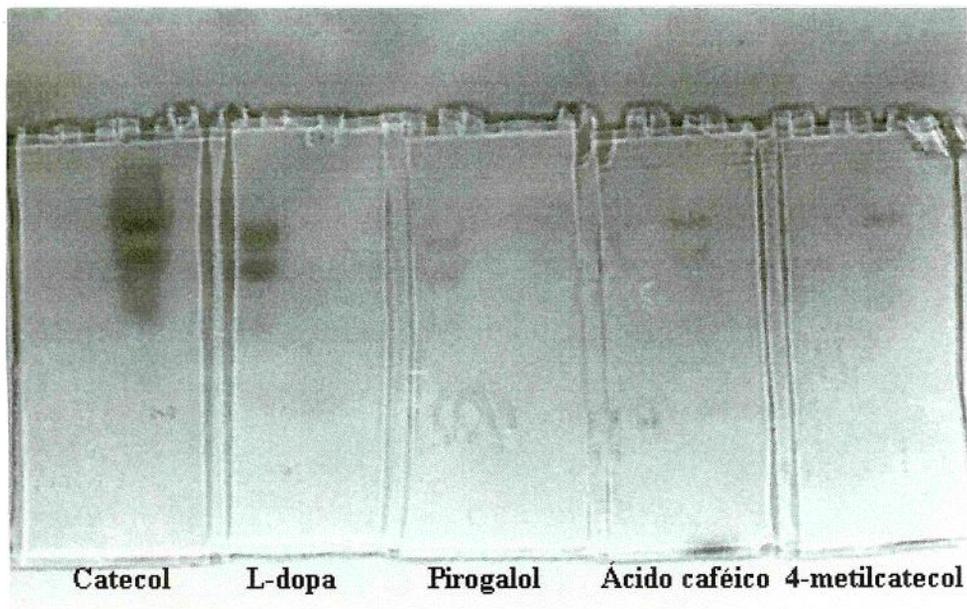
O estudo de atividade da PPO através de eletroforese seguiu a metodologia descrita no item 3.2.9.

Como ilustram as Figuras 28 e 30, foram obtidas aparentemente duas bandas relacionadas com a atividade da enzima PPO, quando reveladas com os substratos correspondendo, à posição da banda de proteína quando reveladas com Coomassie brilliant blue G250. De acordo com a metodologia, na extração da enzima foi utilizado tampão fosfato que, segundo ALFENAS et alii (1991), pode ocasionar modificações posteriores em sua estrutura. Este tipo de condição pode provocar oxidação de ligações sulfidrila nos polipeptídeos ou dos compostos a eles ligados, provocando o aparecimento de bandas de isoenzimas secundárias ou rastros corados no gel. Outra explicação para o aparecimento de bandas secundárias é a isomeria conformacional de algumas enzimas, podendo apresentar estruturas terciárias ou quaternárias diferentes, sob diferentes condições físico-químicas.

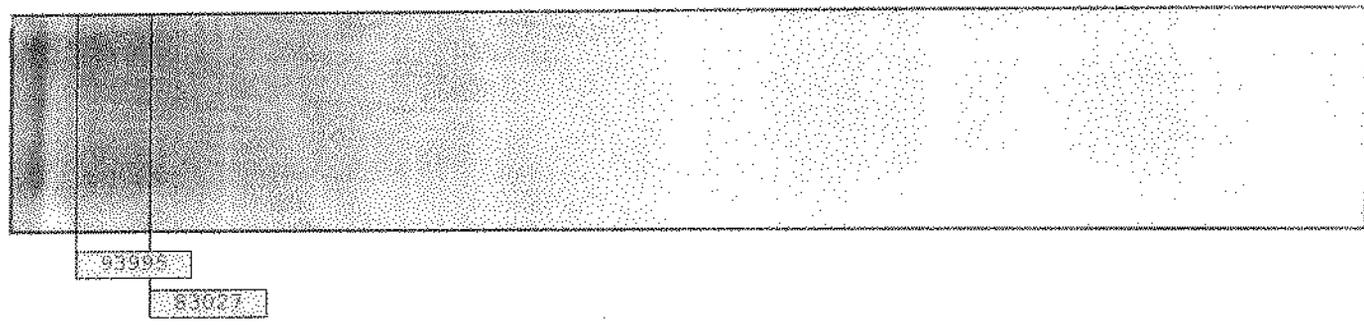
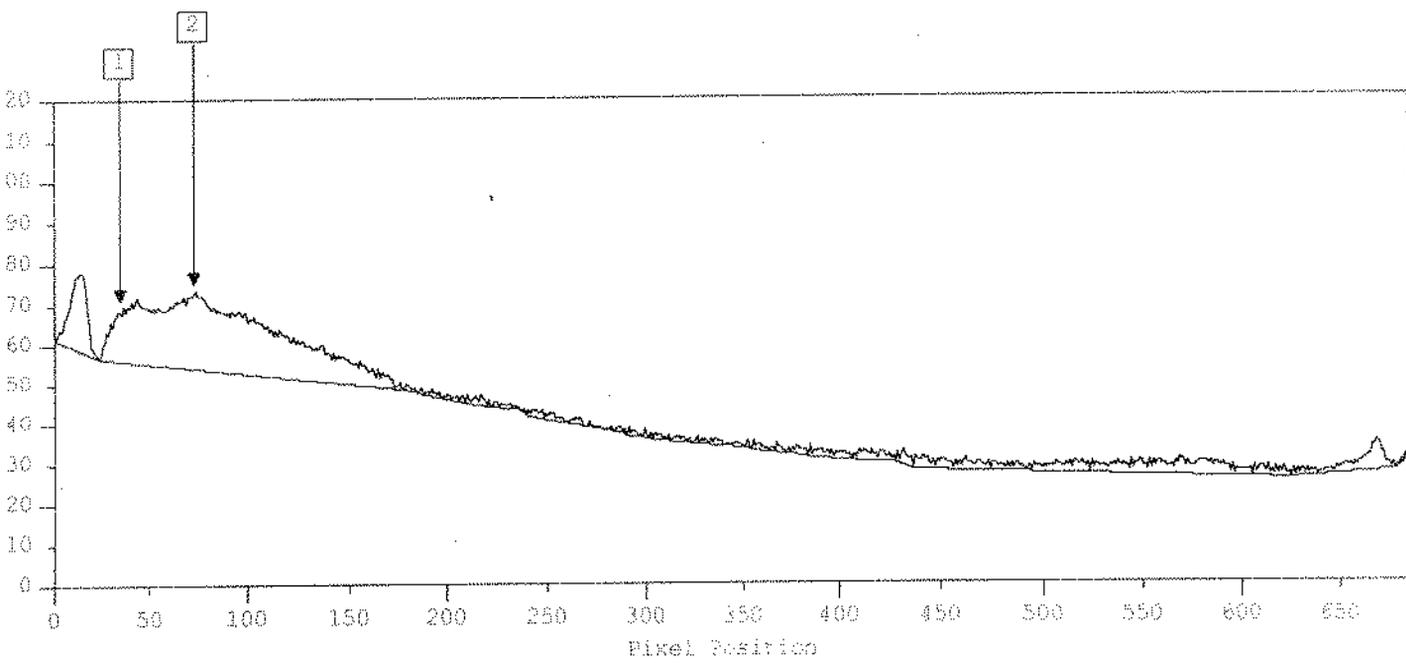
A enzima purificada de polpa de pinha madura aparece como duas bandas de atividade em PAGE, quando catecol, L-dopa, pirogalol, ácido caféico e 4-metilcatecol foram usados como substratos, não sendo detectado nenhuma atividade sobre L-tirosina, confirmando a sua ação de catecolase.

