

MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE POLIFENOL OXIDASES EM EXTRATO BRUTO DE BANANA (*MUSA SP.*): COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS

LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI
NATALÍCIA DE JESUS ANTUNES
MAÍSA RIBEIRO PEREIRA LIMA BRIGAGÃO
PEDRO ORIVAL LUCCAS

Universidade Federal de Alfenas (Unifal – MG), Departamento de Ciências Exatas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000, Alfenas – MG, Brasil.

Autor responsável: P.O. Luccas. E-mail: pedro@unifal-mg.edu.br

INTRODUÇÃO

As enzimas polifenol oxidases (PFO), também, conhecidas como catecol oxidases, tirosinases ou catecolases, foram descobertas, em 1895, por Bourquelot e Bertrand (WHITAKER, 1972). São encontradas em altas concentrações em cogumelos, batata, abacate, folhas de chá, maçã e banana (*Musa sp.*), entre outros, e estão ligadas ao processo de escurecimento da parte comestível dos organismos em que estão presentes, denominado escurecimento enzimático. As PFO catalisam a oxidação de compostos fenólicos, promovendo a formação de o-quinonas, que passam por várias reações levando à formação dos pigmentos escuros. Esses compostos fenólicos, como a adrenalina, têm sido utilizados como substrato para medir a atividade enzimática no extrato bruto de vegetais.

A atividade dessas enzimas pode ser medida pelo consumo de oxigênio utilizando-se a técnica de Warburg (DAWSON & MAGEE, 1955) ou um eletrodo de oxigênio (MAYER et al., 1966); determinação com Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) com detecção eletroquímica (LI et al., 1990) e também pode ser feita a determinação espectrofotométrica (SUMMER & MYRBÄCK, 1951).

Quanto às medidas espectrofotométricas, estas são utilizadas para se acompanhar o desenvolvimento de uma reação enzimática que possua um produto ou reagente que absorva radiação ultravioleta ou visível. Assim, em condições adequadas, a velocidade da reação é proporcional à quantidade de enzima presente no extrato. Como muitas enzimas ainda não são encontradas puras, não é possível quantificá-las, sendo os resultados expressos em unidades de atividade (UA), definidas arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar em 0,001 unidades de absorvância por minuto (LUPETTI ET. al., 2003; HARPER, 1973). Para o cálculo da atividade geralmente é utilizada a fórmula abaixo que relaciona variação de

absorvância (Δ abs), variação de tempo (Δ T), o passo (b) e um determinado volume de amostra (V) (SUMMER & MYRBÄCK, 1951):

$$A \text{ (atividade)} = \Delta \text{ abs} \times 1000 / (\Delta T \times b \times V)$$

Outra maneira de calcular UA é através da medida da velocidade de reação para diferentes proporções de extrato e enzima, o que, em princípio, confere maior confiabilidade aos resultados (HARPER, 1973).

Devido à praticidade do emprego da fórmula, a maioria dos trabalhos que enfocam construção de biossensores utiliza-se desta ferramenta para o cálculo da atividade enzimática. Este trabalho objetivou um estudo comparativo entre as duas técnicas espectrofotométricas supracitadas de medida de atividade enzimática da PFO. Tal enzima tem sido usada na construção de biossensores para a determinação de diversos analitos (MOREIRA et al., 2005; LUPETTI et al., 2003; FATIBELLO & VIEIRA, 2002; ROSATTO ET. al., 2001; CARUSO ET. al., 1999; SIGNORI & FATIBELLO, 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Foram utilizados os seguintes reagentes: Adrenalina, Sigma®; Dihidrogenofosfato de potássio, Synth®; Hidróxido de sódio, Vetec®; Polivinilpirrolidona (PVP), Henrifarma®; Soroalbumina bovina (BSA), Sigma®; Sulfato de cobre, Vetec®; Tartarato de sódio e potássio, Mallinkrodt®.

Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q®.

Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Espectrofotômetro UV –Vis, Shimadzu® UV-2401 PC; Espectrofo-

tômetro Vis, Femto® 435; Cubeta de quartzo com 1 cm de passo óptico; Centrífuga, Fanem® Excelsa Baby I; Liquificador, ARNO®; Balança analítica, Sartorius® BP 210S; pH-metro, Schott® Handylab, Agitador magnético, Marconi®; Purificador de água, Milli-Q Academic®.

