

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Extração, Purificação e Propriedades  
da Polifenoloxidase da Banana Nanica  
*Musa cavendishii*, L.

*Maria Antonia Martins Galeazzi*  
Química

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Em memória de meu pai

À minha mãe

Ao amigo Spiros

## AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela dedicada orientação;

Ao Prof. Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, pela atenção, estímulo e facilidades concedidas;

Ao Prof. Dr. Spiros Minas Constantinides, pelo apoio humano e profissional;

Ao Prof. Dr. Aldo Foccesi Jr., pelo incentivo na carreira universitária;

À Profa. Dra. Florinda Anna Bobbio, pelo auxílio nas discussões;

Ao Prof. Dr. Henrique Amorim pelas suas valiosas sugestões;

À Profa. Lucia Soares Valente, pelas determinações do teor de Cobre neste trabalho;

Às Srtas. Tania Haddad e Adelaide Maria Soares da Costa, pelo leal auxílio no Laboratório;

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta tese.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	i
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Ocorrência e possíveis funções da polifenolo- xidase.....	6
2.2. Purificação de polifenoloxidasas.....	11
2.3. Mecanismos propostos para a reação enzimática	15
2.3.1. Formação de melanina.....	17
2.3.2. Formação de intermediários.....	22
2.4. Especificidade a substratos.....	23
2.5. Efeito de inibidores.....	26
2.6. Formas moleculares ativas.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.1. Reagentes.....	37
3.1.2. Fonte de enzima.....	37
3.2.1. Determinação da atividade enzimática.....	38
3.2.2. Determinação de pH ótimo.....	39
3.2.3. Dosagem de proteína.....	39
3.2.4. Efeito do pH e da composição do meio na ex- tração da enzima.....	40
3.2.5. Obtenção do extrato bruto.....	41
3.2.6. Precipitação fracionada com sulfato de amô- nio.....	41
3.2.7. Precipitação com mistura água/acetona.....	41
3.2.8. Filtração em gel de Sephadex G-100.....	42

	Página
3.2.9. Eletroforese em gel simples de poliacrilamida.....	42
3.2.10. Eletroforese em gel contendo uréia.....	45
3.2.11. Efeito da incorporação do Tween 80 e da Parafenilenodiamina no gel de poliacrilamida..	45
3.2.12. Eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio.....	46
3.2.13. Focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida.....	48
3.2.14. Determinação do coeficiente de sedimentação e peso molecular.....	49
3.2.15. Análise espectrofotométrica.....	50
3.2.16. Efeito de diferentes pHs.....	50
3.2.17. Efeito de diferentes tratamentos térmicos... <u>Temperatura de Estocagem</u> .....	51
<u>Estabilidade em diferentes temperaturas</u> .....	51
<u>Efeito do resfriamento rápido após tratamento térmico</u> .....	51
3.2.18. Efeito do tratamento com uréia.....	52
3.2.19. Efeito da diálise contra diferentes solventes.....	52
3.2.20. Efeito do mercaptoetanol.....	52
3.2.21. Efeito de inibidores.....	53
3.2.22. Análise cromatográfica dos fenólicos.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1. Localização da PPO na fruta e melhores condições de extração.....	56
4.2. Fatores que influenciam a atividade da enzima no extrato bruto.....	60
4.2.1. Influência das condições de pH e da temperatura de estocagem.....	60

	Página
4.2.2. Especificidade de substrato da PPO no extrato bruto.....	62
4.3. Estágios de purificação da poliefenoloxidase...	64
4.3.1. Precipitação fracionada em solventes iônicos e não iônicos.....	64
4.3.2. Filtração em colunas de gel de Sephadex G-100.....	67
4.3.3. Purificação da fração FE por eletroforese em gel simples de poliacrilamida.....	75
4.4. Estudo de alguns parâmetros físico-químicos da PPO em diferentes estágios de purificação.....	77
4.4.1. Estabilidade do precipitado acetônico em função do pH e da temperatura de estocagem.....	77
4.4.2. Efeito do Triton-X100 durante a estocagem do precipitado acetônico.....	77
4.4.3. Efeito da diálise com água e com tampão fosfato sobre a atividade da PPO no precipitado acetônico.....	81
4.4.4. Especificidade da PPO a diferentes substratos.....	81
4.4.5. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida.....	91
4.4.6. Determinação do peso molecular da PPO em gradiente de sacarose.....	102
4.4.7. Efeito do mercaptoetanol sobre a PPO....	102
4.4.8. Efeito do tratamento com Tween 80.....	106
4.4.9. Efeito da parafenilenodiamina na revelação das bandas enzimáticas ativas.....	109
4.4.10. Efeito da temperatura sobre a estabilidade e atividade da enzima.....	114
4.4.11. Efeito do tratamento com uréia.....	115

	Página
4.4.12. Efeito de inibidores.....	120
4.4.13. Análise espectrofotométrica.....	150
4.4.14. Identificação de compostos fenólicos...	150
4.4.15. Efeito de íons na atividade da PPO.....	151
5. DISCUSSÃO.....	157
6. CONCLUSÕES.....	175
7. BIBLIOGRAFIA.....	179

## FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Localização da atividade enzimática em corte transversal da banana semi-verde.....	57
FIGURA 2 - Estabilidade do extrato bruto em soluções de tampão fosfato a diferentes pHs.....	58
FIGURA 3 - Influência do ph sobre a atividade da polifenoloxidase do extrato bruto.....	61
FIGURAS 4 a 7 - Cromatografia em colunas de Sephdex. G-100.....	70-73
FIGURA 8 - Estabilidade do precipitado acetônico em diferentes pHs.....	78
FIGURA 9 - Efeito da temperatura de estocagem no precipitado acetônico.....	79
FIGURAS 10 a 17 - Gráficos de Lineweaver-Burk para determinação do KM para a fração FG utilizando-se diferentes substratos.....	82-89
FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações FP e FE (proteína).....	92
FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima purificada (fração FG).....	93
FIGURA 20 - Especificidade do substrato na fração FE, Eletroforese em gel de poliacrila mida.....	94
FIGURA 21 - Eletroforese da fração FE em gel de poliacrilamida contendo uréia.....	95
FIGURAS 22 e 23 - Eletrofocalização em gel de poliacrilamida das frações FE e FG.....	97-98



	Página
FIGURA 24 - Eletroforese da fração FE em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	99
FIGURA 25 - Eletroforese da fração FG em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	100
FIGURA 26 - Curva padrão de pesos moleculares em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	101
FIGURA 27 - Efeito da diálise no precipitado acetônico pré-incubado com mercaptoetanol. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	104
FIGURA 28 e 29 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FG tratada com mercaptoetanol e SDS.....	105-105a
FIGURA 30 e 31 - Efeito do Tween 80. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações cromatográficas.....	107-108
FIGURAS 32 a 34 - Efeito da parafenilenodiamina. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos diferentes estágios de purificação.....	110-112
FIGURA 35 - Efeito da parafenilenodiamina. Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida da fração FE.....	113
FIGURAS 36 a 39 - Efeito da temperatura na estabilidade da polifenoloxidase em diferentes estágios de purificação.....	116-119
FIGURA 40 - Efeito da incubação do precipitado acetônico com uréia.....	121

FIGURAS 41 a 43 - Efeito de diferentes inibidores na atividade da PPO.....	122-124
FIGURAS 44 a 52 - Determinações de $K_I$ segundo Linewe <u>a</u> ver-Burk para diferentes inibidores e uti lizando-se diversos substratos.....	134-147
FIGURA 53 - Curvas de inibição da fração FE utilizan <u>a</u> do diferentes concentrações de DIECA.....	149
FIGURA 54 - Espectro de absorção da fração FG.....	152
FIGURA 55 - Espectro de absorção ácido clorogêni <u>co</u> na presença e ausência da enzima.....	154
FIGURA 56 - Identificação do ácido clorogênico na fração FG por cromatografia em pa <u>pel</u> .....	155

## QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Efeito do solvente e do pH na atividade da polifenoloxidase.....	57
QUADRO 2 - Efeito do PVP na extração da polifenoloxidase.....	59
QUADRO 3 - Constante de Michaelis ( $K_M$ ) segundo Lineweaver-Burk para diferentes substratos.....	62
QUADRO 4 - Efeito de diferentes meios dialisantes sobre a atividade enzimática.....	63
QUADRO 5 - Recuperação da atividade enzimática pela precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ .....	64
QUADRO 6 - Precipitação fracionada da PPO do extrato bruto com acetona.....	65
QUADRO 7 - Efeito do Triton X-100 no precipitado acetônico.....	66
QUADRO 8 - Fases da purificação da polifenolodase.....	68
QUADRO 9 - Efeito da estocagem a $-40^\circ C$ do precipitado acetônico, na purificação da enzima.....	69
QUADRO 10 - Purificação da PPO do precipitado acetônico mantido a $-40^\circ C$ por 7 dias.....	76
QUADRO 11 - Efeito do Triton X-100 sobre a atividade da enzima no material estocado a $-40^\circ C$ ....	80
QUADRO 12 - Valores de $K_M$ para a reação da PPO nos diferentes estágios de purificação.....	
QUADRO 13 - Inativação da PPO do precipitado acetônico por mercaptoetanol.....	103

QUADROS 14 a 17 - Efeito de diferentes inibidores na reação enzimática com diversos substratos.....	125-128
QUADROS 18 a 21 - Efeito de diferentes inibidores na reação enzimática utilizando-se várias concentrações de catecol.....	130-133
QUADRO 22 - Efeito de vários ions na atividade enzimá tica da fração FE.....	156

## R E S U M O

A polifenoloxidase de banana nanica (Musa cavendishii L.) foi extraída da parte central da fruta semi-madura, em solução de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, contendo 1% de PVP insolúvel e 0,5% de Triton X-100 por homogeneização em liquidificador na temperatura ambiente. O extrato bruto foi precipitado com 2 volumes de acetona previamente resfriada, e a mistura mantida a uma temperatura final de  $-13^{\circ}\text{C}$ . O precipitado acetônico foi re-extraído com tampão fosfato pH 7,0, contendo 0,5% de Triton X-100 e estocado a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. O material insolúvel obtido após este período, foi eliminado por centrifugação a  $12.062 \times g$  por 15 minutos e o extrato, aplicado em coluna de Sephadex G-100 com refrigeração a  $5^{\circ}\text{C}$ . Após eluição da coluna com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, a fração correspondendo à maior atividade enzimática (FE), liofilizada e aplicada em eletroforese de gel de poliacrilamida, deu origem a três bandas ativas, as quais foram cortadas, eluídas em água por 24 horas, dialisadas contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 e liofilizadas. A enzima apresentou um grau de purificação da ordem de 34 vezes.

O precipitado acetônico e a fração FE, analisados em gel de poliacrilamida, mostraram o mesmo número de formas moleculares ativas, que variou de 3 a 5, em presença de diferentes substratos.

A polifenoloxidase de banana nanica é uma oxidase específica para o-difenóis, tendo maior especificidade para dopamina, epinefrina e norepinefrina. A enzima no estado purificado, apresentou menor especificidade para substratos na forma D, sendo mais específica para L-dopa ( $K_M = 6,0 \times 10^{-3}$  M) do que para D-dopa ( $K_M = 2,5 \times 10^{-2}$  M). Em relação à forma racêmica DL-dopa, a enzima apresentou especificidade intermediária ( $K_M = 3,3 \times 10^{-2}$ ).

O ponto isoelétrico da enzima purificada, determinado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, foi de 5,2.

Os experimentos por ultracentrifugação em gradiente de sacarose mostraram um coeficiente de sedimentação de  $3,9 \pm 0,1$  S para polifenoloxidase, correspondente ao peso molecular de  $60.000 \pm 2.000$ . A análise efetuada em gel de poliacrilamida em meio contendo SDS, apresentou sub-unidades com peso molecular de  $30.000 \pm 1.000$ .

Estudos da ação de mercaptoetanol sobre a polifenoloxidase mostraram que a enzima inativada pelo redutor na concentração de 17 mM, tem 30% de sua atividade reativada quando submetida a diálise. Eletroforese em gel de poliacrilamida apresentou a reativação de duas formas moleculares.

Estudos cinéticos, utilizando a enzima no estado semi-purificado (FE) mostraram inibição não competitiva do ácido ascórbico sobre a reação com catecol, nas concentrações de 0,008 mM, 0,04 mM e 0,08 mM. O mesmo tipo de inibição foi obser-

vado utilizando metabissulfito de sódio nas concentrações 0,03 mM, 0,06 mM e 0,24 mM. A utilização de cisteína nas concentrações de 0,083 mM e 0,166 mM, apresentou inibição não competitiva com o catecol, passando para cinética do tipo competitivo na concentração de 0,04 mM. A ação inibitória do ácido ditiocarbâmico sobre a polifenoloxidase mostrou ser menos efetiva do que os outros inibidores utilizados. Dentre eles, o ácido ascórbico mostrou maior inibição sobre a enzima semi-purificada (FE), enquanto que no precipitado acetônico, a cisteína foi forte inibidor com os substratos catecol e DL-dopa. Com exceção do ácido ditiocarbâmico, todos os inibidores apresentaram um período de retardamento da reação enzimática.

Na reação com DL-dopa como substrato, esse retardamento atingiu tempos superiores a 600 minutos, quando usado 0,4 mM de cisteína na mistura de reação.

Os experimentos realizados com o precipitado acetônico e a fração FE, mostraram que a enzima apresenta estabilidade térmica acentuada nas temperaturas de 65 e 75°C, sendo a fração FE - aparentemente menos resistente.

Estudos preliminares, mostraram evidências de que a enzima encontra-se complexada com compostos fenólicos, principalmente - ácido clorogênico.

Dentre os vários íons testados como possíveis co-fatores desta

Dentre os vários íons testados como possíveis co-fatores desta reação enzimática,  $\text{NH}_4^+$  e  $\beta\text{-NAD}^+$  agiram como ativadores, sendo que  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ , comportaram-se como inibidores. Por outro lado,  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  não interferiram com a atividade da enzima.



## S U M M A R Y

The polyphenoloxidase of banana "nanica" (Musa cavendishii L.) was extracted from the central part of half mature fruit by homogenising in a blender at room temperature with a buffer solution of 0.2 M phosphate (pH 7.0) containing 1% of insoluble PVP and 0.5% of Triton X-100. The crude extract was precipitated with 2 volumes of acetone, previously cooled down, and the mixture was maintained at a final temperature of  $-13^{\circ}\text{C}$ . The precipitate from acetone was re-extracted with a phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.5% of Triton X-100 and stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  for 7 days. The insoluble material obtained after this period was eliminated by centrifugation at  $12,062 \times g$  for 15 minutes and the extract put through a Sephadex G-100 column at  $5^{\circ}\text{C}$ . After the elution with a phosphate buffer 0.01 M, pH 7.0, the fraction corresponding to the greatest enzymatic activity (FE) lyophilized and subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel, produced three active bands, which were cut, eluted with water for 24 hours, dialysed against phosphate buffer 0.2 M, pH 7.0, and lyophilized. The enzyme showed a degree of purification of the order of 34 times.

The precipitate from acetone and the fraction FE analysed in polyacrylamide gel showed the same number of molecular forms, which varied from 3 to 5 on the substrates employed.

The polyphenoloxidase of banana "nanica", an oxidase specific

for o-diphenols, showed greater specificity for dopamine, epinefrine and nor-epinefrine. The purified enzyme showed lesser specificity for substrates in D-forms being more specific for L-dopa ( $K_M = 6.0 \times 10^{-3}M$ ) than for D-dopa ( $K_M = 2.5 \times 10^{-2}M$ ). For the racemic DL-dopa the specificity of the enzyme was intermediate ( $K_M = 3.3 \times 10^{-2}M$ ).

The isoelectric point of the purified enzyme determined by isoelectric focusing in polyacrylamide gel was 5.2.

Ultracentrifugation experiments in sucrose gradient showed a sedimentation coefficient of  $3.9 \pm 0.1S$  for polyphenoloxidase corresponding to a molecular weight of  $60,000 \pm 2,000$ . An analysis carried out in polyacrylamide gel in a SDS containing medium showed sub-units with a molecular weight of  $30,000 \pm 1,000$ .

A study of the action of mercaptoethanol on polyphenoloxidase showed that the enzyme was inactivated by 17 mM concentration and recovered 30% of its activity when submitted to dialysis. Electrophoresis in polyacrylamide gel resulted in the recovery of two active molecular forms.

Kinetic studies using a semi-purified enzyme (FE) showed a non-competitive inhibition by ascorbic acid in a reaction with catechol at concentration of 0.008 mM, 0.04 mM and 8.08 mM. The same type of inhibition was observed when employing sodium metabisulphite in concentrations of 0.03 mM, 0.06 mM and 0.24 mM.

The utilization of cysteine in concentration of 0.083 mM and 0.166 mM showed non-competitive inhibition in the presence of catechol changing into a competitive like kinetic at a concentration of 0.4 mM. The inhibiting action of dithiocarbamic acid on polyphenoloxidase was less effective than that of other inhibitor used. Ascorbic acid proved to be the most potent inhibitor in the case of semi-purified enzyme (FE), whereas in the case of acetone precipitated enzyme cysteine showed strong inhibiting effect in the presence of catechol and DL-dopa. With the exception of dithiocarbamic acid all inhibitors produced a delay period in the enzymatic reaction. In the reaction of DL-dopa with the substrate this delay attained times superior to 600 minutes when using 0.4 mM of cysteine in the reaction mixture.

Experiments carried out with acetone precipitates and fraction FE, showed that the enzymes submitted to various temperatures showed accentuated thermal stability at 65°C and 75°C, the FE fraction being apparently less resistant.

Preliminary studies gave evidence that the enzyme exists in the form of complexes with phenol compounds, probably with chlorogenic acid.

Of the various ions tested as possible cofactors of this enzymatic reaction  $\text{NH}_4^+$  and  $\beta\text{-NAD}^+$  acted as activator whereas  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  and  $\text{Fe}^{+3}$  showed inhibiting activity.

On the other hand,  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  and  $\text{Mn}^{+2}$  showed no interference with the enzyme activity.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da banana no Brasil é economicamente importante, sendo consumida por diferentes classes da população. Ela tem sido cultivada mais comumente na região litorânea e grande porcentagem da população nessa área depende da sua produção.

A banana madura é essencialmente doce e de fácil digestão. A digestibilidade do amido presente na fruta nesse estágio, em testes feitos com animais, foi estimado em 45-80%. Nos últimos 30 anos tem sido grande sua utilização na nutrição de pessoas vitimadas por vários distúrbios intestinais. Talvez o mais marcante destes seja a cólica verificada em crianças, que se manifesta como uma intolerância a carboidratos (105). Sob este aspecto, a banana pode ser aconselhada na alimentação infantil, devido à sua fácil assimilação. A bioquímica do fenômeno é ainda obscura e parece não haver uma explicação satisfatória do porque de a banana, mais do que outras frutas doces, ser tão bem tolerada. Tem-se sugerido, como uma provável causa, o teor de aminas fenólicas da fruta.

A qualidade de uma banana varia de forma considerável com o clone, estocagem e condições de amadurecimento. É uma fonte de cálcio e ferro e contém cobre, iodeto, manganês, zinco e cobalto. Além desses componentes ela é rica em potássio, magnésio, sódio e fósforo (12). Comparada com outras frutas e vegetais, apresen

ta maior teor de caroteno (50,332 UI), tiamina (42-62 µg) e riboflavina (87-88 µg) por 100 g de material analisado.

Entretanto, como muitas frutas, a banana produz rápidas mudanças na cor, quando submetida a danos mecânicos durante a colheita e estocagem. Tais mudanças de coloração são acentuadas durante a preparação para o processamento, desidratação e congelamento. A cor natural do produto pode ser mascarada pela formação de pigmentos escuros que ocasionam um produto menos atrativo (52). Usualmente, o escurecimento é acompanhado por transformações indesejáveis no sabor, odor e valor nutritivo.

Contudo, pouca coisa se sabe a respeito das reações indesejáveis que certamente ocorrem durante a estocagem e processamento dessa fruta. Um dos problemas encontrados na manipulação e processamento da banana é o escurecimento enzimático e não enzimático. As polifenoloxidasas estão estreitamente ligadas a este primeiro aspecto, merecendo, portanto, a devida atenção por parte dos pesquisadores e indústrias de alimentos.

As enzimas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos são largamente distribuídas na natureza. Os fenóis são oxidados por peroxidases, fenolases e lacases. Estas últimas são proteínas que contêm cobre e apresentam propriedades semelhantes, principalmente pela sua inibição por agentes que reagem com o cobre da enzima. A oxidação enzimática dos fenóis produz efeito marcante, tanto no odor como na cor da fruta (75). Em alguns casos,

por exemplo: chá, café e cacau, o efeito é benéfico e em outros, como frutas e hortaliças processadas, o problema é inverso, sendo que os maiores esforços dos cientistas de alimentos têm-se - concentrado no controle dessas consequências.

As fenoloxidasas são conhecidas sob diversos nomes triviais, - tais como: tirosinase, catecolase, polifenoloxidase e fenolase.- Esta multiplicidade de nomes é um tanto confusa mas, talvez, ne- cessária, uma vez que as enzimas isoladas de diferentes fontes,- mostram atividade variável para diferentes substratos.

Palmer (93), estudando fenoloxidase de banana, encontrou que o extrato cru continha uma oxidase específica somente para o-di- fenóis, e que era livre de qualquer outro sistema oxidase. Pal- mer propôs chamar a oxidase da banana de polifenoloxidase em con- traste com tirosinase (oxida monofenóis) e fenolase (oxida mono- e difenóis).

Essas enzimas, oxidando mono, di e polifenóis na presença de oxi- gênio molecular, produzem dopacromos, que são polimerizados e o- riginam melaninas como produto final. Entretanto, o conhecimento de seu mecanismo de ação é ainda obscuro.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de fornecer - maiores informações quanto à natureza e comportamento da polife- noloxidase de banana nanica (Musa cavendishii L.)

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O reconhecimento da existência de enzimas como catalisadores do escurecimento, observado em diferentes espécies de alimentos, - foi feito por Lindet (67) e Kastle (54).

A maioria das pesquisas desenvolvidas durante essa época foi relacionada com caracterizações qualitativas e métodos de inativação. Não havia, portanto, nenhuma preocupação com a elucidação de problemas concernentes ao mecanismo dos sistemas enzimáticos envolvidos, natureza dos substratos e mesmo mecanismo de formação de pigmentos escuros observados nos alimentos.

Várias teorias foram então propostas para explicar o escurecimento enzimático. Chodat (17) propôs que os tecidos vegetais - que escureciam com a danificação, continham substâncias denominadas oxigenases. Em contato com o oxigênio do ar elas geravam peróxido de hidrogênio que, ativado pela peroxidase contida nas plantas, acarretava a auto-oxidação de muitos fenólicos naturais.

Em 1931, Onslow (91), interessado no escurecimento resultante - da danificação de tecidos vegetais, mostrou a presença de ortodifenóis livres, com o isolamento de catecol dos tecidos. Em seus experimentos observou que o escurecimento dos derivados catecólicos no tecido vegetal era mais rápido do que em solução aquosa. No entanto, esse escurecimento não se verificava quando-



o tecido era previamente fervido. Este fato levou-o a postular a existência de uma enzima que catalisava a auto-oxidação de derivados fenólicos, que continham grupos hidroxílicos funcionais na posição orto. Onslow postulou, em adição ao conceito emitido por Chodat, a presença de uma enzima que, em contato com o ar oxidava os orto-fenóis gerando, como um dos produtos de oxidação, um peróxido, ou mesmo peróxido de hidrogênio. Este, na presença de peroxidase geraria finalmente, cromogênios característicos que, em sua concepção, eram pigmentos oriundos da oxidação secundária de mono, di e polifenóis.

Em estudos sistemáticos, Onslow pôde classificar essas enzimas em dois grupos: um que continha oxigenases e compostos catecólicos e outro, que continha peroxidases vegetais onde as oxigenases e os catecóis não estavam presentes. O primeiro grupo, que causava rápido escurecimento, podia ser encontrado nas seguintes frutas: maçã, apricot, banana, cereja, figo, uva, pêssego e morango. O segundo grupo era encontrado nas frutas cítricas.

Entretanto, Szent-Gyorgyi (117) já havia demonstrado, em batatas, que essas reações de escurecimento poderiam ocorrer na ausência de peróxidos.

Nessa mesma época, foi estabelecida a distinção entre as oxigenases, que continham cobre na molécula e catalisavam a oxidação de fenóis pelo oxigênio molecular e as peroxidases, que ca

talismavam a oxidação de fenóis pelo peróxido de hidrogênio e continham ferroporfirina.

De acordo com as diferentes reações de oxidação de mono, di e polifenóis, as fenolases foram classificadas posteriormente em três grupos:

- a) tirosinase - catalisando a oxidação de monofenóis, especificamente tirosina;
- b) cresolase - catalisando a oxidação de polifenóis;
- c) lacase - (obtida do látex) catalisando diferentes reações - de oxidação (32).

Atualmente, prefere-se o termo de polifenoloxidase ou fenolase para o sistema de oxidação de polifenóis. A nomenclatura correta, apresentada pela "Comission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" em 1965 (45), é: o-difenol  $O_2$  - oxidoreductase E.C.1.10.3.1. e p-difenol  $O_2$  - oxidoreductase E.C.1.10.3.2..

## 2.1. Ocorrência e possível função da polifenoloxidase

As polifenoloxidases ocorrem com muita frequência em tecidos vegetais e animais.

Palladin (92) foi o primeiro pesquisador a sugerir a existência, em vegetais, de um sistema polifenol-quinona como intermediário na oxidação de vários compostos orgânicos durante a respiração.

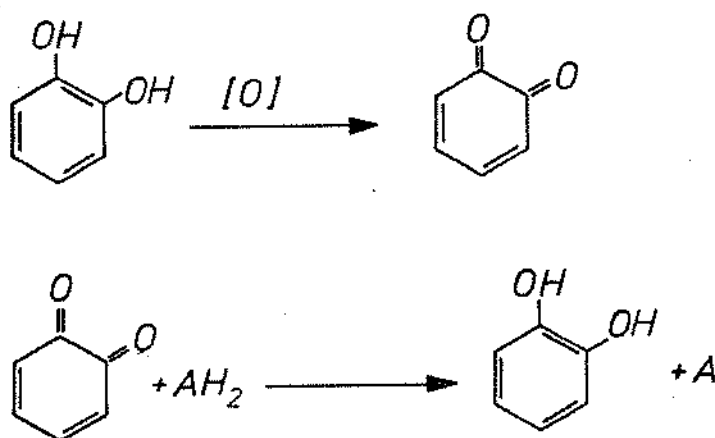


xigênio (13, 106, 128).

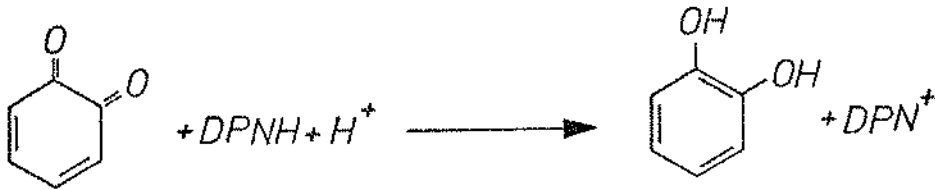
Já se conhecia que o consumo de oxigênio aumentava com a dani-  
ficação dos tecidos vegetais que continham fenolases (119).

As plantas, em geral, contêm um grande número de orto-fenóis, -  
tais como: polifenóis, flavonóides, taninos e alcalóides, sen-  
do particularmente comum, a configuração o-difenólica necessá-  
ria para a atividade da fenolase. Estas enzimas parecem ser i-  
necessíveis à transformação dos substratos até que ocorra a da-  
nificação do tecido. Experimentos com extratos de plantas têm-  
mostrado que grande número dessas substâncias existem em mode-  
los que se modificam com o desenvolvimento da planta (29, 43,-  
86, 87).

Estudos "in vitro" de sistemas enzimáticos e não enzimáticos, -  
com a capacidade de reduzir as quinonas produzidas por fenola-  
ses, têm mostrado grande semelhança entre si e aparecem tanto-  
em vegetais como em animais (55, 58, 115). Desta forma, a oxi-  
dação enzimática dos difenóis pode ser acoplada à oxidação do  
ácido ascórbico:



Em outros sistemas (63, 105), a redução das o-quinonas, em presença de enzimas e coenzimas apropriadas, tem sido acoplada à oxidação de catecol.



Em síntese, apesar desses sistemas serem largamente distribuídos nos vegetais e animais, parece ser pouco evidente que a etapa final da respiração de células vegetais não danificadas, possa envolver as quinonas formadas pela ação da fenolase, pois este estágio de respiração é catalisado por outras enzimas (37, 46, 132).

O problema foi revisto por Towers (124), mas não se pode elucidar a participação da polifenoloxidase como enzima terminal, pois não é possível eliminar-se o sistema oxidase dos citocromos, sem afetar a atividade da fenolase.

A localização da polifenoloxidase nos tecidos, tem sido investigada em grande número de plantas. Samisch (108), mostrou que fatias de damasco, quando imersas em catecol, apresentavam escu

recimento rápido na casca e feixes vasculares, principalmente na porção ventral e dorsal. A parte restante da polpa, compreendida pelo pericarpo da fruta, era muito lentamente escurecida. Hussein e Cruess (44), de forma semelhante, encontraram - em trabalhos com uvas, uma menor atividade de polifenoloxidase no pericarpo do que nos feixes vasculares. Por outro lado, Arnon (6), mostrou que a polifenoloxidase estava quase totalmente localizada no cloroplasto da folha de espinafre.

Tolbert (123), demonstrou que a polifenoloxidase localizada no cloroplasto de grande variedade de plantas, incluindo espinafre, apresentava atividade enzimática na estrutura lamelar. A enzima encontrava-se em estado latente, e era estimulada tanto pela luz, como por dimetilurêia ou antimicina A.

Em trabalhos mais recentes, Anderson (4), mostrou que a localização da polifenoloxidase nos tecidos não é ainda bem compreendida. Enquanto se acredita ser a polifenoloxidase uma enzima solúvel, vários trabalhos mostram que a atividade é localizada na mitocôndria e cloroplasto. Walker e Hulme (127), - preparando mitocôndria de casca de maçã, utilizando polivinilpirrolidona solúvel na extração, encontraram duas polifenoloxidases tanto na mitocôndria, como na fração solúvel que, possivelmente, seriam isoenzimas. Entretanto, os autores sugerem que a distribuição observada poderia ser um artefato, possivelmente causado pela adsorção de o-difenoloxidase citoplásmica

mática que diferia da fração particulada.

## 2.2. Purificação de polifenoloxidasas

Sabe-se que durante a extração de fenolases em vegetais os compostos fenólicos ligam-se facilmente a proteínas, formando melanoproteínas, que são substâncias inibidoras de muitas enzimas - (109). Uma vez que a natureza dos compostos fenólicos naturais varia entre os vegetais, tem-se procurado encontrar sistemas de extração adequados para melhor solubilização da enzima.

Diversos solventes têm sido utilizados sendo que, de um modo geral, o emprego de soluções tamponadas neutras têm produzido boa extratibilidade. Um fator que determina o tipo de solução usada para extração é a natureza e localização da enzima na célula. Em batatas, as fenolases foram encontradas em maior concentração na fração solúvel (21), enquanto que em outros produtos, a enzima encontra-se ligada a cloroplastos ou à mitocôndria (11).

As etapas subsequentes de purificação envolvem eliminação de fenólicos por precipitação em acetona a frio, fracionamento com solução de sulfato de amônio, e separação cromatográfica, tanto por colunas de adsorção como de troca iônica.

Walker e Hulme (126), utilizando casca de maçãs, mostraram que a polivinilpirrolidona insolúvel, quando associada a detergentes aniônicos, aumenta a atividade fenolásica dos extratos.

Em preparações utilizando Triton X-100 seguidas de cromatografia em DEAE-celulose, foi possível separar duas frações enzimáticas que, por sua homogeneidade e semelhança nas propriedades físicas e químicas, foram consideradas isoenzimas (27).

Palmer (93) demonstrou que os extratos da polpa de banana madura, obtidos utilizando 1% do detergente não iônico (Cutscum) em soluções tamponadas, desenvolviam alto índice de atividade enzimática. O detergente a seguir era liberado com a precipitação da enzima pela adição de 1,6 volumes de acetona a frio. Por cromatografia em DEAE-celulose, a enzima foi obtida com um grau de purificação de 10 a 12 vezes.

Preparações purificadas de cogumelo, exibem dois tipos de atividade, dependendo da fonte e do método de purificação. Como regra geral, a relação da atividade catecolase e cresolase é de 10 para 80. Entretanto, têm sido publicadas relações extremas de 2 para 240. Para explicar essa multiplicidade de tipos de enzimas, Mallette e Dawson (74) sugeriram que as enzimas catecolases e as formas intermediárias eram resultados de degradações químicas, físicas ou fragmentações de uma enzima nativa, o que ocorreria durante o fracionamento. Entretanto, Smith e Krueger (114), purificaram extratos de cogumelos através de colunas de DEAE-celulose e hidroxí-apatita, mostrando a presença de diversos tipos de enzimas com alta atividade catecolase e cresolase. Eletroforeses em gel de amido indicaram que os diversos tipos de enzimas devem ocorrer naturalmente, e não resultar da degradação ou fragmenta-



ção de uma enzima nativa.

Kertsz e Zito (61) obtiveram, de cogumelo, preparações homogêneas, utilizando extrações e precipitações com acetona a frio, seguidas de precipitações fracionadas com soluções de sulfato de amônio e cromatografia em Sephadex G-100. As preparações finais apresentaram alta atividade específica. A tirosinase purificada mostrou um coeficiente de sedimentação correspondente ao peso molecular  $128.000 \pm 5\%$ . A enzima dissocia-se em sub-unidades, quando em solução saturada de uréia, as quais são inativas. O conteúdo de cobre estimado foi de 0,20%.

A tirosinase de Neurospora, obtida em estado homogêneo e cristalino, mostrou um pico de absorção característico a 280 nm e um "ombro" a 340 nm (28). Esta enzima apresentou-se em duas formas alélicas que se agregam irreversivelmente, com peso molecular  $63.000 \pm 2.000$ . A tirosinase purificada apresentou um coeficiente de sedimentação, em gradiente de sacarose, de 3,6 S, estando o peso molecular calculado entre 65.000 a 70.000.

Harel e Mayer (39), demonstraram, em preparações de cloroplastos de maçãs e, após tratamento com Triton X-100 e filtração em coluna de Sephadex G-100, três frações com atividade catecolase. O peso molecular estimado para as três frações foi de: 30.000 a 40.000, 60.000 a 70.000 e 120.000 a 130.000. Eletroforeses em gel de amido mostraram que a fração de peso molecular 60.000, tinha uma mobilidade eletroforética menos lenta em direção ao ânodo.

Com preparações de fenolase de batatas foram separados dois componentes por cromatografia em DEAE-celulose (94). Um dos componentes foi purificado por eluição em coluna de Sephadex G-100 e mostrou ser homogêneo por ultracentrifugação, com um coeficiente de sedimentação de 5,9 S. O espectro de absorção da enzima apresentou um pico a 275 nm e um "ombro" na região de 320 nm a 380 nm. Essa enzima, submetida a luz fluorescente em comprimento de onda de excitação de 370 nm, mostrou alta fluorescência.

Gregory e Bendall (34) purificaram a polifenoloxidase de chá - 5.000 vezes através de cromatografia de troca iônica e adsorção. Em um estágio intermediário de purificação, a enzima apresentou quatro frações solúveis de coloração amarela. Os autores acreditaram que essas frações representavam complexos de uma enzima - básica, com produtos de oxidação de ácidos fenólicos. Após a remoção dos materiais complexantes, as frações tornaram-se de coloração azul e divididas em duas espécies: A e B. A enzima da espécie A mostrou uma absorção máxima a 279 nm e 611 nm com um "ombro" a 330 nm. O peso molecular calculado por difusão e sedimentação foi  $144.000 \pm 16.000$ , sendo que o teor de cobre encontrado foi de 0,32%.

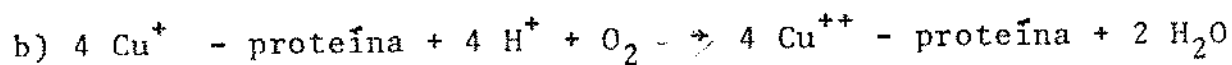
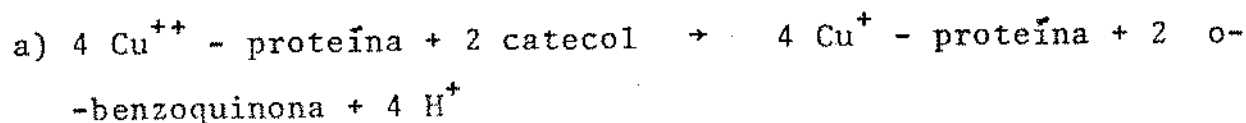
A evidência de ácido clorogênico como um fenólico ligado a moléculas protéicas foi sugerido por Amorim e Josephson (2). Preparações de extratos dialisados de dois tipos de cafés: Mole e - Rio, mostraram por eletroforese em gel de agar, diferenças quan

to à mobilidade eletroforética das proteínas. Os autores relacionaram essas diferenças à presença de polifenoloxidasas mais ativa e ligada ao ácido clorogênico (3).

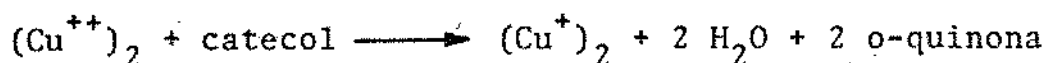
Experimentos conduzidos com focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida mostraram que os extratos de café tratados com uréia 7 M, apresentaram ponto isoelétrico superior aos extratos de café não tratados, o que sugere a provável presença de ácido clorogênico ligado à proteína de maneira não covalente. Sabir e col (107), encontraram que proteínas de girassol - podem estar ligadas por ligações covalentes e não covalentes - ao ácido clorogênico e que, a uréia, tem efeito dissociante do ácido ligado de maneira não covalente.

### 2.3. Mecanismos propostos para a reação enzimática

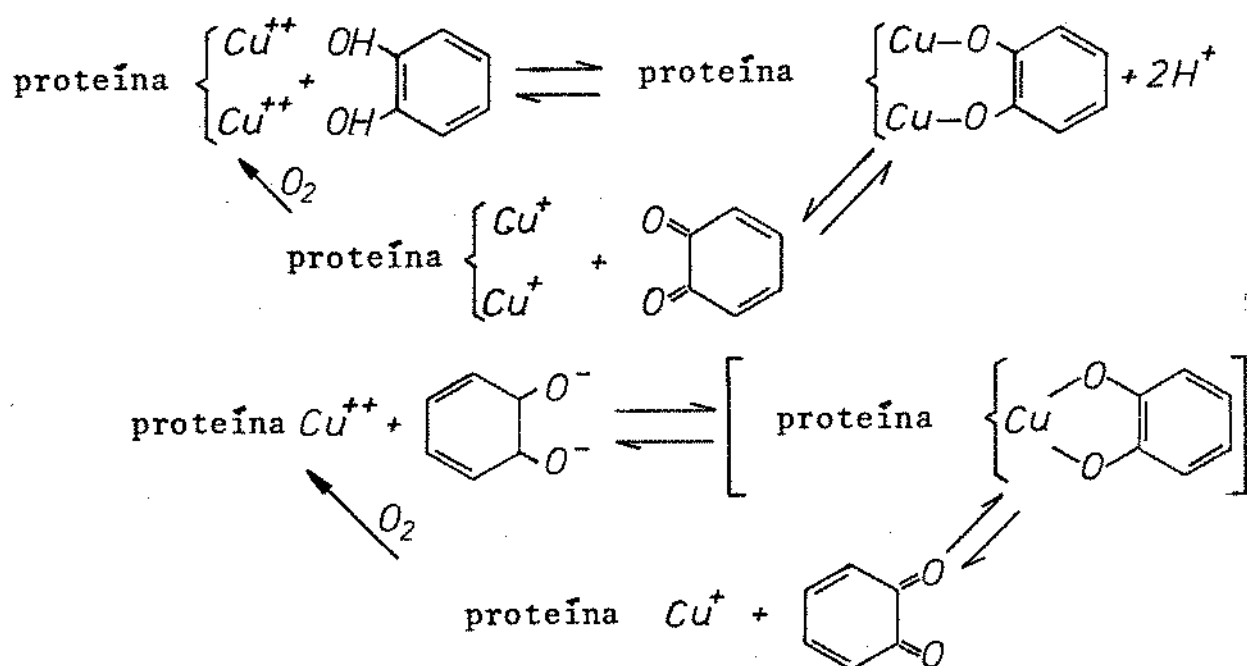
A concordância de que a o-benzoquinona é a primeira etapa no processo de oxidação de catecóis a melanina em presença de polifenoloxidasas é geral. Estas são enzimas conhecidas como proteínas que contêm cobre, catalisando as seguintes reações:



Warburg (129) sugeriu que as fenolases deveriam conter dois átomos de cobre no centro catalítico e que a equação seria:



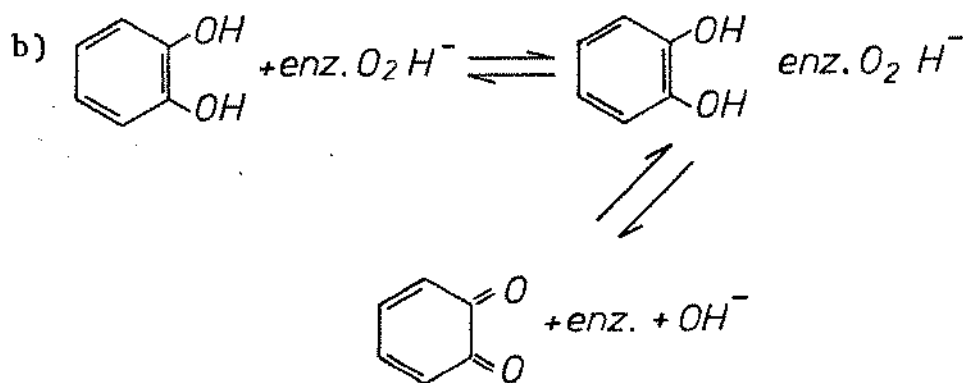
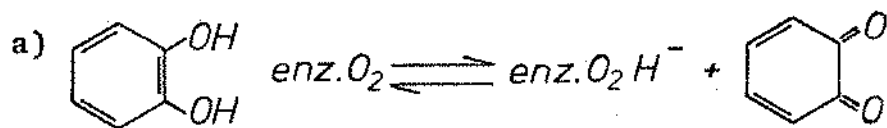
Entretanto, o mecanismo de utilização do oxigênio molecular não está claro nesta expressão. Segundo Mason (78), as reações na superfície catalítica da enzima deveriam ser:



Contudo, deve-se lembrar que as fenolases na presença de o-difenóis ativam o oxigênio para hidroxilação do anel. Há razões para se acreditar que o oxigênio age de forma mais direta do que a proposta nas reações acima (82).

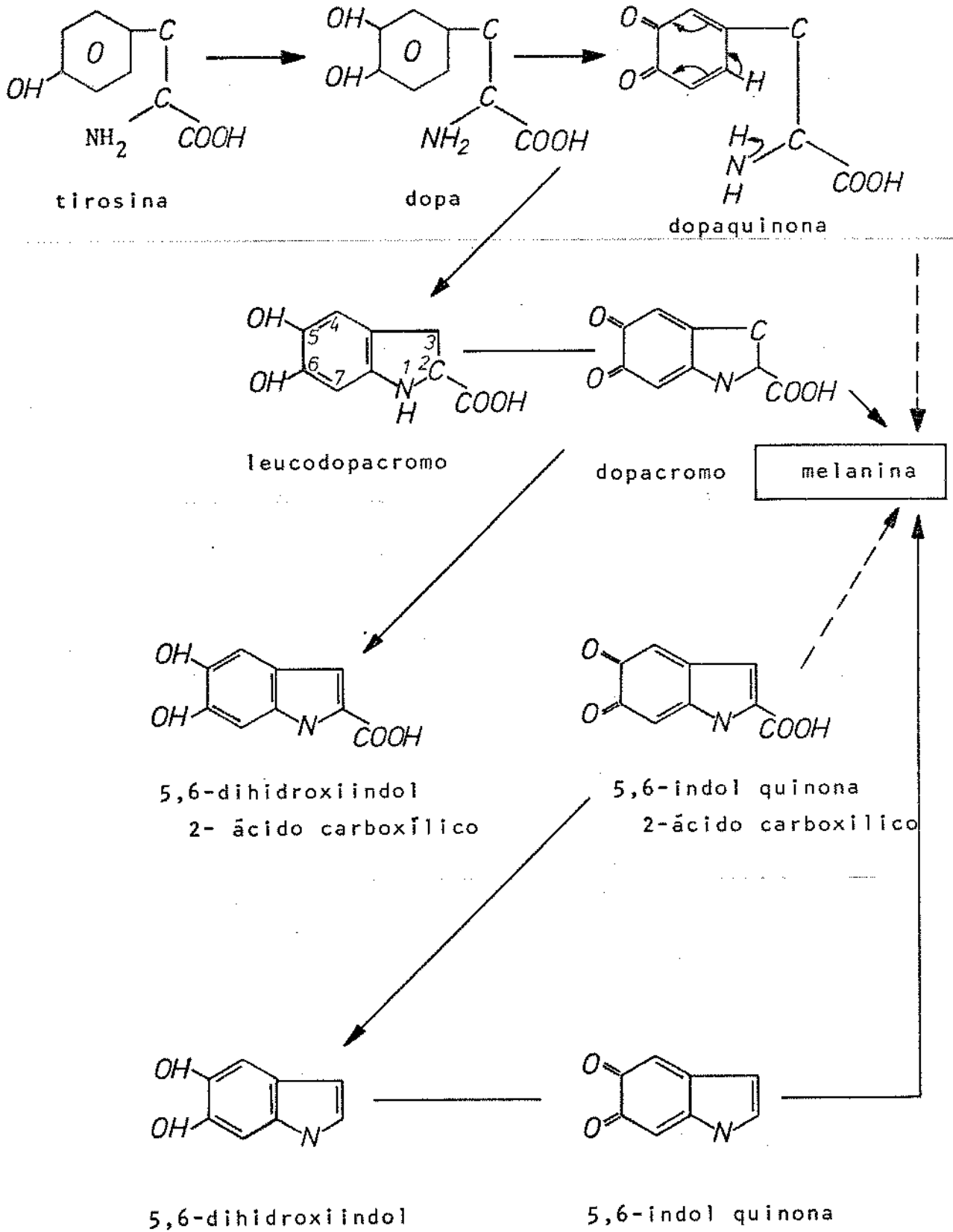
As proposições de Lu Valle e Goddard (71) para o mecanismo de desidrogenação dos o-difenóis pela fenolase e oxigênio, enfatizam a possibilidade de formação de um complexo ternário de enzima-substrato-oxigênio à semelhança do que ocorre com a oxidase-ascórbica que, na desidrogenação do ácido ascórbico, catalisa -

uma reação semelhante à desidrogenação de o-difenóis por fenolases.