A Figura 28, apresenta formas da enzima sendo separada por eletroforese em condições não desnaturadas e detectadas pela imersão dos géis separadamente em tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) contendo diversos substratos. A atividade da enzima no gel mostra que as bandas são ativas para difenóis mas

não para monofenóis, o que também foi evidenciado pela afinidade com o substrato (Tabela 3 ). A intensidade da cor das bandas foi característica de cada substrato e o tempo necessário para o desenvolvimento da cor variou de 1 a 10 minutos. Os substratos catecol e L-dopa tiveram suas cores estáveis, como ilustra a Figura 30; no entanto, os demais perderam a cor rapidamente dificultando a visualização em fotografias, demonstrado na Figura 28. A PPO apresentou especificidade diferente em ordem decrescente com os seguintes substratos: catecol (1), L-dopa (2), pirogalol (3), ácido caféico (4), 4-metilcatecol (5). Os substratos catecol e L-dopa apresentaram maior especificidade como pode ser constatado na Figura 28, embora o desenvolvimento da cor não seja uma medida precisa de especificidade do substrato, os resultados indicam duas bandas de coloração dentro de uma larga zona difusa de coloração da enzima. As bandas de atividades foram muito próximas, no entanto, diferenciando da única banda detectada em géis de SDS-PAGE revelados com Coomassie blue G-250. O aparecimento de duas bandas de atividade em posições muito próximas com pesos moleculares ao redor de 93.000 e 83.000 daltons conforme ilustrado na Figura 29, determinado por fotodensitometria, se assemelha aos pesos moleculares encontrados em filtração em gel (  $90.000 \pm 4.000$  ) e em SDS-PAGE (  $80.000 \pm 4.000$  ), podendo estar relacionadas com diferentes cargas dos polipeptídeos ou monômeros que, segundo MAYER & HAREL (1979), são subunidades agregadas à mesma enzima.



**Figura 28. Especificidade da enzima PPO de polpa de pinha madura frente à ação dos substratos catecol, L-dopa, pirogalol, ácido caféico e 4-metilcatecol.**



**Figura 29. Peso molecular da PPO de pinha determinado através de fotodensitometria, da eletroforese em gel de poliacrilamida corado com o substrato catecol.**



**Figura 30. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, ilustrando a atividade de PPO de polpa de pinha madura corado com solução de substrato catecol e L-dopa.**

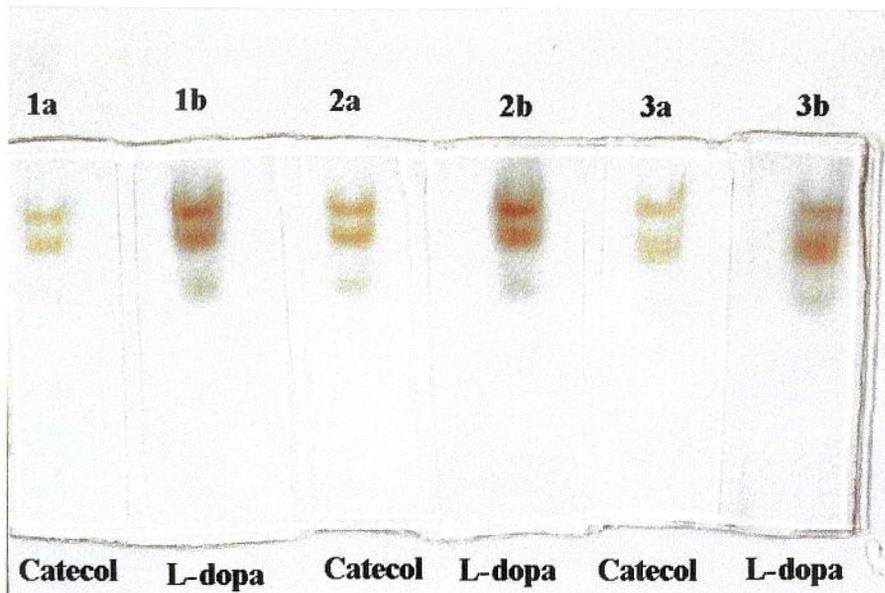
#### **4.5.11. Influência do dodecil sulfato de sódio - SDS.**

A influência do SDS foi investigado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.9.1.

