UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM FRUTOS: POLIFENOLOXIDASE DE ATEMÓIA (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)

IZABELLA RODRIGUES CHAVES DOS SANTOS

ARARAQUARA – SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM FRUTOS: POLIFENOLOXIDASE DE ATEMÓIA (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)

IZABELLA RODRIGUES CHAVES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

PROF. DR. VALDIR AUGUSTO NEVES
ORIENTADOR

ARARAQUARA – SP
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Santos, Izabella Rodrigues Chaves dos
S237e Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (Annona cherimola Mill. X Annona squamosa L.). / Izabella Rodrigues Chaves dos Santos. – Araraquara, 2009.
119 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Valdir Augusto Neves

1.Atemóia. 2.Escurecimento enzimático. 3.Polifenoloxidase. 4.Bioquimica de alimentos. I.Neves, Valdir Augusto, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

IZABELLA RODRIGUES CHAVES DOS SANTOS

ESCURECIMENTO EZIMÁTICO EM FRUTOS:
POLIFENOLOXIDASE DE ATEMÓIA
(*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves (Orientador)

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti (membro titular)

Prof. Dr. Jonas Contiero (membro titular)

Prof. Dr. Rubens Monti (membro suplente)

Prof ª Dr ª Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira (membro suplente)

Araraquara, _____ de _____ de _____.

Dedico esta dissertação ao meu exemplo de vida, Maria Stella Marques Chaves que sempre me estimulou a dar este grande passo. Esteve sempre ao meu lado com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por ser minha mãe, profissional competente, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Dedico também:

À Carlos Alberto dos Santos Júnior

Pelo apoio, compreensão, carinho e atenção que tem me dedicado todos esses anos juntos, e também por ser um grande incentivador e motivador das minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

À minha família: minha mãe e meu pai (in memorian), meus irmãos, Heloisa e José Eduardo, meu cunhado Hassan e meu esposo Júnior, que sempre me deram força e acreditaram na conclusão deste trabalho; e aos meus sobrinhos por tornarem os meus dias mais felizes;

Ao professor Valdir, a quem sou eternamente grata pela orientação, ensinamentos, oportunidade, dedicação e amizade;

À Maraíza, pelos ensinamentos, pelo imenso apoio na parte experimental da pesquisa e pela amizade fortalecida durante esse período;

Ao Ederlan, pela amizade e pelo apoio sempre que precisei.

Aos Professores do DAN, por tudo que me ensinaram;

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Adriana, Gilberto, Lica, Maraiza e Roseli, pelo carinho, auxílio técnico e momentos de confraternização;

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação, Cláudia, Laura e Sônia, pela atenção e ajuda nos momentos que necessitei;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A todos os amigos, aqui representados pela Alexandra, Ana Cláudia, Caio, Liz Maria, Renato e Viviane, pelo apoio e companheirismo.

Aos membros da banca examinadora pela participação e valiosas sugestões;

À CAPES, pela bolsa concedida;

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho se realizasse: Muito Obrigada!!!

"A sabedoria não é mais do que a ciência da felicidade"

Denis Diderot.