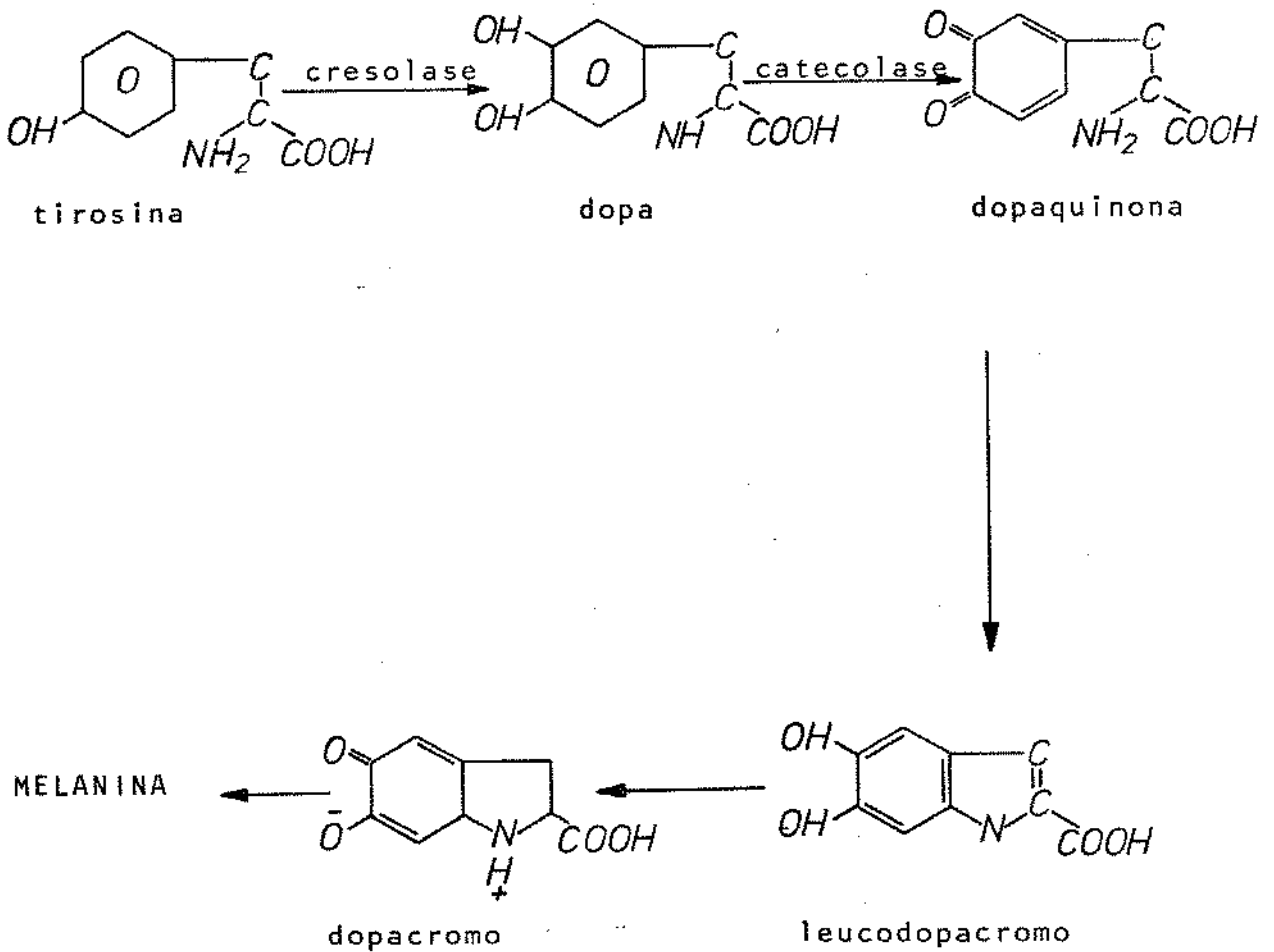


### 2.3.1. Formação de melanina

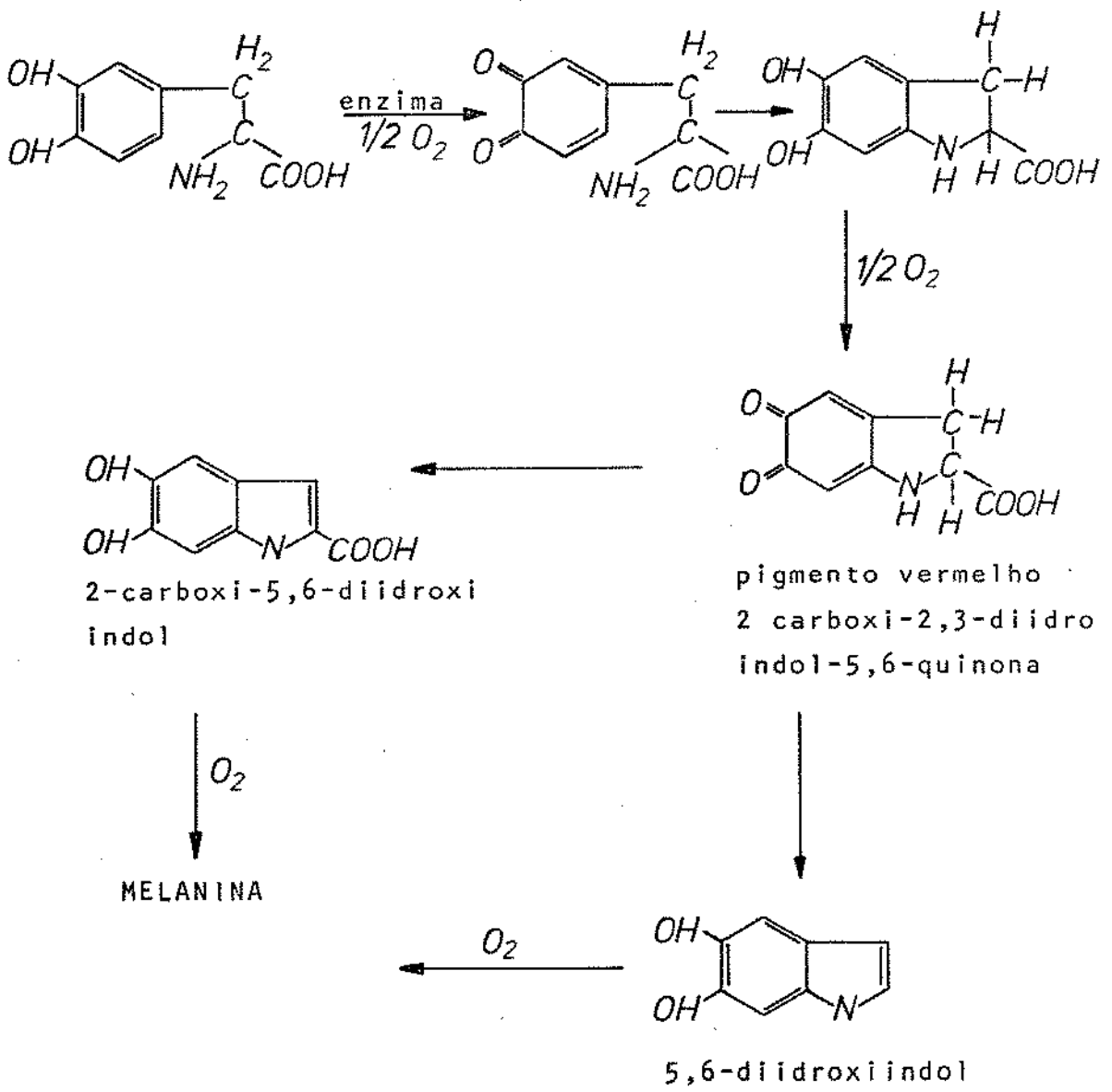
Quimicamente as melaninas são polímeros amorfos, insolúveis, frequentemente ligados a proteínas. São altamente estáveis e têm sido isolados na forma não modificada em fósseis de 150 milhões de anos. As reações envolvidas na formação de melaninas têm sido propostas em modelos químicos (76). Um deles é o mecanismo de oxidação de tirosina a dopa:



Em animais, a hidroxilação da tirosina a dopa pela tirosinase é conhecida há muitos anos. A enzima tem duas atividades: uma, cresolase, que catalisa a hidroxilação de tirosina a dopa e a catecolase que catalisa a oxidação da dopa em dopaquinona, após o que segue o fechamento do anel, seguido por oxidação sucessiva até formação de melanina como produto final (27).

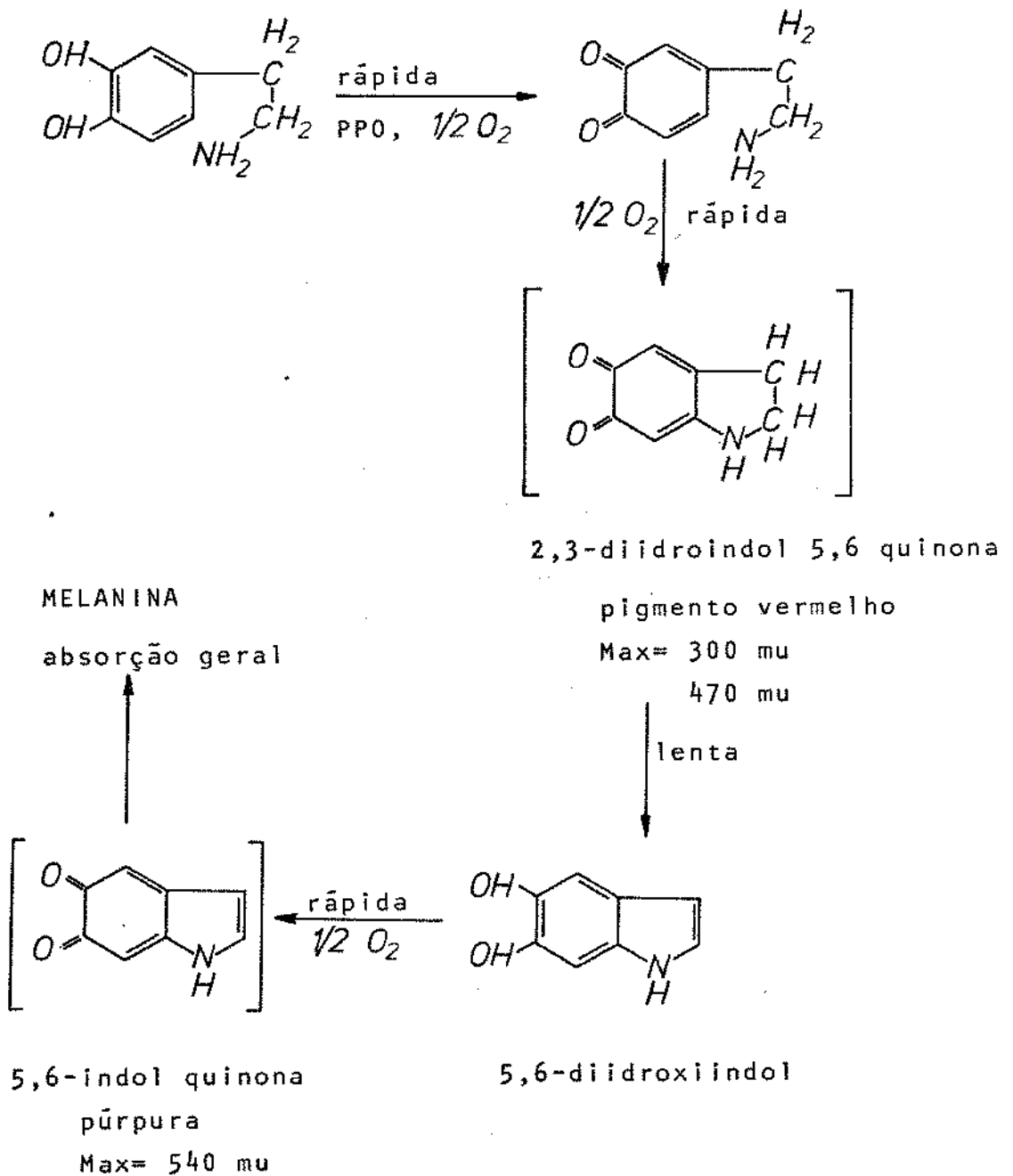


Outros mecanismos foram propostos para a oxidação enzimática de difenóis. Raper (103) propôs um mecanismo para a conversão enzimática de 3,4-dihidroxiifenilalanina (dopa) a melanina:





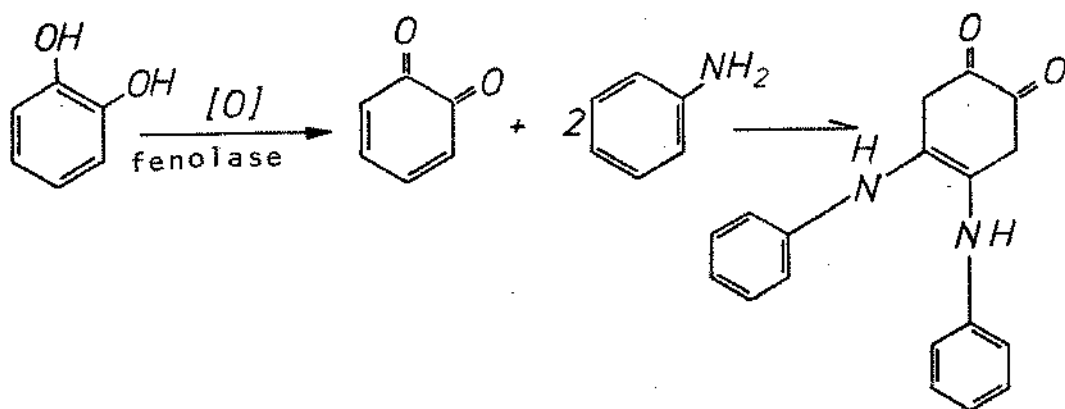
Em trabalhos com polifenoloxidase de banana, Palmer (93) propôs um mecanismo para a oxidação de dopamina, baseado em determinações espectroquímicas dos intermediários formados durante a reação:



### 2.3.2. Formação de intermediários

Alguns intermediários da ação de polifenoloxidasas sobre o-difenóis, como dopa e dopamina, já são conhecidos. Entretanto, os intermediários oriundos da oxidação do catecol ainda permanecem desconhecidos. O estudo desses intermediários tem sido realizado através de cromatografia em papel e por métodos manométricos (30). O composto intermediário isolado em baixa concentração de substrato foi um pigmento vermelho púrpura. Em altas concentrações de substrato, formam-se três isômeros tetra-hidroxi-difenilos junto com outro composto de estrutura ainda desconhecida.

Com a ressonância das quinonas, tendem a se formar cargas positivas no anel aromático (78). Por outro lado, as quinonas reagem com aminas tanto por substituição nuclear como por formação de quinonimina:



Tendo em vista que as reações de aminoácidos com o-quinonas resultam em derivados análogos (97), supõe-se que os intermediários da reação da polifenoloxidase com catecol apresentam um modelo semelhante, que tem sido de difícil isolamento e, conseqüentemente, sua estrutura também difícil de ser estabelecida, devido à alta instabilidade dos produtos (78).

#### 2.4. Especificidade a substratos

A maioria das polifenoloxidases vegetais apresentam atividade catecolase com orto-difenóis simples. De um modo geral, considera-se a atividade tirosinase de menor importância, uma vez que são raros os substratos fenólicos que apresentam ausência de grupos orto-difenólicos. Corroborando essa afirmação, Brown e Ward (16) isolaram por cromatografia em DEAE-celulose, três componentes ativos da tirosinase de camundongo Harding e Pessey. Estes apresentaram atividade para tirosina e dopa, sendo quatro vezes mais ativos para dopa. Através de seus trabalhos experimentais, sugeriram que a mesma enzima pode ser responsável pela oxidação de mono e difenóis.

Onslow (90), em trabalhos realizados com pêssegos, isolou diversos compostos fenólicos e mostrou a presença de enzimas oxidantes. Posteriormente, Reyes e Luh (104) demonstraram que nessa fruta, a atividade polifenoloxidase era mais efetiva ao se utilizar catecol como substrato. Wong e col (134), estudando isoen

zimas de pêssegos mostraram atividade para o-difenóis com maior especificidade para o-catecol e o-catequina. Nenhuma atividade para monofenóis e m-fenóis foi encontrada nessas preparações.

Walker (125) encontrou que polifenoloxidasas de pera e maçã eram semelhantes quanto à especificidade a substratos representados por um grande número de polifenóis, incluindo ácido clorogênico. Uma alta especificidade para ácido clorogênico e 4-metilcatecol foi encontrada em tubérculos de batata (1) e a atividade da enzima no extrato cru era semelhante para ácido clorogênico e catecol, enquanto que, na preparação purificada a atividade foi maior para o ácido clorogênico, sendo inibida por altas concentrações de catecol.

Dizik e Knapp (24), em extratos purificados de abacate, separaram a enzima em cinco frações. Os autores concluíram que a atividade de uma das frações era responsável pela real atividade obtida no extrato cru e purificado. Isto porque ela se mostrou mais ativa para todos os substratos, bem como desenvolveu coloração muito mais rapidamente que para as outras frações. Racusen (102) encontrou, em folhas de Phaseolus vulgaris, que a oxidase apresentava especificidade para ácido cafêico, dopa e pirogalol, enquanto que nenhuma atividade foi encontrada para tirosina.

Griffiths (35) mostrou que o escurecimento de bananas era uma oxidação da dopamina. Estudos mais intensivos realizados por Pal

mer (93) mostraram que nessa fruta a polifenoloxidase tinha especificidade somente para o-difenóis com maior afinidade para dopamina. O autor menciona que no estado semi-purificado, a enzima apresentava-se mais ativa para L-dopa do que para D-dopa como substrato.

Montgomery e Sgarbieri (84), estudando a ação de diversos substratos em diferentes partes da banana madura, mostraram que o catecol e 4-metil catecol eram melhores substratos para a polifenoloxidase. A enzima apresentou maior especificidade para dopamina, dentre os fenólicos estudados. Os autores sugerem que a diferença em especificidade encontrada para dopamina prendeu-se ao fato do grupo carboxílico da dopa induzir um decréscimo na atividade enzimática.

Em trabalhos recentes, Aragão e Bacila (5) mostraram que a polifenoloxidase de Biomphalaria glabrata, embora com baixa especificidade para os substratos estudados, mostrou-se mais ativa para di e tri-fenóis, bem como para várias aminas aromáticas. Os autores sugerem que a posição do aminogruppo das aminas fenólicas influi na formação do complexo enzimático. Assim, a presença de grupos metilos, hidrofóbicos modificariam a estrutura do substrato, produzindo uma melhor adaptação do centro ativo da enzima. Por outro lado, os mesmos autores mostraram que as aminas aromáticas, embora possuindo o grupo hidroxila na cadeia, não eram substratos para a polifenoloxidase.

## 2.5. Efeito de inibidores

Vários inibidores têm sido utilizados para investigar o mecanismo de inibição das reações de oxidação provocadas pelas fenolases.

Há muito tempo sabia-se que o ácido ascórbico era oxidado por quatro sistemas:

- a) oxidação direta pela oxidase do ácido ascórbico (121);
- b) oxidação direta pela o-quinona gerada da ação de peroxidase, por flavonas na presença de peroxidase e peróxido (120);
- c) oxidação direta por o-quinonas formadas por catecol e polifenoloxidase (57,72);
- d) oxidação direta pelo sistema de citocromos (56).

Em trabalhos realizados com maçãs, foi observado que apesar da existência de ácido ascórbico como substrato natural da fruta, não foi localizada nenhuma atividade ascorbase (99). Por outro lado, verificou-se a presença de polifenoloxidase e peroxidase nos tecidos dessa fruta. Concluiu-se, então, que a oxidação do ácido ascórbico estava intimamente relacionada com o escurecimento, sendo que este não ocorria antes de todo o ácido ascórbico ter sido oxidado.

Em anos posteriores foi proposto como regra geral, que o ácido ascórbico seria um agente redutor para qualquer o-quinona produzida durante a oxidação de substratos fenólicos.

Krueger (64), estudando o efeito do ácido ascórbico na velocidade de reação da oxidação da tirosina pela polifenoloxidase de cogumelo, concluiu que o ácido tinha inicialmente um efeito pró-oxidante no sistema, passando a anti-oxidante na ação sobre o produto da reação. Tem sido mostrado que a concentração de íons cúpricos influi nas velocidades de oxidação dos sistemas polifenol oxidases, na presença de ácido ascórbico (59, 60).

Em estudos com batatas (9), observou-se que o ácido ascórbico, quando presente no sistema catecol-polifenoloxidase, provoca um retardamento no desenvolvimento da cor até que haja oxidação completa do ácido. Por outro lado, esses autores mostraram que a presença desse inibidor afeta de forma irreversível o centro ativo da enzima, dependente de cobre iônico.

Os grupos sulfidrilos desempenham papel importante na formação biológica da melanina. O problema de uma ligação química das melaninas às proteínas não está, até o momento, resolvido.

A tendência de numerosas quinonas simples combinarem-se com grupos aminados e com tióis, tem levado à hipótese de uma condensação das quinonas com esses grupos livres nas proteínas. Os grupos sulfidrilos estão presentes nas queratinas e sabe-se que a presença de enxôfre nas melaninas, obtidas pela digestão pancreática de melano-proteínas naturais, foi interpretada como a indicação da participação deste elemento na ligação melano-proteína -

(33). A ação inibitória dos tióis sobre a melanogênese "in vivo" ou "in vitro", já é conhecida (66).

Mason (81) mostrou não ter observado nenhuma reação inibitória de tióis com a dopamina, mas assinala modificações espectrofotométricas do indol 5,6-quinona em presença de glutathione, que ele atribuiu a uma forma oxidada destes dois compostos. Posteriormente, foi mostrado que a oxidação da tirosina ou da dopa pela polifenoloxidase, em presença de um excesso de glutathione ou de cisteína, conduziu à formação de um composto de adição - da dopamina com o tiol (14). O dopacromo formado em presença de glutathione re-arranja-se tanto em 5,6- diidroxil indol a pH 6,8, como em 2- diidroxil indol a pH mais baixo, que são capazes de reagir com o tiol em meio oxidante. Por outro lado, mostrou que a oxidação da dopa pela polifenoloxidase em presença de glutathione ou cisteína em quantidades próximas à estequiométrica, gera um complexo misto destas substâncias com seus produtos de oxidação.

Experimentos desenvolvidos com cromatografia em papel, mostraram, em extratos de maçã, o efeito inibitório da cisteína e glutathione, utilizando ácido clorogênico como substrato para a polifenoloxidase. A mistura desses compostos inibiu o escurecimento pela formação de um complexo cisteína-ácido clorogênico, identificados por fluorescência no cromatograma (41). Em estudos com polifenoloxidase de batatas, a ação da cisteína não se



mostrou eficaz ao utilizar ácido clorogênico como substrato para a enzima (85). Este composto inibidor mostrou ser efetivo para a ação tirosinase, enquanto que, para a inibição da reação com dopa, foram necessárias concentrações mais elevadas.

Dentre os agentes sulfurados, o mais comumente utilizado é o  $\text{SO}_2$ . Ponting e Johnson (100) acreditavam que o  $\text{SO}_2$  inibia a atividade enzimática simplesmente pela sua capacidade redutora, agindo competitivamente com o oxigênio. Diemair e col (23), mostraram que quando a polifenoloxidase de batata era tratada com  $\text{SO}_2$  a enzima era inativada antes que fosse adicionado o substrato.

Embs e Markakis (26), trabalhando com polifenoloxidase de cogumelos, mostraram que o sulfito agia como um inibidor pela combinação com o-quinonas, prevenindo, portanto, a condensação até melanina. Os autores verificaram também que uma pré-incubação do sulfito com a enzima inibia sua capacidade de reagir com o substrato. Confirmando essa proposição, Wong e col (134), mostraram que em pêssegos o metabissulfito de sódio provocava uma diminuição na absorção da reação de oxidação a 420 nm, devido à redução de o-benzoquinona. Essa diminuição dependia da concentração do inibidor utilizado.

O cobre desempenha papel importante no centro catalítico da enzima (79, 80, 83). Assim sendo, têm-se procurado investigar os compostos capazes de agir como quelantes de cobre e, consequen-

temente inibir a atividade enzimática.

Reyes e Luh (104), em estudos com polifenoloxidase de pêssegos, mostraram que ditiocarbamato, bem como 1-fenil 2-tiourêia, são quelantes muito efetivos de cobre e que, fluoroglucinol, na concentração de 3 mM era um inibidor competitivo para a polifenoloxidase.

Pomerantz (98) pôde demonstrar que tanto o ditiocarbamato como o cianeto de potássio produzem inibição de polifenoloxidase de melanoma de "hamster", cuja atividade era restaurada pela adição de  $\text{Cu}^{++}$ . Também mostraram que a adição de ditiocarbamato produz um período de retardamento na formação do dopacromo intermediário.

Polifenoloxidase de duas espécies de uvas, parcialmente purificada, parece degradar antocianina "in vitro", sendo esta degradação inibida por ácido ditiocarbâmico, cianeto de potássio e tiourêia (110). Prabhakaran e col (101) mostraram que o ácido ditiocarbâmico penetra no Micobacterium leprae inibindo completamente a atividade da polifenoloxidase.

Em o-difenoloxidase de folha de fumo, foi demonstrado, utilizando o ácido clorogênico como substrato, que vários outros compostos capazes de reagir com quinonas afetam a oxidação do ácido clorogênico. A cor dos produtos formados e o oxigênio absorvido na sua formação, sugerem que a quinona reage com estes compostos do mesmo modo que reagem com quinonas simples (96).

Macrae e Duggleby (72), em estudos com fenolases de batata, mostraram que os diferentes tipos de inibição e as constantes de inibição encontradas com tirosina e dopa como substratos, indicam a existência de dois centros ativos distintos: um para oxidação de o-difenóis e outro para hidroxilação de mono-fenóis. Os autores sugerem uma teoria na qual os dois centros ativos estão em diferentes moléculas de proteína. Se cada uma das moléculas tiver um centro adicional que liga fenóis ácidos e ácidos carboxílicos, então, substâncias ligadas a este centro inibidor poderão reagir com o centro catalítico. Considerando a forma oxidada de o-difenóis, inibidores o-difenóis poderão ligar-se em ambos os centros. Se a afinidade para o centro catalítico é muito maior do que para o centro inibidor, observar-se-á a inibição competitiva e, se a afinidade para o centro inibidor foi muito maior do que para o centro catalítico, será observada inibição não competitiva. Consequentemente, se as afinidades para os dois centros são aproximadamente iguais, será observada inibição mista. Inibidores monofenóis ligar-se-ão no centro inibidor, dando uma inibição não competitiva ou mista. De forma semelhante, para a hidroxilação do monofenol, o-difenóis e ácidos carboxílicos, podem agir como inibidores competitivos, não competitivos ou mistos.

Em trabalhos com tirosinase de melanoma de camundongo Harding - Passey, foi visto que a oxidação de dopa a dopaquinona, catalisada por tirosinase, foi inibida por tirosina (112). Estudos cinéticos sugeriram a existência de dois centros ativos na molécula

ta da tirosinase; um onde a dopa é oxidada e outro, onde a tirosina é ligada mas não oxidada durante a primeira fase da reação.

Em experimentos recentes, foram isolados dois inibidores de tirosinase de cogumelo (73). Um deles, de peso molecular 1.200, apresentou inibição competitiva para dopa como substrato, o outro, apresentou inibição não competitiva para a tirosinase. Os autores sugeriram que a incubação prolongada do primeiro inibidor com a enzima provocava mudanças conformacionais na molécula,

#### 2.6. Formas moleculares ativas

O termo isozima tem sido usado para descrever as diferentes formas moleculares em muitos sistemas enzimáticos.

Jörnvall (51), mostrou que diferentes enzimas que exibem especificidades semelhantes, apresentam diferentes perfis eletroforéticos e cromatográficos. Para muitas dessas isozimas é evidente, agora, que são formas relacionadas da mesma enzima.

Kaplan (53), apresentou extensa revisão de isozimas de desidrogenase láctica a fim de estudar, em base molecular, a natureza das formas múltiplas das enzimas. As formas moleculares múltiplas podem ser oriundas de diferentes agregados de uma determi-

nada enzima. A estrutura dos agregados pode ser de tal natureza, que a carga na superfície seja diferente a ponto de produzir diferenças nas suas mobilidades eletroforéticas. O termo "conformers" foi descrito pelo autor para descrever um grupo de formas múltiplas de enzimas que possuem a mesma sequência de aminoácidos mas, diferem em sua conformação. Esta diferença na conformação produz variações eletroforéticas bem como diferentes comportamentos em resinas de troca iônica. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as múltiplas formas moleculares da polifenoloxidase.

Harel e Mayer (39), sugeriram que as três frações de catecol oxidase purificadas de cloroplastos de maçã, eram resultantes da agregação de sub-unidades de uma mesma enzima. Estas frações, quando submetidas a tratamento com cloreto de sódio e Triton X-100 e estocadas entre 2 a 4°C, se interconvertiam.

Constantinides e Bedford (19), usando eletroforese em gel de poli-acrilamida, estudaram o sistema polifenoloxidase em tecidos de cogumelos, batatas e maçãs. O sistema enzimático mostrou um fenômeno de formas múltiplas apresentando diferenças de especificidade e características próprias a cada espécie e variedade estudadas. O sistema polifenoloxidase de cogumelo apresentou nove formas múltiplas com alta atividade para DL-dopa e três formas reativas com L-tirosina. Em batatas, foram encontradas onze formas com atividade para DL-dopa enquanto que, em maçãs, três formas eram a

tivas com esse substrato. Os autores verificaram que as formas de polifenoloxidase de cogumelo eram diferentemente afetadas pela temperatura. A atividade de todas as formas foi destruída após um minuto a 100°C, enquanto que, algumas das formas submetidas a 40°C, 50°C e 60°C eram destruídas após 60 minutos e outras, quebradas em fragmentos distintos. A 70°C, a banda de maior mobilidade foi estável por mais de 60 minutos.

Jolley e Mason (48), estudando formas múltiplas de tirosinase de cogumelo, encontraram que as isozimas apresentaram um certo grau de interconversão dependendo das condições de força iônica, pH e concentração protéica. Os seus resultados indicaram que para determinadas condições existia um equilíbrio entre 5 a 6 isozimas. A separação das isozimas de tirosinase mostrou uma mistura de formas poliméricas com predominância de um tetrâmero (50). A dissociação é facilitada a 50°C sob alta força iônica e em presença de 0,25% de dodecil sulfato de sódio. Em eletroforese de gel de poliacrilamida as bandas foram identificadas como monômeros, dímeros e tetrâmeros. Bouchilloux e col (15) mostraram também que a tirosinase de cogumelo era composta por formas múltiplas com aparente dissociação em sub-unidades ativas, na presença de dodecil sulfato de sódio.

Horowitz e col (42) mostraram a presença de diversas formas de tirosinase em Neurospora crassa, distintas pela termo-resistência e propriedades eletroforéticas. Posteriormente, Fling e -

col (28), em preparações homogêneas na forma cristalina, isolaram duas tirosinases alélicas S e L. O peso molecular de ambas foi de  $63.000 \pm 2.000$  e pareciam se agregar reversivelmente em solução. A forma S era consideravelmente mais termolábil que a forma L.

Extratos acetônicos de pêssegos mostraram por eletroforese em gel de poliacrilamida, quatro bandas com atividade de polifenoloxidase. Essas quatro isozimas isoladas A, B, C e D, diferem pela termoestabilidade, sendo que a forma D foi a mais estável a  $76^{\circ}\text{C}$  (134). Por outro lado, a isozima A apresentou-se resistente aos inibidores metabissulfito de sódio, glutationa, ácido ascórbico e ditiocarbamato.

Estudos recentes, realizados com eletroforese em gel de poliacrilamida mostraram nove isozimas com atividade de polifenoloxidase no interior da polpa de banana, oito no exterior da polpa e dez na casca (84). As isozimas do interior e do exterior da polpa mostraram-se iguais diferindo da casca em apenas uma. Compostos químicos como ditiocarbamato de sódio, cisteína, 2-mercaptoetanol e cianeto de sódio inibiram todas as isozimas de polifenoloxidase, enquanto que metabissulfito de sódio inibiu apenas algumas.

Harel e col (40) observaram formas múltiplas de catecol oxidase de uva. Eletroforeses em gel de poliacrilamida mostraram oito bandas ativas, que eram interconvertidas durante o isolamento,

estocagem, tratamento com uréia e pH ácido. Essa interconversão deveria originar-se da dissociação da enzima em sub-unidades. A análise de várias bandas sugeriram que algumas formas da enzima teriam o mesmo peso molecular mas difeririam na distribuição de cargas.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Reagentes

Os reagentes obtidos no comércio tinham a especificação de alto grau de pureza. DL-3,4-di-hidroxifenilalanina, L-dopa, D-dopa, epinefrina, norepinefrina, D-catequina, dopamina, ácido clorogênico, L-tirosina, PVP insolúvel, Triton X-100 eram da marca Sigma Chemicals Co.. O catecol utilizado nos experimentos foi da marca Carlo Erba, por apresentar maior grau de pureza. Os reagentes para os experimentos em gel de poliacrilamida eram da Eastman Organic Chemicals. A acetona utilizada na purificação foi redistilada a 56°C e mantida a -20°C até o momento de uso.

##### 3.1.2. Fonte de enzima

As bananas nanica (Musa cavendishii L.), obtidas no comércio, eram oriundas do litoral do Estado de São Paulo e pertencentes à família Musaceae. Essa espécie é originária da espécie selvagem Musa accuminata (113) e classificada como pertencente ao grupo genético AAA (triplóide). Foi por nós escolhida para o presente trabalho, em virtude da correlação positiva existente entre a atividade de polifenoloxidase e o genoma accuminata (36). As frutas foram analisadas em diversos estágios de maturação, sendo que as diferentes partes, centro e polpa foram utilizadas no

mesmo dia de sua aquisição.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela medida inicial da reação a 420 nm, através do espectrofotômetro de duplo feixe-modelo 356, marca Perkin Elmer acoplado a um registrador. Para o ensaio, a cubeta continha 2 ml de catecol 0,1 M, 1 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima. O controle foi feito nas mesmas condições, não contendo entretanto, solução de enzima. O mesmo tipo de procedimento foi utilizado para os diferentes substratos, em comprimento de onda característico para cada um.

A atividade em unidade de enzima foi determinada segundo a equação:

$$\text{Atividade} = \frac{(S) (V) (1.0) (\text{vol}) (R)}{(\text{vol. enz.}) (10) (20)}$$

Onde:

S = inclinação da reta;

V = velocidade do registrador ( 5 mm/min a 240 mm/min)

1.0 = absorção máxima obtida no registrador, equivalente a 20 cm;

vol = volume total da cubeta, em ml;

20 = largura do papel registrador, em cm;

10 = sensibilidade da posição da pena quando se faz a calibração do aparelho;

R = limite de sensibilidade da pena do registrador (1.....1.000 mV)

Portanto, a fórmula simplificada será:

$$\text{Atividade} = \frac{(S) \cdot (V) \cdot (R) \times 0,015}{\text{vol. enz.}}, \text{ em}$$

(Abs/ml.min<sup>-1</sup>). Considerou-se uma unidade de atividade enzimática como uma unidade de absorvância (U/ml.min<sup>-1</sup>). Nessas condições, foi possível a determinação de parâmetros utilizando-se a porção linear da curva, que representa a velocidade inicial da reação.

### 3.2.2. Determinação do pH ótimo

Amostras do extrato tamponado foram utilizadas para determinação da atividade enzimática em cubetas contendo 2 ml de catecol 0,1M 1 ml de tampão citrato pHs 5,0 e 6,0 em diferentes concentrações e tampão fosfato pHs 7,0 e 8,0 em diferentes concentrações. Devido à auto-oxidação do substrato em pHs neutros e ligeiramente alcalinos, foi feito um experimento utilizando 1 ml de água destilada e deionizada ao invés de tampão em que se verificou não haver nenhum prejuízo para a realização dos testes de atividade, adotando-se esse procedimento como rotina.

### 3.2.3. Dosagem de proteína

A concentração protéica foi determinada segundo diferentes métodos. O escolhido como de melhor resolução foi o de biureto (133)

devido à presença de compostos fenólicos nos extratos, tais como: pigmentos, taninos que interferem grandemente nas determinações por métodos mais sensíveis como o de Lowry e col (7). A medida de absorção em 280 nm, das frações obtidas de colunas cromatográficas, foram realizadas no espectrofotômetro de duplo feixe, modelo 402, marca Perkin Elmer.

#### 3.2.4. Efeito do pH e da composição do meio na extração da enzima

Após se ter determinado o melhor estágio de maturação da fruta, bem como a localização da parte com maior atividade de polifenoloxidase, realizou-se experimentos com a finalidade de se encontrar o pH de melhor extratibilidade da enzima. Para tal, utilizou-se 25 g da parte central da banana, que foram homogeneizados em 50 ml de tampão fosfato 0,2 M, pHs 7,0, 8,0 e 9,0 e tampão citrato pH 6,0, contendo 1% de PVP insolúvel e 0,5% de Triton X-100. Após centrifugação a 12.062 x g por 15 minutos a 4°C o sobrenadante foi coletado e a atividade enzimática determinada para cada extrato. O sobrenadante correspondente aos extratos nos pHs 7,0 e 9,0 foram estocados nas temperaturas de 4°C e -40°C. A atividade enzimática foi determinada após diferentes tempos de estocagem, sofrendo a amostra a -40°C somente um descongelamento.

devido à presença de compostos fenólicos nos extratos, tais como: pigmentos, taninos que interferem grandemente nas determinações por métodos mais sensíveis como o de Lowry e col (70). A medida de absorção em 280 nm, das frações obtidas de colunas cromatográficas, foram realizadas no espectrofotômetro de duplo feixe, modelo 402, marca Perkin Elmer.

#### 3.2.4. Efeito do pH e da composição do meio na extração da enzima

Após se ter determinado o melhor estágio de maturação da fruta, bem como a localização da parte com maior atividade de polifenoloxidase, realizou-se experimentos com a finalidade de se encontrar o pH de melhor extratibilidade da enzima. Para tal, utilizou-se 25 g da parte central da banana, que foram homogeneizados em 50 ml de tampão fosfato 0,2 M, pHs 7,0, 8,0 e 9,0 e tampão citrato pH 6,0, contendo 1% de PVP insolúvel e 0,5% de Triton X-100. Após centrifugação a 12.062 x g por 15 minutos a 4°C o sobrenadante foi coletado e a atividade enzimática determinada para cada extrato. O sobrenadante correspondente aos extratos nos pHs 7,0 e 9,0 foram estocados nas temperaturas de 4°C e -40°C. A atividade enzimática foi determinada após diferentes tempos de estocagem, sofrendo a amostra a -40°C somente um descongelamento.

### 3.2.5. Obtenção do extrato bruto

Utilizou-se a parte central da polpa das bananas semi-verdes, homogeneizada em liquidificador durante 25 segundos, com 25 ml de tampão fosfato, 0,2 M, pH 7,0, contendo 1% de PVP insolúvel e 0,5% de Triton X-100. As concentrações de PVP e Triton foram determinadas para dar a melhor solubilização da enzima e, portanto, maior atividade enzimática no extrato solúvel. Após centrifugação do extrato bruto a 12.062 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante ativo foi imediatamente utilizado nas etapas seguintes de purificação. O precipitado obtido nessa fase foi e-liminado.

### 3.2.6. Precipitação fracionada com sulfato de amônio

O sobrenadante do extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio cristalizado, em agitação constante a 4°C até se atin-gir, em adições lentas, as saturações finais de 40%, 70% e 90%. O precipitado formado em diferentes frações foi centrifugado a 12.062 x g por 15 minutos a 4°C e ressuspenso em água destila-da a 4°C.

### 3.2.7. Precipitação com mistura água/acetona

Ao sobrenadante do extrato bruto foram adicionados lentamente dois volumes de acetona a -13°C e em seguida separou-se o material -insolúvel por centrifugação a 12.062 x g por 15 minutos a -5°C,

em centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC<sub>2</sub>. A recuperação da atividade de polifenoloxidase foi determinada em amostras do precipitado acetônico, ressuspensas no mesmo tampão, contendo 0,25% de Triton X-100. Após manter os diferentes extratos em congelador a -40°C, por tempo não inferior a 7 dias, o material insolúvel obtido após o descongelamento, foi centrifugado a 12.062 x g por 15 minutos a 4°C. Determinou-se no sobrenadante a atividade enzimática, bem como concentração protéica.

### 3.2.8. Filtração em gel de Sephadex G-100

O sobrenadante do precipitado acetônico obtido antes e depois do congelamento a -40°C foi aplicado em coluna cromatográfica (2,5 x 40 cm) de Sephadex G-100 da "Sigma Chemical Co.", equilibrada com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. Em experimentos separados a enzima foi eluída e coletada em frações de 5 e 1,5 ml, a cada 30 minutos. As diferentes frações obtidas foram reunidas e testadas quanto à atividade enzimática e concentração protéica.

### 3.2.9. Eletroforese em gel simples de poliacrilamida

1º Método - A eletroforese foi realizada em tubos verticais, segundo a técnica de Petropakis e col.(95), Taylor (122) e Namrod (88). As amostras foram introduzidas na concentração de 60U totais em solução a 10% de sacarose contendo pequena quantidade de azul de bromofenol. A eletroforese foi iniciada com u-

ma corrente de 2 mA/tubo até que o corante atingisse a superfície do gel inferior. A corrente aumentada para 5 mA/tubo, foi mantida até o fim da corrida. A polifenoloxidase no gel foi detectada imergindo os tubos em 100 ml de uma solução 10 mM de catecol em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, contendo 0,05% de parafenilendiamina por 10 minutos, seguido por lavagens com solução de ácido ascórbico 1 mM por 5 minutos. A seguir foi lavado com água destilada e calculada a mobilidade relativa de cada banda (MR).

2º Método - As eletroforeses foram realizadas em tubos verticais, segundo o método de Davis (22), ligeiramente-modificado (20). O gel inferior foi preparado com 8% de poliacrilamida a partir das seguintes soluções:

- a) 60 g de acrilamida e 0,5 g de N-N'-metilenobisacrilamida (BIS) em 130 ml de água;
- b) tampão Tris-ácido-clorídrico 3,0 M, pH 8,8, contendo 0,23% de N-N'-N'-tetrametilenodiamina;
- c) água destilada.

Nos tubos teste foram misturados, respectivamente; 2,44, 2,62 e 2,44 ml das soluções a, b e c e mais 5 ml de uma solução 0,14% de persulfato de amônio. Os tubos de 9,5 cm, foram preenchidos com o auxílio de uma seringa até atingir 2 cm do topo do tubo.- A fim de se evitar efeito da tensão superficial no gel, foram adicionados lentamente 0,3 ml de água, sem contudo diluir a superfície do gel. Após gelificação, a água foi retirada. O gel superior foi preparado com 3% de poliacrilamida a partir das solu -



ções contendo 10 g de acrilamida e 2,5 g de Bis em 100 ml de água; 4 mg de riboflavina em 100 ml de água; tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,46% de N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina; água destilada. Essas soluções foram misturadas nas proporções - de 1,0:0,5:0,5:0,4 ml e a polimerização foi auxiliada pela incidência de luz fluorescente nos tubos. O mesmo procedimento anterior foi utilizado a fim de evitar tensão superficial, e a polimerização verificou-se após 15 minutos. A amostra foi introduzida no compartimento superior contendo tampão Tris-glicina 0,005 M, pH 8,2, em meio a 2% de sacarose. Os eletrodos dos compartimentos superior e inferior com o tampão contendo duas gotas de azul de bromofenol a 0,5% foram conectados a uma fonte modelo - 4100, marca Ortec. A eletroforese foi completada em duas horas, com corrente de 5 mA/tubo. Para a revelação das proteínas, os géis retirados dos tubos foram imersos em uma solução de amido-Schwartz a 1% em 7,5% de ácido acético glacial por 30 minutos. A descoloração foi feita a seguir através de lavagens sucessivas com ácido acético 7,5%. A atividade de polifenoloxidase foi revelada pela incubação do gel em catecol 0,03 M por 5 minutos, - seguida de várias lavagens com solução etanólica 40%. Com esta técnica, foi possível conservar por meses as bandas enzimáticas ativas em solução etanólica 50%.

### 3.2.10. Eletroforese em gel contendo uréia

A técnica utilizada foi preconizada por Wray e Stubblefield (135). A atividade da solução enzimática incubada com uréia 8 M aplicada no gel, foi de 80 U totais. No final da eletroforese as bandas de proteína e de atividade enzimática, foram reveladas como descrito em 3.2.9 - 2º método.

### 3.2.11. Efeito da incorporação do Tween-80 e da parafenilenodiamina no gel de poliacrilamida.

Efeito do Tween-80 - As frações obtidas após cromatografia, bem como soluções do extrato bruto, foram aplicadas em gel de poliacrilamida, conforme descrito em 3.2.9 - 1º método. O gel inferior continha uma gota de Tween-80 (cerca de 0,02 ml). Após a corrida, os géis foram corados para determinação de atividade enzimática com catecol 0,01 M ou dopamina 0,001 M. A seguir determinou-se a mobilidade relativa das bandas. As bandas eletroforéticas das proteínas foram obtidas pela coloração com amido Schwartz.

A fração enzimática, eluída do Sephadex, foi incubada por cinco minutos com 0,001 ml de Tween-80 e aplicada em gel de poliacrilamida como descrito em 3.2.9. - 2º método. Foram feitas, paralelamente, eletroforeses com amostras isentas de Tween-80. As bandas de proteína foram determinadas com solução de amido Schwartz e a seguir determinadas a mobilidades relativas.

Efeito da parafenilenodiamina - As frações obtidas por eluição do Sephadex, bem como soluções de extrato bruto foram aplicadas em gel de poliacrilamida conforme 3.2.9.-2º método. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados por alguns minutos com solução de catecol 0,01 M ou dopamina 0,001 M, contendo 0,05% de parafenilenodiamina, seguido de lavagens com ácido ascórbico 0,001 M por 10 minutos. A mobilidade relativa das bandas de atividade enzimática e bandas de proteína, foram determinadas nos géis. Paralelamente, foram corados géis com solução de catecol 0,03 M, isento de parafenilenodiamina e ácido ascórbico. As bandas foram fotografadas e as mobilidades relativas determinadas. As amostras submetidas a focalização isoeletrica foram coradas por alguns minutos com catecol 0,03 M contendo 0,05% de parafenilenodiamina e a seguir os géis foram lavados com solução etanólica a 40%. Da mesma forma foi feita coloração de géis com solução de catecol isenta de parafenilenodiamina. As bandas ativas foram fotografadas.

### 3.2.12. Eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)

A técnica foi desenvolvida segundo método de Weber e Osborn (131) adaptado (20). As proteínas padrões utilizadas foram procedentes da Sigma Chemical Co. Os géis foram preparados pela mistura de 15 ml de uma solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), com 13,5 ml de solução de

11,1 g de acrilamida e 0,3 g de Bis em 50 ml de água destilada. A essa mistura foram adicionados 45 ml de N-N-N'-N'-tetrametile nodiamina, 1,5 ml de persulfato de amônio na concentração de 10 mg/ml. Os tubos foram preenchidos até 1,5 cm do topo e a polime rização verificou-se após 15 minutos.

As amostras foram preparadas previamente pela incubação por 2 - horas a 37°C, de tubos contendo 150 µl de proteínas padrões e - da amostra desconhecida na concentração de 1 mg/ml em tampão - fosfato 0,01M, pH 7,0 e 50 µl de uma solução a 0,4% de dodecil- sulfato de sódio em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo ain da 4 ml de mercaptoetanol. Após incubação foram misturados 25 - µl de cada solução de proteína, 75 µl da solução - a 0,05% de azul de bromofenol em água destilada, 20 gotas - de glicerol, 100 µl de mercaptoetanol e 1 ml de tampão fosfato- 0,001 M, pH 7,0. As amostras foram aplicadas no gel em volume - de 0,1 ml. A polifenoloxidase aplicada tinha atividade de 250 U/ml.min<sup>-1</sup>. O tampão utilizado nos eletrodos continha 2 g de do decil sulfato de sódio em 2 litros de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. A eletroforese (3.2.9. - 2º método), foi realizada mantendo a amperagem correspondente a 5 mA/tubo durante o tempo necessá- rio para que o corante migrasse até a parte inferior do tubo.- Após remoção, os géis foram corados em solução de "Coomassie - Brilliant Blue R-250" durante 3 horas. Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com solução de corante contendo 5% de meta- nol e 7,5% de ácido acético glacial. As bandas de proteínas fo-

ram fotografadas, determinando-se também a mobilidade relativa (MR) e o peso molecular da polifenoloxidase na forma monomérica. A atividade para polifenoloxidase foi determinada com solução de catecol 0,03 M.

### 3.2.13. Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida

O método utilizado foi descrito por Wrigley (136). A mistura para o gel continha 0,8 ml de uma solução de N-N-N'-N'-tetrametileno-diamina em 100ml de água destilada, 3,0 ml de uma solução de acrilamida contendo 0,8 g de Bis e 30 g de acrilamida em 100 ml de água, 0,3 ml de uma solução de anfólitos 40%, pH-3,5-9,0 marca LKB. Para cada tubo utilizou-se 0,5 ml desta mistura, 0,1 ml de polifenoloxidase (10 U totais), 0,2 ml de uma solução a 0,5% de persulfato de amônio e completou-se o volume para 1,5 ml com água destilada. O compartimento superior do eletrodo continha uma solução a 2% de N-N-N'-N'-tetrametileno-diamina e o inferior, ânodo, foi preenchido com solução de ácido fosfórico. A eletroforese iniciou com 75 V e 1,5mA/tubo até o tempo para a corrente atingir 0,5 mA/tubo, mantendo-se em seguida, durante 1 hora, a 100 V. O tempo total de corrida foi de 4 horas. Após remoção dos géis estes foram cortados em intervalos de 0,5 cm, colocados em tubos contendo 1 ml de água destilada. Após 24 horas determinou-se a atividade enzimática em cada tubo com catecol 0,08 M e dopamina 0,001 M como substratos. Paralelamente foi corrido um gel sem amostra no qual,-

após ser cortado e eluído em água, mediu-se o pH. As bandas de atividade enzimática foram determinadas utilizando-se solução de catecol 0,03 M e solução de catecol 0,03 M contendo 0,05% de parafenilenodiamina. Os géis foram fotografados.