A eletroforese na presença ou ausência de SDS indicou que as formas da enzima da PPO de pinha não foram afetadas por SDS. O mesmo comportamento foi observado em todos os géis revelados com catecol e L-dopa, não sendo detectada nenhuma forma latente da enzima, além de não haver mudanças na mobilidade das formas individuais bem como dissociação em pequenas subunidades devido ao SDS conforme ilustrado na Figura 31. Nota-se apenas que a intensidade da coloração foi mais forte na presença de SDS.

Resultados semelhantes foram encontrados por ANGLENTON & FLURKEY (1984) para a PPO de alface e cogumelo, porém, o mesmo comportamento não foi observado com as isoenzimas da PPO de uva, inhame e feijão.

Para ALFENAS et alii (1991), o aparecimento de bandas pode ser causada por artefatos, pela degradação de certas enzimas ou sobreposição de bandas gerando medidas errôneas do polimorfismo isoenzimático. Alguns resultados aparecem como enzimas secundárias ou rastros corados no gel. Esse efeito pode variar com o estágio de crescimento, tipo de tecido vegetal, etc.



**Figura 31.** Enzima purificada de polpa de pinha madura, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. (1a e 1b) formas da enzima submetida à separação e coloração para atividade da PPO na ausência de SDS. (2a e 2b) formas da enzima submetida à separação na ausência de SDS e coloração na presença de 0,1% de SDS. (3a e 3b) formas da enzima submetidas à separação e coloração na presença de 0,1% de SDS.

#### 4.5.12. Determinação dos parâmetros cinéticos de $K_m$ e $V_{max}$ de PPO de pinha

O efeito da concentração dos substratos catecol e L-dopa na atividade da PPO purificada, foi investigado na condição de análise usando concentrações de 4 a 25 mM. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados utilizando-se o gráfico de LINEWEVER-BURK (1934), mostrados nas Figura 32 e 33 e na Tabela 7.

A enzima apresentou maior especificidade para o substrato catecol com  $K_m$  de 7,14 mM e  $V_{max}$  de 302,0 U/min/ml. Com L-dopa os valores foram de 25,0 mM para o  $K_m$  e de 180,2 U/min/ml para  $V_{max}$ . A afinidade da PPO pelo substrato, é dependente da origem da enzima (tipo de planta), como foi observado verificado por VAMOS-VIGYÁZÓ (1981), WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990a,b) e OKTAY et alii (1995).

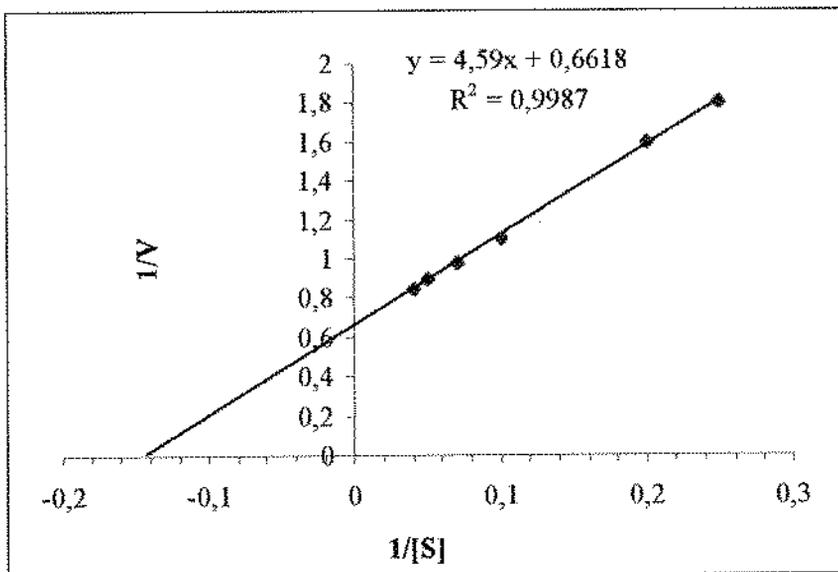
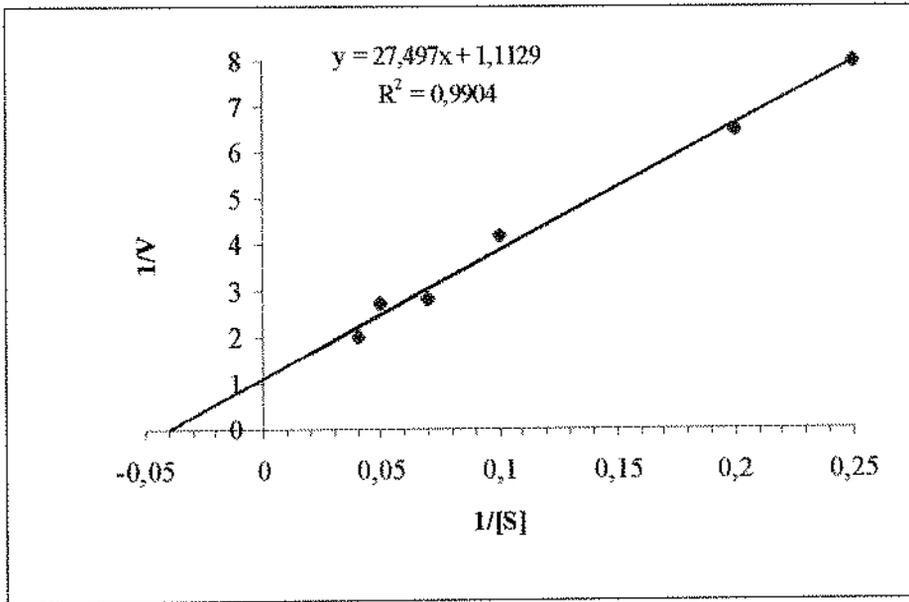


Figura 32. Determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  de PPO de polpa de pinha madura com o substrato catecol.