RESUMO

A família das anonáceas é composta por muitos gêneros e espécies; dentre essas, a atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.), resultante do cruzamento entre a fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) e a cherimóia (*Annona cherimola* Mill.). No Brasil, a atemóia vem despertando grande interesse na produção/comercialização dos seus frutos; no entanto um dos obstáculos enfrentados é a facilidade de escurecimento enzimático que a fruta apresenta. Esse tem como responsável a polifenoloxidase (PPO, E.C. 1.14.18.1); que sob diferentes condições de armazenamento e processamento de vegetais na sua fase pós-colheita pode atuar sob substratos naturais e resultar na formação de compostos escuros, acarretando diminuição do valor nutricional, modificação das propriedades organolépticas e sensoriais, com consequente rejeição. Os objetivos desse trabalho foram isolar, purificar e caracterizar algumas propriedades da polifenoloxidase de atemóia. Condições de extração para a PPO foram estabelecidas e a enzima foi isolada por precipitação com sulfato de amônio e eluição em Sephadex G-100. Somente um pico de atividade foi eluído no processo de purificação com um fator de purificação de 7,12. O peso molecular determinado foi 82 kDa com valores ótimos de pH 6,0 e 7,0 para 4-metil catecol e catecol, respectivamente; sendo estável por 12 e 24 horas à incubação na faixa de pH 4,0-8,0. A temperatura ótima de atividade foi 35°C e 28°C para 4-metil catecol e catecol, respectivamente. Os valores calculados de energia de ativação (Ea) para esses substratos foram 87,29 cal/mol^{-1} e 180,97 cal/mol^{-1}. As constantes cinéticas Km e Vmax foram 5,52mmol/L e 1428,57 UA/mL, para 4-metil catecol, e 79,3 mmol/L e 5000 UA/mL, para catecol. A relação Km/Vmax determinou uma maior afinidade da enzima pelo primeiro substrato. A enzima mostrou desprezível atividade para os ácidos caféico e clorogênico, enquanto nenhuma para L-DOPA, catequina, pirogalol e p-cresol. Foram testados os efeitos inibidores de sais, quelantes, ácidos fenólicos, acidulantes e outros. O cálculo da constante de inibição (Ki) revelou maior inibição pelo ácido p-cumárico seguido de protocatéico, transcinâmico, 2-nitrobenzóico e ácido benzóico. A inibição do ácido benzóico e p-cumárico foram do tipo não competitivo e as demais do tipo competitivo. Estudos de inativação térmica da PPO indicam uma baixa resistência térmica. A energia de ativação (Ea) para inativação da polifenoloxidase foi de 342,31 kJ/mol (83,53 cal/mol) e 357,04 kJ/mol (87,12 cal/mol) para 4-metil catecol e catecol, respectivamente. Nos estudos de inativação térmica não se verificou o efeito protetor da sacarose na inativação enzimática e leve efeito protetor do NaCl e KCl.

Palavras-chaves: atemóia, escurecimento enzimático, polifenoloxidase.

ABSTRACT

The family of annonaceae is composed of many genus and species, among these, the atemoya (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.), resulting from a cross between custard apple (Annona squamosa L.) and cherimoya (Annona cherimola Mill.). In Brazil, the atemoya is attracting great interest in the production / marketing of its fruits, however one of the obstacles faced is the ease of enzymatic browning that gives the fruit. This is as responsible for polyphenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1), which under different conditions of storage and processing plant in its post-harvest can act on natural substrates and result in the formation of dark compounds, causing decrease in nutritional value, modification of the organoleptic and sensory properties, with consequent rejection. The objectives of this study were to isolate, purify and characterize some properties of polyphenoloxidase from atemoya. Conditions for the extraction of PPO were established and the enzyme was isolated by precipitation with ammonium sulfate and elution on Sephadex G-100. Only one peak of activity was eluted in the process of purification with a purification factor of 7.12. The molecular weight of 82 kDa was determined with the optimum values of pH 6.0 and 7.0 for 4-methylcatechol and catechol, respectively. The enzyme was stable for 12 and 24 hours incubation in the pH range 4.0-8.0. The optimum temperatures for activity were 35 ºC and 28 ºC for 4-methylcatechol and catechol, respectively. The values of activation energy (Ea) for these substrates cal/mol^{-1} were 87.29 and 180.97 cal/mol^{-1}. The kinetic constants Km and Vmax were 5.52 mmol/L and 1428.57 UA/mL for 4-methylcatechol, and 79.3 mmol/L and 5000 AU / mL for catechol. The Km/Vmax determined a higher affinity of the enzyme by the first substrate. The enzyme showed negligible activity for caffeic acid and chlorogenic as any for L-DOPA, catechin, pyrogallol and p-cresol. We tested the inhibitory effects of salts, chelating agents, phenolic acids, acidulants and others. The calculation of the inhibition constant (Ki) showed greater inhibition by p-coumaric acid followed by protocatechuic acid, t-cinnamic acid, 2-nitrobenzoic acid and benzoic acid. Inhibition of benzoic acid and p-coumaric were no competitive and others competitive type. Studies of thermal inactivation of PPO show a low thermal resistance. The energy of activation (Ea) for inactivation of polyphenoloxidase was 342.31 kJ/mol (83.53 cal/mol) and 357.04 kJ/mol (87.12 cal/mol) for 4-methyl catechol and catechol, respectively. In the study of thermal inactivation is not verified the protective effect of sucrose on enzyme inactivation and mild protective effect of NaCl and KCl.