O efeito da uréia na focalização isoelétrica foi analisado aplicando-se no gel 100 U de polifenoloxidase incubada com uma solução de uréia 8 M. A atividade enzimática foi determinada com o catecol 0,08 M, determinando-se também o pH e a mobilidade relativa.

#### 3.2.14. Determinação do coeficiente de sedimentação e peso molecular.

O método foi descrito por Martin e Ames (77), ligeiramente modificado (20). Para realização do método foi utilizado um sistema para formação de gradiente de sacarose fabricado em acrílico pela firma Permatron S/A. O gradiente foi obtido com 2,5 ml de solução de sacarose 20% no compartimento da direita e 2,5ml de solução de sacarose a 5% no compartimento da esquerda. O gradiente foi coletado em tubo de nitrato de celulose da ultracentrífuga Beckman com capacidade para 5,5 ml. No topo do tubo colocou-se 0,1 ml de uma mistura de 0,1 mg de desidrogenase láctica (LDH) de procedência Sigma em 0,1 ml de soluções de polifenoloxidase em diferentes estágios de purificação, na concentração de 500 U/ml. Os tubos foram introduzidos em rotor SW-65 e centrifugados a 175.000 x g por 15 horas a 4°C em ultracentrífuga Spinco, modelo L-75 da Beckman. Ao término da centrifuga-

ção, os tubos foram perfurados e o gradiente fracionado em 10 gotas por tubo. A seguir foi determinada a atividade de LDH - (89) no espectrofotômetro modelo 356, Perkin Elmer, bem como de polifenoloxidase em cada tubo. O coeficiente de sedimentação da enzima foi determinado tomando o valor de 7,4 S para LDH. O peso molecular foi determinado segundo Martin e Ames - (77).

### 3.2.15. Análise espectrofotométrica

As frações purificadas foram analisadas no espectrofotômetro de duplo feixe, modelo 402, marca Perkin Elmer, na faixa de comprimento de onda de 250 nm a 400 nm. As soluções continham 0,5 mg de proteína/ml. O espectro dos substratos foi determinado dentro de comprimentos de onda característicos de cada um.

### 3.2.16. Efeito de diferentes pHs na estabilidade da enzima.

Alíquotas de 2 ml do precipitado acetônico foram ajustada com soluções de HCl e NaOH nas faixas de pH de 2,0 a 8,0. As amostras foram deixadas durante 1 hora e meia à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, foram retiradas 10  $\mu$ l de cada amostra e determinada a atividade enzimática, utilizando como substrato catecol 0,08 M.

### 3.2.17. Efeito dos diferentes tratamentos térmicos

Temperatura de estocagem - Amostras do precipitado acetônico foram deixadas por tempos de 1 a 6 dias nas temperaturas de 4 e  $-40^{\circ}\text{C}$ . Em cada dia as amostras eram retiradas do local de estocagem e a atividade enzimática determinada, utilizando-se  $10\mu\text{l}$  de amostra e catecol  $0,08\text{ M}$ .

Estabilidade em diferentes temperaturas - Amostras de 2 ml de extrato cru, precipitado acetônico e fração enzimática obtida após eluição de - colunas foram incubadas em banhos-maria controlados nas temperaturas de 55, 65, 75, 85 e  $95^{\circ}\text{C}$ . Em intervalos de tempos eram retiradas alíquotas de  $10\mu\text{l}$  de cada solução e testada a atividade enzimática com catecol  $0,08\text{ M}$ .

Efeito do resfriamento rápido após tratamento térmico - Soluções contendo 4 ml de extrato bruto da enzima foram incubadas durante 15 minutos, nas temperaturas de 55, 65, 75, 85 e  $95^{\circ}\text{C}$ . Após ter-se determinado a atividade enzimática, as soluções foram divididas em dois grupos de 2 ml cada e submetidas à temperaturas de 0 e  $25^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Imediatamente após esse período, a atividade enzimática foi determinada utilizando catecol  $0,08\text{ M}$ . Os controles foram mantidos nas mesmas temperaturas sem prévia incubação.



### 3.2.18. Efeito do tratamento com uréia

Em amostras do precipitado acetônico foram adicionadas quantidades de uréia nas concentrações finais de 2 M, 4 M e 8 M. Após diferentes tempos de incubação à temperatura ambiente, foram retirados 10  $\mu$ l de cada solução e testada a atividade enzimática com catecol 0,08 M. Os controles foram realizados paralelamente ao experimento com as soluções isentas de uréia.

### 3.2.19. Efeito da diálise contra diferentes solventes

Frações contendo 10 ml de solução de extrato bruto extraído em água pH 6,0 e com tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, bem como soluções do precipitado acetônico foram separadamente dialisadas - contra água destilada, contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, - por 24 horas a 4°C e com solução de uréia numa concentração final de 8 M por 18 horas a 4°C. Os controles para as diferentes soluções foram mantidos em tubos de ensaio pelo mesmo período a 4°C. Após esse tempo a atividade enzimática foi determinada com solução de catecol 0,08 M tanto nos controles como nos diferentes dialisados.

### 3.2.20. Efeito do mercaptoetanol

Amostras contendo 2 ml de uma solução de precipitado acetônico foram incubadas a 37°C com mercaptoetanol nas concentrações de 17 mM, 6 mM e 3 mM. Em intervalos de tempo, foram retiradas

alíquotas e determinada atividade enzimática com catecol - 0,08 M.

Soluções do precipitado acetônico (5 ml) incubadas 10 min nas mesmas concentrações de mercaptoetanol, a temperatura ambiente foram dialisadas contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 por 24 horas a 4°C. Após esse tempo determinou-se a atividade enzimática. Alíquotas dessas amostras contendo 7 U/ml, 9 U/ml, e 11 U/ml foram introduzidas em gel de poliacrilamida e as eletroforeses desenvolvidas segundo 3.2.9, 2º método.

### 3.2.21. Efeito de inibidores

Soluções de 2 ml de precipitado acetônico foram incubados com 2 ml de diferentes inibidores nas concentrações finais de 100 mM, 50 mM, 5 mM e 0,5 mM. Os compostos utilizados para o experimento foram: cisteína, ácido carbâmico, metabissulfito de sódio e ácido ascórbico. A mistura permaneceu na temperatura ambiente e de tempos em tempos retirou-se uma alíquota das soluções e determinou-se a atividade enzimática com catecol 0,08 mM.

Determinação de  $K_I$  e  $K_M$  - Os experimentos foram realizados utilizando-se como substratos, dopamina, catecol e DL-dopa e como fonte de enzima, soluções do precipitado ace

tônico. Os testes foram realizados em cubetas contendo diferentes concentrações de substrato e 1 ml de soluções de inibidores em diferentes concentrações para cada teste. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 10  $\mu$ l de solução do precipitado acetônico. Paralelamente, determinou-se o  $K_M$  dos substratos (65), isentos de inibidor, adicionando a mesma quantidade de enzima. Com a fração ativa após cromatografia os testes para determinação de  $K_I$  foram realizados com os mesmos inibidores, utilizando como substrato, catecol 0,1 M nas mesmas condições descritas anteriormente.

### 3.2.22. Análise cromatográfica dos fenólicos

A enzima no estágio purificado foi aplicada em uma folha de papel Watman nº 1 de 20 x 15 cm na quantidade de 0,10 mg. Paralelamente foram aplicadas amostras de albumina de soro bovino e solução de ácido clorogênico nas quantidades de 0,10 e 0,20 mg, respectivamente. A cromatografia foi realizada em uma mistura butanol:ácido acético:água (4:1:2,2) e após 3 horas, o papel foi seco em estufa com temperatura controlada de 110°C por 20 minutos. O cromatograma final foi observado em U.V. no comprimento de onda de 370 nm e os  $R_f$  correspondentes às manchas fluorescentes, foram determinados.

A identificação dos fenólicos foi feita com solução de 1% de

cloreto férrico e 1% de ferricianeto de potássio, segundo método preconizado por Amorim e col (3).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Localização da polifenoloxidase na fruta e melhores condições de extração

Diferentes estágios de maturação da fruta foram utilizados a fim de ser escolhido o melhor estágio como fonte de enzima para os nossos experimentos. Desta forma, foi escolhida a fruta semi-madura onde a casca apresentou indícios de coloração amarela.- A localização da maior atividade enzimática foi estudada neste estágio de maturação. Os resultados apresentados na Fig. 1, mostram que a maior concentração enzimática encontra-se junto à cavidade ovular da fruta. O extrato bruto obtido dessa região, apresentou 960 U/g, enquanto que a polpa produziu uma atividade de 450 U/g, sendo que esta foi de difícil manipulação, em virtude da presença de pigmentos, taninos e mesmo fenóis complexados com proteína (54), o que dificultou a solubilização da enzima.

Vários experimentos foram realizados com o objetivo de se obter maior extração de polifenoloxidase ativa. O Quadro 1 mostra que a melhor extração foi obtida utilizando tampão fosfato 0,2 M, pH 9,0. Contudo, a utilização do mesmo tampão porém 0,2 M, pH 7,0, embora apresentasse menor extratibilidade do que o de pH 9,0, resultou em maior estabilidade da enzima durante a estocagem a 4°C (Fig. 2).

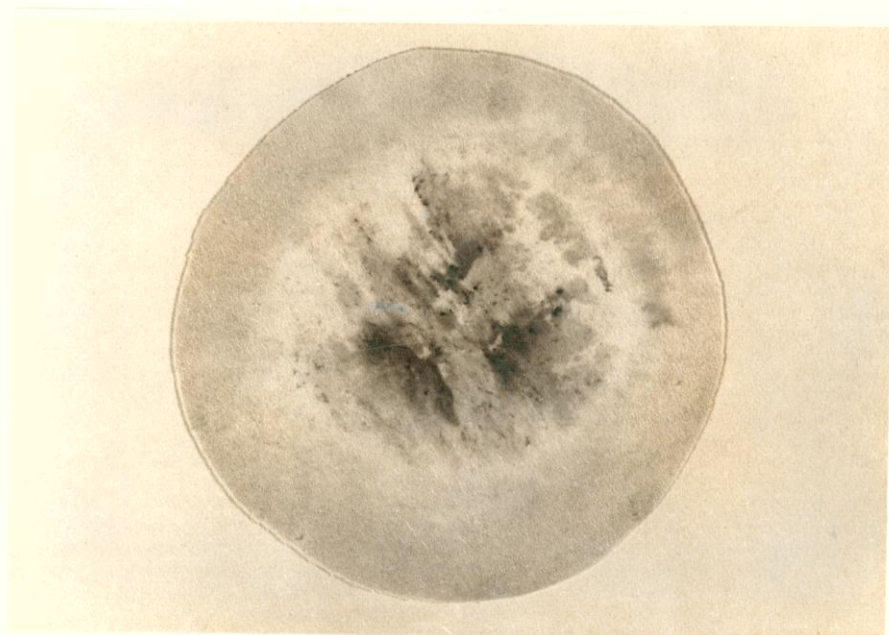


FIGURA 1 - Corte transversal da banana semi-verde, revelada em papel Watman nº 1, imerso em solução de catecol - 0,03 M.

QUADRO 1

Efeito do tipo de solvente e do pH sobre a atividade de polifenoloxidase no extrato de polpa de banana (parte central).

Solução Tamponante	pH	Atividade <sub>1</sub> U/ml.min <sup>-1</sup>
Citrato 0,2 M	6,0	84
Fosfato 0,2 M	7,0	380
Fosfato 0,2 M	8,0	200
Fosfato 0,2 M	9,0	526

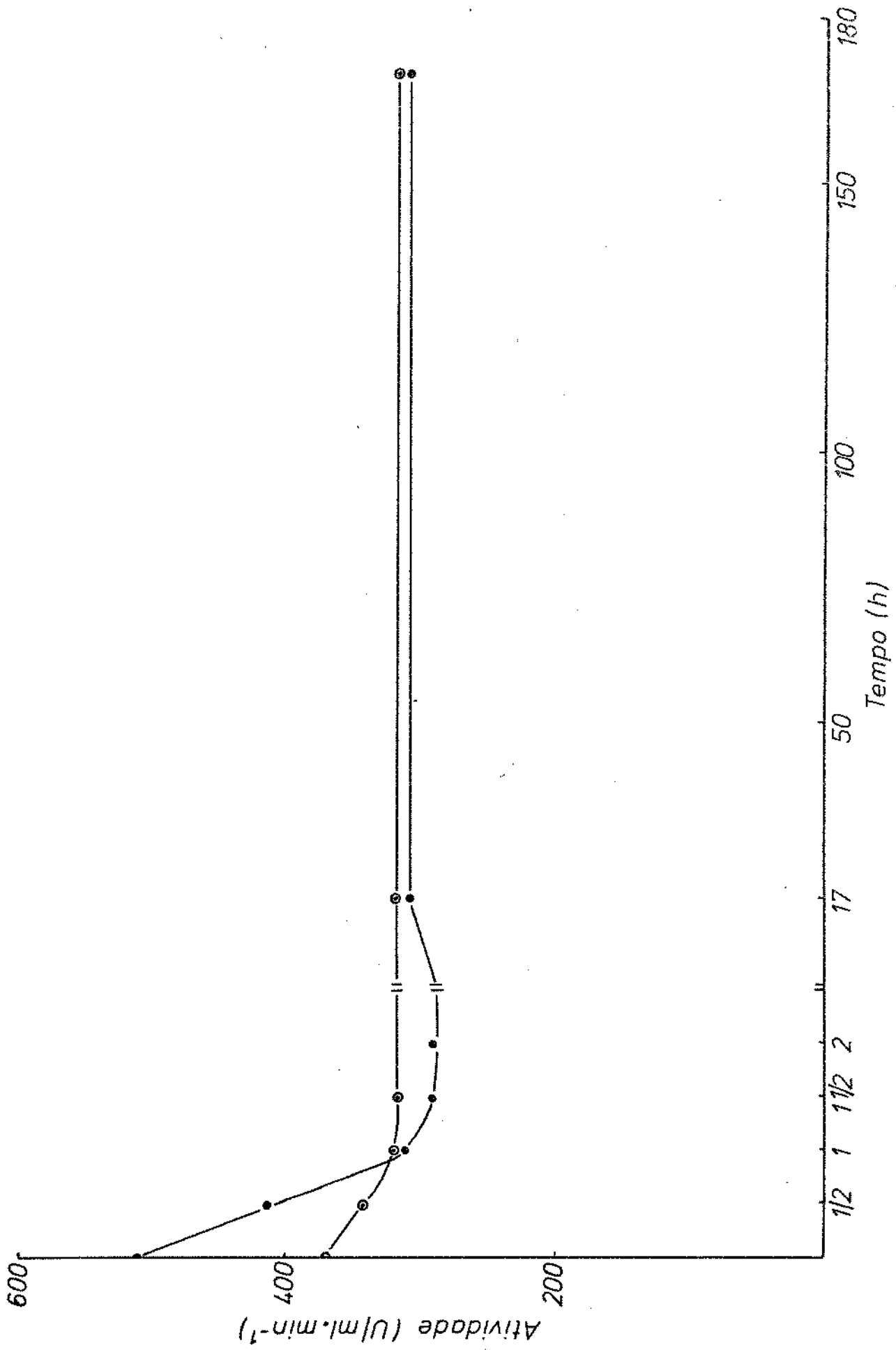


FIGURA 2 - Estabilidade do extrato bruto em soluções de tampão fosfato estocadas a 4°C:  
 pH 7,0 —●—; pH 9,0 —○—

A utilização de PVP insolúvel e de centrifugação adequada, fez-se necessária na extração, a fim de facilitar a precipitação de material insolúvel e contaminantes indesejáveis na preparação. - Os resultados de alguns experimentos realizados encontram-se no Quadro 2, mostrando que 1% de PVP no tampão e força centrífuga - de 12.062 x g, fornecem um extrato mais ativo.

QUADRO 2

Efeito do tratamento com polivinilpirrolidona (PVP) e de diferentes forças centrífugas na obtenção do extrato ativo de polifenol oxidase. Valores expressos em U/ml.min<sup>-1</sup>.

PVP %	Força centrífuga em gravidade		
	3.015xg	12.062xg	27.138xg
0	170	160	240
0,50	160	170	210
1,00	200	330	250
1,50	210	240	200
2,00	230	190	210
2,50	190	230	220
3,00	160	220	290
3,50	170	190	190
4,00	200	170	260
6,00	170	160	210



## 4.2. Fatores que influenciam a atividade da enzima no extrato bruto.

### 4.2.1. Influência das condições de pH e da temperatura de estocagem.

Amostras contendo 1,0 ml de extrato foram conservadas em diferentes temperaturas e utilizadas somente uma vez para determinação da atividade enzimática. Os testes de atividade mostraram que a solução permaneceu estável tanto a 4 como  $-40^{\circ}\text{C}$ , durante, pelo menos, 7 dias. A preferência em se manter o extrato a  $-40^{\circ}\text{C}$  foi em virtude de se evitar a formação de fungos e bactérias criófilas que se desenvolvem com o tempo. Contudo, após 24 horas esse extrato apresentou-se bastante gelatinoso. Portanto, procurou-se utilizar nos experimentos o extrato bruto com tempo inferior a 24 horas.

As variações de pH apresentadas na Fig. 3, sugerem que o melhor ensaio de atividade seria em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,5. Contudo, este provocou ligeira oxidação do substrato o que mascarava a formação do complexo enzimático quando se trabalhava com concentrações baixas de enzima. Este problema foi evitado quando se substituiu o tampão por água destilada, notando-se que o pH final da mistura era 6,8 e não influiu na velocidade da reação.

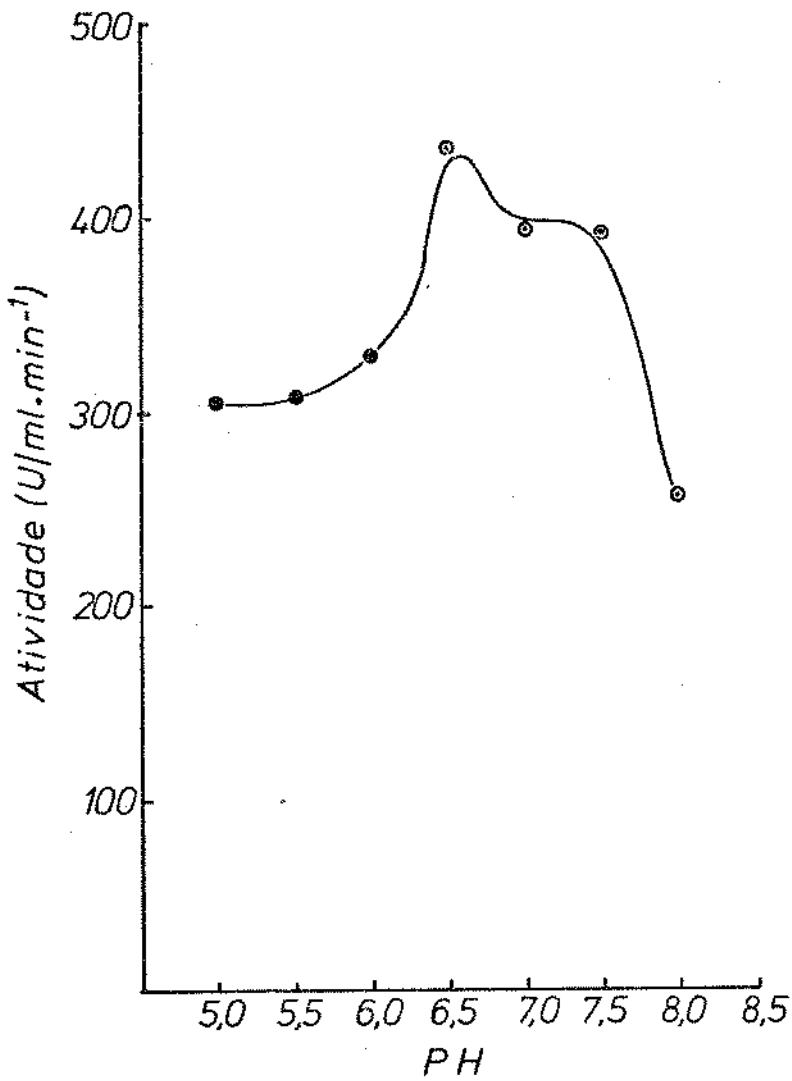


FIGURA 3 - Influência do pH sobre a atividade de polifenoloxidase de um extrato-bruto de polpa central em tampão - fosfato 0,2 M, pH 7,0. Mistura de reação: 2 ml de catecol 0,1 M, - 1 ml de tampão citrato -●-●- ou fosfato 0,02 M -○-○- e 10 µl de extrato enzimático.

#### 4.2.2. Especificidade da polifenoloxidase no extrato bruto.

Os resultados do Quadro 3 mostram que a afinidade da polifenoloxidase é maior para a dopamina. Entretanto, utilizou-se o catecol para a medida da atividade enzimática por ser um reagente de fácil aquisição no mercado e também por ter uma estrutura simples, não apresentando interferência de grupos funcionais ácidos ou básicos na reação enzimática (52).

#### QUADRO 3

Constante de Michaelis ( $K_M$ ) segundo Lineweaver-Burk para diferentes substratos, utilizando o extrato bruto como fonte de enzima.

Substrato	$\frac{-1}{(5)}$	$V_{Max}$ U/ml.min <sup>-1</sup>	$K_M$ (moles/l)
dopamina	1923	162	$5,2 \times 10^{-4}$
DL-dopa	200	56	$5,0 \times 10^{-3}$
L-dopa	76,9	32,4	$1,3 \times 10^{-3}$
catecol	16,6	360	$6,0 \times 10^{-2}$
D-catequina	120,4	21,0	$8,3 \times 10^{-3}$
D-dopa	32,2	43,2	$3,1 \times 10^{-3}$

#### 4.2.3. Influência do meio de extração e da diálise na atividade da enzima.

A estabilidade da enzima e a atividade enzimática foram compara

das em diversos meios de diálise. Pode-se concluir que somente a diálise realizada contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 manteve o extrato bruto ativo por 24 horas. Pelos dados do Quadro 4 podemos verificar que o sistema onde houve menor perda da atividade enzimática foi o extrato bruto tamponado e dialisado - contra o mesmo tampão.

#### QUADRO 4

Efeito de diferentes meios dialisantes sobre a atividade do extrato bruto após diálise a 4°C.

Extrato	Meio dialisante	Tempo hs	Atividade U/ml	Variação atividade (%)
tamponado	-	0	288	0
aquoso	-	0	72	0
aquoso	água	24	54	-40
tamponado	água	24	144	-70
aquoso	tampão	24	198	+120
tamponado	tampão	24	360	-30
tamponado (*)	-	24	504	0
aquoso (*)	-	24	90	0

(\*) As comparações das variações da atividade foram feitas com os extratos aquoso e tamponado deixados a 4°C durante o tempo de diálise.

### 4.3. Estágios de purificação da polifenoloxidase.

#### 4.3.1. Precipitação fracionada em solventes iônicos e não iônicos

Frações de 20 ml de extrato bruto foram precipitadas com adição lenta de sulfato de amônio a 4°C até atingir a saturação de 40, 70 e 90%. O Quadro 5 mostra os resultados desse fracionamento. Os dados obtidos revelaram baixa recuperação do material precipitado que se apresentou de difícil solubilização.

#### Quadro 5

Recuperação da atividade enzimática da polifenoloxidase em frações precipitadas do extrato bruto com diferentes saturações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

F r a ç õ e s	Unidades Totais	Recuperação %
extrato bruto a pH 7,0	18.000	-
40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.740	31,8
70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.850	15,8
90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.350	13,0

Os resultados apresentados no Quadro 6 foram obtidos no tratamento do extrato bruto com 1,5 volumes de acetona (1ª precipita

ção), completando-se a 2 volumes (2<sup>a</sup> precipitação) à temperatura de -13°C. Os precipitados foram re-dissolvidos em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0. A concentração protéica foi determinada pelo método de Weichsenbaum (133), uma vez que os demais métodos de determinação protéica apresentaram vários inconvenientes. Por outro lado, o método do biureto, quando comparado com o Kjeldahl, apresentava concentrações ligeiramente inferiores que foram corrigidas multiplicando-se pelo fator 1,1. A recuperação da enzima foi de 60%, mas o material precipitado apresentou-se ainda bastante insolúvel.

#### QUADRO 6

Precipitação fracionada da polifenoloxidase do extrato bruto com 1,5 e 2 volumes de acetona a -13°C.

Estágios de purificação	Vol (ml)	Atividade (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg prot)	% recuperação	grau de purificação
Extrato bruto	48,0	340	17,9	18,9	-	-
1 <sup>a</sup> pptção	18,0	450	22,6	19,9	49,7	1,05
2 <sup>a</sup> pptção	2,7	650	14,6	44,5	10,7	2,35

A fim de melhorar a solubilidade, os precipitados foram combinados, procedendo-se a re-extração dos mesmos com solução tamporada contendo 0,25% de Triton X-100. Após centrifugação a 12.062 x g por 15 min a 4°C, determinou-se a atividade enzimática no sobrenadante, sendo este a seguir estocado em congelador a -40°C. Os dados do Quadro 7 evidenciam boa recuperação da atividade enzimática.

#### QUADRO 7

Efeito do tratamento do precipitado com Triton X-100 (0,25%) na recuperação da atividade enzimática.

Estágios de purificação	Vol (ml)	Atividade (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg prot)	% recuperação	grau de purificação
Extrato bruto	47,0	280	18,1	15,4	-	-
1. <sup>a</sup> pptção	14,0	650	23,3	27,8	69,6	1,8
2. <sup>a</sup> pptção	10,0	400	8,5	47,0	30,3	3,05
sobrenadante após extr. c/ Triton X-100	22,5	700	9,3	75,2	119,7	4,88

#### 4.3.2. Filtração em coluna de gel de Sephadex G-100

1.<sup>a</sup> Cromatografia - A polifenoloxidase obtida pela precipitação em acetona foi adicionada em coluna de Sephadex G-100 e eluída em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. O fluxo da coluna foi de 5 ml/35 min. A enzima recuperada nestas condições apresentou-se em três frações, sendo que a fração  $F_1$  correspondeu a maior atividade enzimática. A Fig. 4 contém os resultados obtidos nessa separação.

2.<sup>a</sup> Cromatografia - Devido à baixa recuperação e má separação apresentada na 1.<sup>a</sup> cromatografia, procedeu-se à eluição do precipitado acetônico re-extraído em Triton X-100. As condições foram as mesmas utilizadas anteriormente. A Fig. 5 e o Quadro 8 mostram a recuperação da enzima em três frações, sendo que a fração  $F_2$  correspondeu 63% da atividade enzimática total. Pode-se também verificar que essa fração apresentou razoável grau de purificação.

3.<sup>a</sup> Cromatografia - Apesar da melhor resolução apresentada com a polifenoloxidase re-extraída em Triton X-100, a fração de maior atividade correspondeu um eluato colorido, mostrando a presença de pigmentos como contaminantes. Para resolver este problema, procurou-se eluir a enzima em coluna de Sephadex G-100 com um fluxo de 1,5 ml/35 min. A amostra foi introduzida na coluna imediatamente após a precipitação acetônica. A Fig. 6 sugere que não se obteve uma separação completa da



fração protéica contendo atividade enzimática.

QUADRO 8

Fases da purificação de polifenoloxidase incluindo a eluição do precipitado acetônico em coluna de Sephadex G-100, equilibrada com tampão fosfato 0,01 M.

Estágios de purificação	Vol (ml)	Atividade (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg pro)	% recuperação	grau de purificação
Extrato bruto	47,0	280	18,1	15,4	-	0,0
Ppt. acet.	12,2	970	28,2	34,3	97	2,2
Sobren. após Triton X-100	22,5	700	9,3	75,2	119,7	4,7
F <sub>2</sub>	35,0	240	0,63	380,9	63,7	24,7
F <sub>3</sub>	13,0	230	2,26	101,7	23	6,6

4<sup>a</sup> Cromatografia - O problema foi contornado após estocar o precipitado acetônico, dissolvido em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 a -40°C por 7 dias. A amostra após esse período foi descongelada e centrifugada a 12.062 x g por 15 minutos. O sobrenadante contendo maior atividade que o precipitado, foi introduzido na coluna e eluído com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 com um fluxo de 1,5 ml/35 min. Os resultados desse experimento, Fig. 7 e Quadro 9, mostram que a fração FE, contém -

maior atividade. O material era mais incolor que as frações anteriores e com razoável atividade específica. Os eluatos correspondentes à fração FE foram recolhidos e estocados a  $-40^{\circ}\text{C}$  para estudos de purificação posteriores.

#### QUADRO 9

Purificação da plifenoloxidase utilizando tratamento do precipitado acetônico a  $-40^{\circ}\text{C}$ . - (S) fração solúvel: (I) fração insolúvel.

Estágios de purificação	Proteína (mg/ml )	Atividade (U/ml.min <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U/mg prot)	grau de purificação
Extrato bruto	15,8	108	6,8	-
Precipitado acetônico (P)	9,7	360	37,10	5,4
Fração solúvel (S)	2,64	180	68,18	10
Fração insolúvel (I)	1,2	8,0	6,66	0,9

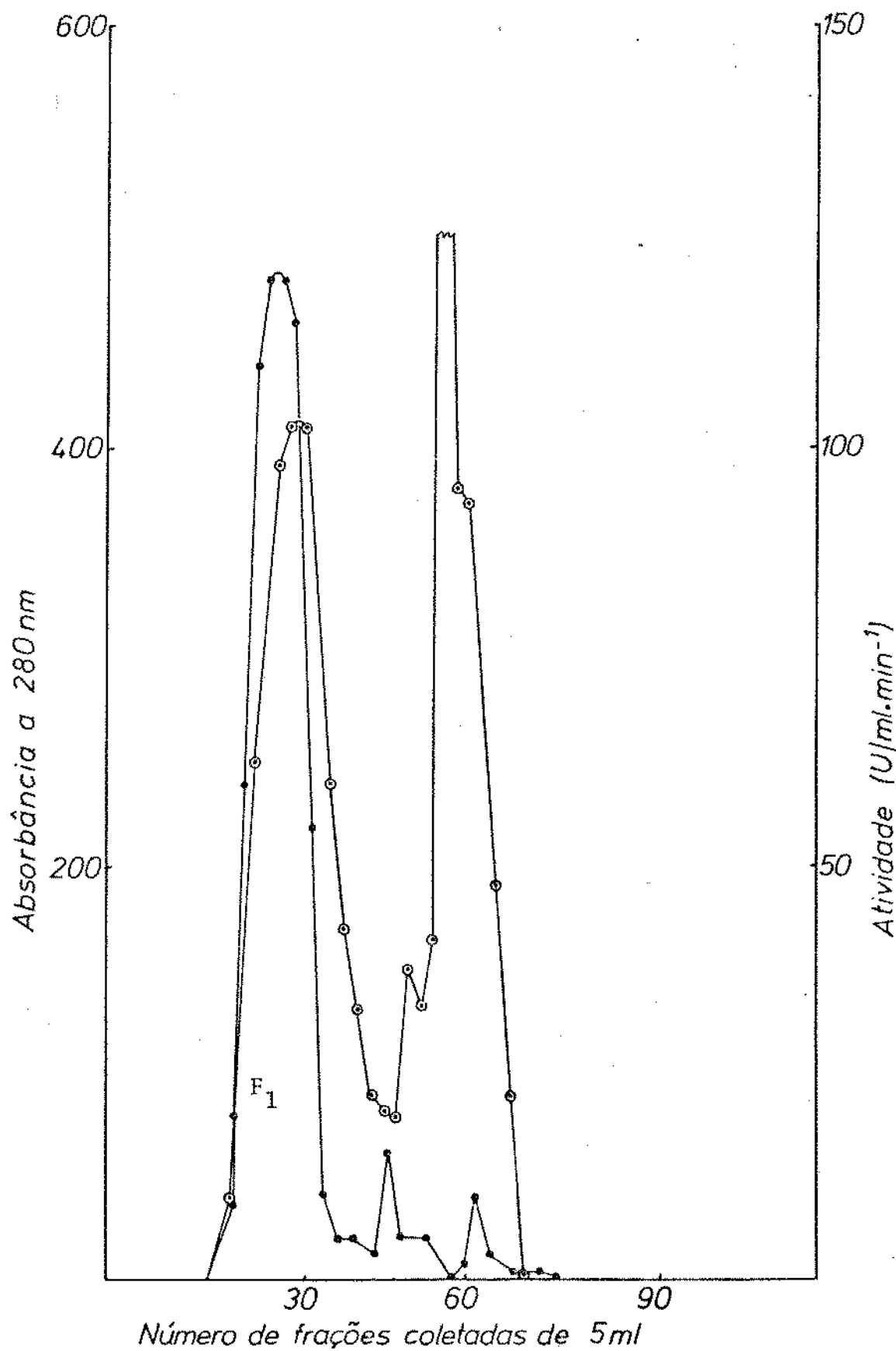


FIGURA 4 - Filtração em Sephadex G-100 do ppt.acetônico eluído com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0; proteína o-o; atividade enzimática -.-.

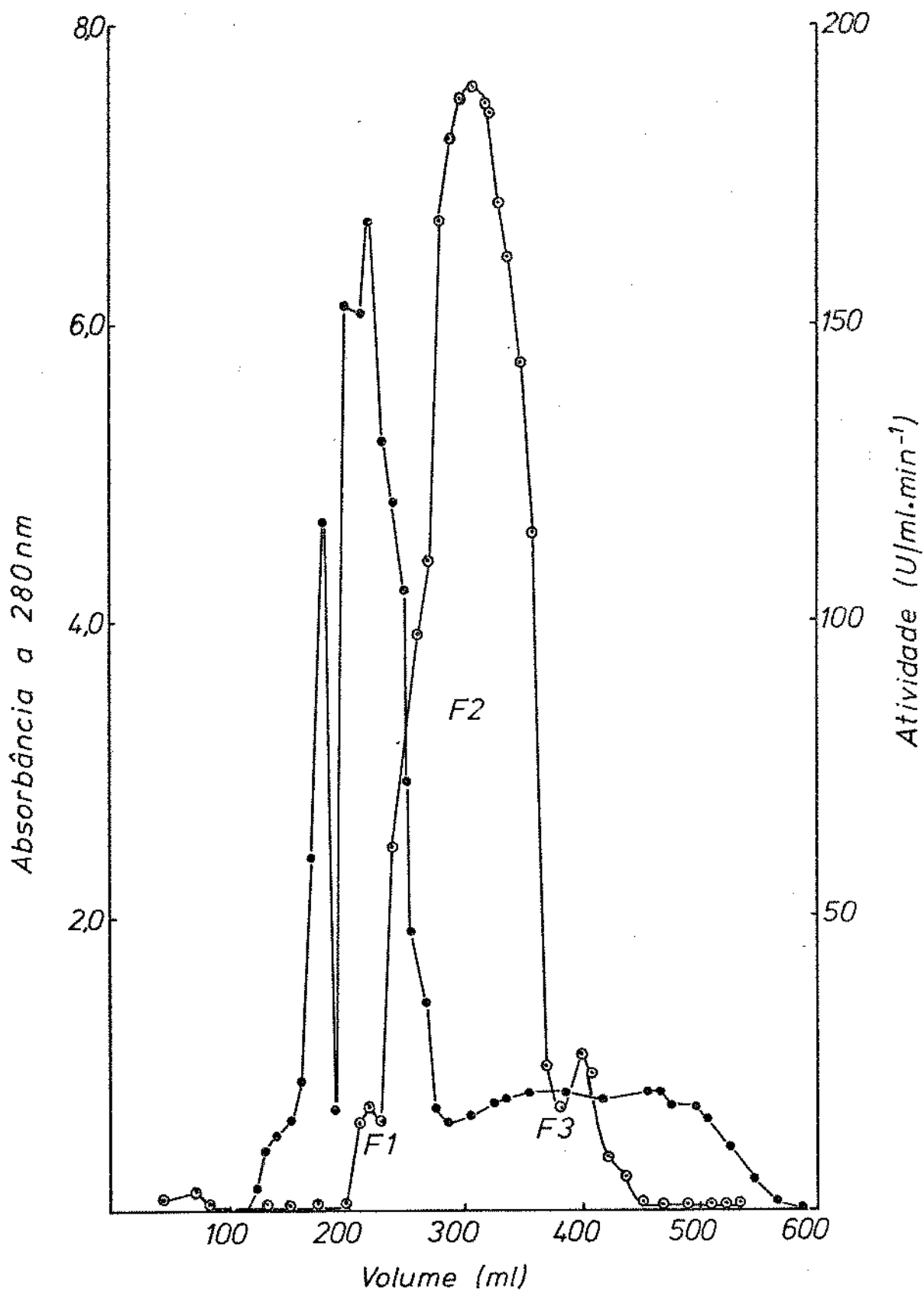


FIGURA 5 - Filtração em Sephadex G-100 do precipitado acetônico re-extraído com tampão fosfato - 0,2 M, pH 7,0, contendo 0,25% de Triton X-100: proteína ●—● ; atividade enzimática ○—○ .

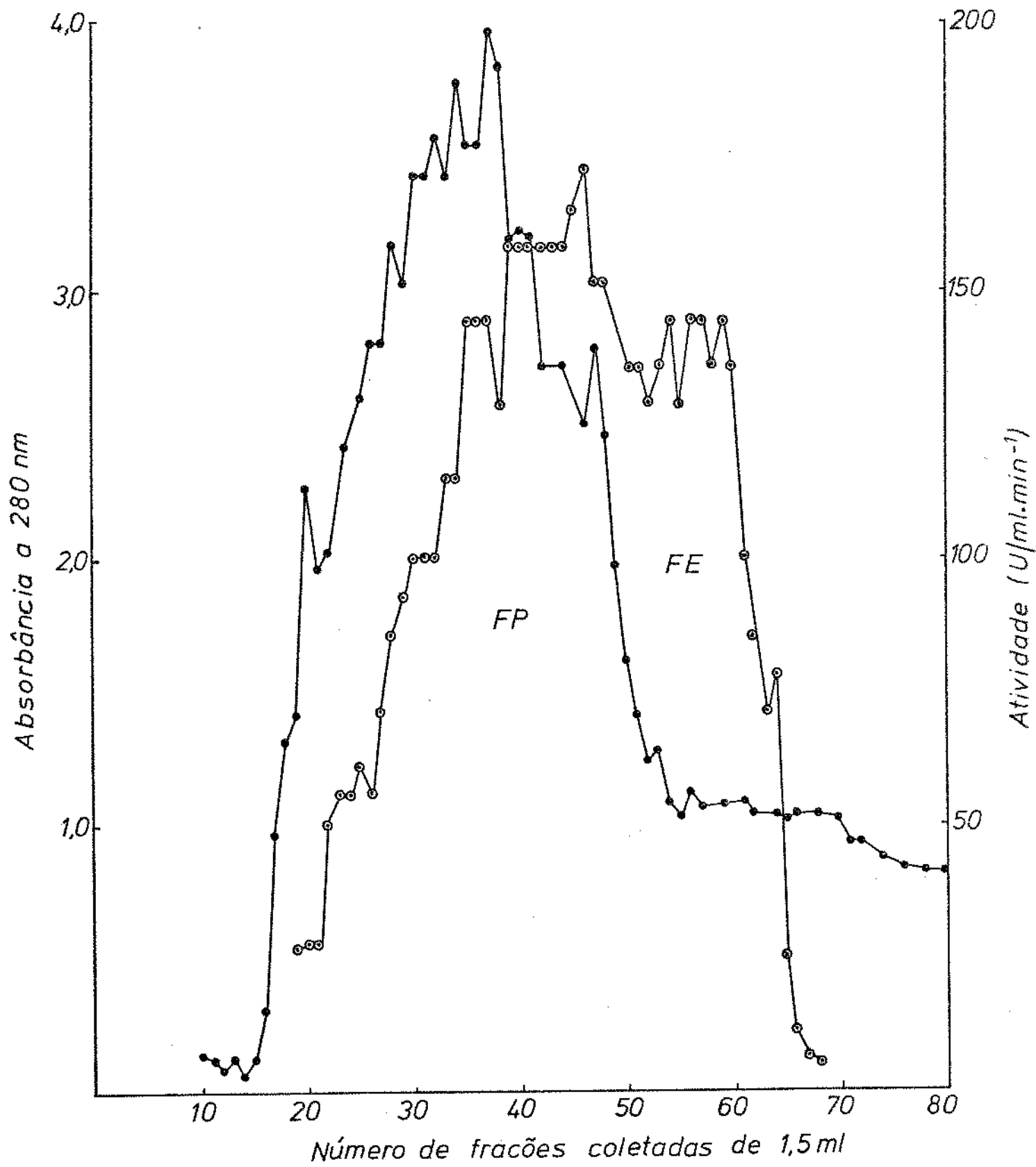
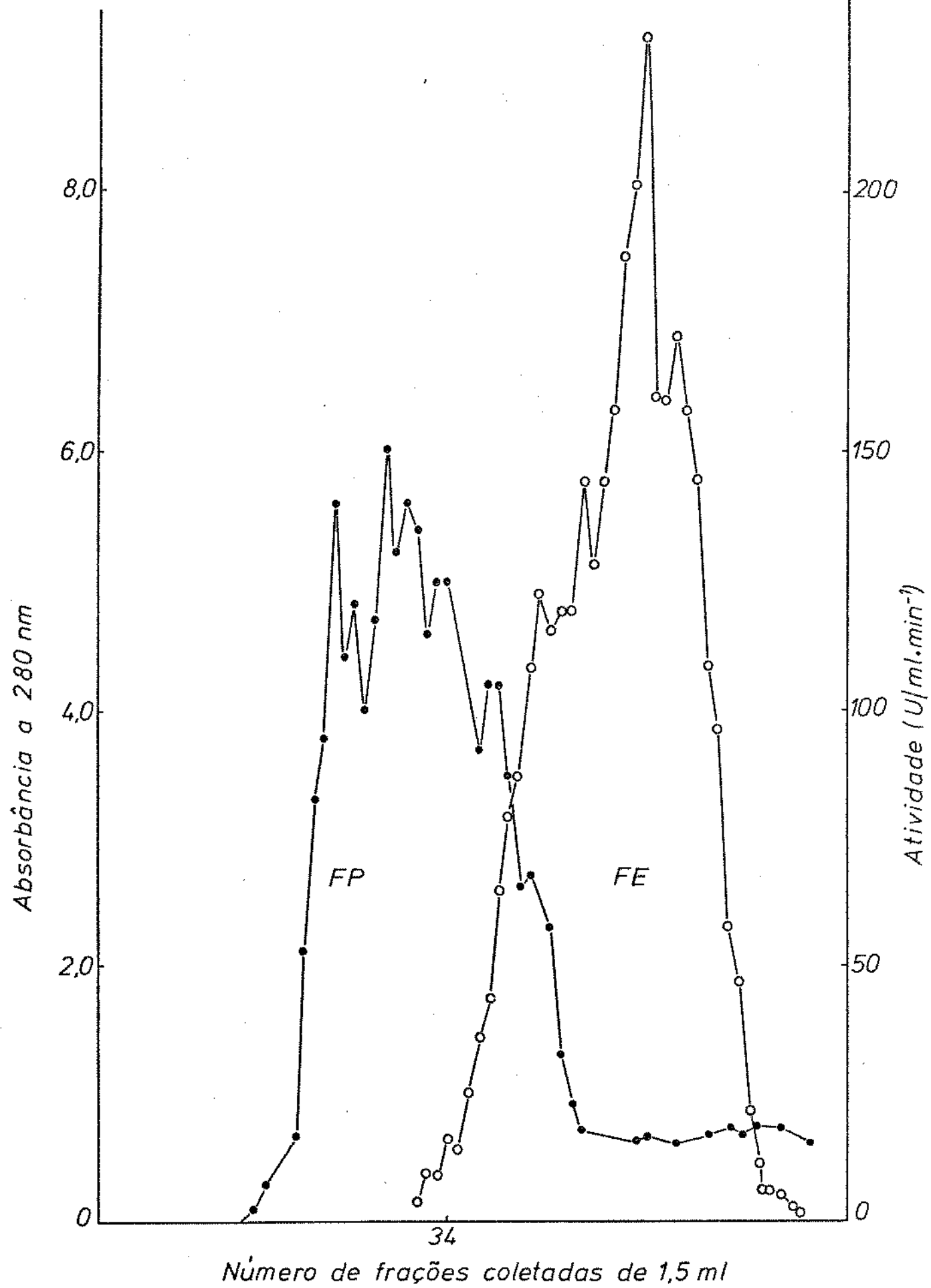


FIGURA 6 - Filtração em gel de Sephadex G-100 do precipitado acetonico re-extraído com tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 - contendo 0,25% de Triton X-100: proteína ●—● ; atividade enzimática ○—○—○ .

FIGURA 7 - Filtração em gel de Sephadex G-100 do precipitado a-  
cetônico re-extraído com tampão fosfato 0,2 M, pH  
7,0 contendo 0,25% de Triton X-100 e mantido por 7  
dias a -40°C. Proteína .-.; atividade enzimática -  
o-o.



#### 4.3.3. Purificação da fração FE por eletroforese em gel simples de poliacrilamida

Eletroforeses em gel de poliacrilamida foram efetuadas como descrito em material e métodos. Um dos géis foi corado para identificação da reação enzimática e os demais foram cortados na região correspondente à maior atividade, em porções extremamente finas. As porções foram extraídas com água destilada por 24 horas, filtradas e, a seguir, dialisadas em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0. A polifenoloxidase obtida, foi então liofilizada e estocada a  $-40^{\circ}\text{C}$ . No Quadro 10 os resultados obtidos mostram que a atividade específica nessa fração foi alta, correspondendo a um grau de purificação da ordem de  $39$  vezes.



QUADRO 10

Purificação da polifenoloxidase do precipitado acetônico mantido a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 7 dias (P); fração enzimática após eluição em coluna de Sephadex G-100 (FE); fração correspondente à polifenoloxidase obtida da eletroforese em gel de poliacrilamida (FG)

Estágios de purificação	Vol. (ml)	Ativid. U/ml.min <sup>-1</sup>	Unidades Totais	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg prot)	Recuperação %	Grau de purificação
Extrato Bruto	46,9	86,4	4.060	10,5	8,2	-	-
Precipitado acetônico (P)	21,0	504,0	10.584	6,8	74,1	260,6	9,0
Fração enzimática (FE)	6,0	936,0	5.616	6,4	146,2	138,3	17,8
Fração eluída do gel (FG)	4,0	283,1	1.132,4	0,89	318,0	27,9	38,8

#### 4.4. Estudo de alguns parâmetros físico-químicos da polifenol-oxidase em diferentes estágios de purificação.

##### 4.4.1. Estabilidade do precipitado acetônico em função do pH e da temperatura de estocagem.

O pH das soluções do precipitado acetônico foi cuidadosamente ajustado com solução 1 M de NaOH ou de HCl. A atividade enzimática foi determinada após diferentes tempos de incubação. A Fig. 8 mostra que a faixa de maior estabilidade da enzima foi encontrada em torno de pH neutro e ligeiramente alcalino. As alterações encontradas em pHs ácidos talvez sejam devidas à ação de detergentes, uma vez que se usou Triton X-100 para a extração, o que poderia alterar a estrutura da proteína (116).

As amostras do precipitado acetônico ajustadas em pH 7,0 foram mantidas nas temperaturas de 4 e -40°C. Os resultados da Fig.9 mostraram a estabilidade da enzima por período superior a 7 dias, sendo que o material mantido congelado apresentou um aumento de atividade em relação à inicial.