**Figura 33. Determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  de PPO de polpa de pinha madura com L-dopa como substrato.**

**Tabela 7. Valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima PPO de polpa de pinha madura.**

Substrato	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/min/ml)
Catecol	7,14	302,0
L-dopa	25,0	180,2
Pirogalol	22,0	125,0
Ácido caféico	12,6	52,6
4-metilcatecol	41,7	181,0

\* As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinadas pelo método de LINEWEVER & BURK.

OKTAY et alii (1995) apresentaram valores de  $K_m$  (mM) e  $V_{max}$  (U/ml) para a PPO de maçã Amasya de 34,0 e 2000 com catecol, 3,1 e 552 com 4-metilcatecol de maior afinidade, 6,5 e 27 com L-dopa, e 27,0 e 1215 com pirogalol. Em um outro trabalho VAMOS-VIGIÁZÒ (1981) apresentou um valor para  $K_m$  da PPO de maçã de 4,6 mM, com catecol como substrato.

Para SIDDIQ et alii (1996), os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  obtidos para a PPO de ameixa diferiram de acordo com os substratos usados. O  $K_m$  (mM) e a  $V_{max}$  ( $A_{420nm}/min \times 10^{-1}$ ) para 4-metilcatecol foi de 17,5 e 6,7; para catecol 19,7 e 6,6; para ácido caféico 27,4 e 1,7 e para ácido clorogênico, 31,2 e 1,9. Estes valores diferem da PPO de maçãs e uvas que apresentam baixa afinidade (alto  $K_m$ ) com 4-metilcatecol em relação ao ácido clorogênico (JANOVITZ-KLAPP et alii, 1990).

DAS et alii (1997) apresentaram resultados semelhantes, obtendo máxima atividade da enzima PPO de abacaxi da Índia quando usaram catecol como substrato, em comparação com L-dopa, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico e p-cumárico e nenhuma atividade com L-tirosina.

ARSLAN et alii (1998) apresentaram valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  para PPO de damascos de 6,6 mM e 833 U/ml/minuto para catecol, 12,5 mM e 500 U/ml/minuto para L-dopa e 20 mM e 1,5 U/ml/minuto para ácido gálico.

#### 4.6. Teor de cobre

A análise de cobre da enzima PPO purificada determinada por absorção atômica de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.15, apresentou valores de cobre de 11 ppm/peso de amostra liofilizada, caracterizando-se como uma metaloenzima, cujo valor se assemelha àquele obtido por FLICK et alii (1977), que comparou a quantidade de cobre presente na enzima PPO de diferentes variedades de berinjela com a respectiva atividade.

KINDRON et alii (1977) apresentaram o conteúdo de cobre de 0,04 %, como sendo uma quantidade muito pequena, sugerindo que o cobre pode ter sido perdido durante a purificação. Relataram ainda, que o conteúdo mínimo de cobre da enzima é de um átomo por molécula. As polifenoloxidasas são metaloenzimas contendo ao redor de 0,2% de cobre, no entanto, sua distribuição dentro da molécula não é bem definida, determinando que o conteúdo de cobre seja em torno de um átomo por cadeia de polipeptídeos ou subunidades da molécula.

MAYER & HAREL (1979) ressaltaram que os dados do conteúdo de cobre devem ser analisados com certo cuidado, devido à remoção parcial do cobre que ocorre dependendo do tipo de extração, variando de acordo com o grau de purificação e ou ação catalítica. De acordo com VAMOS-VIGYÁZÓ (1981), assume-se que um monômero tenha massa molecular ao redor de 30.000 daltons e contém um átomo de cobre. SIMPSON et alii (1987) apresentaram a dependência do íon cobre na atividade da PPO de camarão, usando L-dopa com substrato.

#### 4.7. Composição de aminoácidos da PPO purificada de polpa de pinha madura

A Tabela 8 apresenta o resultado da análise dos aminoácidos detectados na PPO de polpa de pinha madura. A concentração de cada aminoácido foi muito baixa, provavelmente devido aos baixos teores de proteínas da amostra analisada o que dificulta a sua quantificação e a reprodutibilidade dos resultados. Os aminoácidos presentes em maior concentração foram ácido aspártico, ácido glutâmico e lisina, com menores teores de metionina, arginina e tirosina, e ausência de cisteína. O triptofano não foi determinado, uma vez que ele é totalmente destruído durante a hidrólise ácida.

**Tabela 8. Composição de aminoácidos da enzima PPO de polpa pinha madura.**

Aminoácido	µg/mg de amostra	%
Ácido aspártico	854.242	11,4
Treonina	360.250	4,8
Serina	501.899	6,7
Ácido glutâmico	1200.476	16,0
Prolina	310.527	4,1
Glicina	342.398	4,6
Alanina	506.479	6,8
Cisteína	0.000	-
Valina	430.981	5,7
Metionina	14.865	0,2
Isoleucina	298.227	4,0
Leucina	514.571	6,9
Tirosina	179.131	2,4
Fenilalanina	300.458	4,0
Lisina	931.181	12,4
NH <sub>3</sub>	364.819	4,9
Histidina	260.858	3,5
Triptofano	ND*	-
Arginina	128.680	1,7

\*ND = Não determinado. O triptofano é destruído durante a hidrólise ácida.