Keywords: atemoya, enzymatic browning, polyphenoloxidase.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1: Frutos de Atemóia cultivar Gefner. 17

Figura 2: Localização interna e externa de compostos fenólicos e das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em uma célula vegetal. 26

Figura 3: Raio X da estrutura oxidada da catecolase de batata doce. 28

Figura 4: Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas). 28

Figura 5: Reações catalisadas pela PPO. 30

Figura 6: Mecanismo de reação das atividades de monofenolase e difenolase da PPO. 32

Figura 7: Transformações oxidativas dos derivados de catequina durante a fermentação do chá preto. 36

Figura 8: Esquema proposto para o escurecimento enzimático no pericarpo de frutos de lichia. 37

Figura 9: Perfil da cromatografia da PPO em Sephadex G-100. 51

Figura 10: Curva de calibração com padrões protéicos: soroalbumina bovina (BSA), avoalbumina, inibidor de tripsina, citocromo C. 53

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da PPO de atemóia, corada pela atividade enzimática. 54

Figura 12: Atividade da PPO em função do pH utilizando 4-metil catecol como substrato. 56

Figura 13: Atividade da PPO em função do pH utilizando catecol como substrato. 57

Figura 14: Efeito do pH na estabilidade da PPO utilizando 4-metil catecol como substrato. 57

Figura 15: Atividade da PPO em função da temperatura utilizando 4-metil catecol como substrato. 58

Figura 16: Atividade da PPO em função da temperatura utilizando catecol como substrato. 59

Figura 17: Efeito da temperatura na estabilidade da PPO utilizando 4-metil catecol como substrato. 61
Figura 18: Efeito da temperatura na estabilidade da PPO utilizando catecol como substrato. 61
Figura 19: Efeito da concentração de 4-metil catecol na atividade da PPO. 64
Figura 20: Efeito da concentração de catecol na atividade da PPO. 65
Figura 21: Efeito da temperatura na inativação da polifenoloxidase de atemóia utilizando 4-metil catecol como substrato. 75
Figura 22: Curva de log k x 1/T para cálculo de Ea (energia de ativação. para a reação de inativação) utilizando 4-metil catecol como substrato. 75
Figura 23: Efeito da temperatura na inativação da polifenoloxidase de atemóia utilizando catecol como substrato. 77
Figura 24: Curva de log k x 1/T para cálculo de Ea (energia de ativação para a reação de inativação) utilizando catecol como substrato. 77
Figura 25: Efeito do NaCl na inativação térmica da PPO de atemóia a 55ºC e 60ºC. 81
Figura 26: Efeito do NaCl na inativação térmica da PPO de atemóia a 65ºC e 70ºC. 82
Figura 27: Efeito do KCl na inativação térmica da PPO de atemóia a 55ºC e 60ºC. 83
Figura 28: Efeito do KCl na inativação térmica da PPO de atemóia a 65ºC e 70ºC. 84
Figura 29: Efeito do $CaCl_2$ na inativação térmica da PPO de atemóia a 55ºC e 60ºC. 85
Figura 30: Efeito do $CaCl_2$ na inativação térmica da PPO de atemóia a 65ºC e 70ºC. 86
Figura 31: Efeito da sacarose na inativação térmica da PPO de atemóia a 50ºC e 55ºC. 89
Figura 32: Efeito da sacarose na inativação térmica da PPO de atemóia a 60ºC e 70ºC. 90