##### 4.4.2. Efeito do Triton X-100 durante a estocagem do precipitado acetônico a -40°C.

Amostras de extrato bruto tratadas e não tratadas com Triton X-100 foram testadas comparativamente. Os precipitados acetônicos obtidos em diferentes preparações e armazenados a -40°C foram centrifugados a 12.062 x g por 15 min a 4°C e a atividade enzi-

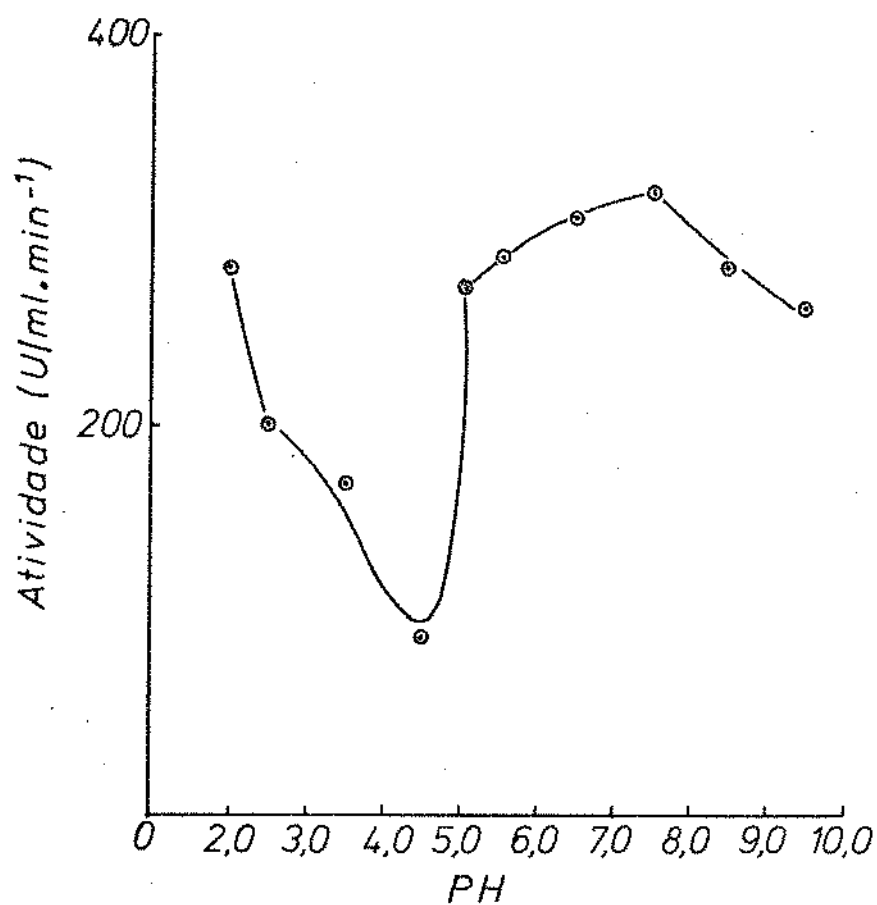


FIGURA 8 - Precipitado acetônico re-suspensão em tampão fosfato 0,2 M, pH - 7,0 e ajustado a diferentes pHs, com NaOH ou HCl. Tempo de incubação: 1:30 h.

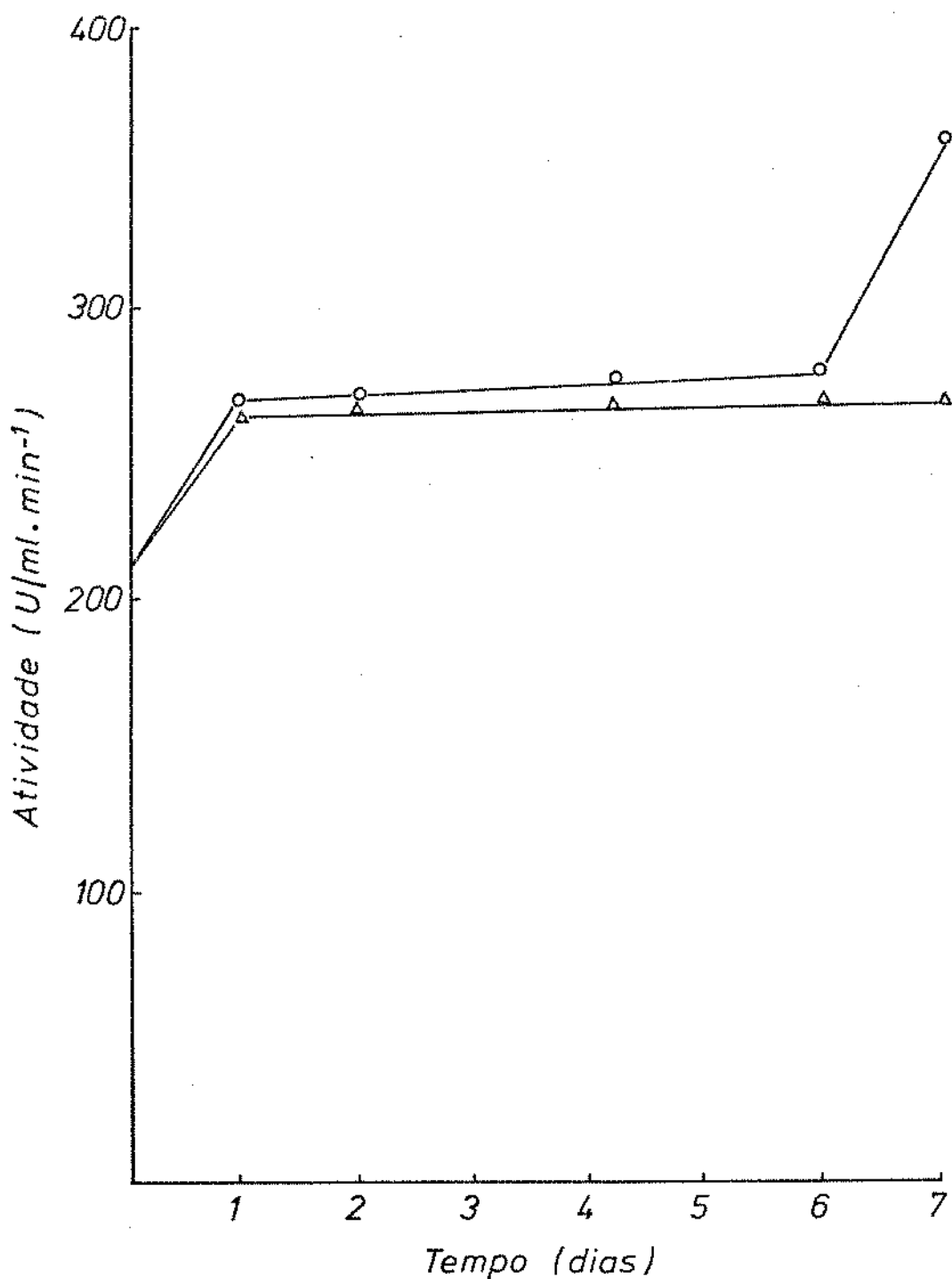


FIGURA 9 - Efeito da estocagem do precipitado acetônico em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0: estocagem a 4°C Δ—Δ , estocagem a -40°C o—o .

mática testada no sobrenadante. Pelos dados do Quadro 11 podemos verificar que o tratamento do precipitado acetônico com Triton X-100 não apresentou grande efeito inicial. Este só ocorreu quando o precipitado acetônico foi mantido a  $-40^{\circ}\text{C}$ , sendo que a diferença da extratibilidade inicial da enzima tratada com Triton X-100 era de 16,7% maior que a não tratada e após estocagem de nove dias passou a 40%. Também pode-se verificar pelos dados que a maior concentração enzimática foi obtida no sobrenadante.

#### QUADRO 11

Efeito do Triton X-100 sobre a atividade da enzima no material estocado a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Material	tempo dias	temp. $^{\circ}\text{C}$	atividade c/Triton X-100 (U/ml.min <sup>-1</sup> )	atividade s/Triton X-100 (U/ml.min <sup>-1</sup> )
ppt. acetônico	0	25	1.080	900
ppt. acetônico	9	-40	6.400	4.300
sobrenadante após centrifugação	9	-40	5.400	3.240

#### 4.4.3. Efeito da diálise com água e tampão fosfato sobre a atividade da polifenoloxidase no precipitado acetônico.

Alíquotas do precipitado acetônico obtido do extrato tamponado, foram dialisadas por 24 horas a 4°C contra água destilada e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, respectivamente. O controle permaneceu pelo mesmo período a 4°C. Após esse tempo, a atividade enzimática foi determinada nos dialisados e no controle. Os resultados obtidos mostraram perda significativa da atividade da enzima na diálise realizada em água destilada. Pode-se concluir portanto, que o melhor meio de manutenção da atividade da polifenoloxidase foi em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, havendo perda de 50% quando a enzima foi dialisada contra água destilada.

#### 4.4.4. Especificidade da polifenoloxidase a diferentes substratos.

A especificidade da polifenoloxidase a diferentes substratos - foi estudada em diferentes estágios de purificação e os  $K_M$  para os substratos foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk (65).

Os resultados das Fig. 10 e 17 e do Quadro 12 mostram uma maior especificidade para dopamina, noradrenalina e adrenalina, enquanto que para os substratos catecol e DL-dopa, observou-se praticamente a mesma especificidade.

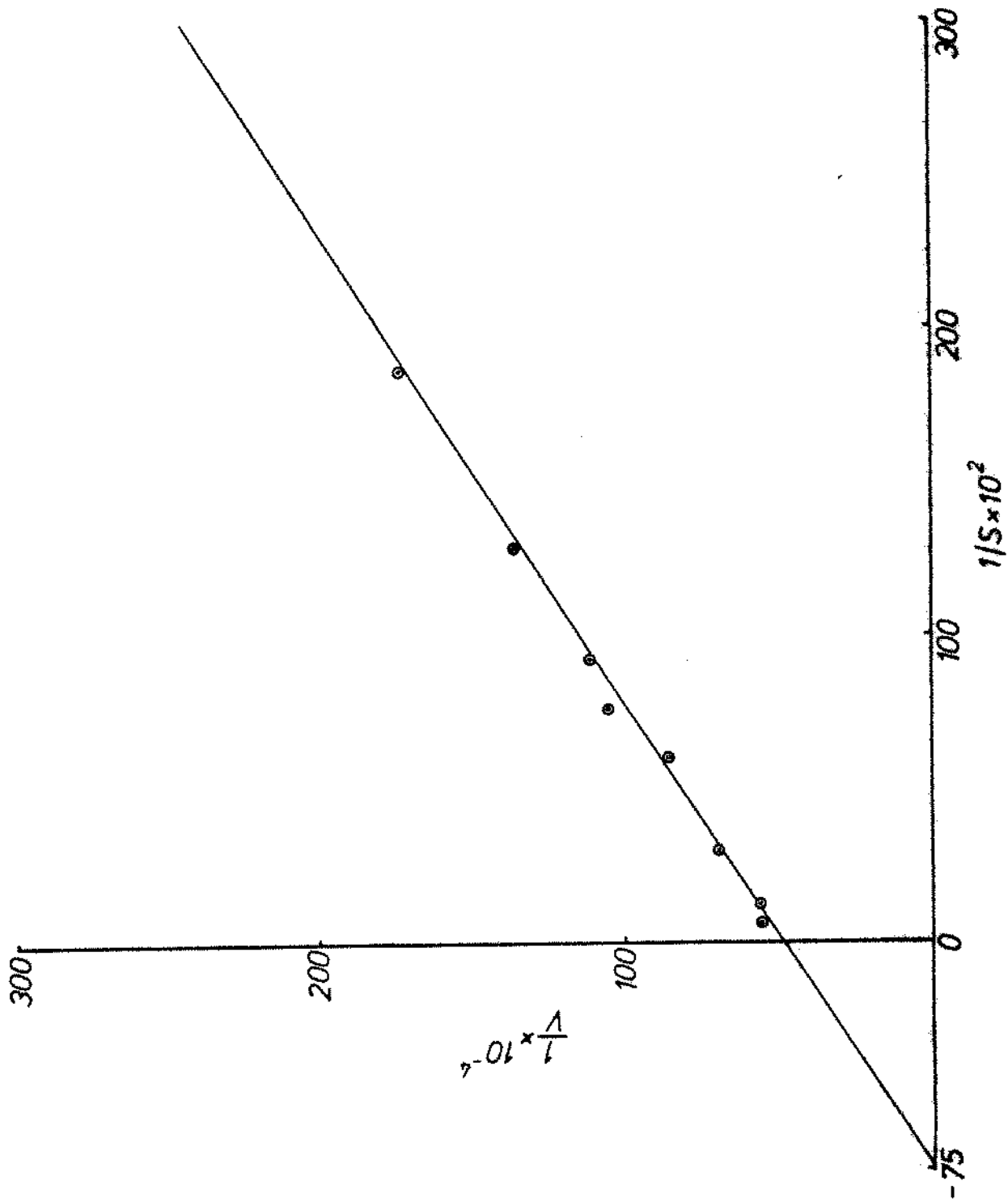


FIGURA 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do  $K_M$  para a fração FG. A cubeta ensaio continha 2,5 ml de solução PH 6,0 de dopamina na concentração inicial de 0,16 mM, 0,5 ml de água e 10 l de solução de enzima.

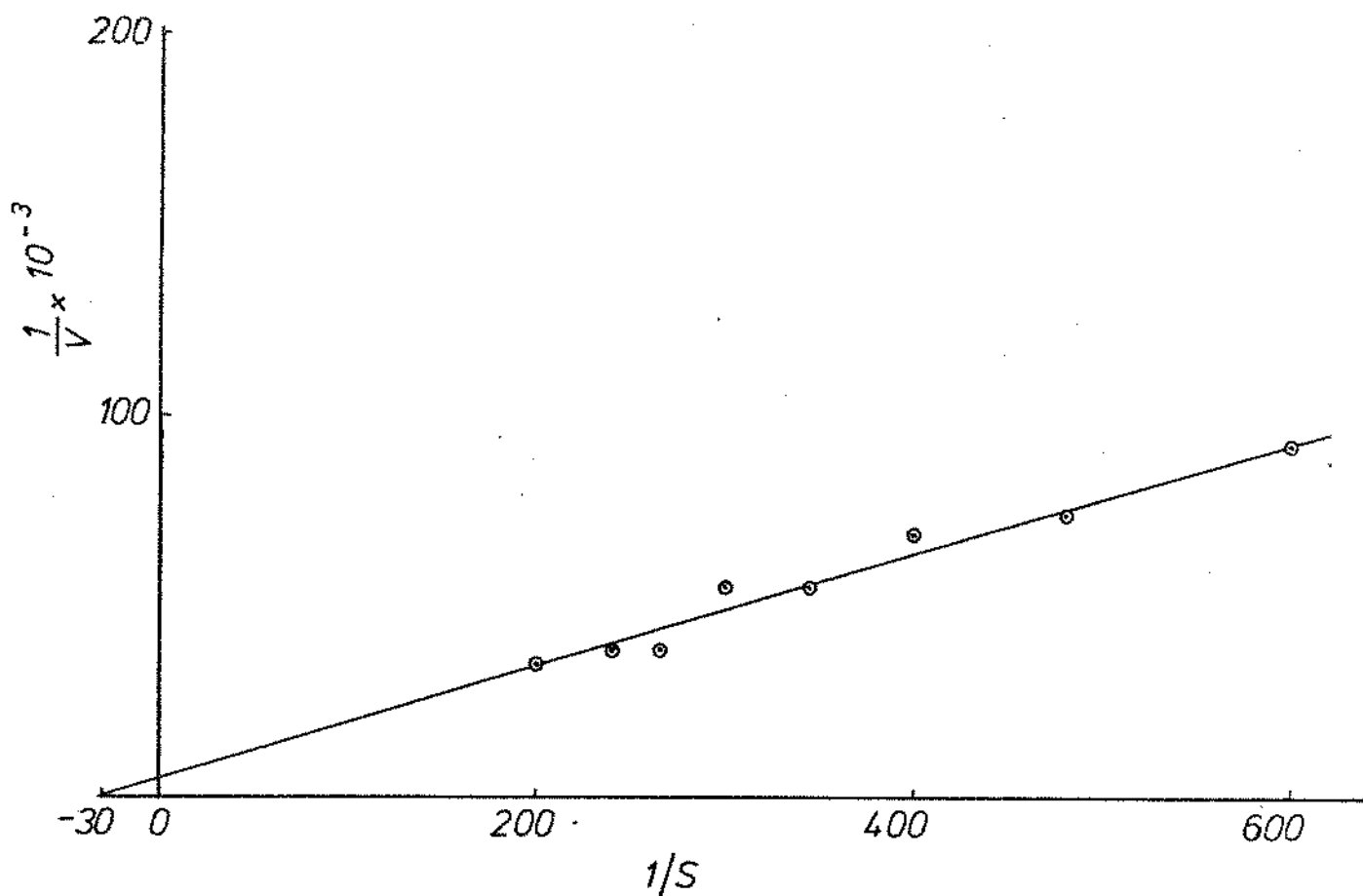


FIGURA 11 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do  $K_M$  para a fração FG. A cubeta de ensaio continha 2,5-ml de solução pH 6,0 de DL-dopa na concentração inicial de 5,0 mM, 0,5 ml de  $H_2O$  e 10  $\mu$ l de solução de enzima.



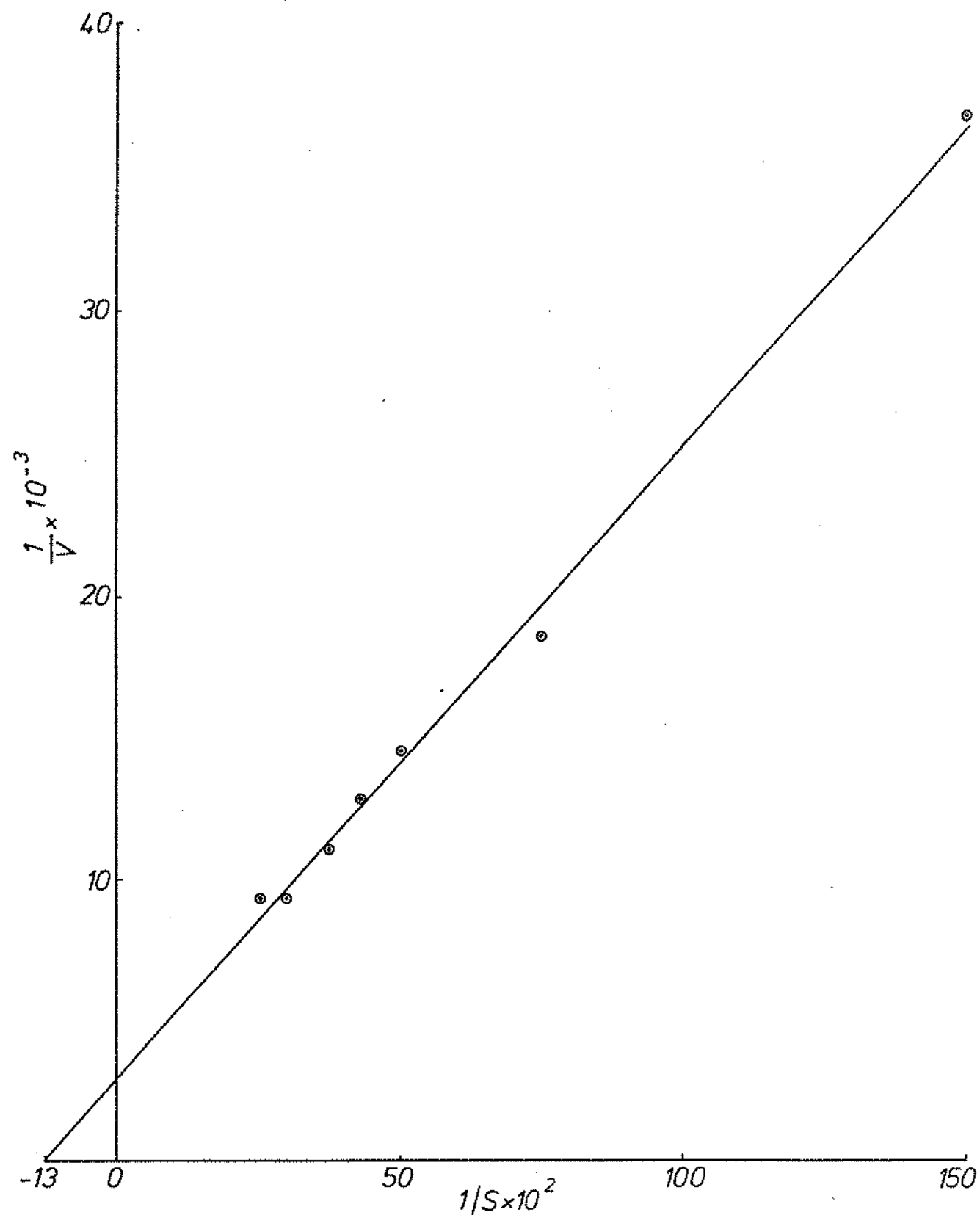


FIGURA 12 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação de  $K_M$  para a fração FG. A cubeta ensaio continha - 2,5 ml de solução pH 6,0 de epinefrina na concentração inicial de 0,4 mM, 0,5 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

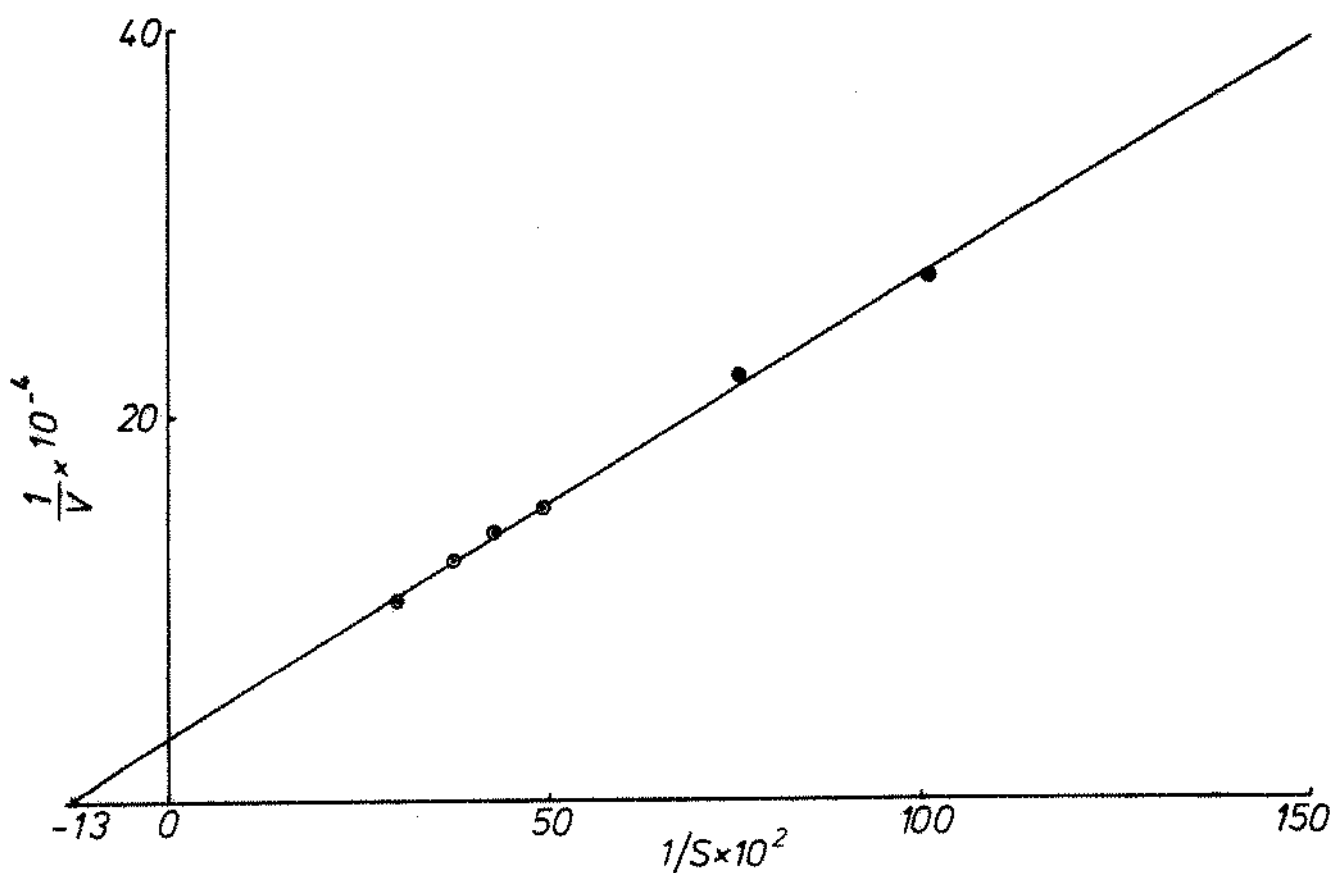


FIGURA 13 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação do  $K_M$  da fração FG. A cubeta de ensaio continha 2,5 ml de solução pH 6,0 de norepinefrina na concentração inicial 0,4 mM e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

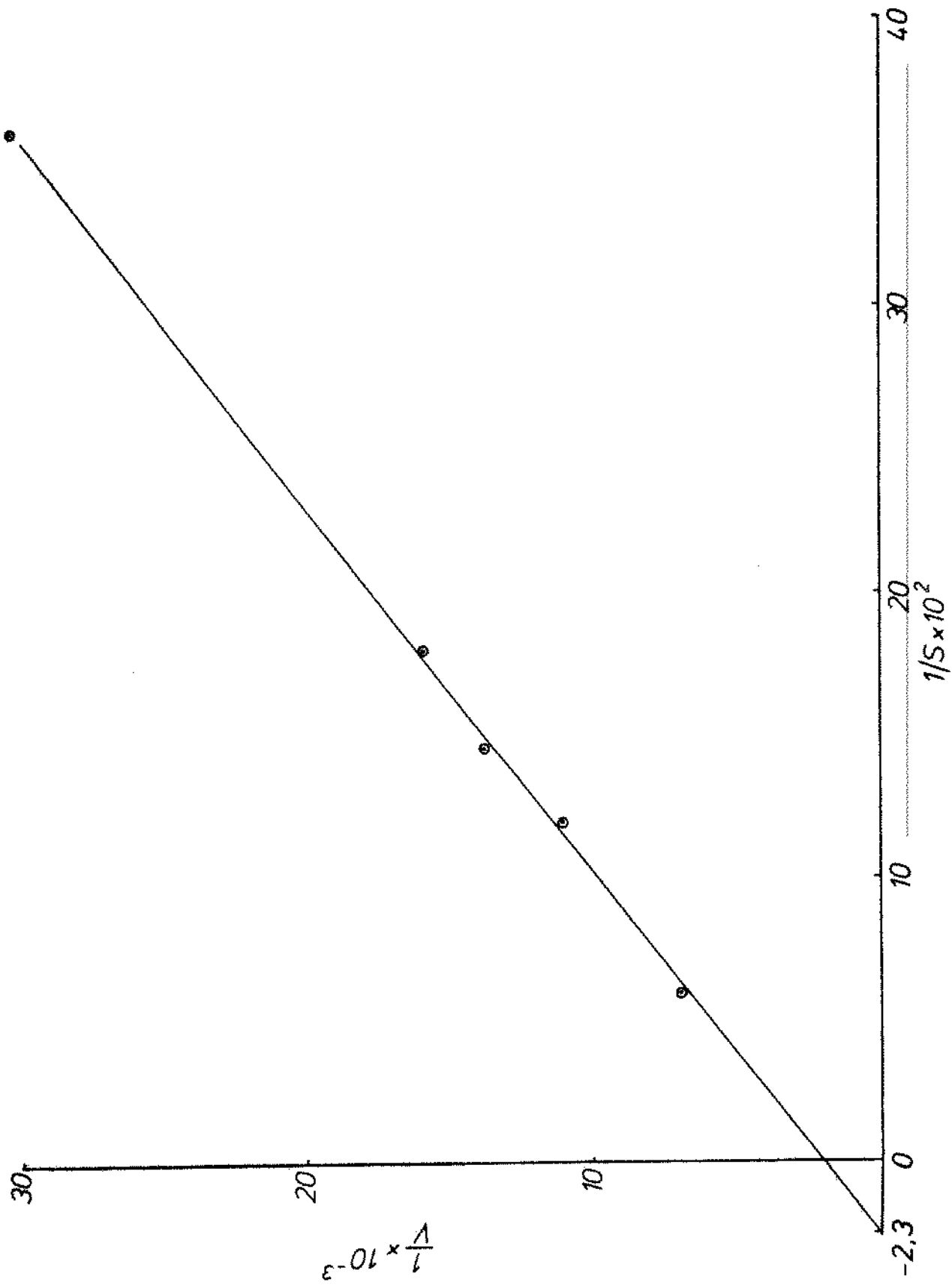


FIGURA 14 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do  $K_M$  da fração FG. A cubeta ensaio continha 2,5 ml de solução de ácido clorogênico na concentração inicial 5 mM, 0,5 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

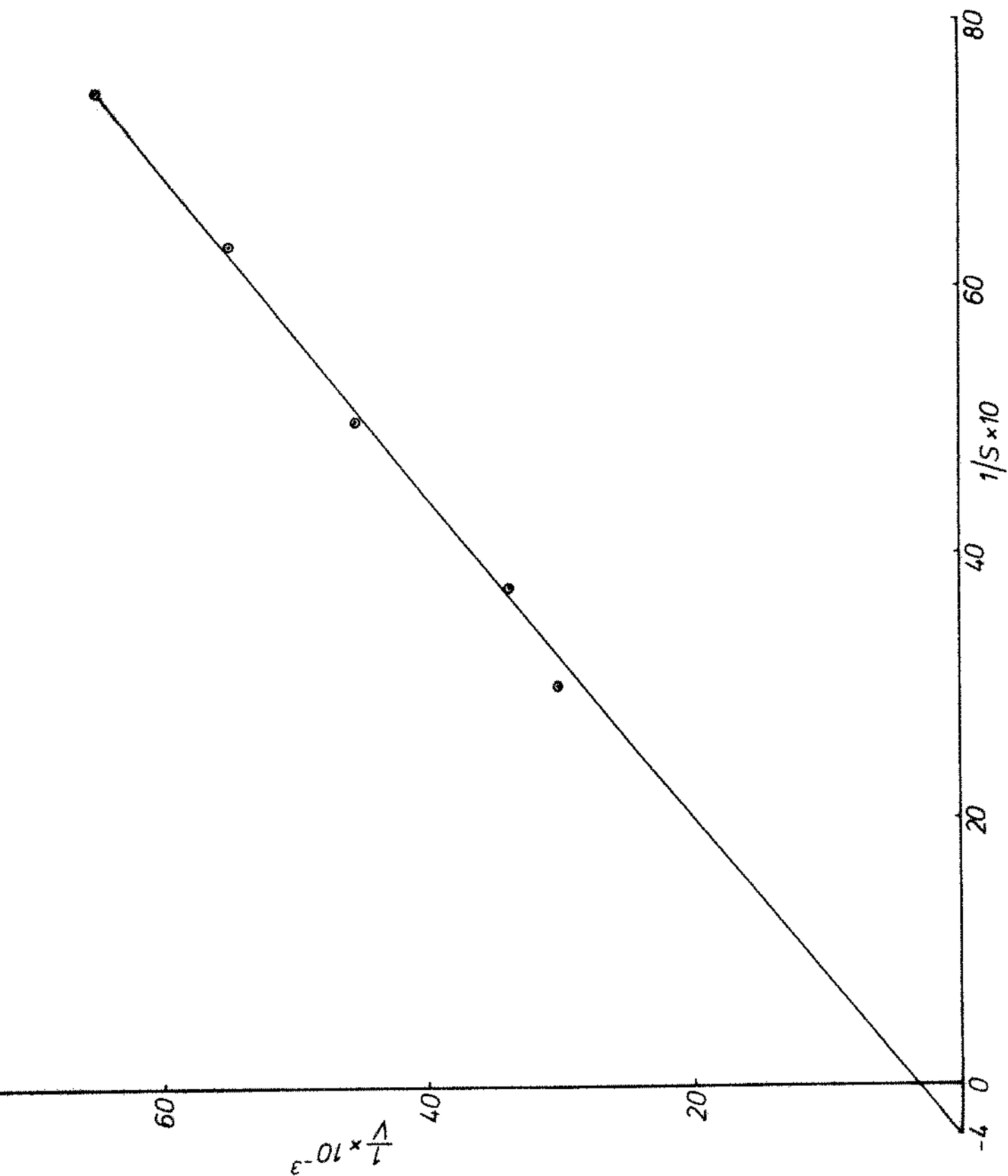


FIGURA 15 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do  $K_M$  da fração FG. A cubeta ensaio continha 2,5 ml da solução pH 6,0 de D-dopa na concentração inicial 4 mM, 0,5 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

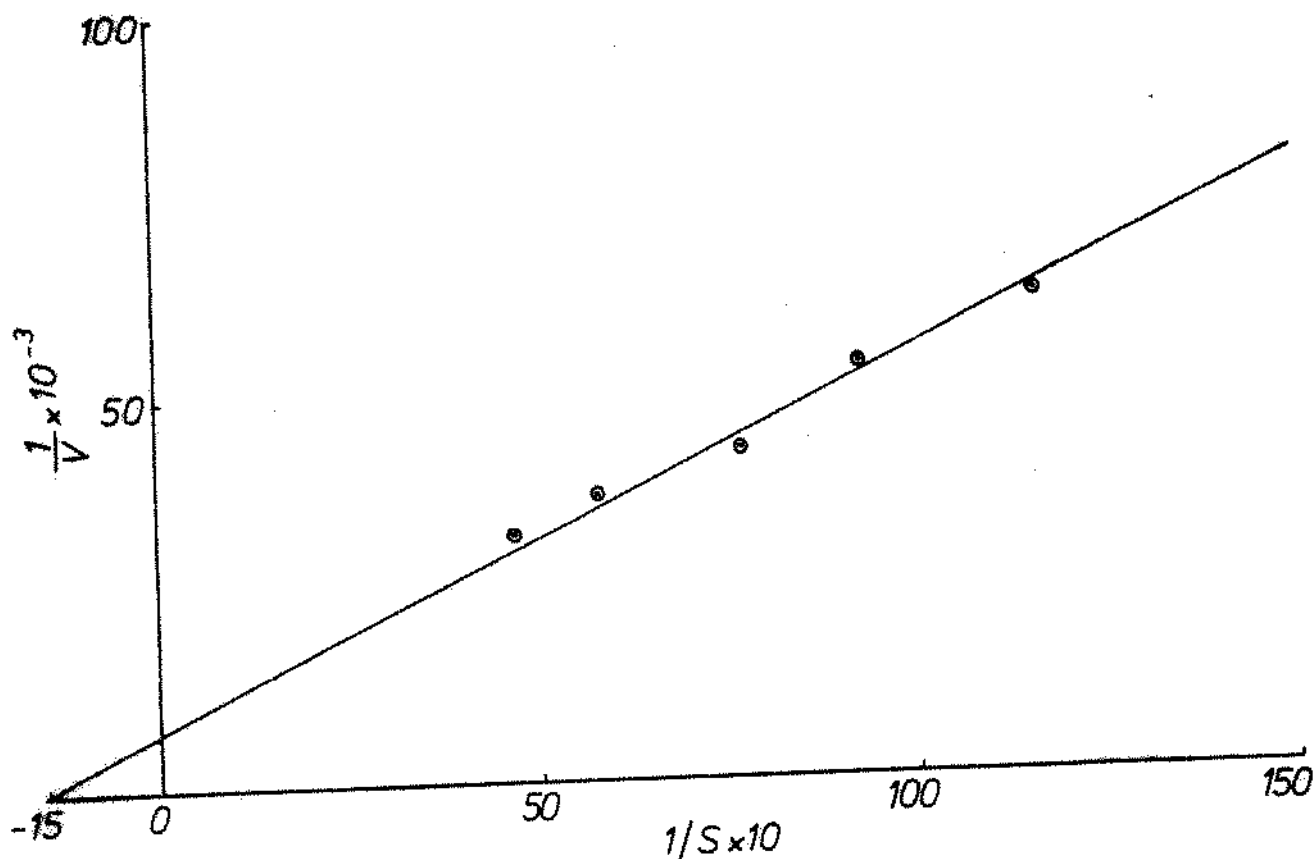


FIGURA 16 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação do  $K_M$  da fração FG. A cubeta ensaio continha 2,5 ml de solução pH 6,0 de L-dopa na concentração inicial 2,6 mM, 0,5 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

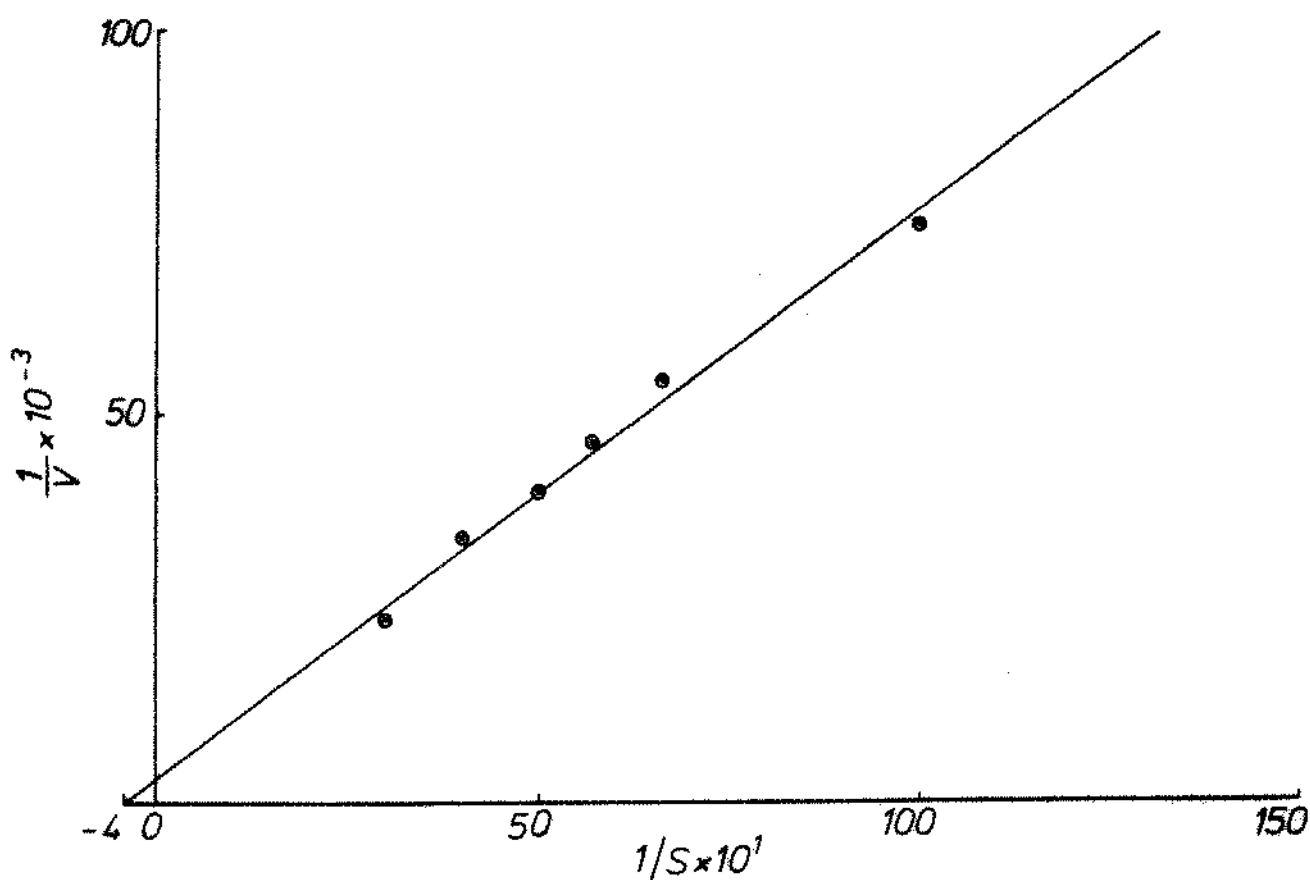


FIGURA 17 - Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação do  $K_M$  da fração FG. A cubeta ensaio continha 2,5 ml de solução pH 6,0 de D-catequina na concentração inicial 3 mM 0,5 ml de água e 10  $\mu$ l de solução de enzima.

Pelo Quadro 12 pode-se concluir que a polifenoloxidase apresenta maior especificidade para a forma L-dopa. Comparando-se o  $K_M$  da D-dopa e L-dopa, verifica-se que a especificidade para D-dopa - na enzima purificada é da ordem de 4 vezes menor que para L-dopa. Evidentemente, o mesmo ocorre para o racêmico DL-dopa. Por outro lado, a polifenoloxidase não apresentou nenhuma atividade para resorcinol, tirosina e ácido gálico.

### QUADRO 12

Valores de  $K_M$  para a reação da polifenoloxidase nos diferentes estágios de purificação, com diversos tipos de substratos.

Substrato	Valores de $K_M$ em moles/litros		
	extrato bruto	ppt.acet.	enzima purific.
dopamina	$5,0 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$
catecol	$3,3 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$
DL-dopa	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$
L-adrenalina	$5,0 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$
noradrenalina	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$
ac. clorogênico	$5,0 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-3}$
L-dopa	$3,6 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$6,6 \times 10^{-3}$
D-dopa	$3,0 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-2}$
D-catequina	$3,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-2}$

#### 4.4.5. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel simples - Os diferentes estágios de purificação da polifenoloxidase foram analisados quanto ao padrão eletroforético das proteínas e atividade enzimática. A Fig. 18 mostra os dados comparativos do tratamento prévio do precipitado acetônico com Triton X-100, seguido de estocagem por 7 dias a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Os resultados obtidos evidenciam melhor purificação da enzima com o tratamento por congelação prolongada. A fração FG foi analisada quanto ao perfil eletroforético. A Fig. 19 mostra que as bandas de mobilidade relativa (MR), 0,50, 0,55, 0,63, 0,66, reveladas com catecol, apresentam a mesma mobilidade eletroforética comparada com a revelação para proteína. Com o objetivo de se estudar a especificidade da enzima frente a diferentes substratos, foram realizadas eletroforeses aplicando-se em cada tubo 50 U totais da fração FE. Os géis foram incubados com diferentes substratos. Os resultados da Fig. 20 mostram que as manchas de MR 0,50, 0,57, 0,63, 0,66 eram comuns para todos os substratos, só diferindo em D-dopa por uma banda de mobilidade relativa menor.

Eletroforese em gel contendo uréia - Aliquotas da fração FE foram incubadas por 10 minutos em solução de uréia em uma concentração final de 8 M. A seguir, aplicou-se as amostras em gel de poliacrilamida contendo uréia. Os resultados da Fig. 21 mostram o efeito da uréia sobre a proteína. Estes resultados sugerem uma modificação estrutural da enzima,



mas não o suficiente para que se altere as propriedades do seu centro catalítico.

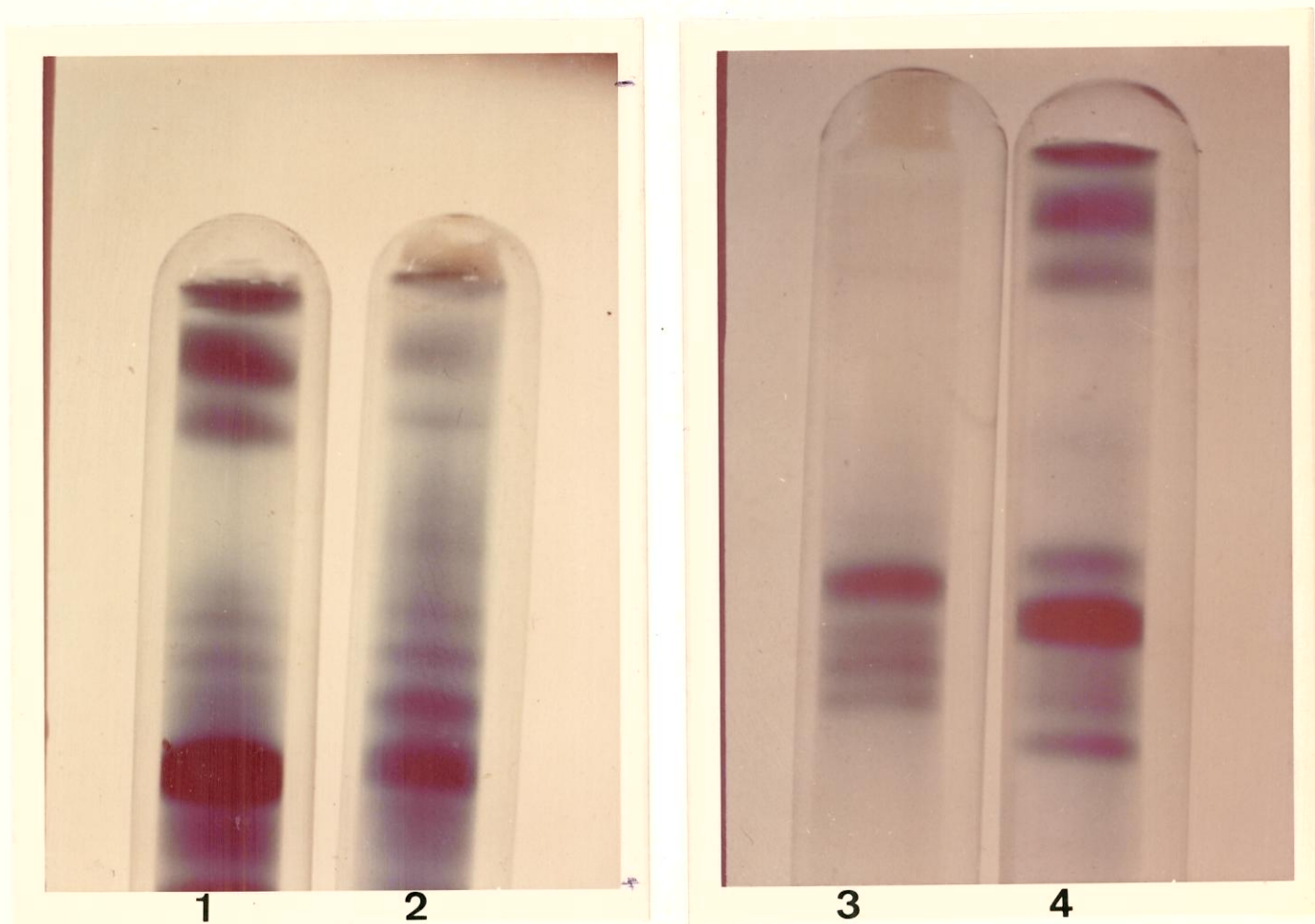


FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações eluídas da coluna de Sephadex G-100 em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0. 1. FP (fração protéica) s/estocagem a  $-40^{\circ}\text{C}$ . 2. FE (fração enzimática) s/estocagem a  $-40^{\circ}\text{C}$ . 3. FE após estocagem do ppt. acetônico por 7 dias a  $-40^{\circ}\text{C}$ . 4. FP após estocagem do ppt. acetônico por 7 dias a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

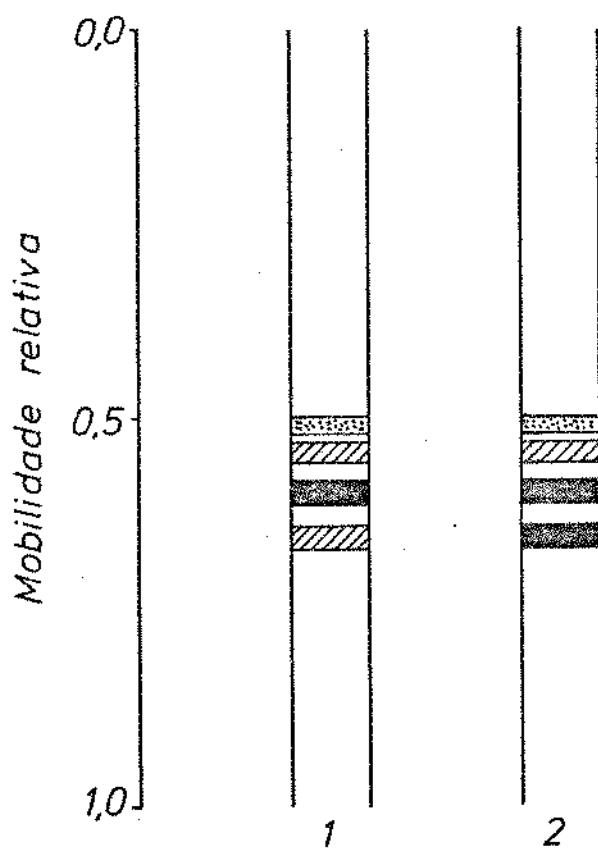


FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FG. 1. mobilidade relativa da proteína (200 µg/tubo). 2. mobilidade relativa da enzima corada com catecol (30U/-tubo).