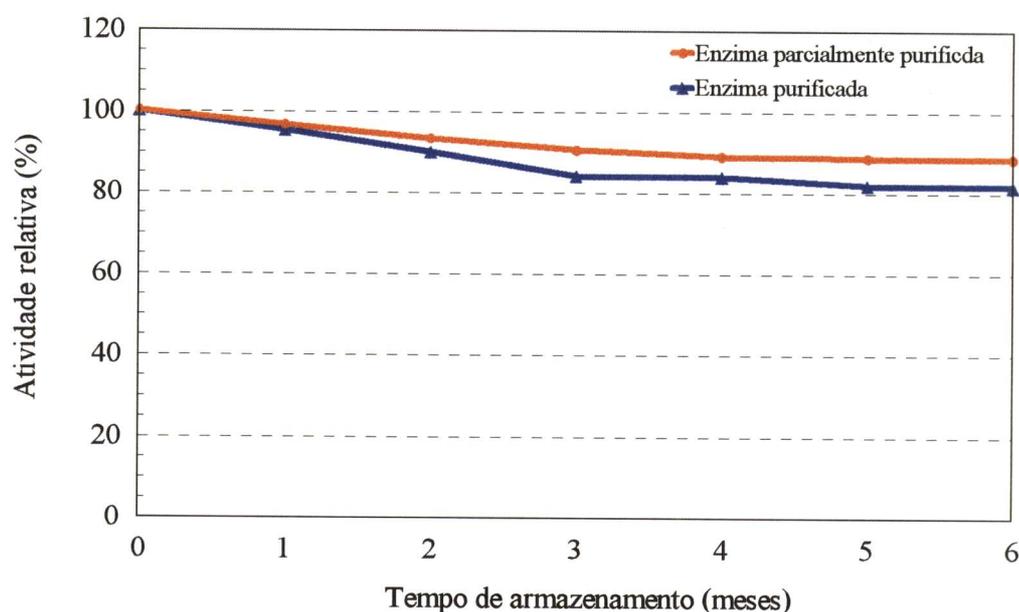
Estes resultados se assemelham àqueles apresentados por KINDRON et alii (1977) para a PPO de uva, que possui uma grande quantidade ácido aspártico, seguido do ácido glutâmico, além de conter pouca cisteína, histidina e metionina.

INTERESSE et alii (1988), ROBB (1984), ZAWISTOWSKI et alii (1988) citados por ZAWISTOWSKI et alii (1991) apresentaram a composição de aminoácidos para PPO de várias fontes, comparando a enzima do *Neurospora*, alcachofra, trigo, uva, espinafre, batata e cogumelo. O ácido aspártico e o ácido glutâmico são os que aparecem maior quantidade, enquanto a cisteína, metionina, arginina, histidina e triptofano aparecem em concentrações menores.

Segundo MURATA et alii (1992) a PPO purificada de maçãs apresentou a composição de aminoácidos e as proporções semelhantes as encontradas na PPO de pinhas, encontrando em maior quantidade ácido aspártico, ácido glutâmico e lisina e em menor os aminoácidos sulfurados. Na enzima PPO da maçã foi encontrado pequenas quantidades de aminoácidos sulfurados, resultados semelhantes aos encontrados em outras PPOs purificadas de *Neurosporas*, cogumelos, batatas e uvas.

#### 4.8. Influência do tempo de armazenamento sobre a atividade da enzima PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura

A Figura 34 ilustra a influência do armazenamento na atividade enzima PPO durante 6 meses, na temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ . As enzimas parcialmente purificada e purificada, foram estáveis durante todo o período, retendo ao redor de 80% da atividade inicial.



**Figura 34. Influência do tempo de armazenamento sobre a atividade da enzima PPO parcialmente purificada e purificada de polpa de pinha madura.**

Para SIDDIQ et alii (1996), a PPO parcialmente purificada de ameixa, foi estável a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 16 semanas de estocagem, retendo 80% da atividade inicial.

## 5. CONCLUSÕES

1- De acordo com as condições iniciais do trabalho desenvolvido, fica evidenciado que a polpa de pinha madura proveniente de Lins-SP, apresentou maior atividade de polifenoloxidase em relação à polpa de pinha verde, casca de pinha verde e casca de pinha madura.

2- A enzima PPO de polpa de pinha madura apresentou especificidade distinta por catecol, demonstrando atividade para substratos o-difenóis e nenhuma atividade para monofenóis, caracterizando-se portanto como uma catecolase.

3- O sistema de purificação da PPO por cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Toyopearl 650M e em gel Toyopearl HW 55F foi muito eficiente, apresentando valores de purificação de 411 vezes após cromatografia em DEAE-Toyopearl 650M e 566 vezes em Toyopearl HW 55F.

4- A PPO purificada apresentou as seguintes características enzimáticas: pH e temperatura ótimos de atividade de 7,0 e 20°C, respectivamente, com estabilidade térmica entre 10 a 30°C durante 5 minutos, com completa inativação a partir de 75°C. O peso molecular foi estimado em 90.700 daltons por filtração em gel de Sephadex G-200 e em 81.000 daltons através de SDS-PAGE. Apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 7,14 mM e 302,0 U/min/ml para catecol, sendo fortemente inibida por L-cisteína, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, glutation e  $\beta$ -mercaptoetanol nas concentrações de 1,5 a 10,0 mM. Foi também inibida por tratamentos semelhantes aos aplicados na indústria de alimentos como ácido ascórbico 0,1% + temperatura 70°C ( $T_{10}$ ) e ácido cítrico + ácido ascórbico + EDTA 30ppm ( $T_{14}$ ), que inibiram em 100% a atividade das enzimas tanto

parcialmente purificada como purificada. Este tratamento pode ser um método alternativo muito indicado em substituição aos sulfitos.