Obtenção do extrato bruto enzimático

Amostras de banana foram colhidas na cidade de Alfenas, MG. Uma massa de 25 g de frutos descascados foi triturada em 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0) e 2,5 g do agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) em um homogeneizador durante 3 minutos. A mistura foi filtrada em gaze e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante foi armazenado a 4 °C e utilizado como fonte enzimática (MOREIRA et al., 2005; LUPETTI et al., 2003; FATIBELLO & VIEIRA, 2002; ROSATTO et al., 2001; CARUSO et al., 1999; SIGNORI & FATIBELLO, 1994).

Determinação da atividade enzimática

Para cada extrato, a atividade da PFO foi determinada pela medida em triplicata da absorbância em 410 nm, monitorando a formação da o-quinona.

A velocidade de reação foi medida para quatro volumes diferentes (50, 100, 150 e 200 µL) de extrato bruto misturados a 2,4 mL de adrenalina 0,05 mol L⁻¹ em um volume final de reação de 3 mL completado com tampão fosfato (pH = 7,0).

A atividade enzimática foi definida como o coeficiente angular do gráfico da velocidade em função da quantidade de enzima multiplicado por 1000 (HARPER, 1973).

A atividade enzimática também foi determinada pela fórmula descrita por SUMMER & MYRBÄCK (1951), onde foram utilizados 2,8 mL da solução 0,05 mol L⁻¹ de adrenalina e 0,2 mL do extrato bruto. O ΔAbs foi calculado para um ΔT de 3 minutos.

Determinação da concentração de proteína total pelo método de biureto

A determinação da concentração de proteína total das amostras foi feita pelo método espectrofotométrico de biureto em 540 nm (GORNALL *et. al*) após serem agitadas e incubadas por 15 minutos a 37°C, utilizando-se BSA como padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os gráficos necessários para o cálculo da atividade enzimática de um extrato pela técnica de medidas da velocidade de reação enzimática. Foram feitas medidas em triplicata de quatro concentrações diferentes de extrato bruto a média das medidas foram

inseridas na curva mostrada na Figura 1b cujo coeficiente angular indica o valor da UA do extrato, neste caso obtendo um valor de 2164 UA.

Com o intuito de se verificar a estabilidade da enzima, as medidas foram feitas por seis dias consecutivos e os resultados estão apresentados na tabela 1. Não foi observado um comportamento regular de degradação da enzima, nota-se também um desvio acentuado nos valores de atividade enzimática o que pode ser atribuído à heterogeneidade da amostra de extrato bruto. A concentração de proteínas foi medida para se verificar a atividade específica da enzima e verificou-se que também não houve uma degradação apreciável de proteínas durante o período estudado assim a variabilidade de atividade e atividade específica apresentaram perfis semelhantes em função do tempo.