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

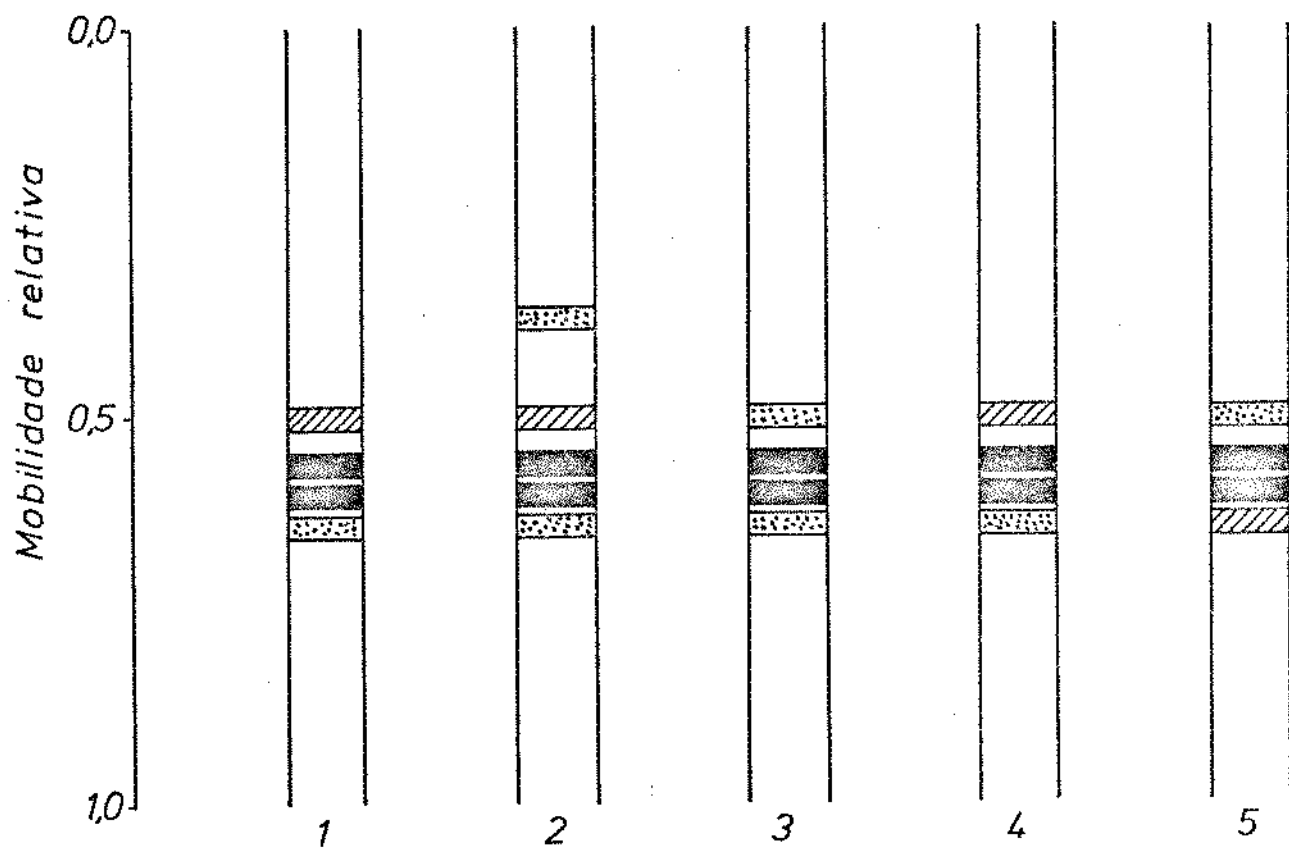


FIGURA 20 - Especificidade do substrato na fração FE. Eletroforese em gel de poliacrilamida da FE na concentração de 50 U totais/tubo; 3 mA/tubo 160 volts. 1. Incubação com L-dopa 2 mM; 2. Incubação com D-dopa 4 mM; 3. Incubação com DL-dopa 1 mM; 4. Incubação com dopamina 0,2 mM; 5. Incubação com catecol 30 mM.

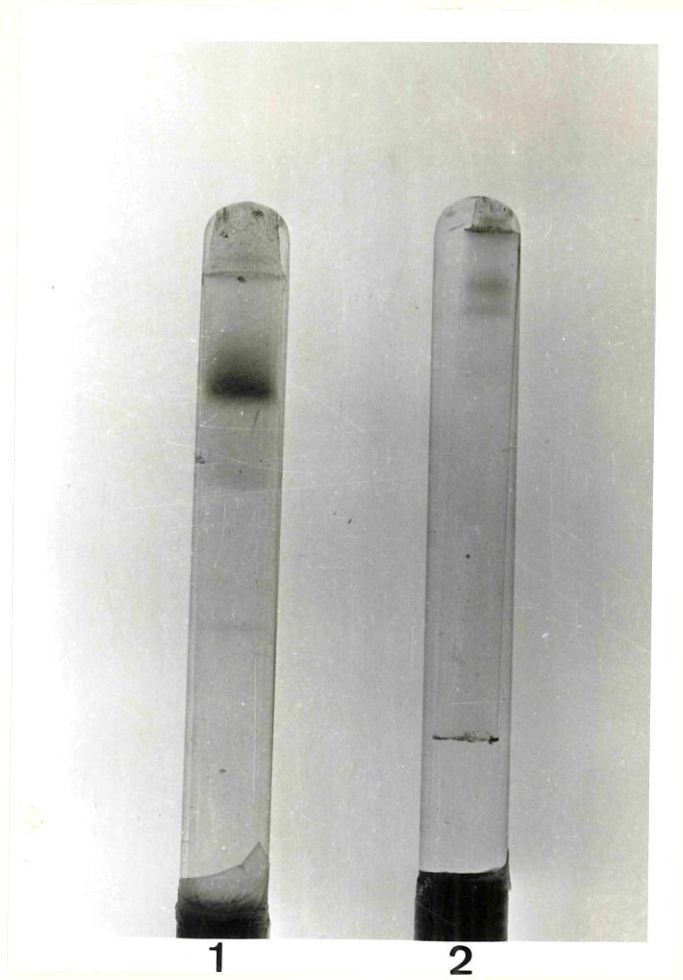


FIGURA 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia.  
1. Fração FE incubada por 5 min com uréia 8 M (proteína). 2. Fração FE incubada por 5 min com uréia 8 M -  
(atividade revelada com catecol 0,03 M).

Eletrofocalização em gel de poliacrilamida - Os experimentos realizados referem-se às amostras obtidas da fração FE e da FG, as quais foram aplicadas em gel de poliacrilamida, conforme descrito em material e métodos. No final da corrida, os géis foram corados com catecol 0,1 M para a localização da atividade enzimática (Fig. 22). Os géis foram cortados em porções de 0,5 cm, coletados em tubos contendo 1,0 ml de água destilada e mantidos por 24 horas a 4°C. A seguir foram feitas, nestes tubos, determinações de pH e atividade enzimática. Paralelamente foi utilizado um branco, sem amostra e o pH determinado como descrito anteriormente. O gradiente de pH obtido no controle e no gel contendo a enzima foram coincidentes. A atividade da enzima na fração FG foi determinada utilizando-se catecol 0,1 M e dopamina 0,001 M como substratos. O resultado da Fig. 23 indica o pH isoelétrico da enzima, ao redor de 5,2.

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - As amostras utilizadas para a identificação das unidades protéicas correspondem às frações FE e FG, que foram aplicadas no gel, em duplicatas, nas concentrações de 200 ug para a fração FE e 80 ug para a fração FG. O peso molecular do monômero foi encontrado através de uma curva obtida com proteínas padrões na concentração de 30 ug para cada proteína, e os resultados encontram-se nas Fig. 24, 25 e 26. Para a sub-unidade protéica encontrou-se um peso molecular entre 30.000 e 31.000.

Intensidade: ■ forte, ▨ media, ▩ fraca

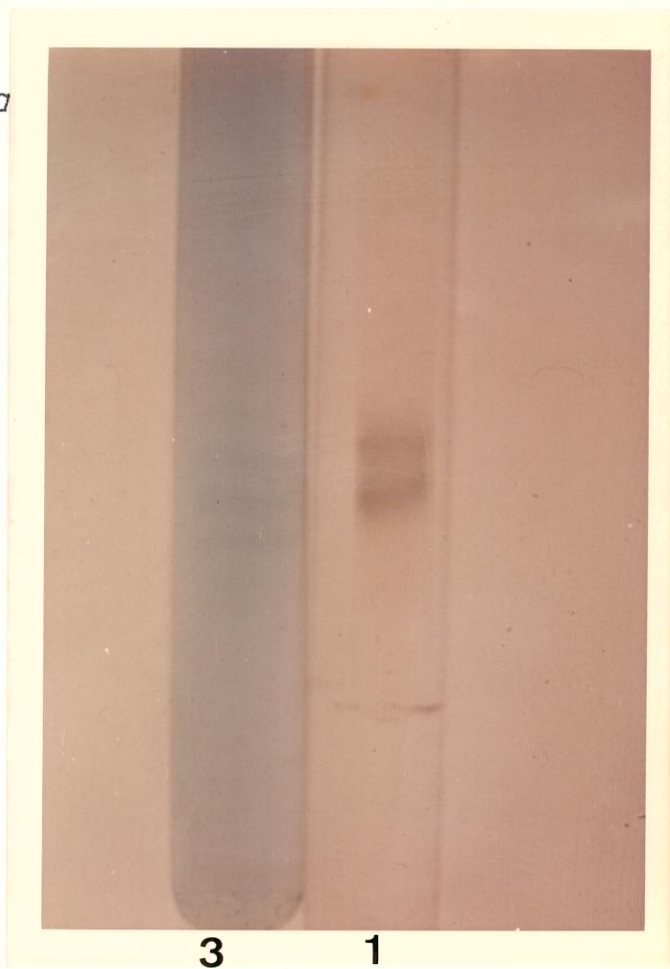
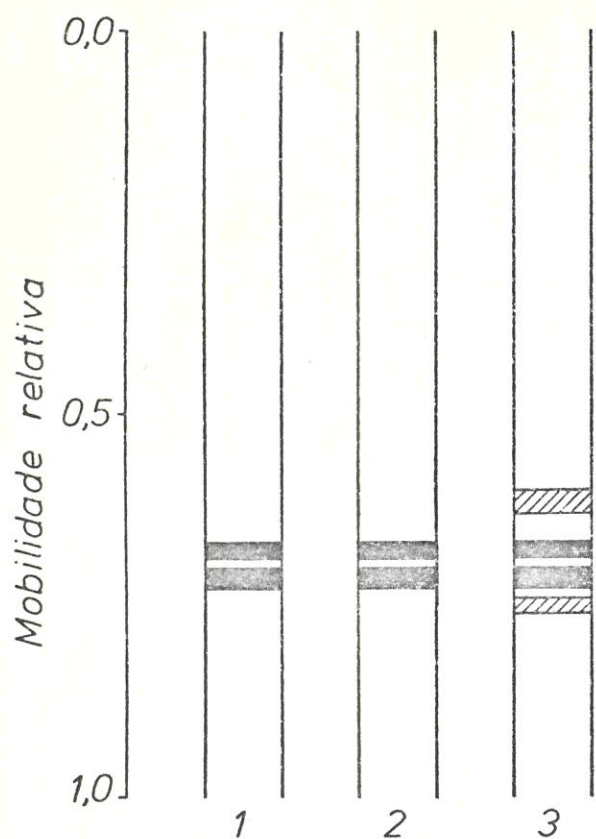


FIGURA 22.- Eletrofocalização em gel de poliacrilamida da enzima purificada. 1. atividade da enzima na fração FG; 2. atividade da enzima na fração FE; 3. enzima na fração FG (proteína)

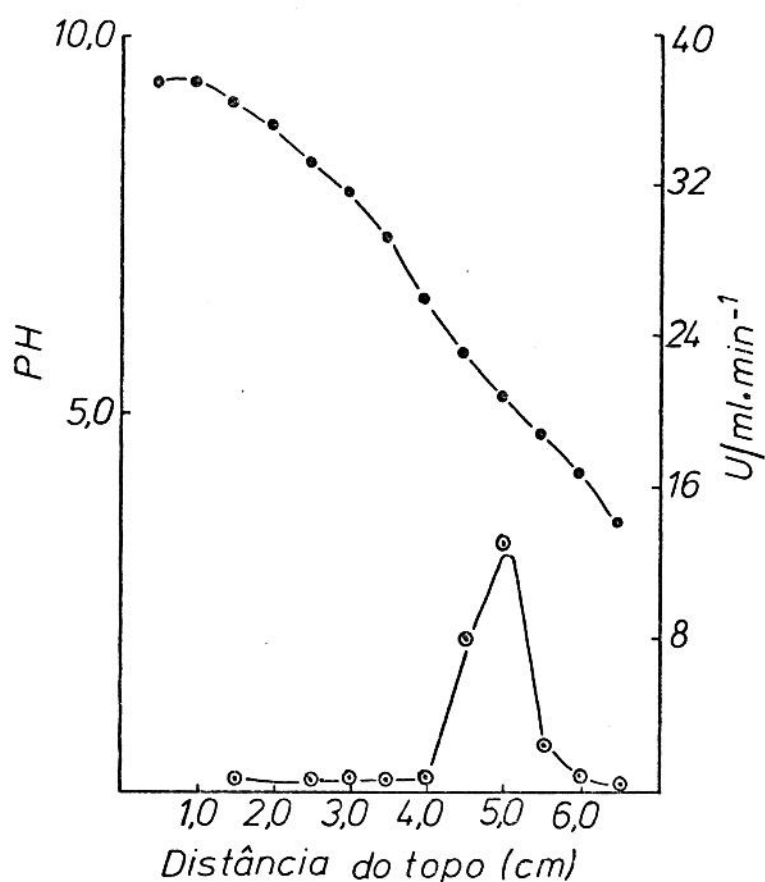


FIGURA 23 - Eletrofocalização da enzima da fração FG. Gradiente de pH no gel contendo a fração FG ●—●. Atividade da fração FG determinada em cubeta contendo solução de catecol 0,1 M, 0,5 ml de água e 50  $\mu$ l de enzima eluída após eletrofocalização.



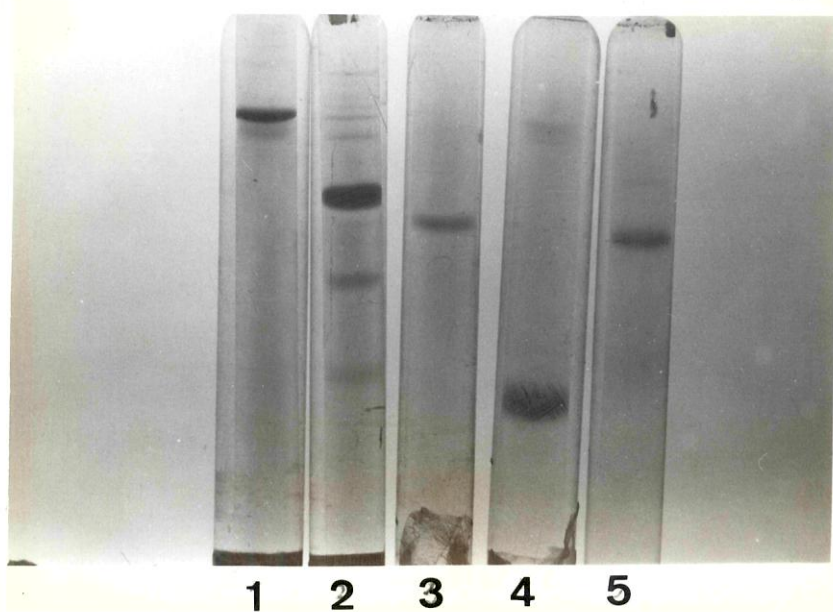


FIGURA 24 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.  
1. Albumina de soro bovino, 250  $\mu$ g. 2. Desidrogenase lática, 250  $\mu$ g. 3. Pepsina, 250  $\mu$ g. 4. Lisozima, 250  $\mu$ g. 5. Fração FE, 200  $\mu$ g.



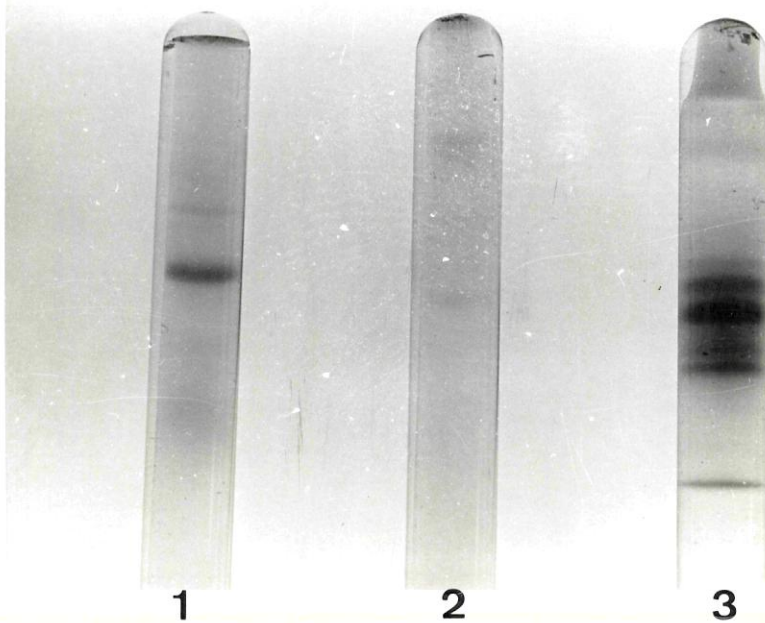


FIGURA 25 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS:  
1. Fração FE, 200  $\mu$ g. 2. Fração FG, 50  $\mu$ g. 3. Ele -  
troforese em gel de poliacrilamida simples da fra -  
ção FE, 500  $\mu$ g.

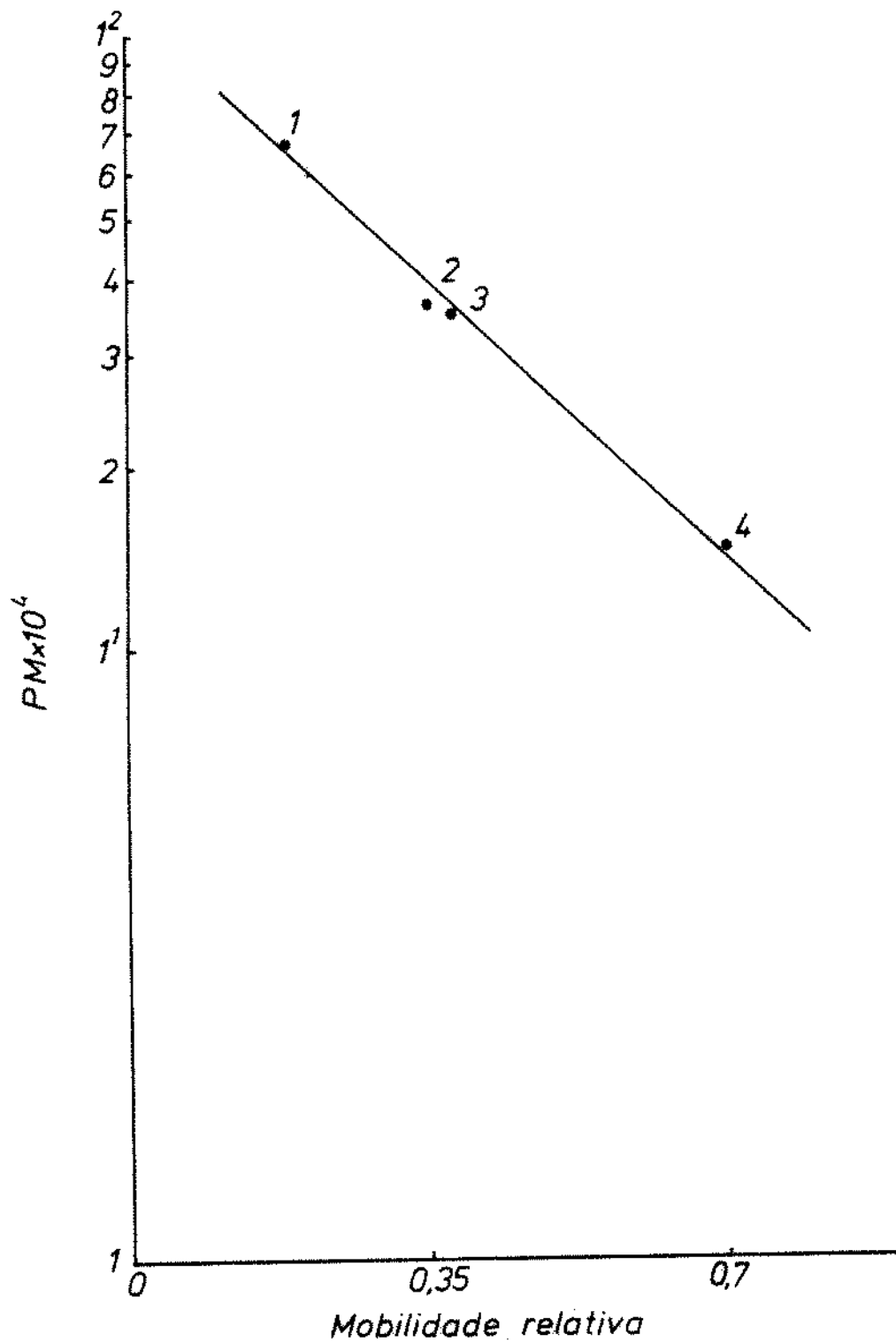


FIGURA 26 - Curva padrão de pesos moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. 1. Albumina de soro bovino, P.M. 65.000; 2. Desidrogenase lática, P.M. 36.000; 3. Pepsina, P.M. 35.000; 4. Lisozima, P.M. 14.100.

#### 4.4.6. Determinação do peso molecular da polifenoloxidase em gradiente de sacarose.

As amostras nos diferentes estágios de purificação foram aplicadas em gradiente de sacarose como descrito em material e métodos. Os coeficientes de sedimentação encontrados e utilizados para os cálculos dos pesos moleculares indicam que os diferentes tratamentos utilizados para a purificação não afetaram estruturalmente a proteína. Aplicou-se no topo do gradiente, 15  $\mu$ g da preparação enzimática, havendo recuperação de 75% da atividade enzimática. O coeficiente de sedimentação encontrado para os diferentes estágios de purificação foi de  $3,9 \pm 0,1$  S, correspondendo ao peso molecular de  $60.000 \pm 2.000$ .

#### 4.4.7. Efeito do mercaptoetanol sobre a polifenoloxidase

Alíquotas de 2 ml de solução do precipitado acetônico foram incubadas com diferentes concentrações de mercaptoetanol. Em intervalos de 2 segundos eram feitas as medidas da atividade. Os resultados mostraram máxima inibição após um minuto de incubação com mercaptoetanol na concentração de 17 mM.

As mesmas amostras dialisadas contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 por 24 horas com trocas constantes de tampão, apresentaram uma recuperação de atividade de 30%, independentemente da maior ou menor inibição. Os resultados estão contidos no Quadro 13. A fim de estudarmos as formas enzimáticas que foram inibidas pelo-

mercaptoetanol, foram feitas eletroforeses em gel de poliacrilamida. Os resultados apresentados na Fig. 27 mostram a destruição quase que irreversível de uma das formas e a recuperação das outras duas. Seriam, portanto, as formas de mobilidade eletroforéticas 0,63 e 0,66 as responsáveis pela recuperação de 30% da atividade enzimática.

~ QUADRO 13

Inativação da polifenoloxidase do precipitado acetônico(90 U/ml) por mercaptoetanol e porcentagem de recuperação da atividade - após diálise.

Concentração de Mercaptoetanol (mM)	Atividade Residual (U/ml)	Inativação (%)	Atividade Após diálise (U/ml)	Recuperação da atividade pela diálise (%)
17	0	100	27,0	30
6	19,0	90	27,0	20
3	21,6	76	36,0	16

Amostras da fração FG na concentração de 1 mg/ml incubadas por 2 horas a 37°C em meio tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo 50 µl de uma solução a 0,4% de dodecil sulfato de sódio e 4 ml de mercaptoetanol, foram analisadas em gel de poliacrilamida - simples. Pelas Fig. 28 e 29 pode-se concluir que o mercaptoetanol altera a mobilidade eletroforética da enzima cuja estrutura

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

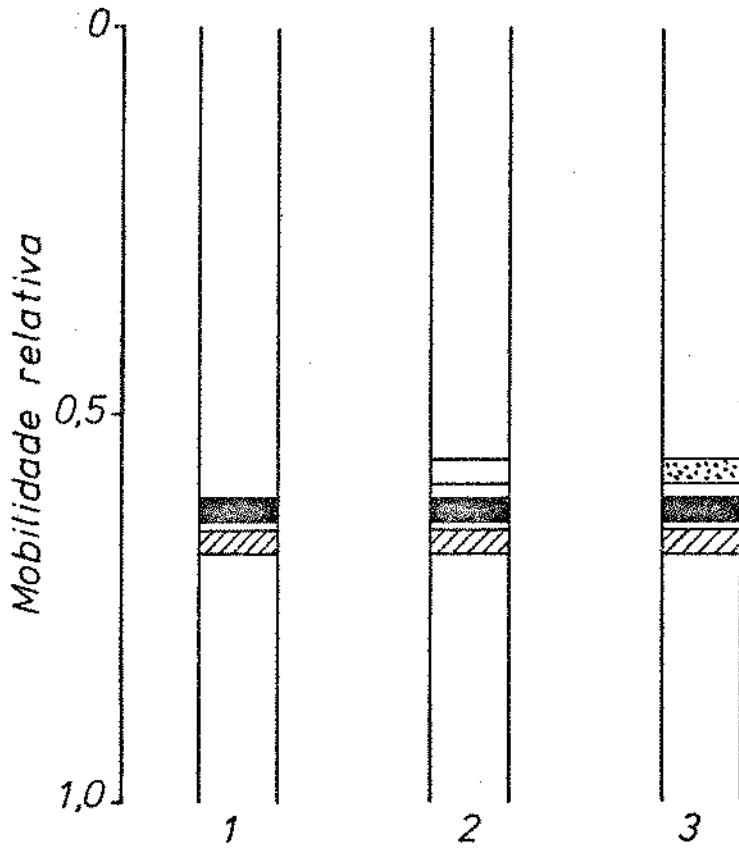


FIGURA 27 - Eletrofocalização em gel de poliacrilamida do precipitado acetônico com mercaptoetanol e dialisado contra tampão-fosfato 0,2 M, pH 7,0 por 24 horas. 1. precipitado acetônico incubado com 17 mM de mercaptoetanol; 2. precipitado acetônico incubado com 6 mM de mercaptoetanol; 3. precipitado acetônico incubado com 3 mM de mercaptoetanol.

Intensidade: ■ forte, ▨ media, ▩ fraca

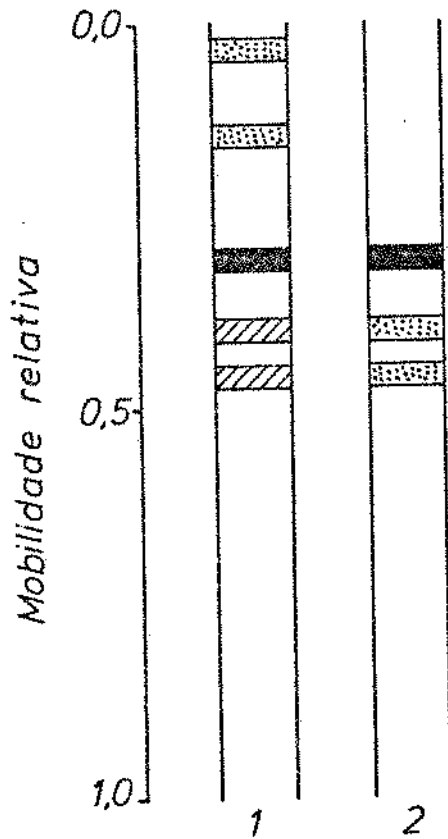


FIGURA 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FG tratada com mercaptoetanol e SDS. 1. perfil - protéico; 2. atividade enzimática revelada com catecol 0,03 M.

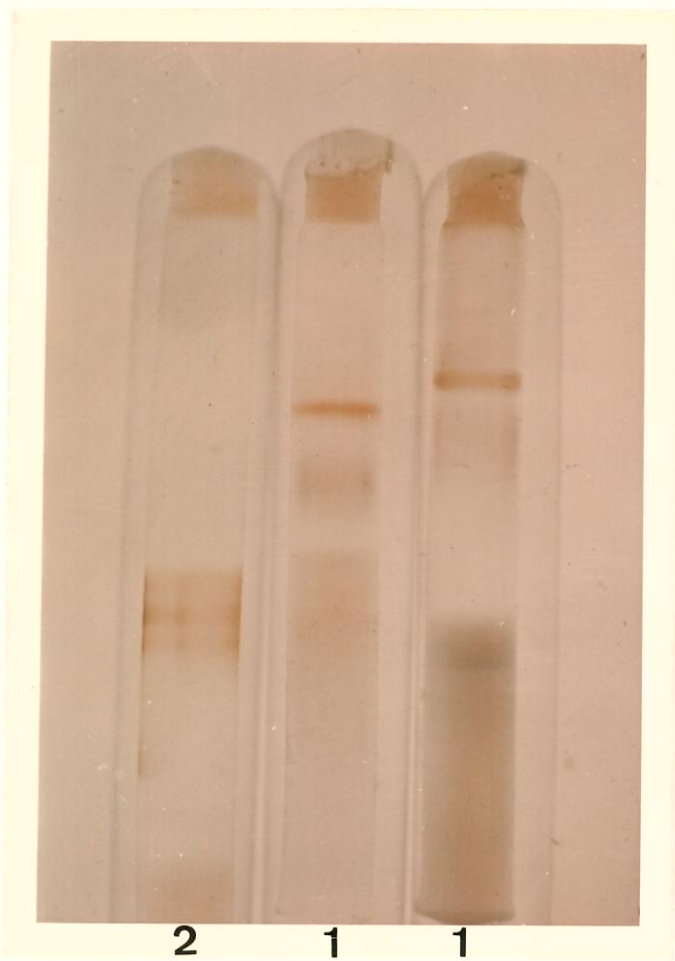


FIGURA 29 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FG tratada com mercaptol e SDS. 1. Atividade enzimática revelada com catecol 0,03 M. 2. Fração FG não tratada com MESH e SDS (atividade enzimática).

modificada é protegida pelo dodecil sulfato de sódio. Por outro lado, há um restabelecimento da atividade da polifenoloxidase - devido à eliminação do mercaptoetanol durante a eletroforese.

#### 4.4.8. Efeito do tratamento com Tween-80

As frações correspondentes aos picos I e II e F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> da 1.<sup>a</sup> e 2.<sup>a</sup> cromatografias, foram analisadas em gel de poliacrilamida segundo método descrito em 3.14. Se compararmos as Fig. 30 e 31, podemos notar que há diferenças em relação ao número de bandas, e a mobilidade eletroforética das frações. Este resultado provavelmente prende-se ao fato de que as concentrações de Tween-80, adicionados no gel não foram as mesmas para as diferentes eletroforeses. Para verificar se o Tween-80 apresentava um efeito dissociante na proteína, amostras de 0,4 ml da fração do pico I foram incubadas com uma gota (aproximadamente 0,05 ml) de detergente a temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida simples. Paralelamente, desenvolveu-se eletroforeses-controles contendo amostras do pico I sem o uso de Tween-80. Os resultados da Fig. 32, mostram que o Tween-80 tem efeito acentuado sobre a proteína e, conseqüentemente, sobre o perfil eletroforético da enzima.



Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

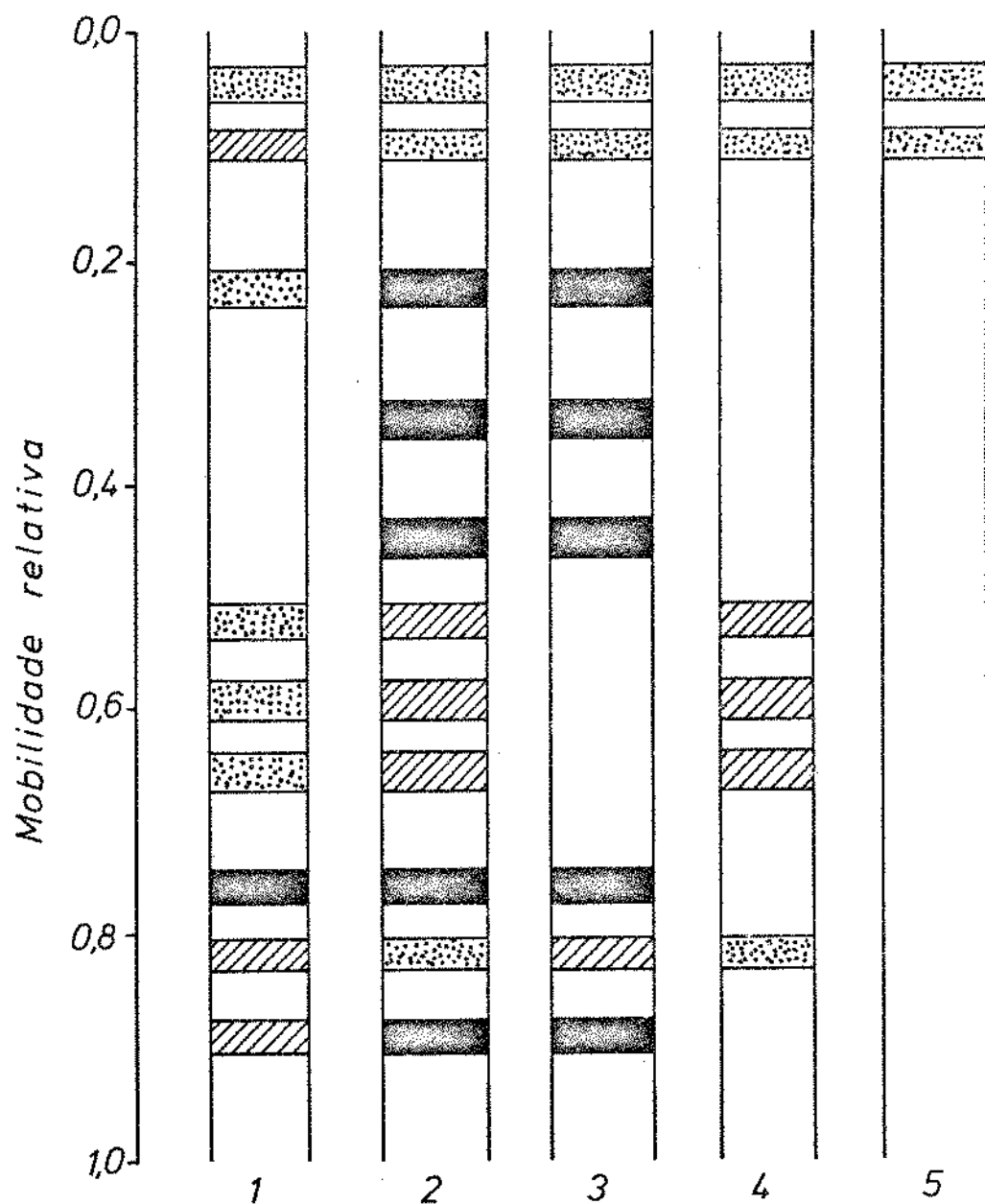


FIGURA 30 - Efeito do substrato. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações eluídas do Sephadex G-100. 1. extrato bruto (catecol 0,01 M); 2. Pico I - (catecol 0,01 M); 3. Pico I (dopamina 0,001 M); 4. Pico II (catecol 0,01 M); 5. Pico II (dopamina 0,001 M).

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

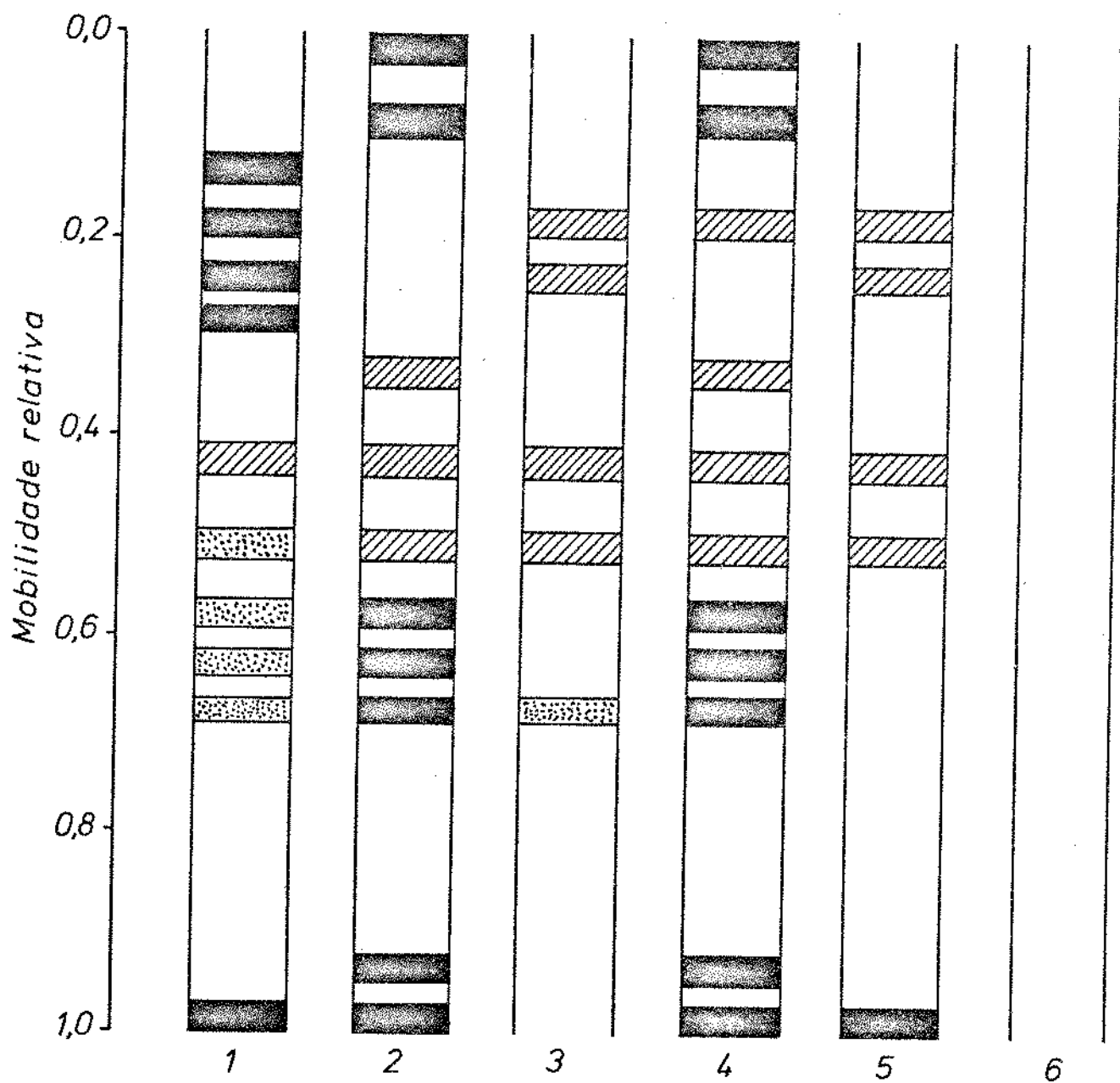


FIGURA 31 - Eletroforese das frações eluídas do Sephadex G-100. 1. extrato bruto (proteína); 2. extrato bruto (catecol 0,01 M); 3. Pico F<sub>2</sub> (proteína); 4. Pico F<sub>2</sub> (catecol 0,01 M); 5. Pico F<sub>3</sub> (proteína); 6. Pico F<sub>3</sub> (catecol 0,001 M).

#### 4.4.9. Efeito da parafenilendiamina na revelação das bandas ativas.

As frações correspondentes aos picos FG e FE do 4º cromatograma, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo método descrito em 3.2.9. Paralelamente foi realizada eletroforese da fração FE sem contudo adicionar-se parafenilendiamina à solução do substrato. As Fig. 33 e 34 mostram que a parafenilendiamina torna as bandas mais intensas ou mesmo aumenta o número de bandas provavelmente devido à sua combinação com quinonas. Desta forma, o perfil eletroforético da enzima apresentou bandas com mobilidade eletroforética entre 0,05 e 0,45 para os substratos catecol e dopamina, que nada mais são do que contaminantes ou artefatos provenientes do método de revelação da atividade enzimática.

Amostras submetidas à focalização isoelétrica, também foram analisadas com substrato contendo parafenilendiamina. Pela Fig. 35 pode-se verificar que há formação de uma coloração contaminante que não é enzima.

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

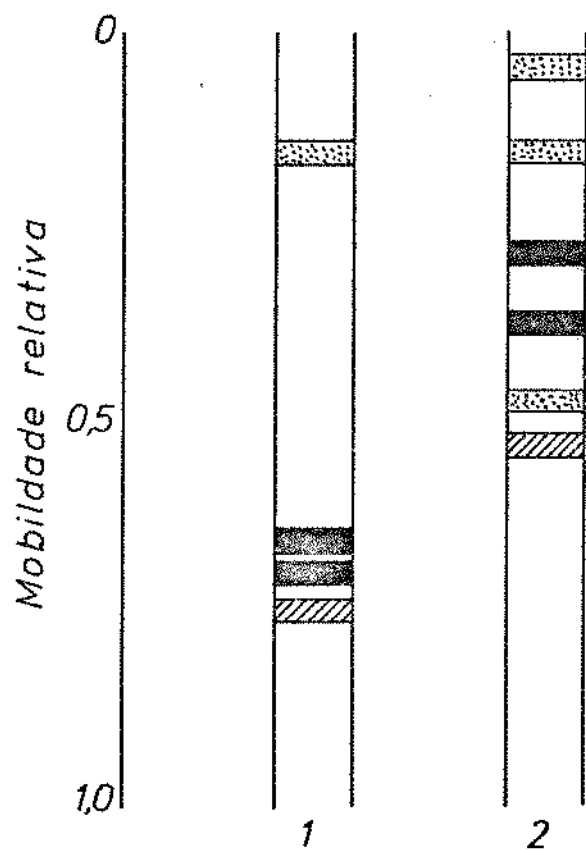


FIGURA 32 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do pico I, obtido por eluição do Sephadex G-100. 1. Enzima não incubada com Tween-80; 2. Enzima incubada com Tween-80.

Intensidade: ■ forte, ▨ média, ▩ fraca

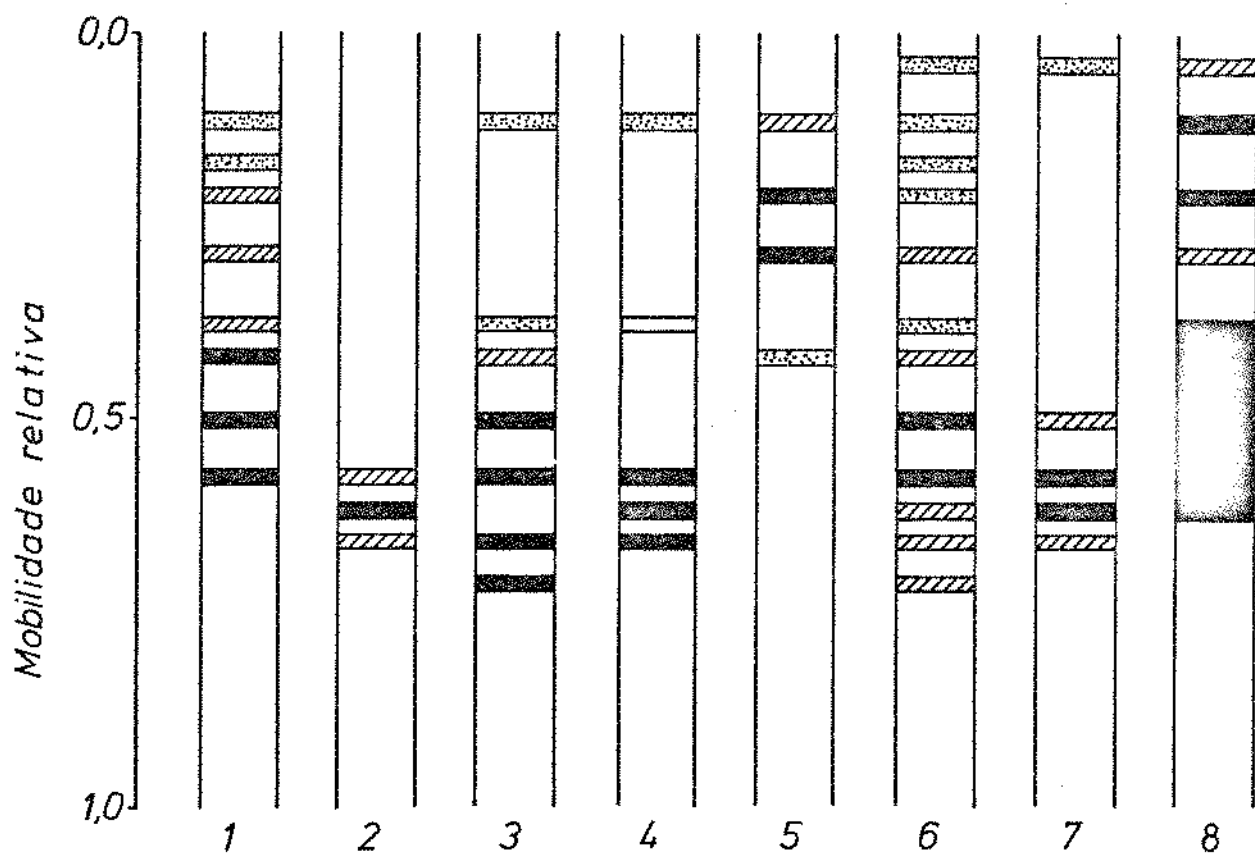


FIGURA 33 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de diferentes estágios de purificação da polifenoloxidase. Revelação da atividade enzimática com soluções de substrato contendo 0,05% de parafenilenodiamina. 1. FP (proteína); 2. FP (catecol-0,01 M); 3. FE (proteína); 4. FE (catecol 0,01 M); 5. FE (dopamina 0,001 M); 6. precipitado al cetônico (catecol 0,01 M); 8. precipitado acetônico (dopamina 0,001 M).

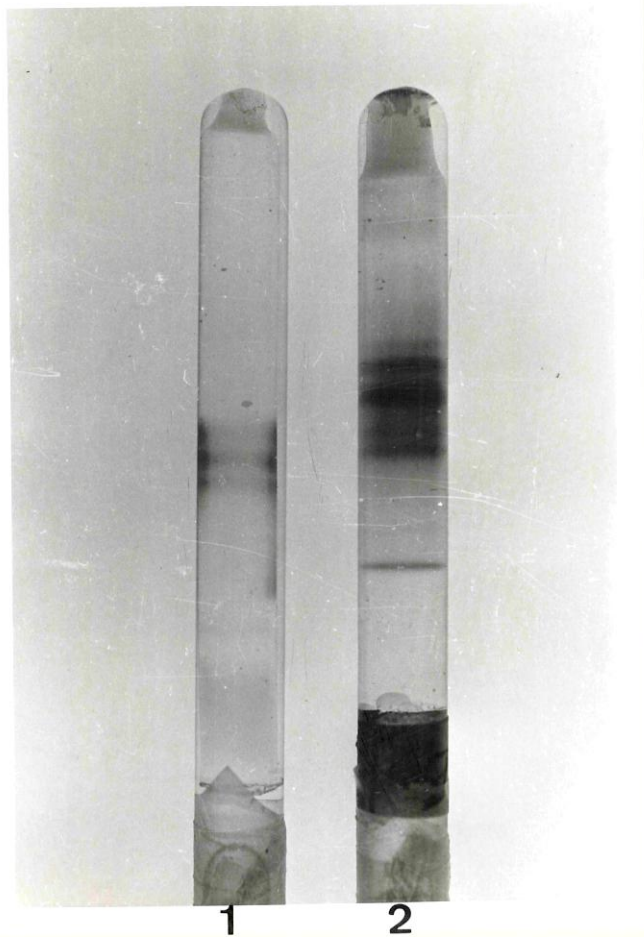


FIGURA 34 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FE.  
1. FE, atividade revelada com catecol 0,01 M sem pa  
rafenilenodiamina. 2. FE (proteína).



FIGURA 35 - Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida da fração FE. 1. FE, atividade revelada com catecol - 0,03 M. 2. FE, atividade revelada com catecol 0,03M contendo 0,05% de parafenilenodiamina.

#### 4.4.10. Efeito da temperatura sobre a estabilidade e atividade da enzima

Amostras do extrato bruto, bem como do precipitado acetônico foram mantidas em temperaturas constantes por diferentes períodos de tempo. A Fig. 36 mostra que entre as temperaturas de 65 e 75°C a enzima mostra maior resistência térmica. Pela Fig. 37 essa estabilidade é nítida a 75°C, mostrando um aumento de atividade - que se estabiliza até 20 minutos de incubação da enzima, enquanto que a 65°C há uma diminuição gradativa com o tempo de incubação até 20 minutos. Após esse tempo, há um decréscimo linear da atividade em função da temperatura.