Figura 1 do apêndice: Curva de calibração com BSA pelo método de Bradford. 116
Figura 2 do apêndice: Determinação da Ki para azida sódica. 116
Figura 3 do apêndice: Determinação da Ki para dietilditiocarbamato. 117
Figura 4 do apêndice: Determinação da Ki para ácido transcinâmico. 117
Figura 5 do apêndice: Determinação da Ki para ácido benzóico. 118
Figura 6 do apêndice: Determinação da Ki para ácido 2-nitrobenzóico. 118
Figura 7 do apêndice: Determinação da Ki para ácido protocatéico. 119
Figura 8 do apêndice: Determinação da Ki para ácido p-cumárico. 119

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1: Efeito da concentração de Triton X-114 na extração da PPO de atemóia. 47

Tabela 2: Efeito da concentração de Policlar aT na extração da PPO de atemóia. 48

Tabela 3: Efeito da concentração de Policlar aT na extração da PPO de atemóia contendo 6% de Triton X-114. 48

Tabela 4: Efeito do uso de 0,2g de Policlar aT/10g fruta e 6% de Triton X-114 na extração da PPO de atemóia. 49

Tabela 5: Quadro de purificação da polifenoloxidase de atemóia. 50

Tabela 6: Atividade da PPO de atemóia com diferentes compostos. 63

Tabela 7: Efeito de sais na atividade da PPO de atemóia. 70

Tabela 8: Efeito de compostos quelantes na atividade da PPO de atemóia. 70

Tabela 9: Efeito de outros compostos na atividade da PPO de atemóia. 71

Tabela 10: Efeito de compostos acidulantes na atividade da PPO de atemóia. 71

Tabela 11: Efeito de substratos análogos na atividade da PPO de atemóia. 72

Tabela 1 do apêndice: Leituras de absorbância a 595nm. 113

Tabela 2 do apêndice: Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da PPO de atemóia utilizando 4-metil catecol como substrato. 113

Tabela 3 do apêndice: Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da PPO de atemóia utilizando catecol como substrato. 114

Tabela 4 do apêndice: Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de NaCl em diferentes concentrações. 114

Tabela 5 do apêndice: Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de KCl em

diferentes concentrações. 115

Tabela 6 do apêndice: Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de $CaCl_2$ em diferentes concentrações. 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A.E. – atividade específica

BSA – soroalbumina bovina

$CaCl_2$ – cloreto de cálcio

$CuSO_4$ – sulfato de cobre

Ea – Energia de ativação

EDTA – ácido etileno diamino tetra cético

$FeSO_4$ – sulfato de ferro

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IUB – International Union of Biochemistry