5- O comportamento eletroforético da enzima purificada, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes e detectadas pela imersão em solução de substratos, na ausência e presença de SDS, indicou que as formas aparentes da enzima de pinha não foram afetadas por SDS, sendo verificado o mesmo comportamento em todos os géis revelados com catecol e L-dopa, não foram detectadas formas latentes, mudanças de mobilidade das formas individuais bem como dissociação em pequenas subunidades.

6- As enzimas PPO polpa de pinha madura obtidas por extração simples com tampão fosfato de potássio 0,025M (pH7,5), tanto a forma parcialmente purificada como a purificada apresentaram-se estáveis durante o período de armazenamento de 6 meses à temperatura de -10°C, sendo uma condição promissora para aplicação industrial no melhoramento de sabor, com diminuição do amargor e adstringência de produtos de frutas e hortaliças.

Conclui-se, portanto, que a partir dos resultados deste estudo, a preparação enzimática de polifenoloxidase de polpa de pinha madura é uma fonte potencial para aplicação em processamento de alimentos pois apresenta certas características favoráveis como: facilidade de extração, repetibilidade dos resultados e alta estabilidade em relação ao armazenamento.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudo da enzima PPO em outras espécies de anonáceas produzidas no Estado de São Paulo e região Nordeste, como atemóia, condessa e biribá, tendo em vista a importância a nível internacional desta família, de acordo com a realização do “I Simpósio Brasileiro sobre Anonáceas” em Porto Seguro - Bahia, agosto de 1997, “Congresso Internacional de Anonáceas” em Chapingo - México em novembro de 1997 e “Congresso Internacional sobre Anonáceas” em Londres - Inglaterra em julho de 1998.

- Estudar detalhadamente os frutos de Anonáceas como fontes da enzima polifenoloxidase para aplicação na indústria de alimentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.

ALMEIDA, M.E.M. **Estudo de interações entre o emprego de compostos químicos com o tratamento térmico no controle da atividade da polifenol oxidase em frutas e hortaliças**. Piracicaba, 1990. 112p. Tese (Mestre em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over wide range. **Biochemistry Journal**, v.98, p. 595-605, 1965.

ANGLENTON, E. L.; FLURKEY, W. H. Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis. **Phytochemistry**, v.23, n.12, p. 2723-2725, 1984.

ANOSIKE, E.O. ; AYAEBENE, A.O. Purification and some properties of polyphenoloxidase from the yam tubers, *Discorea bulbifera*. **Phytochemistry**, v.20, n.12, p.2625-2628, 1981.

ARSLAN, O.; TEMUR, A.; TOZLU, I. Polyphenol oxidase from *Allium* sp. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p.2861-2863, 1997.

- ARSLAN, O.; TEMUR, A.; TOZLU, I. Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.46, p.1239-1241, 1998.
- AUGUSTIN, M.A.; GHAZALI, H.M.; HASHIM, H. Polyphenoloxidase from guava (*Psidium guajava* L.). **Journal Science Food Agricultural**, v.36, p.1259-1265, 1985.
- BATISTUTI, J.P.; LOURENÇO, E.J. Isolation and purification of polyphenol oxidase from a new variety of potato. **Food Chemistry**, v.18, p.251-263, 1985.
- BADRAN, A.M.; JONES, D.E. Polyethylene glycols-tannins interaction in extracting enzymes. **Nature**, v.206, p.622-624, 1965.
- BENDAL, D.S.; GREGORY, R.P.F. Purification of phenol oxidases. In: **Enzymes chemistry of phenolic compounds**. ed. PRIDHAM, J.B. Pergamon Press, Oxford, 1963. p.7-24.
- BENJAMIN, N.O.; MONTGOMERY, M.W. Polyphenol oxidase of Royal Ann cherries: purification and characterization. **Journal of Food Science**, v.38, p.799-806, 1973.
- BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 257-261, 1994.

- CANO, M. P.; LOBO, M. G.; BEGOÑA DE ANCOS; GALEAZZI, M. A. M.  
Polyphenol oxidase from Spanish hermaphrodite and female papaya fruits  
(*Carica papaya* Cv. Sunrise, Solo Group). **Journal Agricultural Food  
Chemistry**, v.44, p.3075-3079, 1996.
- CHAZARRA, S.; CABANES, J.; ESCRIBANO, J.; GARCIA-CARMONA, F.  
Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in  
iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal Agricultural Food  
Chemistry**, v. 44, p.984-988, 1996.
- CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de  
los Alimentos**, Zaragoza, 1976, Ed. Acribia. v.I, 333p.
- CONSTANTINIDES, S. M. & BEDFORD, C. L. Multiple forms of  
phenoloxidase. **Journal of Food Science**, v.32, p. 446-450, 1967.
- COUCEIRO, E.M. Pinha, fruto do conde ou ata, sua cultura e origem.  
**Publicação da CEASA**, Recife, v.1, n.8, p.1973.
- COSENTEG, M.Y.; LEE,C.Y. Changes in apple polyphenoloxidase and  
polyphenol concentration in relation to degree of browning. **Journal of  
Food Science**, v. 52, n. 4, p. 985-989, 1987.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum  
proteins. **Annals of New York Academy of Science**, v. 121, p. 404-427,  
1964.