Para se estudar uma possível regeneração da enzima pelo resfriamento, cada amostra do extrato bruto, mantida por 15 minutos a diferentes temperaturas, foi resfriada por 10 minutos a 0 e 25°C e a seguir foi determinada a atividade enzimática. Pela Fig, 38, pode-se novamente verificar a maior resistência térmica a 65 e 75°C. Quanto à capacidade da enzima para a regeneração térmica, verifica-se que a 65°C houve uma regeneração de 20% da atividade em relação à atividade medida a 55°C, quando o resfriamento, após incubação térmica foi lento (25°C). No resfriamento rápido (0°C) não houve reativação visível, porém a atividade permaneceu igual à medida a 55°C e superior à atividade medida imediatamente após o aquecimento (incubação por 15 minutos).

As experiências de termoestabilidade da enzima a diferentes tem-



peraturas realizadas com a enzima semi-purificada (FE) cujos resultados estão na Fig. 39, mostram novamente uma maior estabilidade térmica da enzima quando aquecida entre 65 e 75°C por 15 minutos. Além de 15 minutos de aquecimento a essa temperatura, a inativação não se verifica de maneira linear em função do tempo. Temperaturas iguais ou superiores a 85°C causam uma rápida inativação da enzima.

#### 4.4.11. Efeito do tratamento com uréia

Os resultados dos experimentos realizados com o precipitado acetônico em diferentes concentrações de uréia, estão expressos na Fig. 40. Pode-se observar que a incubação da enzima com uréia na concentração de 8 M, não afeta de maneira sensível a atividade de polifenoloxidase. Amostras do precipitado acetônico tratadas e não tratadas com Triton X-100 apresentaram, após 7 dias de estocagem a -40°C, 5.400 e 3.240 unidades totais de atividade, respectivamente. Essas mesmas amostras quando incubadas com uréia 8 M por 18 horas a 4°C não mostraram diferenças sensíveis na atividade da polifenoloxidase. Entretanto, quando foram submetidas a diálise contra solução de uréia 8 M por 18 horas a 4°C, houve perda de 60% da atividade enzimática total.

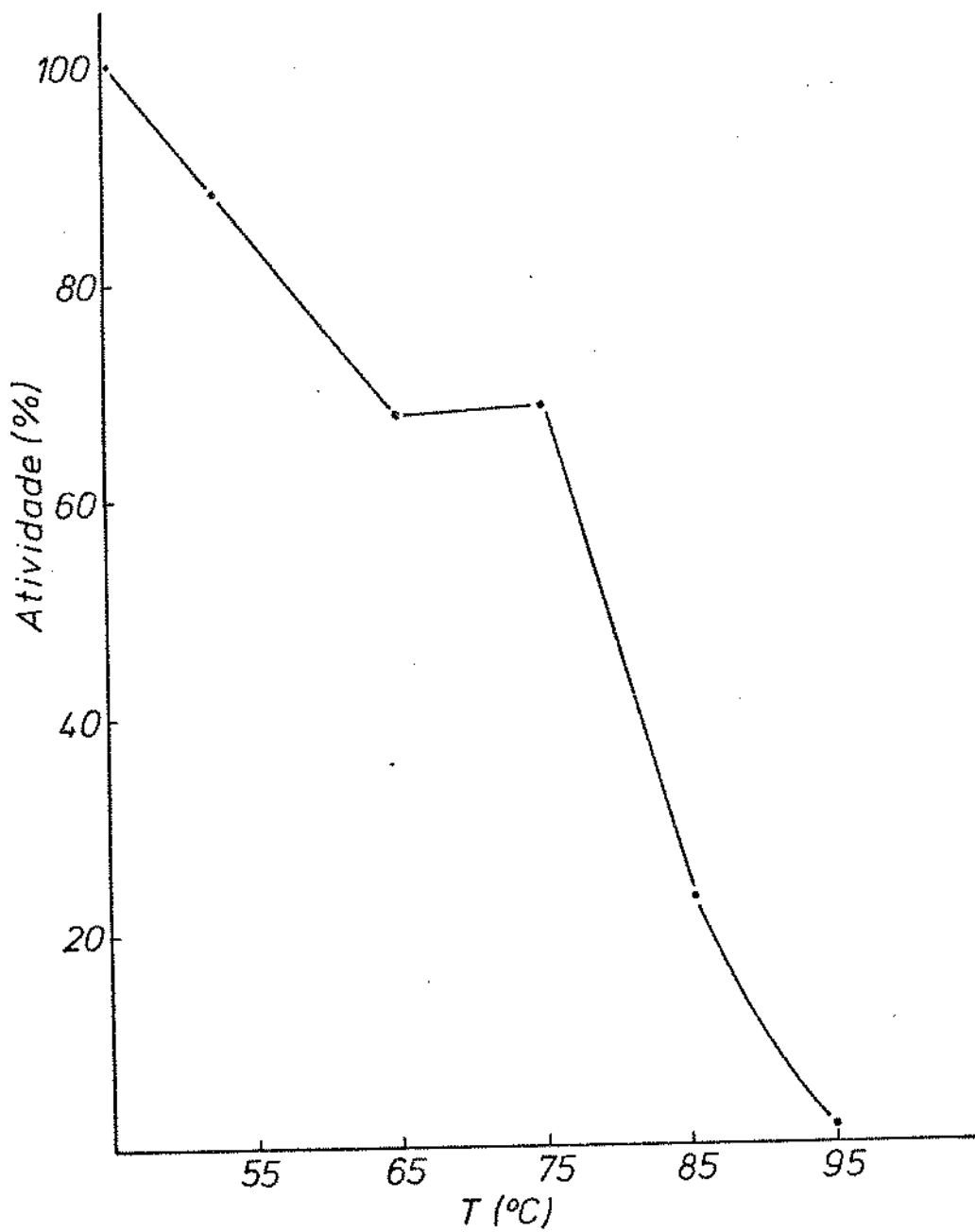


FIGURA 36 - Efeito da temperatura no extrato bruto de polifenoloxidase. Amostra incubada por 15 minutos.

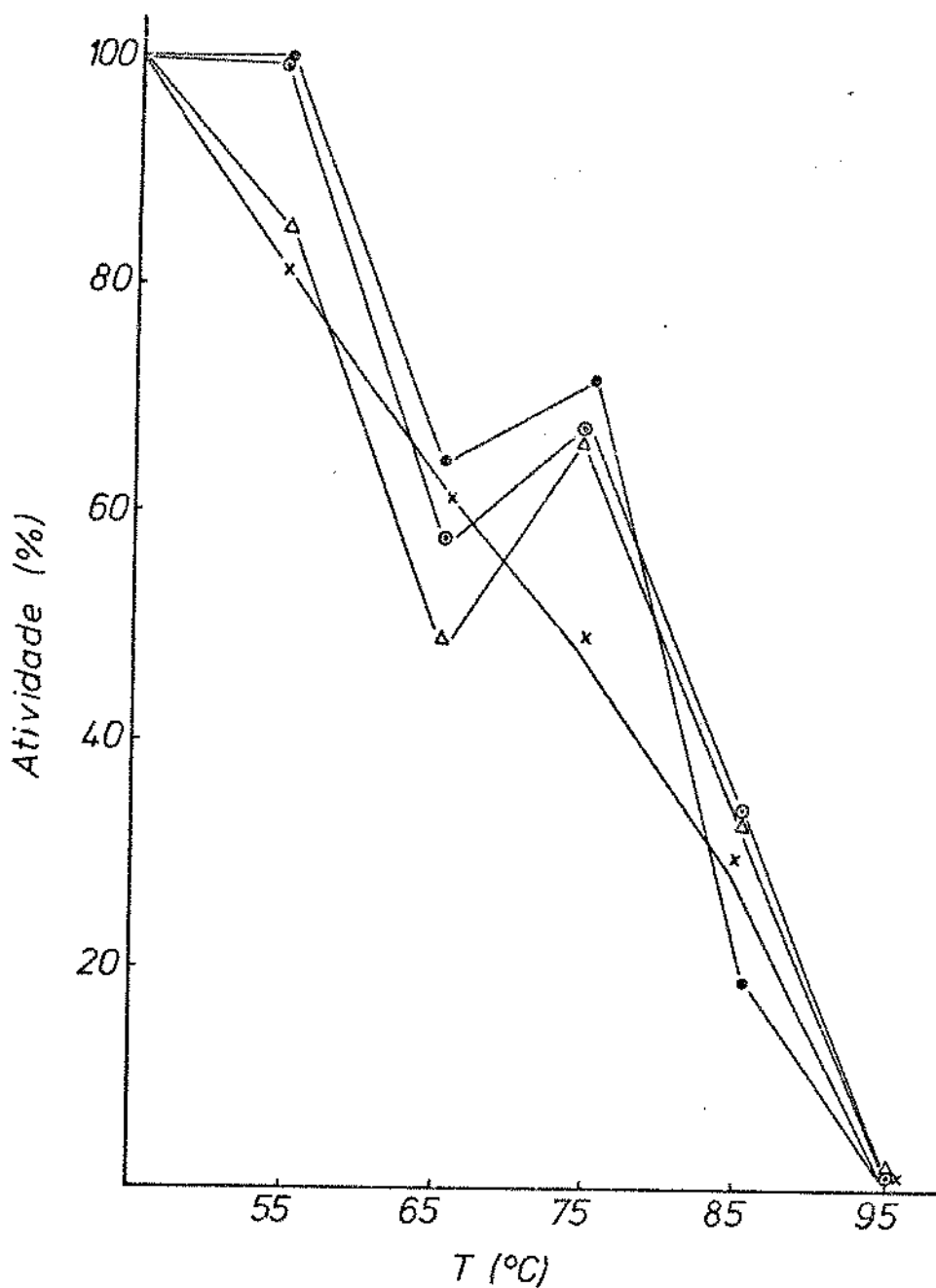


FIGURA 37 - Efeito da temperatura na estabilidade da enzima no precipitado acetônico. Enzima incubada por 10 min ●—● . Enzima incubada por 15 min ○—○ . Enzima incubada por 20 min Δ—Δ . Enzima incubada por 30 min x—x .

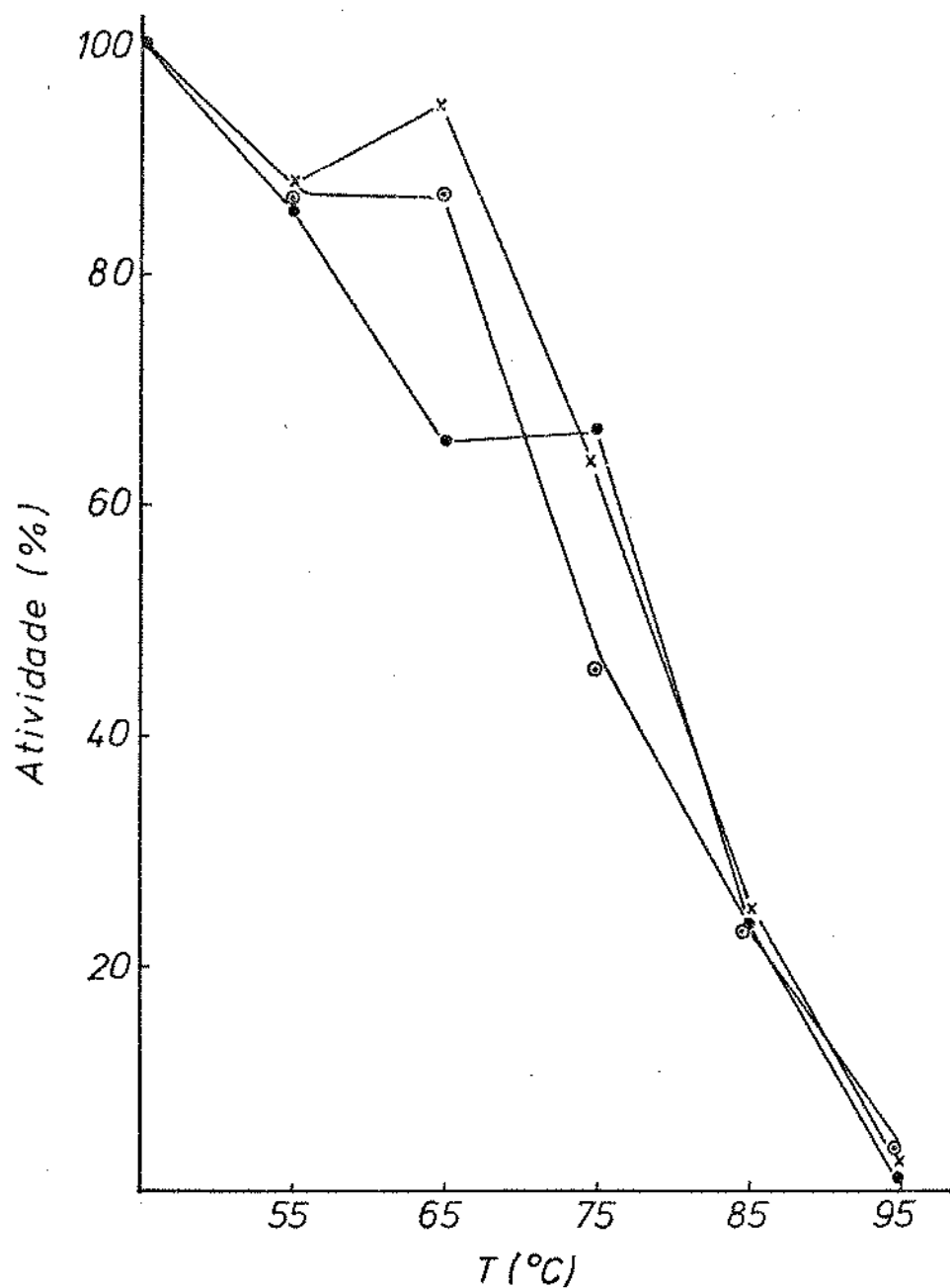


FIGURA 38 - Efeito da temperatura no extrato bruto.  
 1. aquecimento por 15 min ●—● . Aquecimento por 15 min e manutenção a 0°C - por 10 min ○—○ . 3. Aquecimento e manutenção a 25°C por 10 min x—x .

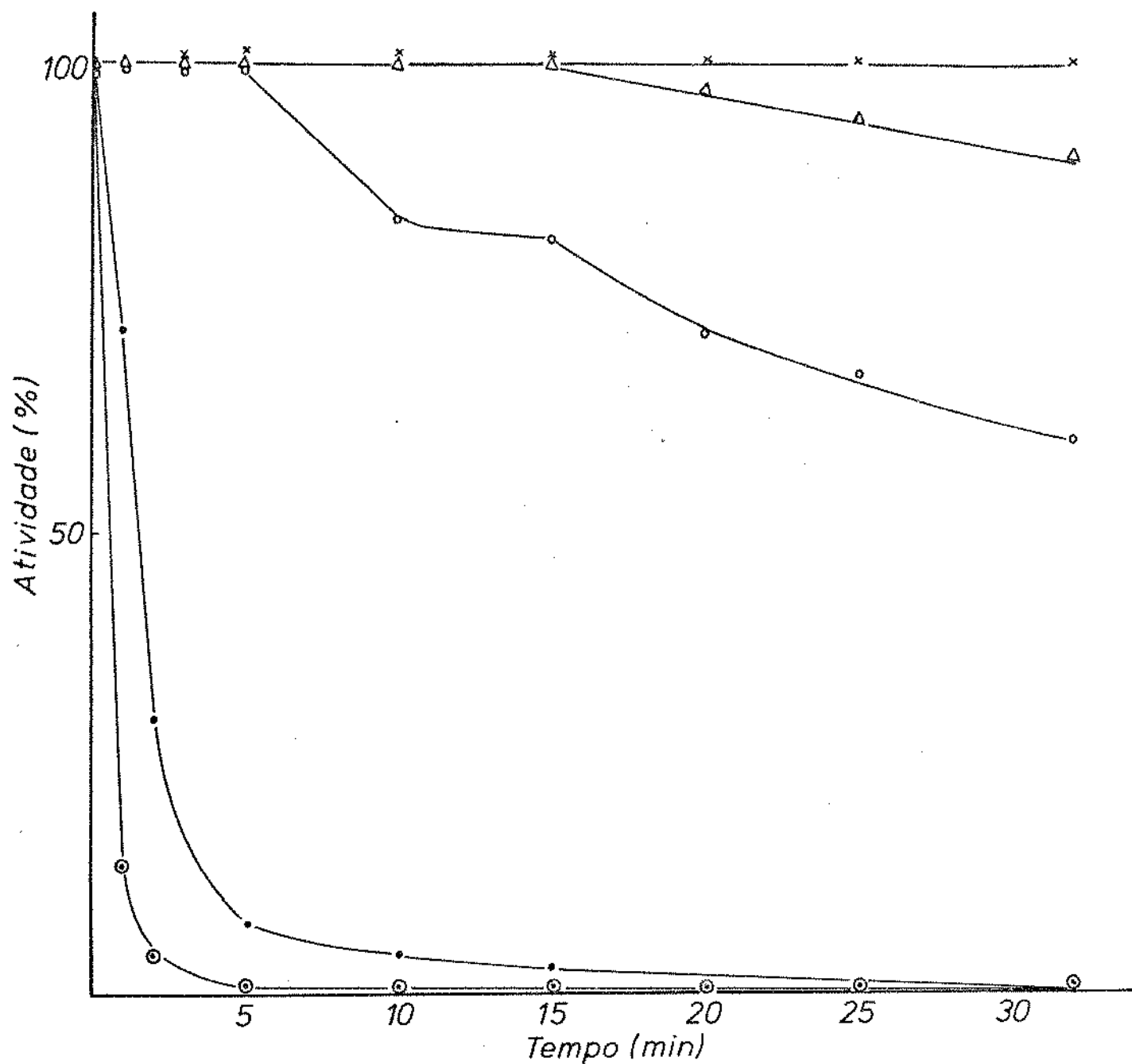


FIGURA 39 - Efeito da temperatura na fração FE em diferentes tempos de incubação. FE submetida a 55°C x—x . FE submetida a 65°C Δ—Δ . FE submetida a 75°C ○—○ . FE submetida a 85°C ●—● . FE submetida a 95°C ◉—◉ .

#### 4.4.12. Efeito de inibidores

As amostras do precipitado acetônico foram analisadas quanto aos efeitos de alguns inibidores da reação enzimática em função do tempo. Pelas Fig. 41 e 42, pode-se verificar que as concentrações de  $5 \times 10^{-2}M$  de cisteína e  $5 \times 10^{-2}M$  de ácido ditiocarbâmico (DIECA), inibem completamente a reação de polifenoloxidase com catecol. Entretanto, a Fig. 43 mostra que o metabissulfito de sódio é um inibidor mais efetivo da reação.

Durante as reações enzimáticas com diferentes concentrações de substratos, os inibidores analisados mostraram produzir um período de retardamento inicial da reação, que depende do tipo e concentração do substrato. O período de retardamento encontrado para a polifenoloxidase revelou-se inversamente proporcional à concentração do substrato utilizado e diretamente proporcional à concentração do inibidor. Com a cisteína, o período de retardamento encontrado nos experimentos com o precipitado acetônico (Quadro 14), seguiu uma escala decrescente para os substratos DL-dopa > dopamina > catecol, nas diferentes concentrações de inibidor. Já com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio (Quadros 15 e 16), o período de retardamento decresceu na seguinte ordem: DL-dopa > catecol > dopamina, para o primeiro inibidor e catecol > dopamina para o segundo. Entretanto, os experimentos realizados com DIECA, embora não apresentassem retardamento para nenhum dos substratos estudados, mostraram considerável inibição da atividade enzimática como pode ser verificado no Quadro 17.

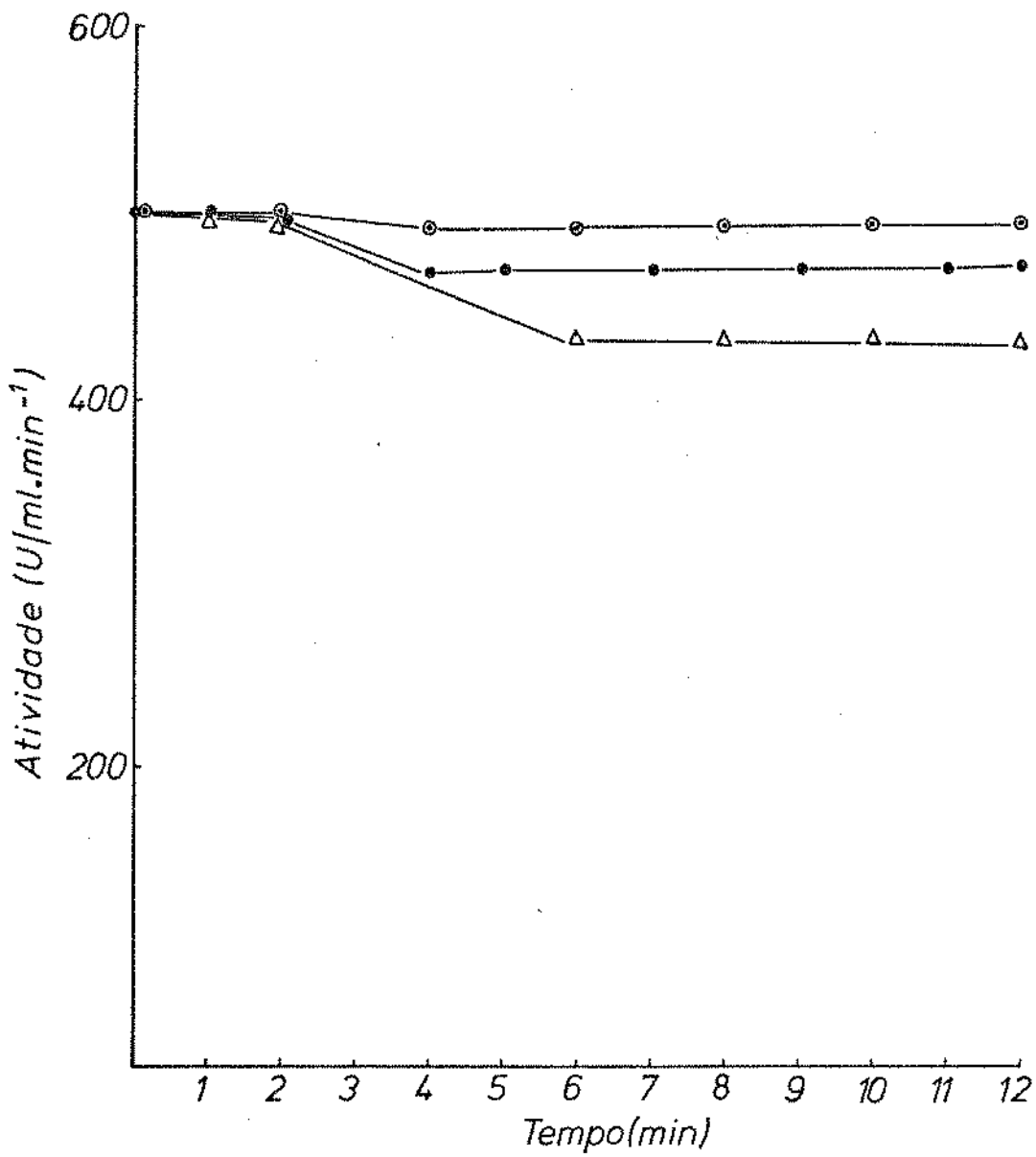


FIGURA 40 - Efeito da incubação do precipitado acetônico com uréia nas concentrações finais: 2 M  $\circ$ — $\circ$  ; 4M  $\bullet$ — $\bullet$  ; 8 M  $\Delta$ — $\Delta$  .

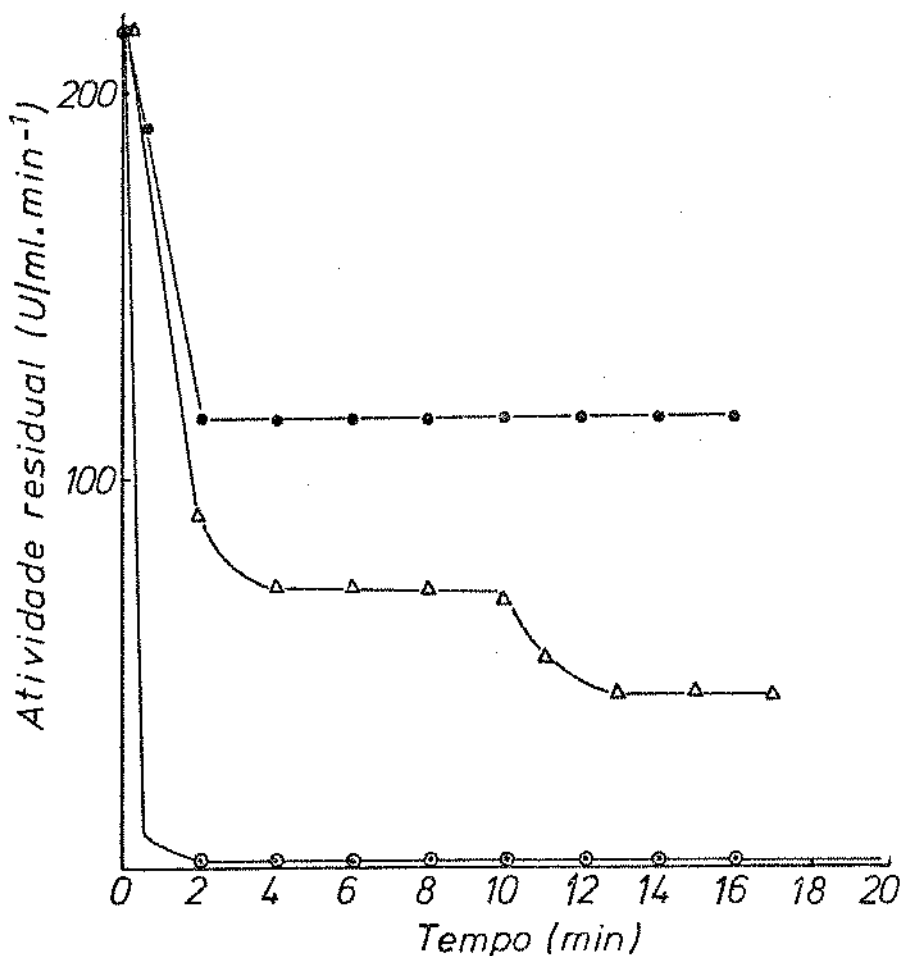


FIGURA 41 - Inibição da enzima do precipitado acetônico com cisteína. 2 ml de solução de enzima + 2 ml cisteína  $1 \times 10^{-3}$  M - •-•; 2 ml de solução de enzima + 2 ml cisteína  $1 \times 10^{-2}$  M  $\Delta$ - $\Delta$ ; 2 ml de solução de enzima + 2 ml cisteína  $1 \times 10^{-1}$  M o-o.



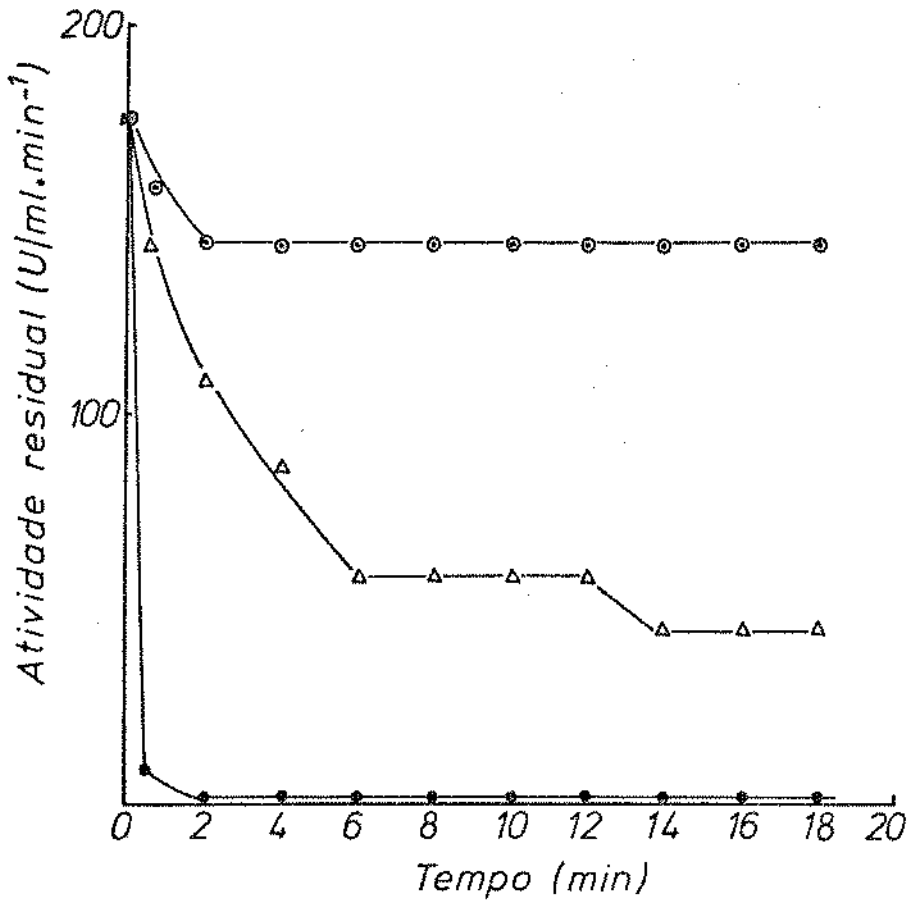


FIGURA 42 - Inibição da enzima do precipitado acetônico com ácido dietil carbâmico: 2 ml de solução de enzima + 2 ml de DIECA  $1 \times 10^{-3}$  M ●-●; 2 ml de solução de enzima + 2 ml de DIECA  $1 \times 10^{-2}$  M Δ-Δ; 2 ml de solução de enzima + 2 ml de DIECA  $1 \times 10^{-1}$  M •-•.

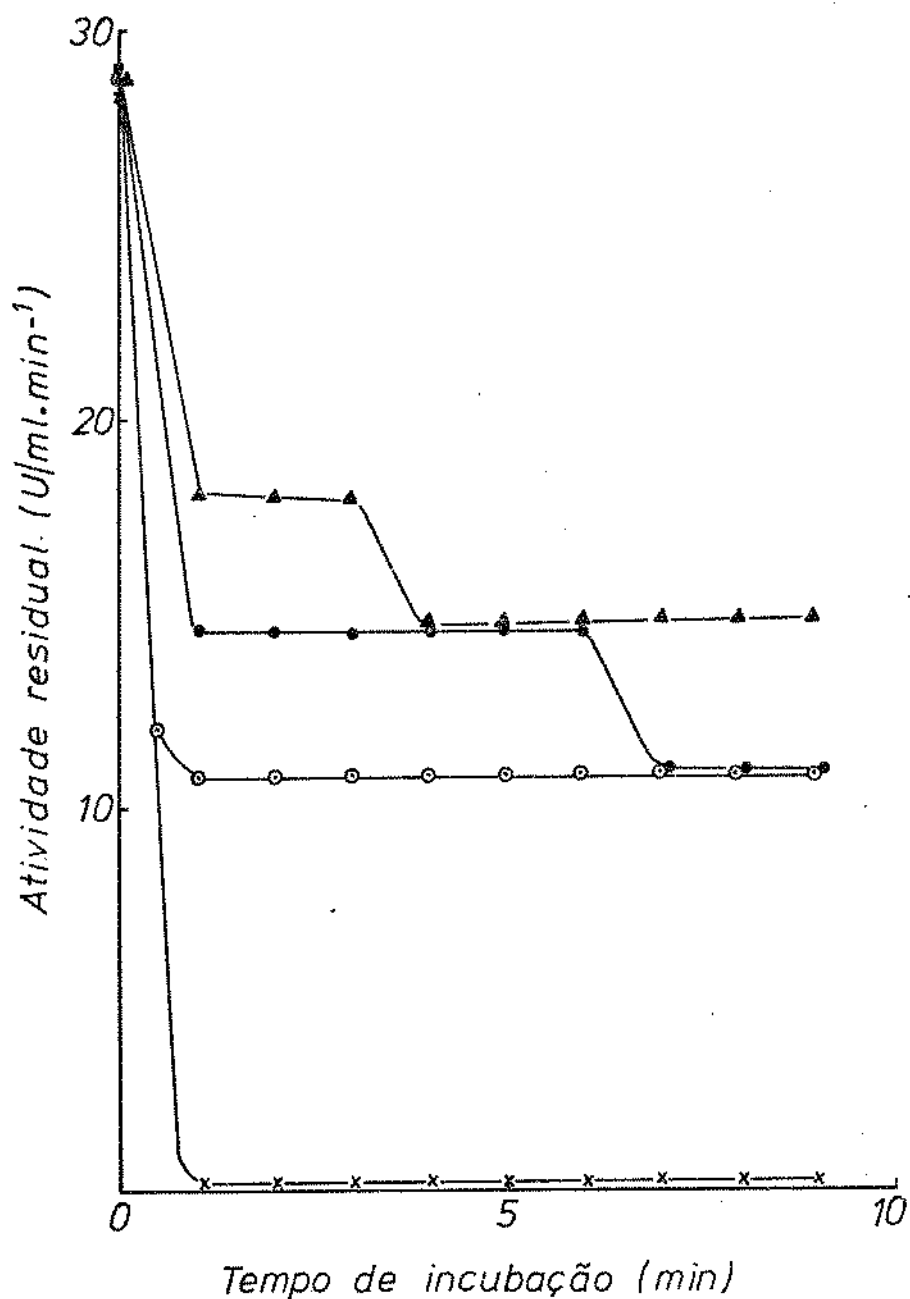


FIGURA 43 - Inibição da enzima do precipitado acetônico com metabissulfito de sódio: 2 ml de solução da enzima + 2 ml de metabissulfito 0,02 mM  $\Delta$ - $\Delta$ ; 2 ml de solução de enzima + 2 ml de metabissulfito 0,04 mM  $\bullet$ - $\bullet$ ; 2 ml de solução de enzima + 2 ml de metabissulfito 0,1 mM  $o$ - $o$ ; 2 ml de solução de enzima + 2 ml de metabissulfito 2 mM  $x$ - $x$ .

QUADRO 14

-Efeito da concentração da cisteína em diferentes substratos. A cubeta ensaio continha as várias concentrações de substratos, 1 ml de solução 0,166 mM ou 0,4 mM de inibidor e 10 µl de solução de enzima (precipitado acetônico), para um volume final de 3,5 ml.

Substrato (mM)	Concentração de cisteína			
	$4,7 \times 10^{-2}$		$11,4 \times 10^{-2}$	
	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
<b>Catecol</b>				
66	0	90	100	9,9
50	0	81	110	9,0
35	0	72	130	7,2
21	0	54	180	5,4
<b>DL-dopa</b>				
13,0	120	7,2	600	0
10,0	180	6,3	600	0
5,7	300	3,6	600	0
4,2	600	3,6	600	0
<b>Dopamina</b>				
3,5	40	22,5	140	2,7
2,5	40	18,0	230	1,8
1,4	40	16,2	300	1,6
1,0	40	14,4	360	0,9

QUADRO 15

Efeito inibitório do ácido ascórbico ( $2,3 \times 10^{-2}$  mM) em várias concentrações de diferentes substratos. A cubeta de ensaio continha as várias concentrações de substratos, 1 ml de solução 0,08 mM de inibidor, e  $10^{-4}$  l de solução de enzima (precipitado acetônico) para um volume final de 3,5 ml.

Catecol			DL-dopa			Dopamina		
conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade ( $U/ml \cdot min^{-1}$ )	conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade ( $U/ml \cdot min^{-1}$ )	conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade ( $U/ml \cdot min^{-1}$ )
80	10	57,6	80	60	18,0	3,00	0	40,0
50	12	54,0	40	120	10,8	1,50	0	36,0
25	13	40,0	30	160	7,2	0,64	0	32,4
20	25	36,0	20	300	3,6	0,21	10	28,8

QUADRO 16

Efeito do metabissulfito de sódio ( $3,7 \times 10^{-2}$  mM) em diferentes concentrações de substratos. A cubeta de ensaio continha as várias concentrações de substrato, 1 ml de solução 0,13 mM de inibidor e 10  $\mu$ l de solução de enzima (precipitado acetônico) para um volume final de 3,5 ml.

Catecol			Dopamina		
conc. (mM)	retardamento (seg)	atividade <sub>t=1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	conc. (mM)	retardamento (seg)	atividade <sub>t=1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
80	10	36,0	3,00	10	46,8
50	27	32,4	1,50	10	39,6
25	30	18,0	0,64	10	36,0
20	40	18,0	0,21	10	36,0

QUADRO 17

Efeito inibitório do ácido ditiocarbâmico ( $1,4 \times 10^{-2}$  mM) em várias concentrações de diferentes substratos. A cubeta de ensaio continha as várias concentrações de substratos, 1 ml de solução 0,05 mM de inibidor e 10 l de solução de enzima (precipitado acetônico) para um volume final de 3,5 ml.

Catecol				DL-dopa		Dopamina		
conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade (U/ml.min <sup>-1</sup> )	conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade (U/ml.min <sup>-1</sup> )	conc. (mM)	retarda-mento (seg)	atividade (U/ml.min <sup>-1</sup> )
80	0	180,0	5,7	0	36,0	0,70	0	54,0
50	0	103,5	4,0	0	34,2	0,50	0	48,5
25	0	72,0	2,8	0	16,2	0,35	0	40,5
20	0	58,5	1,5	0	13,0	0,20	0	31,5

Os experimentos realizados com a fração FE mostraram, conforme dados apresentados nos Quadro 18, 19 e 20, que o ácido ascórbico, além de produzir maior período de retardamento que a cisteína e metabissulfito de sódio, ainda revelou-se um inibidor - mais efetivo para a enzima, seguido de cisteína e metabissulfito de sódio. Com o DIECA, da mesma forma que para o precipitado acetônico, não se observou nenhum retardamento, embora inibisse a reação enzimática (Quadro 21).

O estudo do  $K_I$  foi realizado com o precipitado acetônico e diferentes concentrações de substratos e inibidores. Pelas Fig. 44, 45, 46 e 47, pode-se concluir que a cisteína tem uma inibição não competitiva, inicialmente passando para competitiva em concentrações superiores. Esse comportamento ocorre tanto para catecol como para dopamina como substrato. Com DL-dopa a inibição com baixa concentração de cisteína segue também cinética - não competitiva, como apresentado na Fig. 48, mas em concentrações superiores, torna-se difícil determinar o tipo de inibição, sendo que com 0,4 mM de cisteína houve inibição total da reação por um período prolongado. Com relação ao ácido ascórbico como inibidor, a inibição mostrou-se não competitiva na concentração de 0,08 mM (Fig. 49), sendo que em concentrações superiores a cinética apresentou-se mista. Ao mesmo tempo, nesses experimentos cinéticos, só foi determinado o tipo de inibição utilizando catecol como substrato.

QUADRO 18

Efeito inibitório da cisteína em diferentes concentrações de catecol.

A cubeta ensaio continha as várias concentrações de catecol, 1 ml de solução (0,08, 0,17 ou 0,4 mM) de cisteína e  $10^{-4}$  l de solução de enzima (FE) para um volume final de 3,0 ml.

Catecol (mM)	Cisteína ( $2,8 \times 10^{-2}$ mM)		Cisteína ( $5,5 \times 10^{-2}$ mM)		Cisteína ( $13,3 \times 10^{-2}$ mM)	
	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
66	0	126	0	123	12	108
50	0	117	2	105	15	90
33	0	95	3	90	17	63
25	0	81	6	72	25	54



QUADRO 19

Efeito inibitório do metabissulfito de sódio em diferentes concentrações de catecol.

A cubeta ensaio continha as várias concentrações de catecol, 1 ml de solução (0,03, 0,06 ou 0,24 mM) de metabissulfito e  $10 \mu\text{l}$  de solução de enzima (FE) para um volume final de 3,0 ml.

Catecol (mM)	Metabissulfito ( $1 \times 10^{-2}$ mM)		Metabissulfito ( $2 \times 10^{-2}$ mM)		Metabissulfito ( $8 \times 10^{-2}$ mM)	
	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
66	0	180	0	162	10	135
50	0	153	0	144	13	126
33	0	138	0	126	17	99
25	0	123	0	120	20	90

QUADRO 20

Efeito inibitório do ácido ascórbico em diferentes concentrações de catecol.

A cubeta ensaio continha as várias concentrações de catecol, 1 ml de solução (0,008, 0,04 ou 0,08 mM) de ácido ascórbico e 10  $\mu$ l de solução de enzima (FE) para um volume final de 3,0 ml.

Catecol (mM)	Ac. ascórbico (0,3x10 <sup>-2</sup> mM)		Ac. ascórbico (1,3x10 <sup>-2</sup> mM)		Ac. ascórbico (2,7x10 <sup>-2</sup> mM)	
	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
66	0	162	21	126	60	81
50	0	153	31	108	75	72
33	0	144	31	99	90	63
25	0	117	35	90	100	54

QUADRO 21

Efeito inibitório do ácido ditiocarbâmico (DIECA) em diferentes concentrações de catecol. A cubeta ensaio continha as várias - concentrações de catecol, 1 ml de solução (0,05 ou 0,02 mM) de DIECA e 10 µl de solução de enzima (FE) para um volume final de 3,0 ml.

Catecol (mM)	DIECA ( $1,7 \times 10^{-2}$ mM)		DIECA ( $0,7 \times 10^{-2}$ mM)	
	retardamento (seg)	atividade <sub>-1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )	retardamento (seg)	atividade <sub>-1</sub> (U/ml.min <sup>-1</sup> )
66		252		234
50		171		144
33		162		135
25		126		126

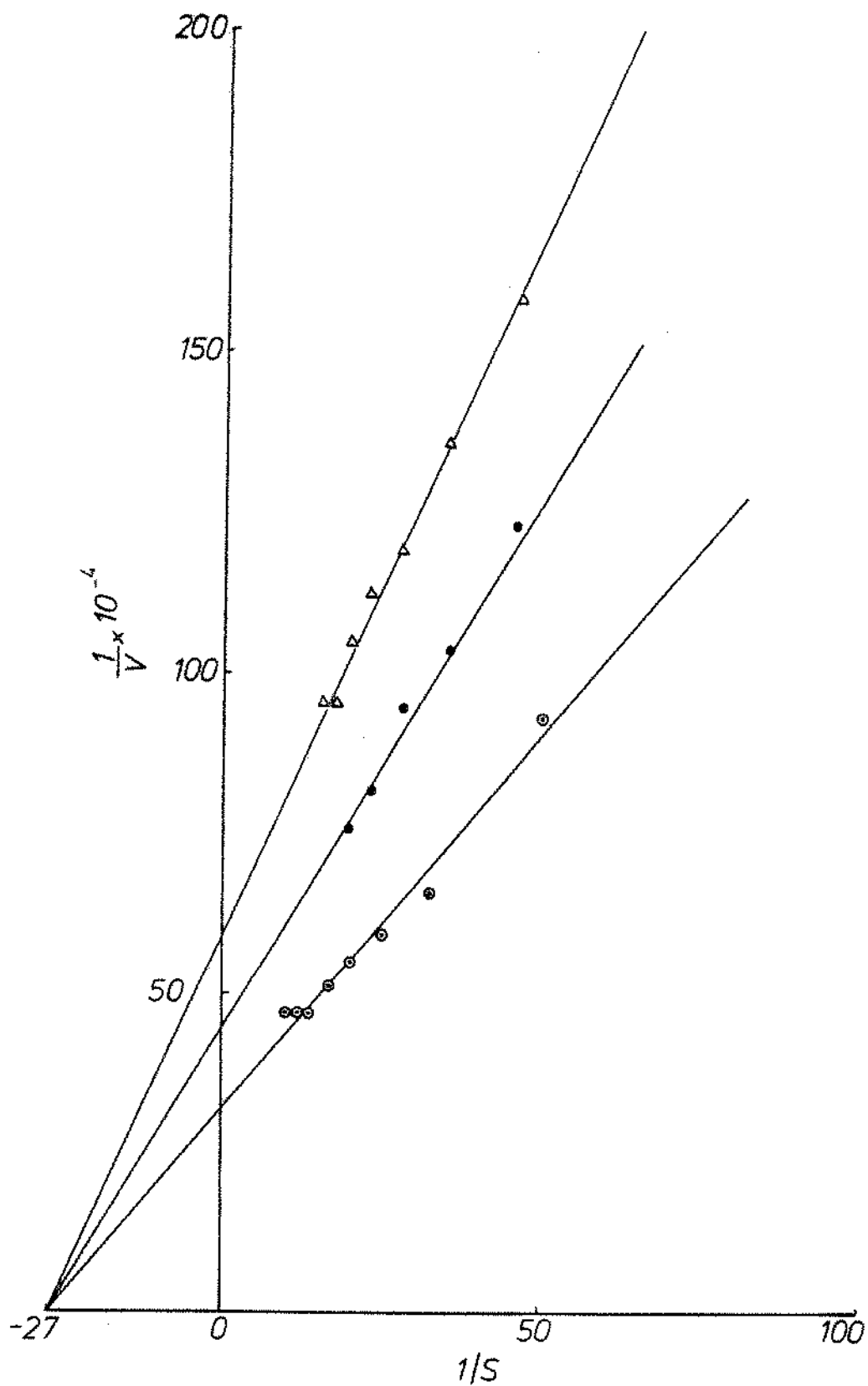
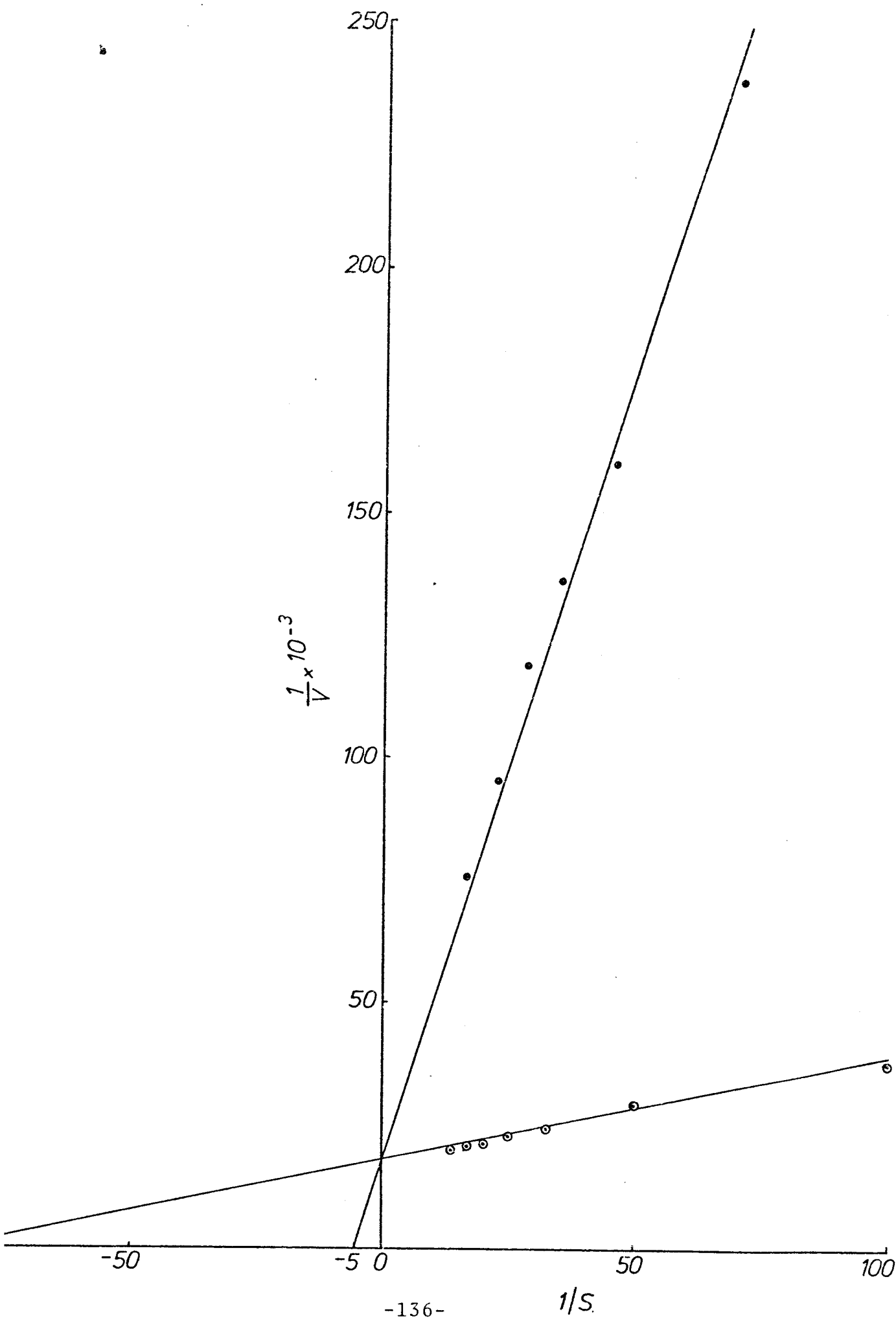


FIGURA 44 - Determinação de  $K_I$  segundo Lineweaver-Burk, com diferentes concentrações de cisteína: catecol sem inibidor o-o; catecol contendo cisteína de 0,028 mM -  $K_I = 6,0 \times 10^{-5}$  o-•; catecol contendo cisteína 0,055 mM  $K_I = 6,0 \times 10^{-5}$  M Δ-Δ.