KCl – cloreto de potássio

Ki – constante de inibição

Km – constante de Michaelis

$MnCl_2$ – cloreto de manganês

NaCl – cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

$(NH_4)_2SO_4$ – sulfato de amônio

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PM – peso molecular

POD – peroxidase

Policlar aT - polivinilpirrolidona insolúvel

PPO - polifenoloxidase

rpm – rotações por minuto

UA – unidade de atividade

Vmax – velocidade máxima

$ZnSO_4$ – sulfato de zinco

SUMÁRIO

1. Introdução..... 17
2. Revisão bibliográfica: polifenoloxidases..... 22
2.1. Ocorrência e localização..... 23
2.2. Reações catalizadas e mecanismo de ação..... 27
2.3. Função biológica da polifenoloxidase..... 32
3. Objetivos..... 38
4. Material e métodos..... 39
4.1. Material..... 39
4.2. Métodos..... 39
4.2.1. Extração..... 39
4.2.2. Otimização das condições de extração..... 40
4.2.3. Purificação..... 40
4.2.4. Ensaio de atividade enzimática..... 41
4.2.5. Determinação de proteína..... 41
4.2.6. Estimativa do peso molecular..... 41
4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 42
4.2.8. Efeito do pH na atividade enzimática 42
4.2.9. Efeito do pH na estabilidade enzimática 42
4.2.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática 43
4.2.11. Efeito da temperatura na estabilidade enzimática 43
4.2.12. Especificidade a substratos..... 43
4.2.13. Cálculo das constantes cinéticas (Km e Vmax)..... 44
4.2.14. Efeito de inibidores na atividade enzimática 44
4.2.15. Estudos de inativação térmica 44
4.2.15.1. Efeito da temperatura na inativação enzimática e cálculo da energia de ativação (Ea) 44
4.2.15.2. Efeito de sais na inativação térmica..... 44
4.2.15.3. Efeito da sacarose na inativação térmica..... 45
5. Resultados e discussão..... 46
5.1.Extração..... 46
5.2. Otimização das condições de extração..... 46
5.3. Purificação..... 49

5.4. Estimativa do peso molecular..... 52
5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)..... 53
5.6. Efeito do pH na atividade enzimática 55
5.7. Efeito do pH na estabilidade enzimática 57
5.8. Efeito da temperatura na atividade enzimática 58
5.9. Efeito da temperatura na estabilidade enzimática 60
5.10. Especificidade a substratos e cálculo das constantes cinéticas (Km e Vmax) 62
5.11. Efeito de inibidores na atividade enzimática 66
5.12. Estudos de inativação térmica 73
6. Conclusões 91
7. Referências bibliográficas 94
8. Apêndice 113
8.1. Tabelas do apêndice 113
8.2. Figuras do apêndice 116

1. INTRODUÇÃO

A família das anonáceas é composta por cerca de 40 gêneros e de mais de 2000 espécies, das quais as comestíveis estão distribuídas em 5 gêneros: *Annona, Rollinia, Duguetia, Uvaria* e *Asimira* (NOGUEIRA et al., 2005). No Brasil, muitas espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo as mais importantes a graviola, para a indústria de suco e polpa, e a fruta-do-conde, cherimóia, atemóia e fruta-da-condessa, para consumo *in natura* (MOSCA; LIMA, 2008).

A atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) (figura 1), resultante do cruzamento entre a fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) e a cherimóia (*Annona cherimola* Mill.*)* (STENZEL; MURATA; NEVES, 2003), apresenta como principais características a sua adaptação climática intermediária a dos seus parentes, a qualidade da cherimóia e a rusticidade e facilidade de produção da fruta-do-conde. Essa adaptação climática intermediária traduz-se numa relevante vantagem, pois, com isso, a atemóia pode ser cultivada tanto nos trópicos como nos subtrópicos (MOSCA; LIMA, 2008).