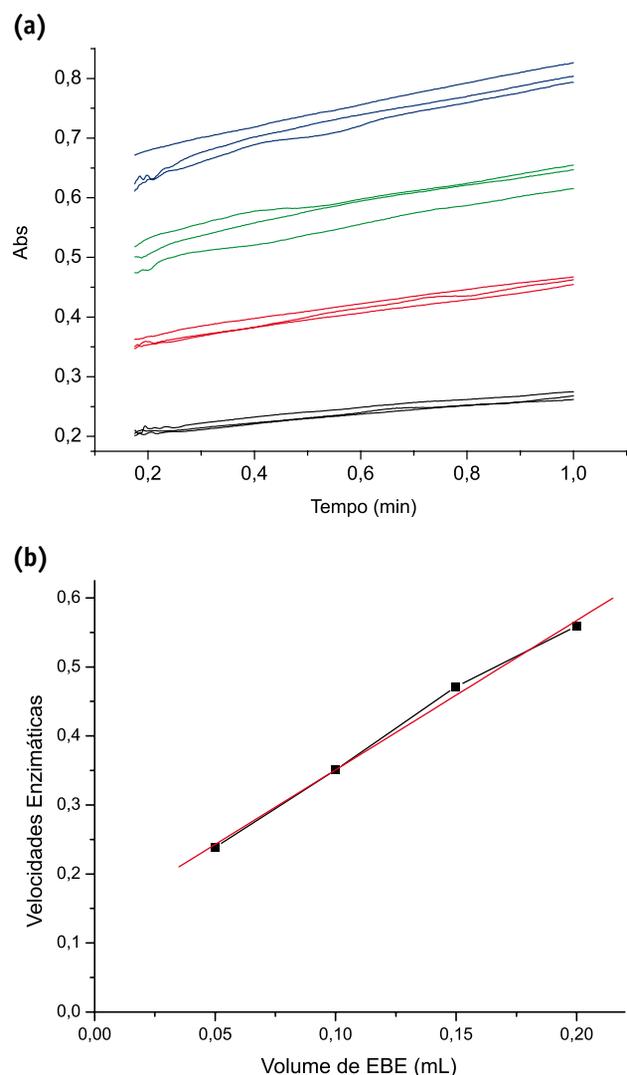


Figura 1. Técnica para medida de atividade enzimática através da velocidade de reação: (a) velocidade de reação para diferentes concentrações de extrato; (b) curva da velocidade em função da concentração.

Tabela 1. Teor de proteína; atividade calculada através da fórmula (F) e da curva de velocidade (C) seguidas de suas atividade específica (AE) definida como unidade por miligrama de proteína.

Dia	Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade da polifenol oxidase			
		F	AE	C	AE
1	16,81±0,6121	952,8±27,46	56,93±6,754	1742±128,2	103,9±7,626
2	15,31±1,221	929,2±45,81	60,53±6,723	1985±67,68	129,6±4,409
3	16,04±0,8872	897,9±10,12	55,98±4,891	2164±46,67	136,4±2,969
5	18,81±0,3267	918,2±61,33	48,81±10,04	1376±103,2	73,13±5,483
6	18,13±0,5745	864,0±37,81	47,66±9,032	2262±164,7	123,5±9,051

Com os resultados obtidos (Tabela 1) pode se notar que a medida de atividade enzimática empregando a equação apresentou resultados sistematicamente inferiores aos obtidos empregando a técnica das velocidades de reação. Isto pode ser atribuído ao fato de que os dados foram obtidos fora da faixa de resposta linear, uma vez que é estipulado o tempo de 3 minutos para a aquisição dos dados (SUMMER & MYRBÄCK, 1951). Quando se empregou tempos menores os valores calculados com a fórmula foram mais próximos aos obtidos com a curva de velocidade.

CONCLUSÃO

O estudo comparativo entre as duas técnicas para medidas de atividade enzimática indica diferenças de resultados. O método empregando a equação é mais rápido, porém por utilizar menos dados, uma vez que pressupõe que o sistema possui um comportamento linear na faixa de concentração estudada, é mais susceptível a erros.

O método empregando as medidas de velocidades das reações em diversas concentrações de extrato é moroso, porém menos susceptível a erros uma vez que utiliza mais medidas e permite verificar se há comportamento linear na faixa de concentração empregada para as medidas da atividade enzimática. Considerando o exposto, conclui-se que a utilização da equação para o cálculo da atividade enzimática apresentou subestimação dos valores de atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARUSO, C. S.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). *Anal. Lett.*, v. 32, p. 39-50, 1999.

DAWSON, C. R.; MAGEE, R. J. Plant tyrosinase (Poliphenol oxidase). *Methods Enzymol.*, v. 2, p. 817-827, 1955.

FATIBELLO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim. Nova*, v. 25, p. 455-464, 2002.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. J. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p. 751 - 766, 1949)

HARPER, H. P. Manual de química fisiológica, 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1973.

LI, Z. F.; CHRISTENSEN, B. M.; TRACY, W. Electrochemical determination of diphenol oxidase activity using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, v. 190, p. 354-359, 1990.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO, O. F. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo com extrato bruto enzimático de abacate (*Persea americana*). *Quim. Nova*, v. 26, p. 197-201, 2003.

MAYER, A. M.; HAREL, E.; BEN-SHAUL, R. Assay of catechol oxidase – a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, v. 5, p. 783-789, 1966.

MOREIRA, L. N.; MAGALHÃES, C. S.; LUCCAS, P. O. Emprego de sistema de análise em fluxo contínuo com biossensor potenciométrico para determinação de adrenalina em medicamentos. *Infarma*, v. 16, p. 59-62, 2005.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N; KUBOTA, L T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova*, v. 24, p. 77-86, 2001.

SIGNORI, C. A.; FATIBELLO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). *Quim. Nova*, v. 17, p. 38-42, 1994.

SUMMER, J. B.; MYRBÄCK, K. The Enzymes-chemistry and mechanism action. New York, Academic Press Inc. Publishers, 1951, v. 3, cap. 57.

WHITAKER, J. R. principles of enzymology for food sciences, New York: Marcel Dekker, 1972.