FIGURA 45 - Determinação do  $K_I$  no precipitado acetônico, segundo Lineweaver-Burk. Catecol sem inibidor o-o; catecol contendo cisteína 0,133 mM  $K_I = 2,8 \times 10^{-5}$  M.-.



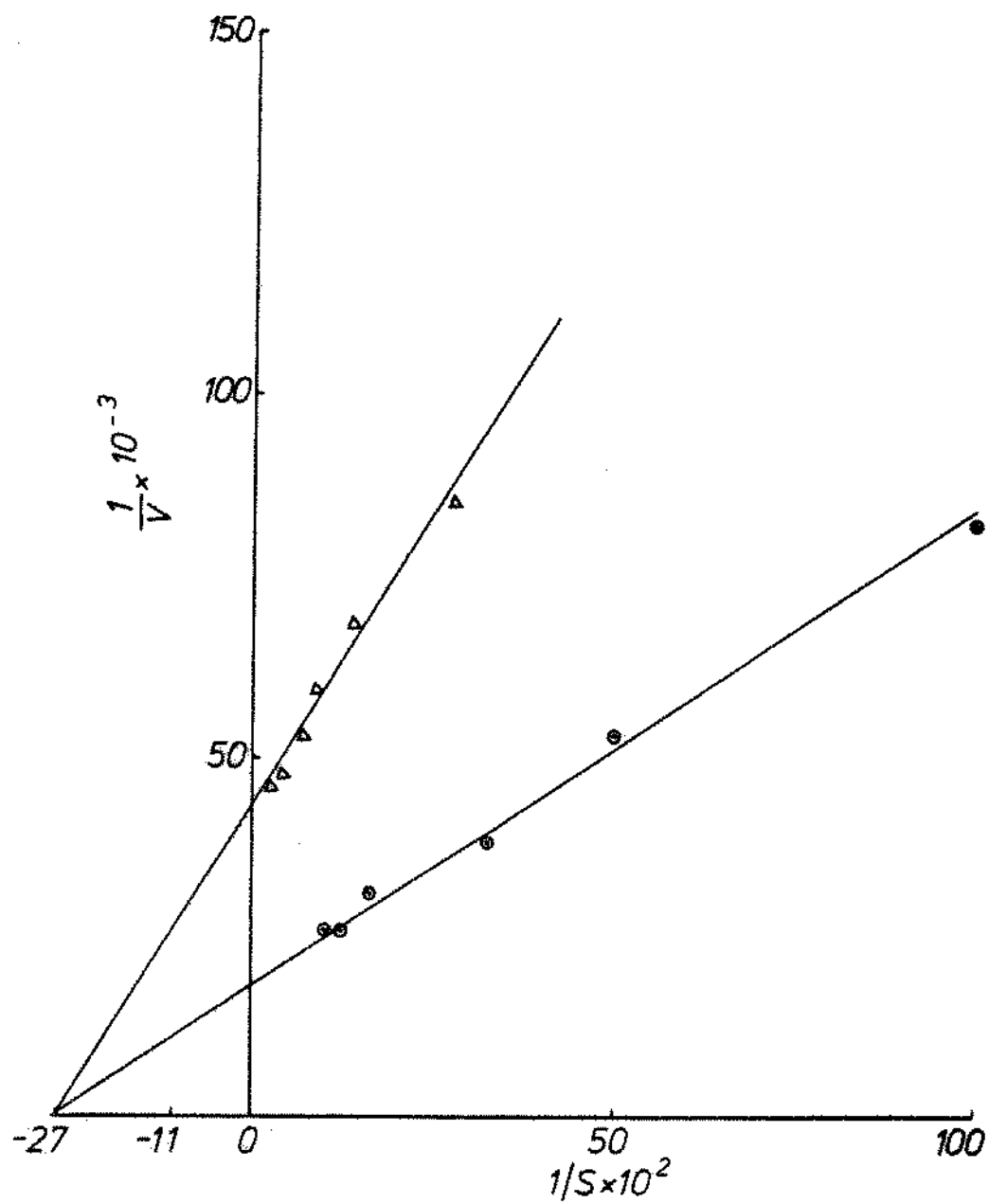
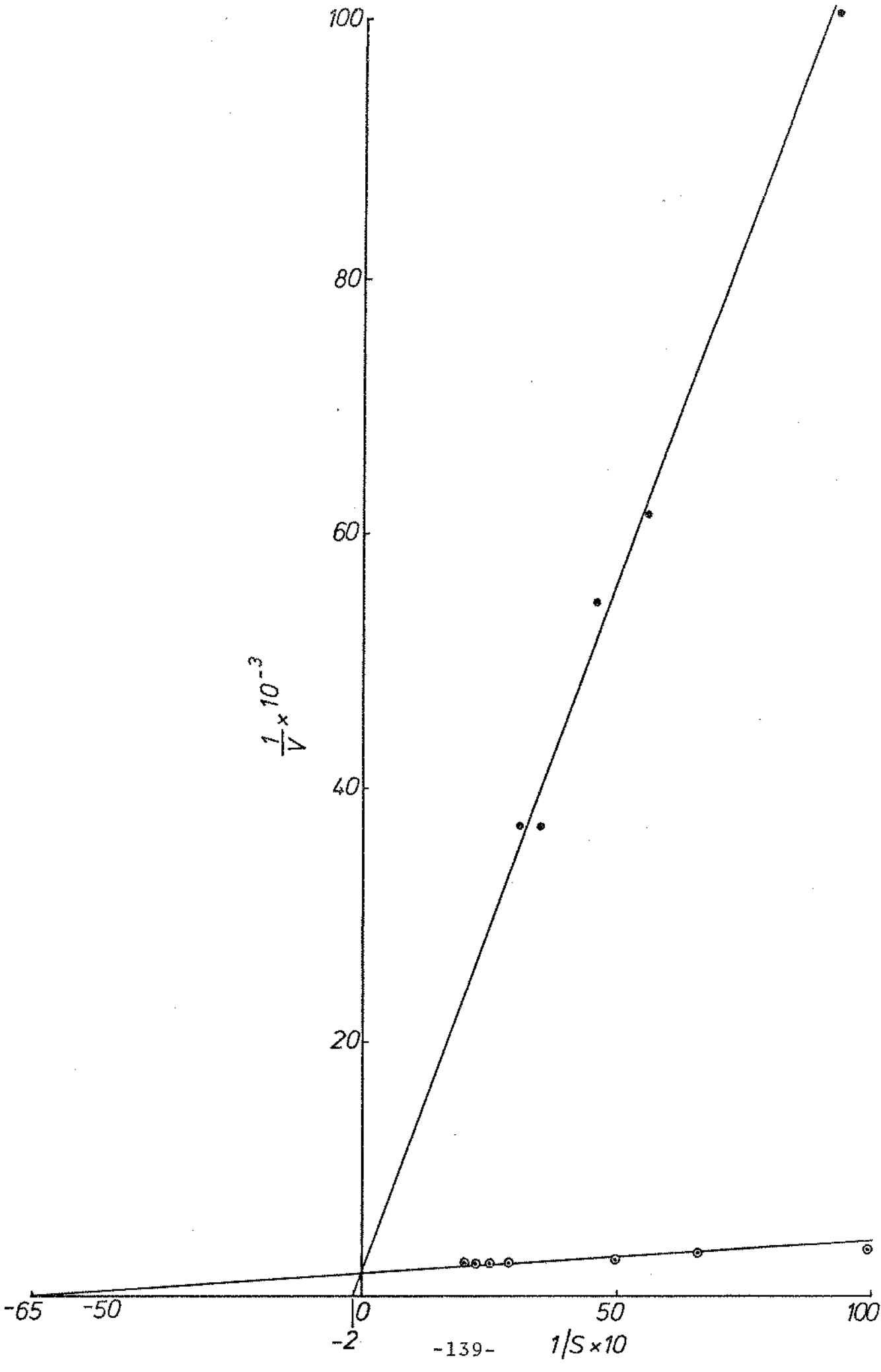


FIGURA 46 - Determinação de  $K_I$  no precipitado acetônico, utilizando dopamina como substrato sem inibidor o-o; contendo cisteína - 0,055 mM  $K_I = 3,3 \times 10^{-5}$  Δ-Δ.

FIGURA 47 - Determinação de  $K_I$  no precipitado acetônico, utilizando dopamina como substrato, sem inibidor o-o ; contendo 0,133 mM,  $K_I = 4,8 \times 10^{-6} M$  .-.





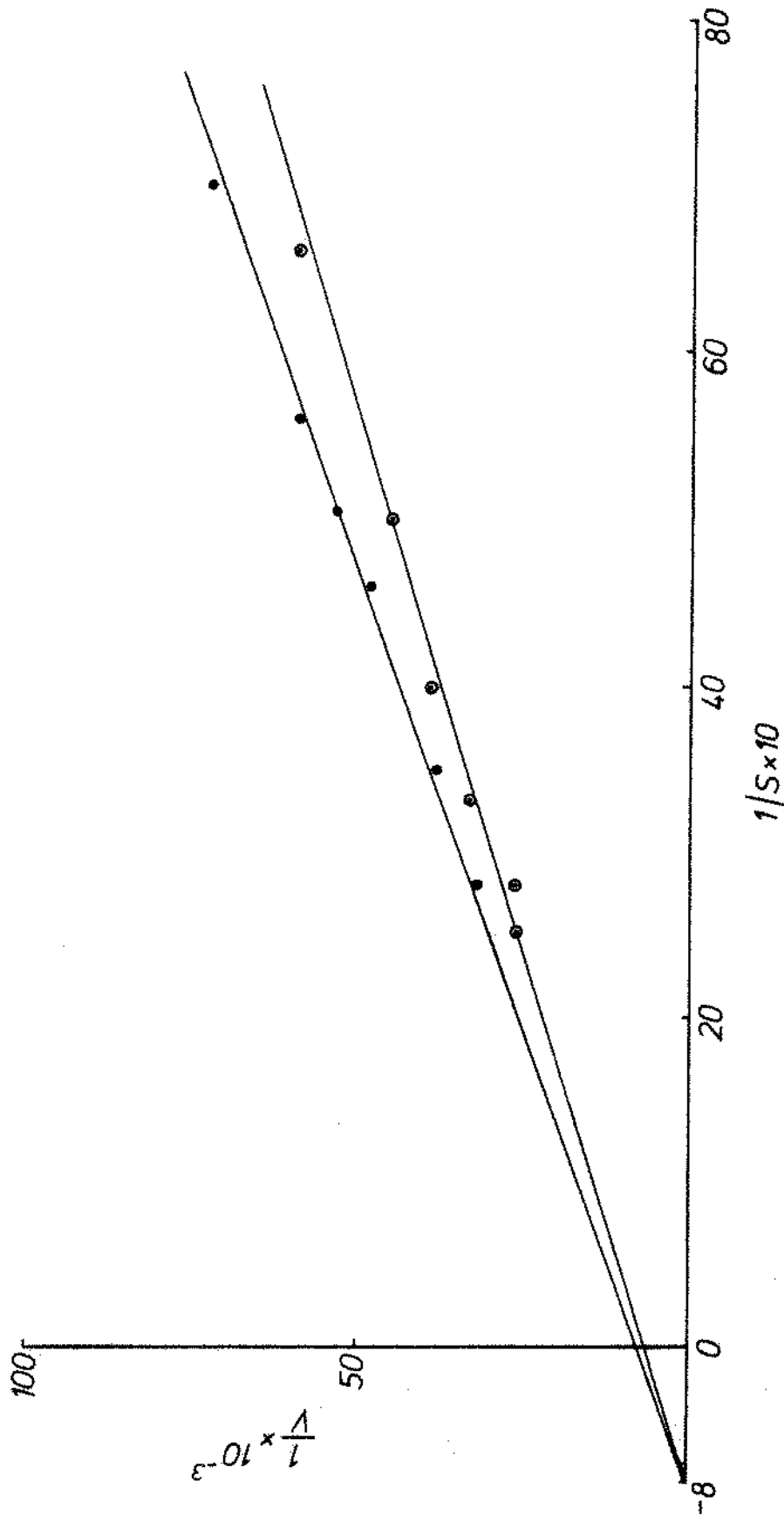
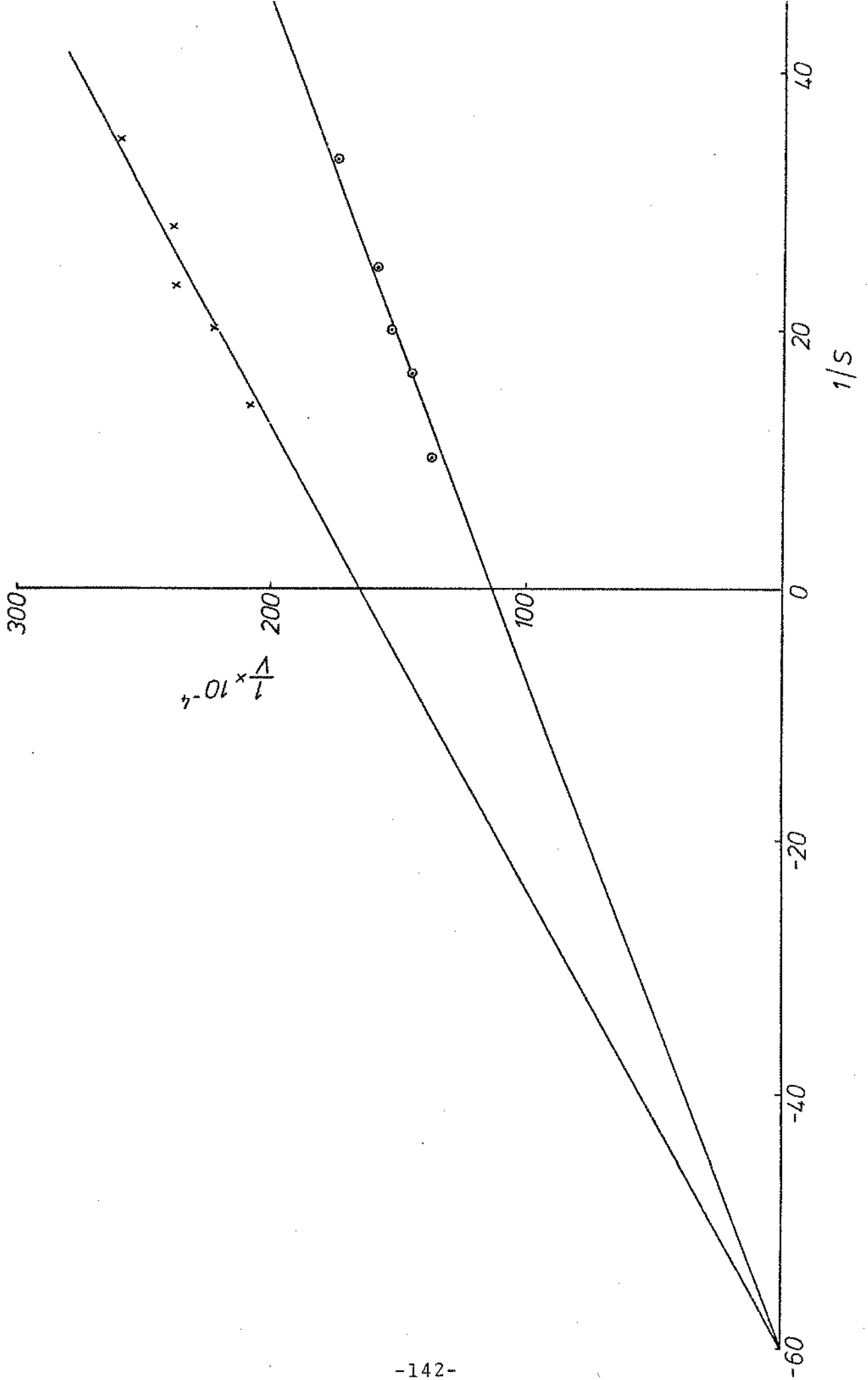


FIGURA 48 - Determinação do  $K_I$  no precipitado acetônico utilizando DL-dopa como substrato. DL-dopa sem inibidor o-o; DL-dopa contendo cisteína, 0,028 mM  $K_I = 1,5 \times 10^{-5}M$  .-.

FIGURA 49 - Determinação do  $K_I$  no precipitado acetônico, utilizando catecol como substrato. Sem inibidor o-o; com catecol contendo ácido ascórbico 0,027 mM,  $K_I = 5,13 \times 10^{-5}$  - x-x.



Os mesmos estudos foram realizados utilizando a fração FE e catecol como substrato para a reação enzimática. Pelas Fig. 50 e 51, pode se verificar que para as concentrações utilizadas de ácido ascórbico e metabissulfito de sódio a cinética apresentou-se não competitiva. Para a cisteína, a cinética é não competitiva a baixas concentrações do inibidor, passando a competitiva para concentrações superiores (Fig. 52).

Entretanto, embora não se tenha podido definir o tipo de inibição para a reação enzimática no precipitado acetônico, quando se utilizou DIECA como inibidor com a fração FE, a cinética sugere, nas concentrações utilizadas, inibição ao nível do substrato (Fig. 53).

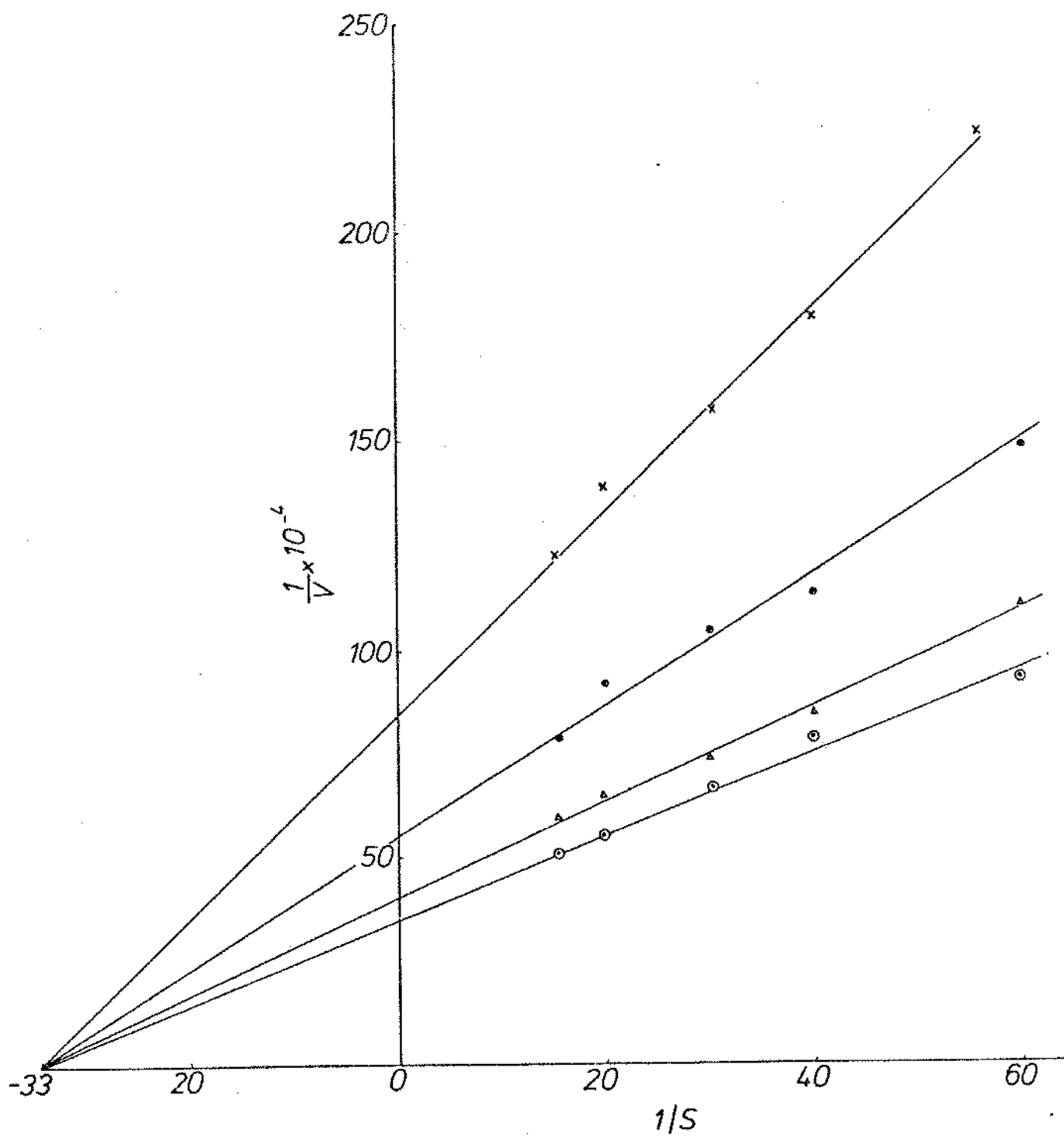


FIGURA 50 - Determinação  $K_I$  na fração FE, utilizando catecol como substrato: sem inibidor o-o; catecol contendo as seguintes concentrações de ácido ascórbico: 0,003 mM - ( $K_I = 1,3 \times 10^{-5} M$ ); 0,013 mM .-. ( $K_I = 1,6 \times 10^{-5} M$ ) ; 0,027 mM x-x ( $K_I = 9,3 \times 10^{-6} M$ ).

FIGURA 51 - Determinação do  $K_I$  na fração PE utilizando catecol como substrato. Sem inibidor o-o; catecol contendo as seguintes concentrações de metabissulfito de sódio: 0,01 mM,  $K_I = 1,5 \times 10^{-4}$  M .-.; 0,02 mM,  $K_I = 1,5 \times 10^{-4}$   $\Delta$ - $\Delta$  ; 0,08 mM,  $K_I = 1,5 \times 10^{-4}$  x-x.

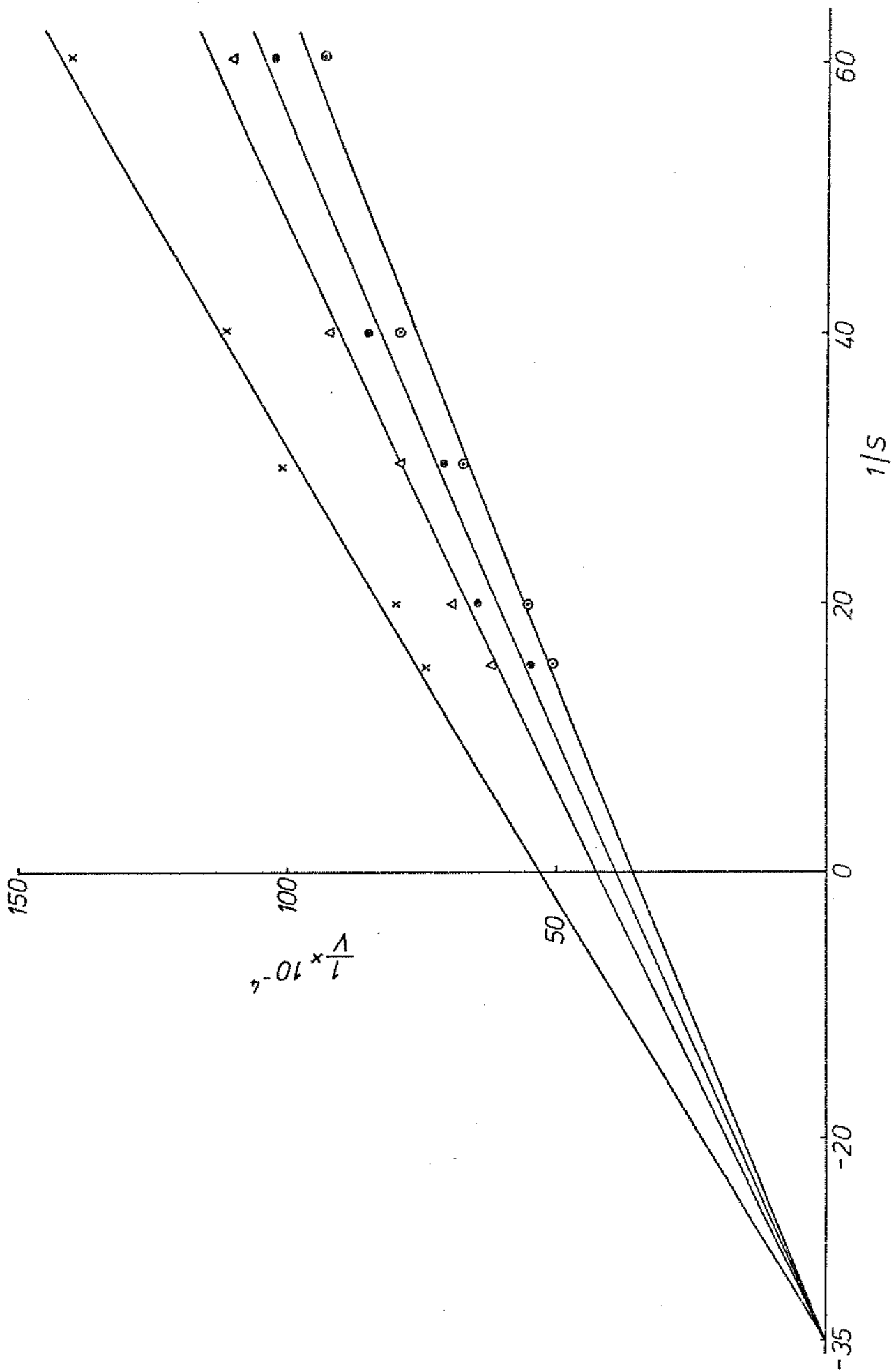
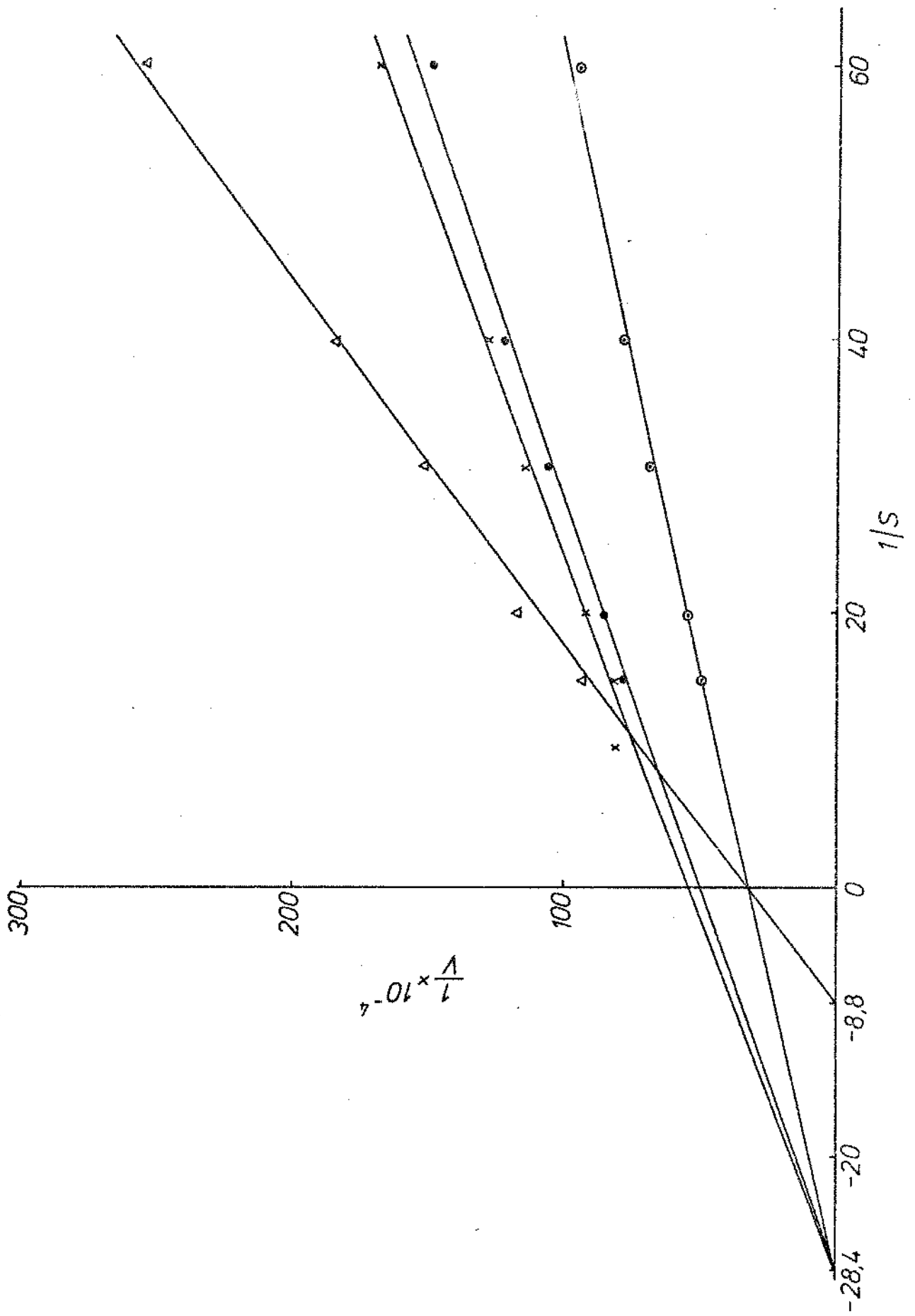




FIGURA 52 - Determinação do  $K_I$  na fração FE utilizando catecol como substrato. Sem inibidor o-o; catecol contendo as seguintes concentrações de cisteína: 0,028 mM ,  $K_I = 3,6 \times 10^{-5}$ ; 0,055 mM,  $K_I = 9,0 \times 10^{-5}$ ; 0,133 mM,  $K_I = 2,8 \times 10^{-5}$ M.



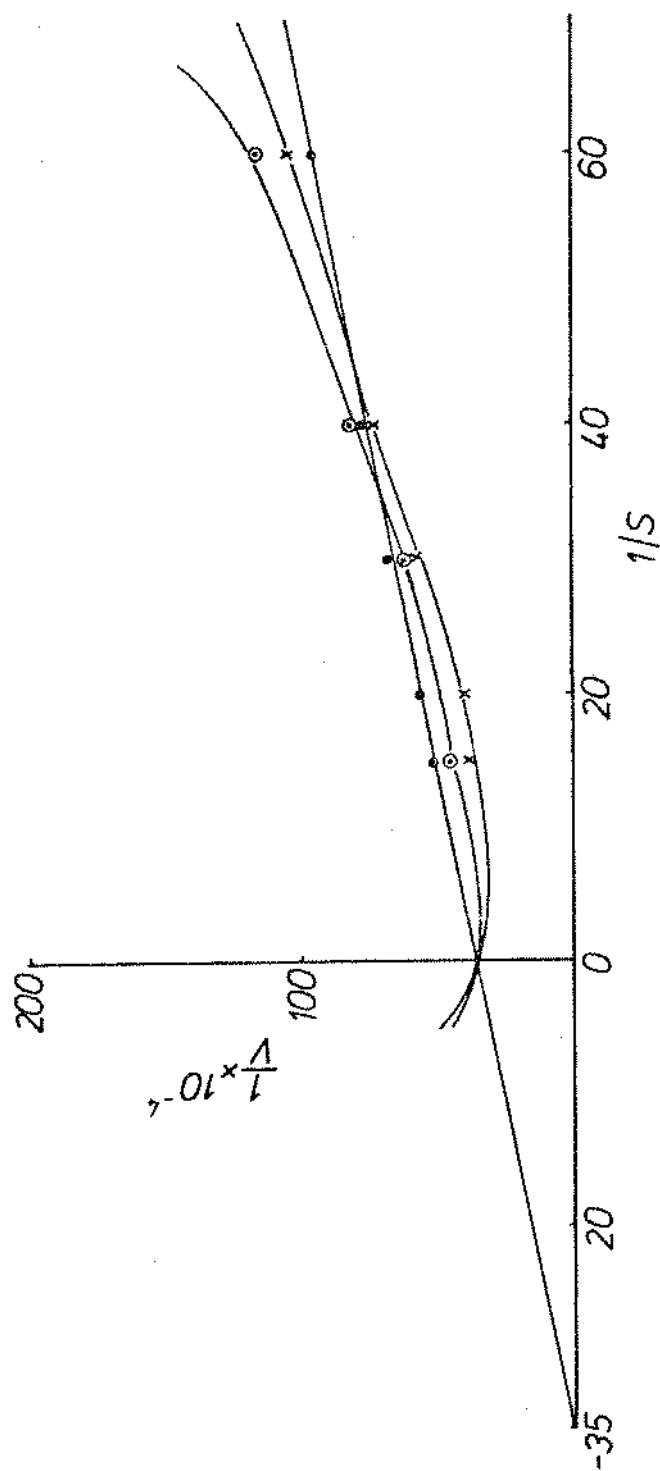


FIGURA 53 - Curvas de inibição da fração FE utilizando catecol como substrato:  
 sem inibidor .-.; catecol contendo DIECA nas concentrações: 0,017  
 mM x-x; 0,007 mM o-o.

#### 4.4.13. Análise espectrofotométrica

A enzima no estágio final de purificação foi analisada quanto ao seu perfil espectrofotométrico. A Fig. 54 mostra o espectro da enzima no estágio final de purificação, um pico característico a 279 nm e um "ombro" na faixa de 330 nm a 370 nm. Dos substratos analisados, o ácido clorogênico apresenta um pico de 330 a 340 nm. A Fig. 55 mostra que o ácido clorogênico tem o seu espectro de absorção modificado pela adição de 10 µl da solução da enzima purificada, com um aumento do pico de absorção na faixa de 300 a 340 nm, sem contudo formar dopacromos característicos na região do visível. Após 5 minutos da adição da enzima, esse pico a 330 nm diminui.

#### 4.4.14. Identificação dos compostos fenólicos

A presença de compostos fenólicos na preparação enzimática em estado semi-purificado foi analisada por fluorescência e cromatografia em papel. Amostras concentradas de ácido clorogênico, enzima purificada e albumina de soro bovino, foram aplicadas em papel Watman nº 1 que, depois de secos, foram analisados numa câmara com luz ultra-violeta em comprimento de onda 370 nm. O ponto correspondente ao ácido clorogênico e a amostra purificada apresentaram fluorescência característica. A identificação da presença de ácido clorogênico foi analisada por cromatografia em papel, utilizando como solvente butanol:ácido acético:água (4:1:2,2). - Pela Fig. 56 podemos verificar que tanto a análise de fluorescência quanto a determinação de compostos fenólicos, são coinciden-

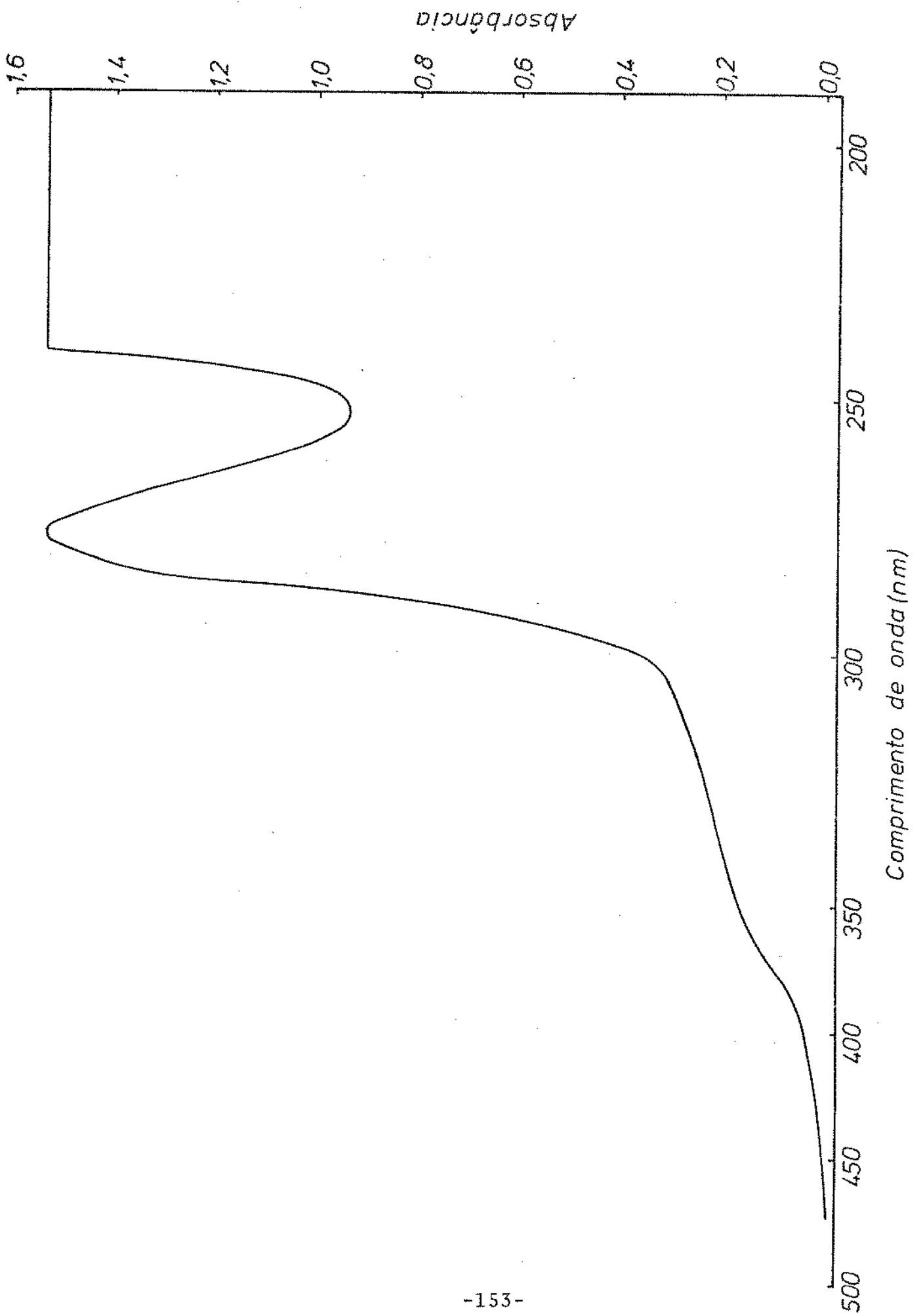
tes em relação ao Rf 0,57 para ácido clorogênico e para o componente desconhecido que migra da enzima purificada.

#### 4.4.15. Efeito de íons na atividade da polifenoloxidase.

Os experimentos realizados com a enzima da fração FE e sais de diferentes tipos, apresentaram diferenças nítidas quanto ao efeito do íon na inativação da enzima. O Quadro 22 mostra que a ordem de inibição com relação aos metais utilizados foi  $Fe^{+2} > Ca^{+2} > Zn^{+2} > Fe^{+3} > Cu^{+2}$ , sendo que este último apresentou pequena inativação nas duas concentrações utilizadas.

É interessante notar no mesmo Quadro, que o íon  $NH_4$  é importante na reação enzimática, produzindo ativação que é proporcional à sua concentração no meio. Igualmente, o nucleotídeo  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, apresenta ativação da enzima nas concentrações de 0,001 e 0,002-mM, enquanto que não se observou nenhum efeito na concentração igual e superior a 0,055 mM.

FIGURA 54 - Espectro da fração FG na faixa de comprimento de on  
da de 200 nm a 450 nm.



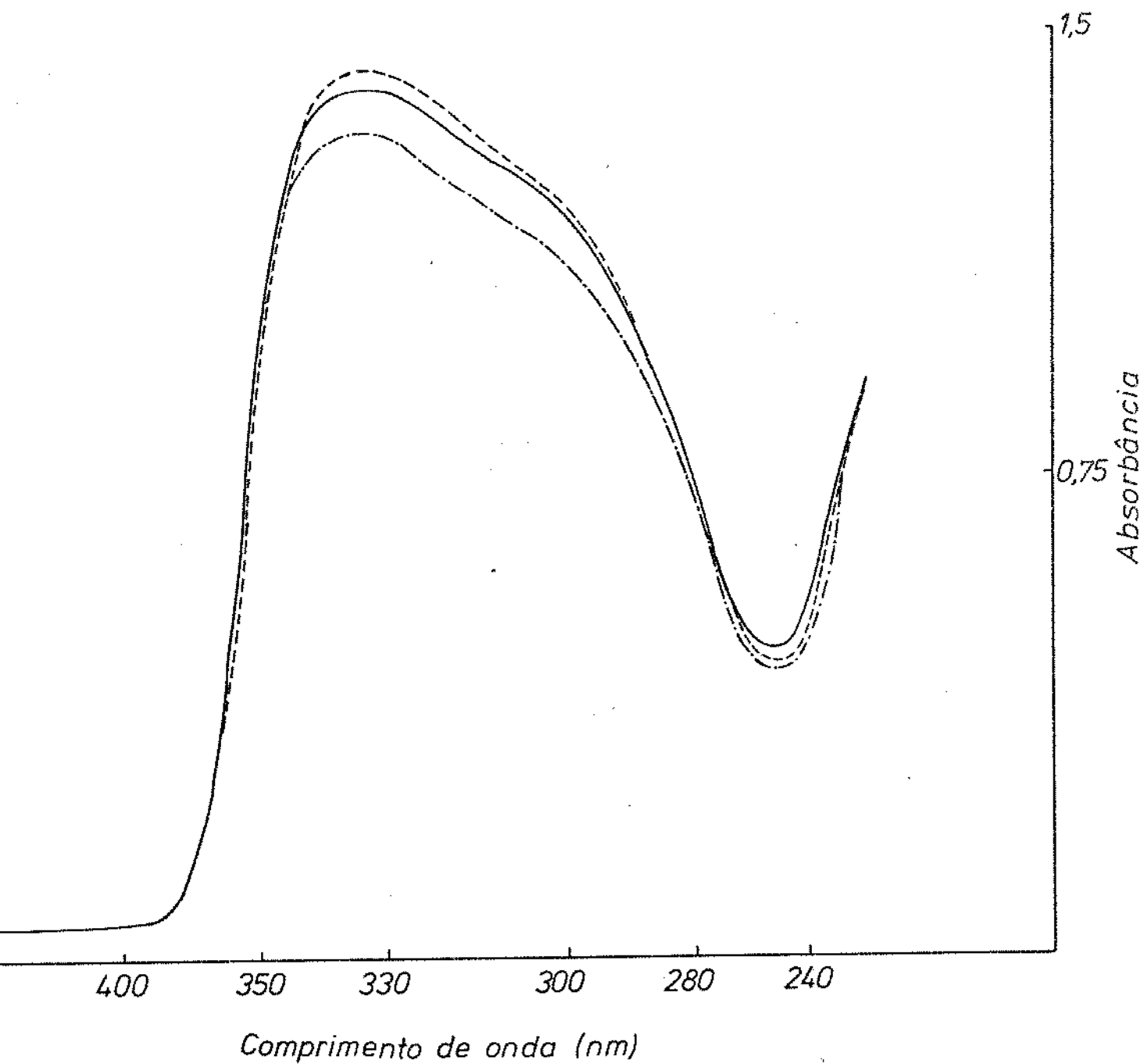


FIGURA 55 - Análise espectrofotométrica da reação enzimática com ácido clorogênico. Ácido clorogênico  $10^{-6}M$  .-. Ácido clorogênico (3ml) + 10 µl da solução de enzima purificada ---; após 5 min da adição da enzima —.



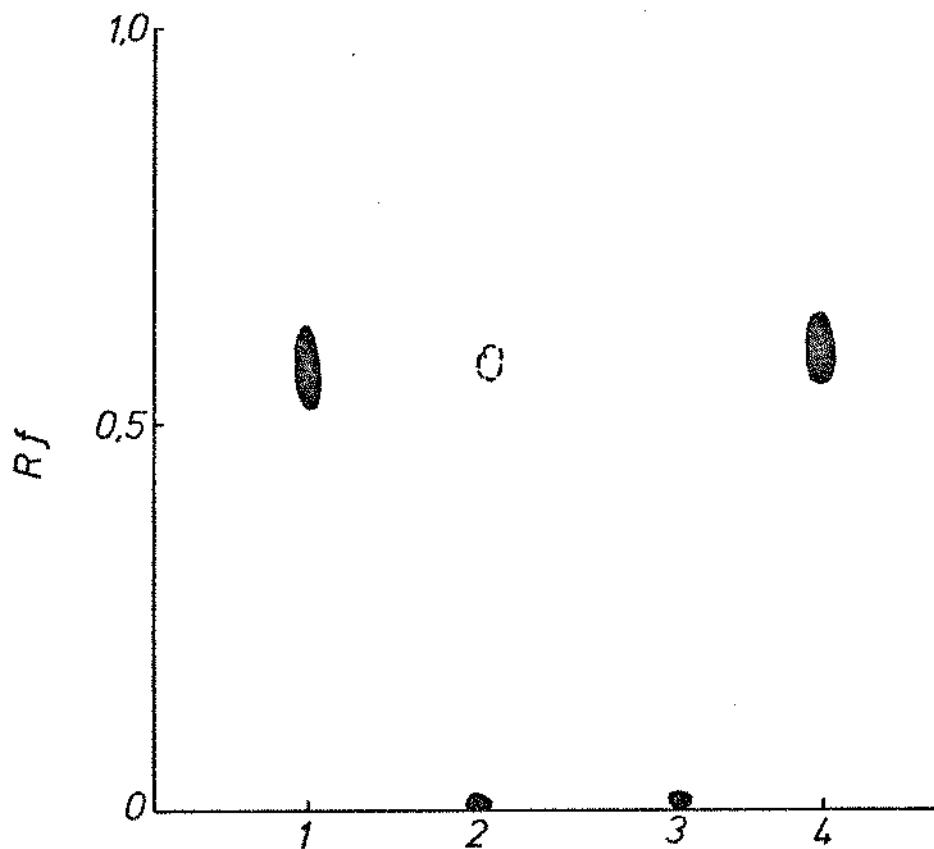


FIGURA 56 - Cromatografia em papel Watman nº 1 de 20 x 15 cm em mistura butanol:ácido acético:água (4:1:2,2).  
 1. Ácido clorogênico (20 µg). 2. Fração FG (50µg)  
 3. Albumina de soro bovino (50 µg). 4. Ácido clorogênico (100 µg).

QUADRO 22

Efeito de íons na atividade enzimática (FE). A cubeta ensaio continha 3,0 ml de catecol 0,08 M, 50 µl de soluções dos diferentes sais em concentração final descrita abaixo e 10 µl da solução de enzima (FE). A cubeta controle não continha solução de sal.

sais	conc. mM	Atividade U/ml.min <sup>-1</sup>	Atividade % do controle
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0166	162	90
CuCl	0,0166	180	100
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,033	162	90
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,0166	144	80
FeSO <sub>4</sub>	0,0166	108	60
CaCl <sub>2</sub>	0,0166	126	70
MgSO <sub>4</sub>	0,0166	180	100
NH <sub>4</sub> Cl	0,0166	180	100
NH <sub>4</sub> Cl	0,033	216	120
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0166	180	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,033	252	140
ZnSO <sub>4</sub>	0,0166	126	70
βNAD <sup>+</sup>	0,0010	252	140
βNAD <sup>+</sup>	0,0020	288	160
βNAD <sup>+</sup>	0,055	180	100
MnCl <sub>2</sub>	0,0166	180	100

## 5. DISCUSSÃO

A localização da polifenoloxidase tem sido investigada em diferentes partes dos tecidos vegetais. Samisch (108), mostrou em fatias de damasco que o escurecimento se verificava com maior velocidade nos feixes vasculares do que no pericarpo da fruta. Em banana madura verificou-se que a polifenoloxidase localiza-se em maior concentração na região central próxima às sementes abortivas da fruta (84).

Um dos fatores que parece interferir na atividade da polifenoloxidase da banana é a alta concentração de tanino que ocasiona escurecimento e interações com outros constituintes da célula, provocando reações indesejáveis. Estudos realizados sobre o amadurecimento de diversas variedades de bananas, mostraram que as oxidases, principalmente a polifenoloxidase, apresentavam um aumento sensível da atividade durante o amadurecimento (113). Este fato, provavelmente, estaria relacionado com a presença de substâncias fenólicas solúveis em grande concentração na fruta-verde, combinando-se com proteínas ativas de uma forma inibitória.

A maior concentração de tanino e amido verifica-se na fruta verde, sendo que o primeiro distribui-se longitudinalmente em células específicas na região das sementes abortivas (8). Com o amadurecimento da fruta, esses taninos se polimerizam com substâncias fenólicas, formando complexos insolúveis de alto peso molecular, - que apresentam menores interferências com as proteínas. O amido

por sua vez é transformado em açúcares e polissacarídeos solúveis.