- DAS, J.J.; BHAT, S.G.; GOWDA, L.R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p.2031-2035, 1997.
- ESKIN, M.N.A. Biochemistry of food spoilage: Enzymatic browning. In: ESKIN, M.N.A. **Biochemistry of Foods**. 2.ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1990. p. 401-432.
- ESKIN, M.N.A.; HANDERSON, H.M.; TOWNSEND, R.J. **Biochemistry of Foods**. New York: Academic Press, Inc., 1971. p.239.
- FERRER, A.S.; BRU, R.; VALERO, E.; CARMONA, F. G. Changes in pH-dependent grape polyphenoloxidase activity during maturation. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.37, p. 1242-1245, 1989.
- FLICK, G.J. ; ORY, R.L.; St.ANGELO, A.J. Comparison of nutrient composition and of enzyme activity in purple, green, and white eggplant. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.25, n.1, p.117-120, 1977.
- FLURKEY, W.H.; JEN, J.J. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. **Journal of Food Science**, v.43, p.1828-1831, 1978.
- FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUDA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p.1138-1142, 1995.

FUJITA, S.; TONO, T. Purification and some properties of polyphenoloxidase in eggplant (*Solanum melongena*). **Journal Science Food Agriculture**, v. 46, p. 115-123, 1988.

FUJITA, S.; TONO, T.; KAWAHARA, H. Purification of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). **Journal of Food Science**, v.55, p. 643-651, 1991.

GOLBECK, J.H.; CAMMARATA, K.V. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. **Plant Physiology**, v. 67, p.977-984, 1981.

GOODENOUGH, P.W.; KESSEL, S.; LEA, A.G.H. & LEFFLER, T. Mono and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*. **Phytochemistry**, v.22, p. 359-363, 1983.

GREGORY, R.P.F.; BENDALL, D.S. The purification and some properties of the polyphenoloxidase from tea (*Camelia sinensis* L.). **Biochemistry**, v.101, p.569-572, 1966.

GUSMAN, R.; ARAQUE, M.; GUILJARRO, G. Caracterizacion del anon (*Annona squamosa*) y su industrializacion a pequeña escala. **Frutas Tropicales**. Boletim informativo, n.6, p.23-26, 1985.

HAREL, E.; MAYER, A.M.; LEHMAN, E. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. **Phytochemistry**, v.12, p.2649-2652, 1973.

- HAREL, E.; MAYER, A.M. Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. **Phytochemistry**, v.10, p.17-22, 1971.
- INTERESSE, F. S.; RUGGIERO, P. Partial purification and some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase. **Journal Science Food Agricultural**, v.31, p.459-466, 1980.
- IKEDIOSI, C. O.; OBASUYI, H. N. Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2815-2820, 1982.
- JAIN, J.C.; TAKEO, T. A review the enzymes of tea and their role in tea making. **Journal of Biochemistry**, v.8, p. 243-279, 1984.
- JANOVITZ-KLAPP, A.; RICHARD, F.; NICOLAS, J. Polyphenol oxidase from apple. Partial purification and some properties. **Phytochemistry**, v.28, p.2903-2907, 1989.
- JANOVITZ-KLAPP, A.; RICHARD, F.C.; GOUPY, P.M.; NICOLAS, J.J. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.36, p.926-931, 1990.
- JIANG, Y.; FU, J. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. **Food Chemistry**, v.62, n.1, p.49-52, 1998.

KNAPP, F.W. Some characteristics of eggplant and avocado polyphenolases.

**Journal of Food Science**, v.30, p.930-936, 1964.

KAHN, V. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties.

**Journal Science Food Agricultural**, v.26, p.1319-1324, 1975.

KAHN, V. Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars

differing in their rate of browning. **Journal Science Food Agricultural**,

v.28, p.233-239, 1977.

KANH, V.; ANDRAWIS, A. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolene.

**Phytochemistry**, v.24, p.333-337, 1985.

KATO, Y.; KOMIYA, K.; IWEDA, T.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, T. Packing

of Toyopearl column for gel filtration. I. Influence of packing velocity

column performance. **Journal of Chromatography**, v.205, p.185-188,

1981(a).

KATO, Y.; KOMIYA, K.; IWEDA, T.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, T. Packing

of Toyopearl column for gel filtration. II Dependence optical packing

velocity on column size. **Journal of Chromatography**, v.206, p.135-138,

1981(b).

KATO, Y.; KOMIYA, K.; IWEDA, T.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, T. Packing

of Toyopearl column for gel filtration. III- Semi-constant-pressure packing.

**Journal of Chromatography**, v.208, p.71-73, 1981(c).

- KATO, Y.; NAKAMURA, K.; HASHIMOTO, T. Operational variables in medium-performance ion-exchange chromatography of proteins on DEAE-Toyopearl 650. **Journal of Chromatography**, v.256, p.143-150, 1983.
- KAVATI, R. Melhoria em fruta-do-conde. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. **Anonáceas- Produção e mercado**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia: Vitória da Conquista, 1997. p.47-54.
- KINDRON, M.; HAREL, M.; MAYER, A.M. Catechol oxidase activity in grapes and wine. **American Journal Enology Viticulture**, v.29, n.1, p.30-35, 1978.
- KINDRON, M.; HAREL, E. & MAYER, A.M. Copper content and amino acid composition of catechol oxidase from clairette grapes. **Phytochemistry**, v.16, p.1050-1051, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 680-685, 1970.
- LANGDON, T.T. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. **Food Technology**, v.41, p. 64-67, 1987.
- LERCH, K. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine B-monooxygenase. In: **Metal ions in biological systems. Copper proteins**, New York, ed. SIGEL, H. Marcel Dekker, Basel, p. 143-148, 1981.