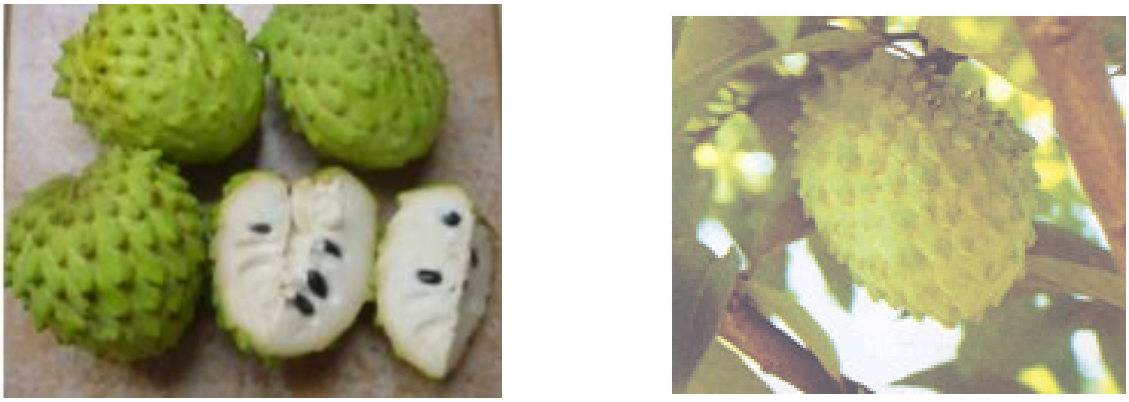


Figura 1. Frutos de Atemóia cultivar Gefner.

A cherimóia ocorre nas regiões do Chile, Peru, Bolívia, Equador e outros, em locais de clima ameno (TOKUNAGA, 2000). A fruta-do-conde é originária da América Tropical e foi introduzida no Brasil em 1926 sendo encontrada em São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro; no Nordeste e Planalto Central é chamada de pinha enquanto no Norte, de ata. Por ser um fruto doce, de aroma agradável, a fruta-do-conde é importante tanto para o consumo da fruta fresca como para a industrialização, sendo apropriada para a elaboração de bebidas fermentadas e muito aceita na fabricação de sorvetes (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001).

O cultivo comercial das anonas se dá de forma bastante regionalizada em decorrência das exigências climáticas de cada espécie e, até de hábitos de consumo no país. Assim é o caso da fruta-do-conde, que é explorada em clima tipicamente tropical ou subtropical úmido; já a cherimóia requer climas subtropicais (acima de 600m de altitude) (NOGUEIRA et al., 2005). A atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) é um híbrido interespecífico, resultante do cruzamento entre a cherimóia (*A. cherimola* Mill.) e a fruta-do-conde (*A. squamosa* L); o primeiro cruzamento artificial ocorreu na Flórida (EUA) no ano de 1908 (TOKUNAGA, 2000). Por ser uma mistura entre duas espécies, suas características são muito variáveis entre os cultivares; apresenta, em relação à fruta-do-conde, a vantagem de ser mais saborosa, conter menor número de sementes, maior vida útil e maior produtividade (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006).

Durante um longo período houve certo desinteresse pelo fruto, porém, na década de 1940, foram iniciados, em Israel, estudos visando padronizar sua melhor propagação (MORTON, 1987). No Brasil há relatos de que, em 1950, o IAC (Instituto Agronômico de Campinas) realizou a introdução da atemóia no Estado de São Paulo visando avaliar seu comportamento (TOKUNAGA, 2000).

Atualmente são conhecidas cerca de 15 cultivares de atemóia (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006), sendo que, no Brasil, as mais encontradas são: Thompson, Pink's Mammoth, Gefner e African Pride (TOKUNAGA, 2000). De acordo com Bonaventure (1999), a variedade Pink's Mammoth é a mais antiga do mundo; produz frutos alguns anos após a sua plantação, sendo a mais plantada no mundo e a mãe de todas as outras. A variedade Thompson é na realidade a australiana Hillary, que algumas vezes também é chamada de White e é a segunda mais plantada no mundo tendo uma relação direta com a Pink's Mammoth. A variedade African Pride é a mesma que a israelense Kaller. Foi exportada para o sul da África, onde ganhou esse nome, viajou para a Austrália e não se sabe como chegou ao Brasil. Seu fruto também é de excelente qualidade. Quanto à variedade Gefner, de origem israelense, seu gosto é delicioso, perfumado e refinado, porém rompe com facilidade dificultando o transporte. Alguns produtores afirmam que existe African Pride I e II; é a atemóia que mais se parece com a cherimóia.