Portanto, o estudo do melhor estágio de amadurecimento da banana, no sentido de se obter a enzima na fruta de forma mais solúvel e mais ativa, mostrou-nos que a banana em início de amadurecimento, apresentou na parte central, próximo às sementes abortivas, a maior atividade de polifenoloxidase (Fig. 1).

Sob esse ponto de vista, a eficiência da extração enzimática - obtida de várias fontes vegetais, está na dependência da inativação dos taninos. Loomis e Battaile (69), discutiram a utilização de vários polímeros que previnem a inativação de enzimas durante a extração, complexando-se com taninos e produtos da ação da polifenoloxidase. Um deles é o polietilenoglicol (PEG) e, apesar desse composto ter mostrado grande eficiência na extração de polifenoloxidases, evitando a inibição de tanino e polifenóis (88), o PVP insolúvel tem sido utilizado em muitos casos para insolubilizar os compostos fenólicos dos extratos vegetais (125). Existem poucas evidências da localização real da polifenoloxidase nas frações sub-celulares. A maioria das polifenoloxidases parecem se encontrar na fração solúvel da célula, uma vez que a não utilização de PVP no meio de extração, resulta na obtenção de parte da enzima na forma solúvel.

Palmer (93), em estudos com bananas, mostrou que as reações de escurecimento verificavam-se na superfície de fragmentos de te

cidos sedimentados por centrifugação, sugerindo que a polifenol oxidase estava absorvida ou associada estruturalmente com a parede celular. A utilização de detergentes não iônicos em suas preparações aumentaram a atividade enzimática pela maior solubilização da enzima.

Dados obtidos em nosso trabalho evidenciam que pela alta extração obtida com a utilização de PVP e Triton X-100 no meio de extração (Quadro 1), a enzima estará parcialmente solúvel, sendo que ela pode se ligar a frações insolúveis, tanto sub-celulares, como polissacarídicas, que são precipitadas juntamente com a proteína no extrato acetônico (Quadro 11). A maior eficiência de extração da enzima foi obtida pela re-extração do precipitado acetônico com Triton X-100 e a estocagem da solução a  $-40^{\circ}\text{C}$ , por tempo não inferior a 7 dias (Fig. 9). Esse congelamento como etapa intermediária da purificação, é muito importante para liberar a enzima na forma solúvel, quebrando, possivelmente, as ligações entre proteínas e compostos insolúveis. Essa etapa de purificação não só torna o extrato enzimático mais limpo como produz um aumento da atividade específica (Quadro 9). Esta estocagem a  $-40^{\circ}\text{C}$  favorece uma boa resolução no fracionamento da enzima por cromatografia em coluna de Sephadex G-100. (Fig. 5).

Vários trabalhos de purificação em coluna de DEAE-celulose, CM-celulose e mesmo Sephadex G-100, mostram a separação da enzima em diferentes picos com pesos moleculares múltiplos. Os autores são concordantes em sugerir que, se por um lado essas intercon-

versões possam ser resultantes do processo de extração e purificação, por outro lado representam vários graus de agregação de sub-unidades de uma mesma enzima (39, 94).

Palmer (93), com polifenoloxidase de banana, obteve por purificação em DEAE-celulose, uma única fração, apresentando um grau de purificação de 10 a 12 vezes. Os resultados obtidos com banana nanica, foram melhorados pela cromatografia em Sephadex G-100, após congelamento da enzima, obtendo-se uma fração com um grau de purificação de 18 vezes, eliminando-se assim, grande parte dos pigmentos remanescentes após precipitação acetônica, e proteínas contaminantes não ativas (Quadro 10 e Fig. 7 e 18).

O baixo rendimento protéico obtido após essa purificação, conduziu-nos a utilizar, em escala preparativa, a purificação da enzima através de eletroforese em gel de poliacrilamida, obtendo-se assim, uma fração enzimática com alta atividade específica, sendo que o grau de purificação final foi de 39 vezes. Essa fração, após eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrou que as bandas obtidas, tinham atividade enzimática como evidenciado pela revelação com catecol na Fig. 19.

O espectro de absorção encontrado para a enzima, indicou-nos um pico em 279 nm, característico de proteínas em geral e um "ombro" entre 320 e 350 nm, sendo que a relação entre a absorção em 330 e 279 nm foi de 0,11 (Fig. 55). Os nossos resultados assemelham-se aos dados obtidos com tirosinase purificada a partir de cogu

melo (15). Esses autores observaram que a relação:

$$A_{330}/A_{280 \text{ nm}}$$

variou de 0,11 a 0,06 para as quatro frações enzimáticas obtidas tendendo a aumentar com o tempo de estocagem, gerando também, o aparecimento de coloração marrom na solução.

Estudos preliminares, na tentativa de identificar essa absorção em 330 nm, sugeriram-nos, através de cromatografia em papel, a presença de compostos fenólicos (Rf 0,57), ligados à molécula - protéica, assemelhando-se com a mobilidade encontrada para o ácido clorogênico, também com Rf 0,57 (Fig. 56). A mancha correspondente ao composto fenólico no cromatograma e a da solução da enzima purificada, apresentaram forte fluorescência branco azulada, quando submetidas à luz de comprimento de onda de excitação em 370 nm, semelhante à fluorescência observada para o ácido clorogênico. O mesmo tipo de fluorescência foi identificado em fenolase purificada de batata (94). É interessante notar também que essa absorção só foi observada em polifenoloxidases presentes em tecidos de diferentes vegetais e não em tecido animal.

Gregory e Bendall (34), também observaram esse "ombro" em 330 nm em frações purificadas de chá, o qual foi justificado pelo alto teor de cobre encontrado na preparação. Em nossos experimentos, a porcentagem de cobre encontrada, foi considerada desprezível, o que não justifica, portanto, a absorção obtida em 330 nm.

A análise eletroforética, em gel de poliacrilamida nos diferentes estágios de purificação da polifenoloxidase de banana, mostrou que as formas moleculares permanecem íntegras nos diferentes estágios, sendo que com a enzima purificada, houve o desenvolvimento mais nítido de uma banda de RM 0,49, a qual, aparentemente, apresentava-se sobreposta na fração FE (Fig. 34 e 19). O número de bandas ativas, utilizando-se incubação dos géis de poliacrilamida com diferentes substratos, foram iguais, diferindo em apenas uma banda com D-dopa (RM 0,36), a qual só foi evidenciada após lavagens sucessivas com álcool (Fig. 20).

Resultados obtidos por Montgomery e Sgarbieri (84), utilizando extrato cru do centro da polpa de banana, mostraram bandas em número de 2 a 9 que variaram de acordo com os diferentes substratos, sendo a de maior número correspondente ao catecol e dopamina. A grande multiplicidade de bandas encontradas por esses autores, deve-se ao fato de que os géis continham Tween-80. Por outro lado, os géis eram incubados com os substratos contendo 0,05% de parafenilendiamina, que por sua habilidade em se complexar com quinonas, produzia artefatos nos géis (Fig. 33 e 35).

Em relação à especificidade da enzima pelos seus substratos, embora qualitativamente não apresente grandes diferenças quando analisadas através da determinação de  $K_M$  (Quadro 12), a polifenoloxidase de banana mostrou ter maior especificidade para dopamina, que foi identificada como sendo o substrato natural mais abundante da banana (35).



Embora a polifenoloxidase de banana nanica pareça ser semelhante às enzimas de diferentes fontes como batata doce (25), tabaco (18) e folha de chá (137), as formas moleculares múltiplas da polifenoloxidase parecem mostrar diferenças de especificidade, dependendo da fonte de que provém. Trabalho ainda não publicado, (31), realizado com polifenoloxidase de banana-maçã, mostra que a enzima obtida no extrato bruto, foi também específica para o-difenóis. Entretanto, essas formas moleculares diferem das de banana nanica pela mobilidade eletroforética e intensidade de desenvolvimento de dopacromo, quando se utilizou dopamina e catecol como substratos na eletroforese em gel de poliacrilamida.

Sgarbieri e col (111) mostraram que o genoma balbisiana (B) existente nos triplóides AAB e ABB mais comuns nas diferentes espécies de bananas é responsável pela menor atividade encontrada nas frutas. O fato de termos obtido diferenças nas formas moleculares da banana nanica, genoma AAA e banana maçã AAB, poderia ser explicada pela diferença genética.

Os nossos resultados, portanto, enfatizam a proposição de Yasunobu (137) que, apesar das polifenoloxidases catalizarem a oxidação de uma grande variedade de substratos, cada enzima, individualmente, tende a oxidar mais rapidamente um tipo específico de substrato fenólico.

O estudo da multiplicidade das formas moleculares de uma mesma enzima, tem sido objeto de intensas pesquisas nos últimos anos. As múltiplas formas mais investigadas têm sido as oriundas de tirosinase, tanto animal como vegetal (28, 39, 94). Essas enzimas têm sido encontradas na forma predominantemente tetramérica, com peso molecular de 130.000 e com especificidade tanto para mono como para difenóis. Kertesz (59), estudando, em tirosinase de batatas, a ação de íons metálicos na oxidação de compostos fenólicos, demonstrou que a velocidade de oxidação de tirosina, está diretamente relacionada com a concentração de íons cúpricos nas preparações. De um modo geral, as tirosinases de diferentes fontes, são enzimas com teor de cobre calculado entre 0,2 a 0,3%. Jolley e col. (50), encontraram que tirosinases de cogumelos apresentavam sub-unidades que eram, talvez, responsáveis pelas diferenças de especificidade para mono e difenóis. Por outro lado, a multiplicidade de formas moleculares é explicada pela presença de catecolases e formas intermediárias, resultantes de degradações químicas ou físicas ou mesmo fragmentação de uma enzima nativa, e que pode ocorrer durante o fracionamento (74).

Contudo, os resultados obtidos por ultracentrifugação da polifenoloxidase de banana em diferentes estágios de purificação, mostraram um coeficiente de sedimentação de  $3,9 \pm 0,1$  S, correspondendo ao peso molecular de  $60.000 \pm 2.000$ . Essa enzima apresentou sub-unidades de peso molecular  $30.000 \pm 1.000$  (Fig. 24 e 25), mostrando que a proteína ocorre na forma dîmera. As

análises eletroforéticas, bem como o coeficiente de sedimentação encontrados nos diferentes estágios de purificação, mostram que as formas moleculares ativas permanecem íntegras durante o processo. Se considerarmos a polifenoloxidase formada por duas sub-unidades A e B, seriam esperadas três formas moleculares múltiplas. Contudo, a eletroforese da enzima purificada apresentou mais de três formas múltiplas, que poderiam ser interpretadas como dependentes do arranjo conformacional das sub-unidades. Por outro lado, o teor de cobre encontrado em nossas preparações (0,009%), não foi considerado significativo ou essencial para a atividade da enzima.

Baseados em nossos experimentos, enfatizamos a proposição de Smith e Krueger (114), de que, inicialmente, as diversas formas de enzima com diferentes especificidades devam ocorrer "in natura" e não ser resultado da degradação de uma enzima nativa. Levando em conta que as formas moleculares agregam-se reversivelmente (28), as formas múltiplas de polifenoloxidase formam um agregado de especificidade para difenóis, que, se por um lado se assemelham a tirosinase de *Neurospora* (28), em virtude do peso molecular de suas sub-unidades, por outro são diferentes pela especificidade. Desta forma, podemos concluir que a especificidade das polifenoloxidases estará intimamente relacionada ao tipo de agregado encontrado nos tecidos, bem como, possivelmente, à concentração de cobre encontrada na molécula da enzima.

Jolley e col (49) mostraram que a associação e dissociação das formas moleculares podem ocorrer com variações de pH, calor, - detergentes iônicos e concentração de proteínas. As polifenolo xidasas em purês de diferentes frutas, com pH ao redor de 4,0, - foram de um modo geral bastante termo-resistentes, sendo que - os purês de pera submetidos a 75°C por 60 minutos, retinham - 68% de sua atividade, enquanto que nos de maçã, a inativação - verificou-se após 20 minutos. Essa resistência térmica, em ge- ral, diminui com a purificação da enzima (83). Por outro lado, a análise eletroforética das formas moleculares de tirosinase- de cogumelo em gel de poliacrilamida, mostrou que na temperatu- ra de 60°C, as proteínas ativas eram quebradas gerando novos - fragmentos ativos (49).

Os experimentos realizados com polifenoloxidase de banana, mos- traram que existe uma resistência térmica acentuada quando se submete a enzima do precipitado acetônico, a temperaturas de - 65 e 75°C, sendo que a meia vida encontrada para a enzima nes- sas temperaturas, foi de 30 minutos (Fig.37 e 39). Por outro - lado, os estudos realizados por aquecimento seguido de resfria- mento a 0°C, nos sugere que nas temperaturas de 55 e 65°C, há uma re-estruturação da molécula da enzima, tornando-a mais ati- va, sendo que a 75°C o resfriamento a 0°C, contribuirá para - maior inativação, devido provavelmente à formação de uma nova- molécula modificada estruturalmente (Fig.38). Esse resfriamento rápido nos sugere que a re-naturação de formas moleculares par

cialmente desnaturadas (65 e 75°C) faz-se ao acaso adquirindo conformações mais ou menos ativas dependendo do grau de desnaturação inicial da molécula. Por outro lado o resfriamento lento a 25°C permite às moléculas se organizarem de forma a encontrar uma maior estabilidade para manter sua atividade catalítica (Fig. 38).

Considerando a proposição de que as formas moleculares da enzima são oriundas de associações de moléculas, podemos dizer que estas podem sofrer modificações provocadas por agentes como uréia e dodocilsulfato de sódio. Essas mudanças estruturais acarretam transformações nas propriedades físicas e químicas da proteína com alterações da mobilidade eletroforética (Fig. 32). A ação de agentes reconhecidamente desnaturantes de proteína, como a uréia, foi verificada com estudos realizados pela incubação de uma solução de enzima com diferentes concentrações de uréia (Fig. 40). Esses resultados mostraram que a enzima após incubação com uréia, até uma concentração de 8 M, apresentou atividade que permaneceu praticamente inalterada por períodos prolongados. Por outro lado, a eletroforese da enzima tratada com uréia 8 M em gel de poliacrilamida (contendo uréia), mostrou 2 bandas ativas (Fig. 21). A diferença entre a mobilidade relativa da enzima incubada e não incubada com uréia 8 M, mostra que a proteína sofre modificações estruturais, mas não suficientes para alterar o seu centro catalítico. Sabendo que a polifenoloxidase de banana é um dímero, podemos supor que a uréia

dissociará a enzima em duas sub-unidades cataliticamente ativas, mas que diferem na polaridade para o cátodo com baixa mobilidade. Harel e col (40) encontraram em polifenoloxidase de uvas, um efeito dissociante da uréia 5 M com modificações no perfil eletroforético das formas enzimáticas. Por outro lado, o estudo com tirosinase de cogumelo purificada (49), mostrou que a enzima era progressivamente inativada durante a diálise contra solução de uréia 8 M a pH 8,3.

Esse comportamento foi também verificado em nossos experimentos, quando a polifenoloxidase incubada com uréia 8 M era dialisada contra água destilada ou mesmo solução de uréia 8 M. Contudo, essa inativação (60%) não ocorria quando a enzima tratada ou não com uréia, era dialisada contra solução de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0. Por outro lado, quando o extrato aquoso enzimático era submetido a diálise contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, havia uma ativação da enzima (Quadro 4). Em todos os experimentos o fosfato mostrou ter papel importante para a manutenção da atividade enzimática.

Como outros agentes dissociantes, o Tween-80 pode provocar alterações conformacionais drásticas na proteína. Essas alterações - podem ser verificadas comparando-se o número de bandas das eletroforeses contendo Tween-80 no gel de poliacrilamida (Fig. 30 e 31). Os RM encontrados não são repetitivos em diferentes experimentos (84) e não coincidem com os RM encontrados para as bandas ativas sem adição de Tween-80 no gel de poliacrilamida (Fig. 34).

A ação de agentes redutores como o mercaptoetanol pode destruir a atividade catalítica se esta depender da presença de pontes -dissulfídicas (-S-S-) no centro ativo ou em outra região da molécula, se esta for importante para manter a conformação do centro ativo da enzima. Quando a enzima foi inativada com mercaptoetanol e SDS e em seguida feita a eletroforese em gel de poliacrilamida simples, constatou-se a re-ativação de uma das formas enzimáticas (Fig. 28 e 29).

Como os polipetídeos dissociados permanecem protegidos pelo SDS impedindo a re-associação das formas, os resultados indicam que o importante para a atividade enzimática é a integridade da ligação (-S-S-), provavelmente como parte estrutural do centro ativo da enzima. Durante a corrida no gel, o mercaptoetanol se separa do complexo SDS-polipeptídeo, permitindo a regeneração de algumas ligações dissulfídicas com o aparecimento da atividade enzimática. Essa suposição é confirmada quando a enzima previamente incubada com mercaptoetanol é submetida a diálise - contra tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, obtendo apenas 30% da restauração da atividade. A enzima então dialisada mostrou na eletroforese em gel de poliacrilamida a recuperação de apenas duas bandas com atividade enzimática (Fig. 27).

A ação de diferentes inibidores de polifenoloxidase tem sido intensamente investigada. Estudos realizados por Kertesz (59), - mostraram que a velocidade de oxidação gerada pelo sistema polifenoloxidase, em presença de ácido ascórbico estava intimamente

relacionada com o teor de íon cúprico na enzima, cuja atividade era restaurada pela adição de sal de cobre. Contudo, Baruah e Swain (9), estudando o mecanismo da ação do ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de batata, mostrou que o ácido ascórbico afetava irreversivelmente o centro ativo da proteína, sugerindo uma não dependência do íon cúprico.

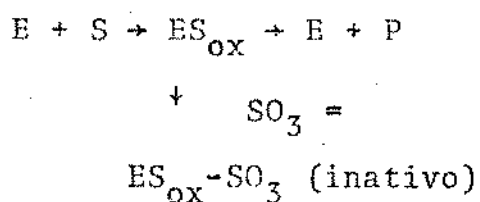
Estudos de inibição da polifenoloxidase de banana, fração semi-purificada e purificada (PE), mostraram que o ácido ascórbico - em baixas concentrações, age na reação não somente como um redutor, mas também como inibidor da enzima. Sabendo que o ponto isoelétrico determinado por focalização isoelétrica em gel de poli(acrilamida) foi de 5,2 (Fig. 23) e que a composição de aminoácidos de polifenoloxidases purificadas de outras fontes apresentam predominância de aminoácidos básicos (34,94), era de se esperar um pH isoelétrico mais elevado. O ponto isoelétrico de 5,2 poderia ser devido à presença de ácido clorogênico ligado à molécula da enzima.

Desta forma, a ação não competitiva do ácido ascórbico como inibidor da enzima poderia ser proposto através do seguinte mecanismo: inicialmente o ácido agiria como redutor, transformando-se na primeira etapa de reação a ácido deidroascórbico, o que é verificado pelo retardamento nas reações enzimáticas (Quadro 20 e Fig. 51). O ácido então formado poderia reagir diretamente com o sítio ativo se este contiver amino grupos, formando uma ligação tipo base de Schiff, ou mesmo com amino grupos da super



fície da enzima, mudando conformacionalmente a sua estrutura, a ponto de tornar o centro catalítico inativo.

A ação do metabissulfito de sódio sobre a enzima seria não competitiva (Fig. 51) pela afinidade na formação de um complexo enzima-substrato oxidado com o sulfito ionizado. Esse complexo geraria um produto de adição inativo, do tipo:



Trabalhos realizados por Muneta e Walradt (85), mostraram que concentrações de até 0,01 M de cisteína eram incapazes de inibir o consumo de oxigênio na reação de polifenoloxidase com ácido clorogênico. O ácido clorogênico oxidado, reduziu a concentração de cisteína do meio de reação formando produtos de adição com pigmentação levemente amarelada. Por outro lado, a afinidade do ácido clorogênico oxidado de ligar-se a aminoácidos e proteínas, foi confirmado com trabalhos realizados com duas variedades de café (2).

O efeito inibitório da cisteína sobre a reação de oxidação de catecol pela polifenoloxidase de banana, nos sugere que o ácido clorogênico presente na molécula da enzima, por um mecanismo desconhecido, poderá estar relacionado com a cinética encontrada nos experimentos.

Assim, em baixas concentrações de cisteína, a reação mostrar-se-ia não competitiva (Fig. 52), cujo mecanismo poderia ser sugerido pela afinidade do inibidor ao ácido clorogênico oxidado, formando um produto de adição. Em concentrações mais elevadas de cisteína, sendo o teor de ácido clorogênico na molécula de proteína provavelmente muito baixo, o inibidor, após saturar este centro de ligação passaria a agir sobre a reação enzimática, apresentando um mecanismo de cinética do tipo competitivo. A ação inibitória poderia verificar-se tanto por afinidade com o centro catalítico, como por complexação à quinona formada.

O ácido ditiocarbâmico é considerado um agente quelante de cobre. Contudo, resultados obtidos por Pomerantz (98) com tirosinase purificada de melanoma de "hamster", mostraram que esse ácido pode agir tanto na enzima de forma não competitiva como na transformação dopaquinona a dopacromo. Portanto o efeito inibitório do ácido ditiocarbâmico sobre a polifenoloxidase de banana contendo baixo teor de cobre (0,009%), não seria devido à ação do inibidor sobre o cobre, uma vez que necessitou-se concentrações relativamente altas do ácido para se obter inativação parcial da enzima (Fig. 53). Resultados preliminares, como tentativa de se obter graficamente uma cinética para a inibição enzimática, foram interpretados segundo mecanismo proposto por Webb (130), como uma ação inibitória do ácido ditiocarbâmico sobre o substrato. Pelo fato do DIECA conter átomos de enxofre, a sua ação seria do tipo interação de tióis com grupos fenólicos oxidados. Entretanto

to, os problemas quanto à cinética dessa reação enzimática, deverão ser melhor investigados em relação às distintas formas moleculares da enzima.

Pela análise de nossos resultados, podemos sugerir que a polifenoloxidase de banana poderá ser uma proteína básica complexada ao ácido clorogênico, o que justificaria o baixo PI encontrado. O seu centro ativo parece ser bastante estável, uma vez que a ação de agentes dissociantes comuns de proteínas não alteram a atividade enzimática. Desta forma, parece de grande importância conhecer-se a estrutura e o comportamento do centro ativo da polifenoloxidase.

Se considerarmos a teoria do ajuste induzido, proposta por Koshland e Neet (62), podemos concluir que o íon fosfato provoca uma orientação dos grupos catalíticos do centro ativo da enzima, tornando-a mais ativa no sentido de favorecer a aproximação de grupos ativos, como ocorre com o fosfato na superfície da hexoquinase, favorecendo a posição da hidroxila 6 da glicose (53). Esse efeito de orientação e encaixe no sítio ativo é aumentado pela presença de grupos hidrofóbicos da cadeia lateral dos *o*-difenóis o que é constatado pelo  $K_M$  determinado para dopamina, adrenalina e nor-adrenalina. Por outro lado, a presença de grupo carboxílico existente na cadeia lateral da DL-dopa, provoca aumento do  $K_M$  da enzima. Quanto à diferença de especificidade encontrada entre L-dopa e D-dopa, quando se utilizou a enzima

purificada, poderia ser explicada pelo efeito do grupo carboxílico da forma L que, imprimiria uma orientação mais estável, sem possíveis interações com amino grupos próximos ao centro ativo, o que produziria um efeito negativo quanto à orientação dos grupos hidroxílicos do substrato em relação ao centro catalítico da enzima, dirigidos por íons fosfatos. Por outro lado, a presença de grupos amínicos e a ausência de grupos de alta densidade eletrônica que possam produzir impedimentos estéricos, fornecerá maior acidez aos grupos hidroxílicos do anel benzênico, produzindo maior afinidade e, conseqüentemente, maior especificidade da enzima para a forma L do substrato.

A caracterização do centro ativo das polifenoloxidasas bem como o estudo das formas moleculares das diferentes espécies de banana com diferentes genótipos será de grande valia para a explicação dos mecanismos da catálise enzimática sobre diferentes tipos de substratos e sobre o mecanismo de ação dessas enzimas "in vivo".

## 6. CONCLUSÕES

Os nossos estudos com polifenoloxidase de banana nanica foram realizados no sentido de contribuir para uma melhor compreensão dos sistema polifenoloxidase, bem como a utilização dos resultados obtidos, a fim de minimizar o escurecimento enzimático indesejável que ocorre em vegetais.

Os experimentos conduziram-nos às seguintes conclusões:

1. O tampão fosfato pH 7,0 tem ação importante, contribuindo para a estabilidade e o aumento da atividade enzimática da polifenoloxidase;
2. O pH ótimo para a atividade da enzima é 6,5, sendo o seu ponto isoelétrico 5,2;
3. O precipitado acetônico é estável por 1:30 h, na faixa de pH entre 5,5 a 7,5;
4. A re-extração do precipitado acetônico com 0,5% de Triton-X-100, seguido de estocagem por 7 dias a -40°C, produz grande aumento na atividade específica da enzima, bem como maior solubilização da polifenoloxidase;
5. A diálise da fração FE em água destilada, diminui de 60% a atividade enzimática.
6. Apenas uma fração enzimaticamente ativa (FE) se obtém por cromatografia em Sephadex G-100;

7. A análise eletroforética da fração FE em gel de poliacrilamida, revelada com os substratos catecol, dopamina, L-dopa, D-dopa e DL-dopa apresentou de três a quatro formas moleculares ativas;
8. As mesmas formas moleculares ativas foram encontradas em todas as preparações mostrando que não são artefatos de técnica ou fragmentos de uma enzima nativa;
9. A polifenoloxidase nos diferentes estágios de purificação apresentou o mesmo coeficiente de sedimentação ( $3,9 \pm 0,1 S$ ), correspondendo ao peso molecular de  $60.000 \pm 2.000$ ;
10. A enzima é uma proteína constituída de duas sub-unidades semelhantes com peso molecular  $30.000 \pm 1.000$ , mas sendo diferentes entre si pela distribuição de cargas;
11. A proteína da fração FG, com um grau de purificação da ordem de 39 vezes, é uma enzima com estereo-especificidade para substratos na forma L;
12. A presença de grupos carboxílicos na cadeia lateral, bem como sua natureza em um orto-difenol, contribui para diminuição da especificidade da enzima pelo substrato.
13. A polifenoloxidase de banana é uma enzima de relativa termo resistência, sendo estável durante 30 min. nas temperaturas de 65 e 75 °C, nos diferentes estágios de purificação. O subsequente resfriamento rápido a 0°C, auxilia a inativação da

enzima;

14. A atividade do centro ativo da enzima é dependente de pontes dissulfídicas;
15. A uréia na concentração de 8 M, não afeta a atividade catalítica da enzima, mas modifica estruturalmente a proteína;
16. A enzima na fração FG encontra-se complexada ao ácido clorogênico;
17. A ação de inibidores na fração FE, indicaram que o ácido ascórbico nas concentrações de 0,003 mM, 0,013 mM e 0,027 mM, inibe a enzima não competitivamente. Da mesma forma, o metabisulfito de sódio nas concentrações de 0,01 mM, 0,02 mM, e 0,08 mM, apresenta cinética não competitiva de inibição enzimática;
18. O ácido ascórbico é o inibidor mais efetivo sobre a enzima na fração FE, enquanto que a cisteína foi o inibidor mais potente sobre a reação enzimática no precipitado acetônico, sendo que na concentração de 0,013mM, a inibição da reação com DL-dopa como substrato, verificou-se por período prolongado de tempo;
19. Com exceção do ácido ditiocarbâmico todos os outros inibidores apresentaram um período de retardamento da reação enzimática com diferentes substratos;

20. Os íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\beta\text{-NAD}^+$  são ativadores da reação enzimática na fração FE, enquanto que os íons  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  são inibidores.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ALBERGHINA, F.A.A., 1964 - Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices: partial purification and properties. *Phytochemistry* 3, 65.
2. AMORIM, H.V. & JOSEPHSON, R.V., 1975 - Water soluble protein and nonprotein components of Brazilian green coffee beans. *J. Food Sci.* 40, 1179.
3. AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; MELO, M.; CRUZ, V.F. & MALAVOLTA, E., 1975 - Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage 4. Electrophoresis of soluble proteins in agar-gel and its interaction with chlorogenic acid. *Turrialba* 25, 18.
4. ANDERSON, J.M., 1968 - Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7, 1973.
5. ARAGÃO, G.A. & BACILA, M., 1976 - Purification and properties of a polyphenoloxidase from the fresh water snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 53 B, 179.
6. ARNON, D.I., 1949 - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1.
7. A.O.A.C. - Association of Official Agricultural Chemists. "Official methods of analysis". Washington D.C., 1955.

8. BARNELL, H.R. & BARNELL, E., 1945 - Studies on tropical fruits XVI. The distribution of tannins within the bananas and the changes in their conditions and amount during ripening. *Ann. Botany, N.S.* 9, 77.
9. BARUAH, P. & SWAIN, T., 1953 - The effect of L-ascorbic acid on the in vitro activity of polyphenoloxidase from potato. *Biochem. J.* 55, 392.
10. BEDOSIAN, K.; NELSON, A.I. & STEINBERG, M.P., 1959 - Effect of borates and other inhibitors on enzymic browning in apple tissue. *Food Technol.* 13, 722.
11. BENDALL, D.S. & GREGORY, R.P.F., 1963 - Purification of phenoloxidase. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*, 7, Pergamon Press, Oxford.
12. BOGERT, L.J., 1942 - Dietary use of banana in health and disease. United Fruit Co; Research Dept., New York.
13. BOSWELL, J.G. & WHITTING, G.C., 1938 - A study of the polyphenoloxidase system in potato tubers. *Ann. Bot.*, 2, 847.
14. BOUCHILLOUX, S. & KODJA, A., 1960 - Combinaison des thiols avec les quinones se formant au cours de la Mélanogénèse. *Bull.Soc.Chim.Bio.* 42, 9, 69.
15. BOUCHILLOUX, S.; McMAHILL, P. & MASON, H.S., 1963 - The multiple forms of Mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 238, 1699.

16. BROWN, F.C. & WARD, D.N., 1958 - Studies on mammalian tyrosinase I. Chromatography on cellulose ion exchange agents. J.Biol.Chem. 233, 77.
17. CHODAT, R., 1936 - Darstellung und Nachweis von Oxydasen und Katalasen pflanzlicher und tierischer Herkunft methoden ihrer Anwendung. In Emil Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeits methoden, Abt. IV, Teil I, 319-410, Urban und Schwarzenberg, Berlin.
18. CLAYTON, R.A., 1959 - Properties of tobacco polyphenoloxidase. Arch.Biochem, Biophys. 81:404.
19. CONSTANTINIDES, S.M. & BEDFORD, C.L., 1967 - Multiple forms of phenoloxidase. J.Food Sci., 132, 446.
20. CONSTANTINIDES, S.M., SGARBIERI, V.C. & GALEAZZI, M.A.M. - Experimentos em Bioquímica e Nutrição. Manual de Laboratório (a ser editado).
21. CRAFF, C.C., 1966 - Localization and activity of phenolase in potato tubers. Amer. Potato J. 43, 112.
22. DAVIS, B.J., 1964 - Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 404.
23. DIEMAIR, W.; KOCH, J. & HESS, D., 1960 - Einfluss der schwefligen Säure und L-Ascorbicsäure bei der Weinbereitung. Z.Lebensm. Unters. Forsch, 113, 381.

24. DIZIK, N.S. & KNAPP, F.W., 1970 - Avocado polyphenoloxidase purification and fractionation on Sephadex thin layers. J. Food Sci. 35, 282.
25. EIGER, I.Z. & DOWSON, C.R., 1949 - Sweet potato phenolase. Preparation, properties and determination of protein content. Arch. Biochem., 21:194.
26. EMBS, R.J. & MARKAKIS, P., 1965 - Mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenoloxidase. J. Food Sci., 30, 753.
27. FINKLE, B.J. & RONECKLES, V.C., 1967 - Phenolic compounds and metabolic regulation. Appleton Century Crofts, N.Y.
28. FLING, M.; HOROWITZ, N.H. & HEINEMANN, S.F., 1963 - The isolation and properties of crystalline tyrosine from Neurospora. J. Biol. Chem. 238, 6.
29. FORSYTH, W.G.C., 1952 - Cacao polyphenolic substances. II changes during fermentation. Biochem. J., 51, 516.
30. FORSYTH, W.G.C. & QUESNEL, V.C., 1957 - Intermediates in the enzymatic oxidation of catechol. Biochem. Biophys. Acta 25, 155.
31. GALEAZZI, M.A.; CONSTANTINIDES, S.M. & SGARBIERI, V.C., 1977 - Some properties of apple banana (*Musa sapientum*, L) polyphenoloxidase (em publicação).

32. GRAUBARD, M., 1939 - A comparative study of some oxidases and peroxidases. *Enzymologia* 5, 332.
33. GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M., 1971 - Chemistry of the amino acids. Vol. I, Wiley, New York.
34. GREGORY, R.P.F. & BENDALL, D.S., 1966 - The purification and some properties of the polyphenoloxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem.J.*, 101, 569.
35. GRIFFITHS, L.A., 1959 - Detection and identification of the polyphenoloxidase substrate of banana. *Nature* 184, 58.
36. GRIFFITHS, L.A., 1961 - Relationship between 3,4-dihydroxy phenylethylamine content and the genome *accuminata*. *Nature* 192, 84
37. HACKETT, D.P.; SCHNEIDERMAN, H.A. & THIMANN, K.V., 1953 - Terminal oxidase mediating water uptake by potato tissue. *Arch.Biochem.Biophys.*, 47, 205.
38. HAREL E.; MAYER, A.M. & SHAIN, Y., 1964 - Catechol oxidase from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol.Plantarum* 17, 921.
39. HAREL, E. & MAYER, A.M., 1963 - Interconversion of subunits of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry*, 7, 199.

40. HAREL, E.; MAYER, A.M. & LEHMAN, E., 1973 - Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phytochemistry*, 12:2649.
41. HENZE, R.E., 1956 - Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solution with cysteine and glutathione. *Science*, 123, 390.
42. HOROWITZ, N.H.; FLING, M. & McLEOD, H.L., 1961 - Structural and regulative genes controlling tyrosinase synthesis in *Neurospora*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 26, 233.
43. HUSHIMA, Y.T.; NAKABAYASHI, T.; NISHIDA, S., 1955 - em "Comparative Biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzy.* 16, 105.
44. HUSSEIN, A.A. & CRUESS, W.V., 1940 - Properties of the oxidising enzymes of certain *vinifera* grapes. *Food Res.* 5, 637
45. International Union of Biochemistry 1965 - Enzyme Nomenclature, Recommendations (1964) of the International Union of Enzymes together with Their Units and the Symbols of Enzyme Kinetics - Elsevier Publ. Co., N.Y
46. JAMES, W.O. 1953- *Plant Respiration* - Clarendon Press, Oxford
47. JOHNSON, S.W. & ZILVA, S.S. 1937 - CLXX - The relation between the rate of enzymic oxidation and the Stereo chemical

Structure of Ascorbic Acid and its Analogues- Biochem.  
J. 31, 1366.

48. JOLLEY, R.L. & MASON, H.S., 1965 - The multiple forms of mushroom tyrosinase. J. Biol. Chem. 240, P.C. 1489
49. JOLLEY, R.L., NELSON, M.R., ROBB, D.A. - 1969 - The multiple forms of Mushroom Tyrosinase. J. Biol. Chem. 244, 3251.
50. JOLLEY, R.L., ROBB D.A. & MASON H.S., 1969 - The multiple forms of mushroom tyrosinase. J. Biol. Chem. 244, 1593.
51. JÖRNVALL, H., 1968 - Multiple Molecular Forms of Enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 1.
52. JOSLYN, M.A. & PONTING, J. D., 1951 - Enzyme catalysed oxidative browning of fruit product. Adv. Food Res. 3, 1.
53. KAPLAN, N.O. 1968 - Nature of multiple molecular forms of enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci, 151, 382.
54. Kastle, J.H., 1910 - The oxidases and other oxygen-catalysts concerned in biological oxidation. Hyg. Lab. Washington Bull. 59, 1.
55. KEILIN, D. & MANN, T., 1938 - Polyphenoloxidase: Purification nature and properties. Proc. Roy. Soc. London 125 B. 187.

56. KEILIN, D. & HARTREE, E.F., 1938 - Polyphenoloxidase:  
Purification nature and properties. Proc. Roy. Soc.  
London 125 B, 171.
57. KEILIN, D. & MANN, T. , 1938 - Polyphenoloxidase: purification  
nature and properties. Proc. Roy. Soc. London 125 B, 138.
58. KENDAL, L.P., 1949 - The Action of Tyrosinase on Monophenols.  
Biochem. J. 44, 442.
59. KERTESZ, D., 1951 - Cuivre, Polyph enoloxidase (Tyrosinase),  
cat chol et acide ascorbique. Bull. Soc. Chim. Biol.  
Paris, 33, 1400
60. KERTESZ, D., 1952 - Tyrosinase and Polyphenoloxidase. The  
role of Metallic Ions in Melanogenesis. Biochim. Biophys.  
Acta 9, 170
61. KERTSZ, D. & ZITO, R., 1965 - Mushroom polyphenoloxidase 1.  
Purification and General properties. Biochem. Biophys.  
Acta 96, 447.
62. KOSHLAND, D.E. JR. & NEET, K.E., 1968 - The Catalytic and  
Regulatory Properties of Enzymes. The Enzymes, 2<sup>d</sup> ed.,  
Vol. 1, Academic Press, New York
63. KUBOWITZ, F., 1937 - Schwermetallproteid und Pyridinproteid  
die Komponentem blaus ure und Kohlenoxydempfindlicher  
Alkoholdehydrasen. Biochem. Z. 293, 308



64. KRUEGER, R.C., 1950 - The Effect of Ascorbic Acid on the Enzymatic Oxidation of Monohydric and o- Dihydric Phenols. J.Amer. Chem. Soc. 72, 5582.
65. LINEWEAVER, H. & BURK, D., 1934 - The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658.
66. LERNER, A.B. & FITZPATRICK, T.B., 1953 - Pigment Cell Growth. Myron Gordon ed., Academic Press, N.Y.
67. LINDET, M., 1958 - Sur l'oxydation du tannin de la pomme à cidre. Compt. Rend. 120, 370.
68. LOESECKE, VON W.H., 1949 - Bananas: Chemistry, physiology and Technology. Interscience Publishers, Inc., New York VII.
69. LOOMIS, W.D. & BATAILLE, J., 1964 - Cell-free enzyme from tannin-containing plant tissue. Plant. Physiol. 39, Suppl. XXI.
70. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.V., & FARR, R.V., 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265.
71. LU VALLE, J.E. & GODDARD, D.R. 1948 - The mechanism of enzymatic oxidations and reductions. Quart. Rev. Biol. 23, 197.
72. MACRAE, A.R. & DUGGLEBY, R.G., 1968 - Substrates and Inhibitors

- of Potato Tuber Phenolase. *Phytochemistry* 7,855.
73. MADHOSINGH, C. & SUNDBERG, L., 1974 - Purification and Properties of Tyrosinase inhibitor from mushroom. *FEBS LETTERS* 49,2.
74. MALLETTÉ, M.F. & DAWSON C.R., 1949 - On the nature of highly purified mushroom tyrosinase preparations. *Arch. Biochem.* 23,29.
75. MAPSON, L.W. & SWAIN T., 1961 - Oxidation of ascorbic acid and Phenolic constituents. *Soc. Chem. Ind. (London)*, Monograph 11,121.
76. MARIN, L., 1972 - Secondary Metabolism in Plants and Animals. Academic Press, N.Y.
77. MARTIN, R.G. & AMES B.N., 1961 - A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to Protein Mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372.
78. MASON, H.S., 1955 - Comparative Biochemistry of the Phenolase Complex. *Adv. Enzymol.* 16, 105.
79. MASON, H.S., 1956 - Structures and functions of the phenolase complex. *Nature (London)* 177,79.
80. MASON, H.S., 1957 - Mechanism of oxygen metabolism. *Adv. Enzymol.* 19, 79.

81. MASON, H.S., 1959 - Pigment Cell Biology. Myron Gordon ed., Academic Press, N.Y.
82. MASON, H.S., FOWLKS, W.L., PETERSON E., 1955 - Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. J. Amer. Chem. Soc. 77, 2914.
83. MATHEW, A.G. & PARPIA, H.A.B., 1971 - Food Browning as a Polyphenol Reaction. Adv. Food Res. 19, 75.
84. Montgomery, M.W. & SGARBIERI, V.C., 1975 - Isoenzymes of Banana Polyphenol Oxidase. Phytochemistry 14.1245.
85. MUNETA, P. & WALRADT, J., 1968 - Cysteine Inhibition of Enzymatic Blackning with Polyphenoloxidase from Potatoes. J. Food Sci. 33, 606.
86. NAKABAYASHI, T.J., 1955 - em "Comparative Biochemistry of the Phenolase Complex". Adv. Enzymol. 16, 105.
87. NAKABAYASHI, T.J., 1954 - Browning of apple fruit. II Terminal oxidase of the respiration of apple fruit. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 28, 212.
88. NAMROD, D.B., 1972 - Polyphenol Oxidase of Rayan Ann Cherries: Purification and characterization. Master's thesis, Corvallis, Oregon State University.
89. NEILANDS, J.B., 1952 - Studies on Lactic dehydrogenase of

- heart. I. Purity Kinetics and equilibria. J. Biol. Chem. 199, 373.
90. ONSLOW, M.W., 1920 - Oxidizing enzymes III. The oxidizing enzymes of some common fruits. Biochem. J. 14, 541.
91. ONSLOW, M.W., 1931 - The Principles of Plant Biochemistry, Cambridge University Press, Cambridge, England.
92. PALLADIN, V.I., 1930 - The respirations of plants and its relationship to the transformation of substances and energy in plants. Zap. Akad. Nauk. SSSR, 8, 37.
93. PALMER, J.K., 1963 - Banana Polyphenoloxidase: Purification and properties. Plant Physiol. 38, 508.
94. PATIL, S.S. & ZUCKER, M., 1965 - Potato Phenolases: Purification and Properties. J. Biol. Chem. 240, 10.
95. PETROPAKIS, H.J., MONTGOMERY, M.W., DAVIDSON, W.D., ANGLIEMIER, A.F., 1969 - Separation of bovine sarcoplasmic proteins by vertical gel electrophoresis. Can. Inst. Food Tech. J. 2, 108.
96. PIERPOINT, W.S., 1966 - The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. Biochem. J. 98, 567.
97. PLATT, B.S. & WORMALL, A.B., 1955 - in "Comparative Biochemistry of the phenolase Complex". Adv. Enzymol. 16, 195.

98. POMERANTZ, S.H., 1963 - Separation Purification and Properties of Two Tyrosinases from Hamster Melanoma. *J. Biol. Chem.* 238, 7.
99. PONTING, J.D. & JOSLYN, M.A., 1948 - Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts. *Arch. Biochem.* 19, 47.
100. PONTING, J.D. & JOHNSON, C., 1945 - Determination of SO<sub>2</sub> in fruits. *Ind. Eng. Chem.* 17, 682.
101. PRABHAKARAN, K., HARRIS, E.B., KIRCHHEIMER, W.F., 1969 - Effect of inhibitors on phenoloxidase of Mycobacterium leprae. *J. Bacteriol.* 100, 935.
102. RACUSEN, D., 1970 - The catechol oxidase of bean leaves (Phaseolus vulgaris) *Can. J. Biol.* 48, 1029.
103. RAPER, H.S., 1938 - Some problems of tyrosine metabolism. *J. Chem. Soc.*, 125.
104. REYES, P. & LUH, B.S., 1960 - Characteristics of browning enzymes in Fay Elbert freestone peaches. *Food Technol.* 14, 570.
105. ROBERTS, E.A. H. & WOOD, D.J. 1953 - Separation of tea polyphenols on paper chromatograms. *Biochem J.* 53, 332.
106. ROBINSON, E.S. & NELSON, J.M., 1944 - The tyrosine - tyrosinase

- reaction and aerobic plant respiration. Arch. Biochem. 4,111.
107. SABIR, M.A., SOSULSKI F.W., FINLAYSON, A.J., 1974 - Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower J. Agric. Food Chem. 22,575.
108. SAMISCH, R., 1935 - The location of oxidase in the apricot Am. J. Botany 22,291.
109. SANDERSON, G.W., 1965 - The action of polyphenolic compounds on enzymes. Biochem J. 95,248.
110. SEGAL, B. & SEGAL, R.M., 1969. Enzymatic degradation of grape anthocyanins. Rev. Ferment. Ind. Aliment. 24,22.
111. SGARBIERI, C.V., HEC, M., SHERMAN, L.J., 1965 - Estudo bioquímico de algumas variedades de bananas cultivadas no Brasil Col. Inst. Tecnol. Alim. 1, 527.
112. SHIMAO, K., 1962 - Partial Purification and Kinetic studies of Mammalian Tyrosinase. Biochim. Biophys. Acta. 62,205.
113. SIMMONDS, N.W., 1966 - Bananas. Longmans Green and Co. Ltd. London 2nd ed.
114. SMITH, J.L. & KRUEGER, R.C., 1962 - Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom. J. Biol. Chem. 234:4,1121.

- 115- SREERANGACHAR H.B., 1943 - Studies on the Fermentation of Ceylon Tea. *Biochem. J.* 87, 653.
116. SWAIN T., MAPSON L.W., ROBB, D.A., 1966 - Activation of Vicia Faba L. Tyrosinase as effect by denaturing agents. *Phytochemistry* 5, 469.
117. SZENT-GYÖRGYI, A., 1925 - Zellatnung IV. Über den Oxydationsmechanismus der Kartoffeln. *Biochem. Z.* 162, 399
118. SZENTI-GYÖRGYI, A., 1928 - Observation on the function of peroxidase system and chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.* 22, 1387
119. SZENT-GYÖRGYI, A. & VICTORISZ, K., 1931 - Bemerkungen über die Funktion und Bedeutung der Polyphenoloxidase der Kartoffel. *Biochem. Z.* 168.
120. TAUBER, H., 1936 - The interaction of peroxidase and ascorbic acid (Vitamin C) in biological oxidations and reductions. *Enzymologia* 1, 209
121. TAUBER, H., KLEINER, I.S. & MISHKIND, D., 1935 - Ascorbic acid (Vitamin C) oxidase. *J. Biol. Chem.* 110, 211
122. TAYLOR, S.L., 1970 - Some enzymes change in livers of rainbow trout (Salmo gairdnerii) fed aflatoxin B<sub>1</sub> and sterculic acid. Master's thesis. Corvallis Oregon State University.

123. TOLBERT, N.E., 1973 - Activation of Polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51. 234
124. TOWERS, G.H.N., 1964 - Metabolism of phenolics in higher plants and microorganisms. *Biochemistry of Phenolic compounds*, Academic Press, New York.
125. WALKER, J.R.L., 1964 - The polyphenoloxidase of pear fruit-  
*Austr. J. Biol. Sci.* 17, 575
126. WALKER, J.R., & HULME, A. C., 1965 - The inhibition of the Phenolase from apple peel by polyvinylpyrrolidone.  
*Phytochemistry* 4, 677.
127. WALKER, J.R.L. & HULME, A.C., 1966 - Studies on the enzymic browning of apples. III Purification of apple phenolase.  
*Phytochemistry* 5, 259.
128. WALTER, E.M. & NELSON, J.M., 1945 - Further studies on tyrosinase in aerobic plant respiration. *Arch. Biochem.* 6, 131.
129. WARBURG, O., 1949 - Heavy metal prosthetic groups and enzyme action, Univ. Press, Oxford.
130. WEBB, J.L., 1963 - Enzyme and Metabolic Inhibitors: General Principles of Inhibition. Academic Press, New York, Vol I.



131. WEBER, K. & OSBORN, M., 1969 - The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406
132. WEBSTER, G.C., 1953 - The effect of carbon monoxide on respiration in the sweet potato, *Ipomoea batatas* L. *Science* 117, 530
133. WEICHSELBAUM, T. E., 1946 - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Tech. Suppl.* 10, 40.
134. WONG, T.C., LUH, B.S. & WHITAKER, J.R., 1971 - Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 49, 19.
135. WRAY, W., & STUBBLEFIELD, E. 1970 - A Highly Sensitive Procedure for Detection of Histones in Polyacrylamide Gels. *Analyt. Biochem.* 38, 454.
136. WRIGLEY, C.W., 1968 - Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. *J. Chromatog.* 36, 362
137. YASUNOBU, K.I., 1959 - Mode of action of tyrosinase- In *Pigment Cell Biology*, Myron Gordon ed., Academic Press. N.Y.