- LIAO, M.L.; LIU, M.S.; YANG, J.S. Respiration measurement of some important fruits in Taiwan. **Acta Horticulturae**, v. 138, p. 227-246, 1983.
- LINEWEVER H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- LIMA, E. D.P. A.; PASTORE, G.M. ; DAWOOD, L.A.C. Comportamento eletroforético da polifenoloxidase (PPO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2, p.1150-1153, 1998.
- LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelle. **Methods in enzymology**, v 31, p. 528-544, 1974.
- LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin fenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. 1.ed. Florida: CRC Press, Inc., 1990. 378p.
- MAHANTA, P. K.; BORUAH, S. K. ; BORUAH, H. K. ; KALITA, J.N. Changes of polyphenol oxidase and peroxidase activities and pigment composition of some manufactured black tea (*Camellia sinensis* L.). **American Chemical Society**, v. 41, p.272-276, 1993.

- MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R. Modification of proteins by polyphenoloxidase and peroxidase and their products. **Journal Food Biochemistry**, v.8, p.137-162, 1984.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. **Phytochemistry**, v.26, n. 1, p.11-20, 1987.
- MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v.18, p. 193-215, 1979.
- McMANUS, J. P.; DAVIS, K.G.; BEART, J.E.; GAFFNEY, S.H.; LILLEY, T.H. & HASLAM, E. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. **Journal Chemistry Society Perkin Trans. II.**, v.9, p.1429-1438, 1985.
- MOTODA, S. Formation of aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. **Journal of Fermentation Technology**, v.57, n.5, p. 395-399, 1979.
- MURATA, M., KUROKAMI, C. & HOMMA, S. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, n.11, p.1705 - 1710, 1992.
- NICOLAS, J.J. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.2, p.109-157, 1994.

- ODA, Y.; KATO, H.; ISODA, Y.; TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, T.;  
TAKADA, Y.; KUDO, S. Purification and properties of polyphenoloxidase  
from spinach leaves. **Agricultural Biological Chemistry**, v.53, p.2053-2061,  
1989.
- OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLÜ, I.; KOCACALISKANI, SAKIROĞLU, H.  
Polyphenoloxidase from Amasya apple. **Journal of Food Science**, v.60, n.3,  
p. 494-505, 1995.
- ROBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza:  
Editorial Acribia, 1991. 516p.
- ROUDSARI, M.H.; SIGNORET, S.; CROUZET, J. Eggplant polyphenol  
oxidase: purification, characterization and properties. **Food Chemistry**, v.7,  
p.227-235, 1981.
- SACHDE, A. G.; AL-BAKIR, A. Y., ABDUL-RAHEEM, J. A. K. Polyphenol  
oxidase from barhee and zahdi dates. II. Characterization. **Journal of  
Biochemistry**. v.12, p.241-251, 1989.
- SAKIROĞLU, H.; KÜFREVIÖGLÜ, Ö. I.; KOCACALISKANI, I.; OKTAY,  
M.; ONGANER, Y. Purification and characterization of dog-rose (*Rose  
dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. **Journal Agricultural Food  
Chemistry**, v.44, p. 2982-2986, 1996.
- SHARMA, R.C.; ALI, R. Isolation and characterization of catechol oxidase from  
*Solanum melongena*. **Phytochemistry**, v.19, p.1597-1600, 1980.

- SIDDIQ, M.; CASH, J. N.; SINHA, N. K.; AKHTER, P. Characterization and inhibition of polyphenoloxidase from pears (*Pyrus communis* L. cv. bosc and red). **Journal of Food Biochemistry**, v.17, p. 327-337, 1994.
- SIDDIQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. **Journal of Food Science**, v.57, n.5, p. 1177-1179, 1992.
- SIDDIQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N.; HANUM, T. Partial purification of polyphenol oxidase from plums (*Prunus domestica* L., cv. STANLEY) **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p.111-123, 1996.
- SMITH, D.M.; MONTGOMERY, M.W. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'anjou pears. **Phytochemistry**, v.24, n.5, p.901-904, 1985.
- TONO, T.; FUJITA, S.; KAWASAKI, H.; LI, Z. Purification and high L-epicatechin oxidase of Japanese pears. **Nippon Nôgeikagaku Kaishi**, v.60, n.9, p.705-712, 1986.
- WANG, J. Y.; JIAO, H.J.; FAUST, M. Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thiadiazuron. **Journal Plant Growth Regulation**, v.10, p.33-39, 1991.
- WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, 1969.

- WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: Purification and characterization. **Journal of Food Science**, v.55, n.5, p.1315-1319, 1990(a).
- WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 5, p. 1320-1351, 1990(b).
- WHITAKER, J.R. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on Sephadex. **Analytical Chemistry**, v.35, n.12, p.1950-1953, 1963.
- WISSEMANN, K. W.; LEE, C.Y. Characterization of polyphenol-oxidase from Rovat 51 and Niagara grapes. **Journal of Food Science**, v.46, p.506-508, 1981.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruit and vegetables. **CRC - Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.49, 1981.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L.; NÁDUDVARI-MÁRKUS, V. Enzymatic browning, polyphenol content, polyphenoloxidase and peroxidase activities in pear cultivars. **Acta Alimentaria**, v.11, p.157-160, 1982.
- YOSHIYAMA, M. & ITO, Y. Decrease of astringency of cacao beans by an enzymatic treatment. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.43, n.2, p. 124-129, 1996.

ZAWISTWSKI, J. ; BILIADERIS, C.G. & ESKIN, N.A.M. Polyphenol Oxidase. In: ROBINSON, D. S. & ESKIN, N.A.M. **Oxidative Enzymes in Foods**. London e New York: Elsevier Applied Science, 1991. cap.6, p.217-273

ZAWISTWSKI, J. ; BILIADERIS, C.G.; MURRAY, E.D. Isolation and some properties of an acidic fraction of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v.12, p.23-35, 1988.