A variedade Gefner, objeto de estudo desse trabalho, é um cultivar bastante produtivo; seus frutos atingem facilmente 450-500g. Os carpelos são estreitos e pontiagudos e a polpa branca, abundante, suculenta e resistente (TOKUNAGA, 2000). A cultura da atemóia apresenta grandes perspectivas, pois seus frutos tendem a conquistar a preferência dos consumidores nacionais e internacionais (TOKUNAGA, 2000).

Os frutos de anonáceas têm atividade metabólica intensa após a colheita, o que faz com que a maturação se processe em curto espaço de tempo, limitando a vida útil dos frutos. A atemóia por seu alto conteúdo de umidade se torna extremamente perecível, sobretudo em nossas condições ambientais com elevada temperatura, associada à ausência ou ao manejo inadequado pós-colheita,

constituem um fator negativo para sua conservação (MOSCA; LIMA, 2008). Segundo Yamashita et al., (2002) o rápido amolecimento da polpa e escurecimento da casca são os principais problemas que afetam a comercialização das atemóias.

Os compostos fenólicos ou polifenóis são largamente distribuídos no reino vegetal, geralmente ocorrendo como subprodutos do metabolismo, constituem, portanto um componente comum da dieta humana. Do ponto de vista químico, podem ser definidos como um grupo bastante diversificado de substâncias que possuem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila ou outros grupos funcionais como ésteres, glicosídeos, etc., no qual os mais importantes são os ácidos fenólicos (caféico, clorogênico, ferúlico, gálico, p-cumárico), os flavonóides (antocianinas, flavanas, flavonas, flavonóis, isoflavonas) e os taninos (ESCARPA; GONZALEZ, 2001). Para a ciência dos alimentos é importante o papel dos compostos fenólicos na qualidade organoléptica e nutricional dos produtos vegetais, além da sua capacidade de atuação na fisiologia e bioquímica dos frutos, tais como crescimento, escurecimento enzimático, proteção a patógenos, atuação contra raios ultravioleta e outras condições de estresse que podem interferir na pós-colheita (TUCK; HAYBALL, 2002; ESCARPA; GONZALEZ, 2001; RICE-EVANS; MILLER; PYLE, 1997).

Um dos grandes desafios do processamento mínimo de frutas e hortaliças é a significativa susceptibilidade ao escurecimento enzimático. Tal escurecimento ocorre principalmente após danos causados aos tecidos durante os processos de colheita, transporte, ou quando são expostos ao ar após terem sido cortados, fatiados ou esmagados, para posterior processamento, permitindo o contato entre a enzima e os substratos fenólicos que podem resultar na formação de compostos escuros (MDLULI, 2005). O escurecimento enzimático está relacionado à ação das enzimas

polifenoloxidase (PPO) e peroxidades (POD), que utilizam compostos fenólicos como substratos e provocam alterações indesejáveis na cor, sabor e aroma dos vegetais (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001).

O escurecimento enzimático é uma das reações mais estudadas em frutas, legumes e alimentos marinhos. Pesquisadores nas áreas de ciências dos alimentos, horticultura e fisiologia pós-colheita têm estudado esse fenômeno, devido à diversidade do seu impacto nestes sistemas; e como conseqüência o estudo da polifenoloxidase de vegetais é um tema de grande destaque, pela sua importância tanto na fisiologia quanto na bioquímica de diversos vegetais. A intenção deste trabalho foi trazer uma contribuição para o estudo da polifenoloxidase de atemóia, haja vista sua importância na fase pós-colheita desse fruto, somado a praticamente ausência de dados sobre a enzima na literatura específica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: POLIFENOLOXIDASES

As polifenoloxidases (PPO) fazem parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidorredutases, (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; MAYER, 1987; MAYER; HAREL, 1991; CLEMENTE, 1998) que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular (MATHEIS, 1983). De acordo com o "Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular" (Nomenclatura Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a classe das oxidorredutases (1) compreende todas as enzimas que catalisam reações de óxido-redução, o substrato oxidado é considerado como doador de hidrogênio ou elétron (WEBB, 1992). A PPO tem sido sujeita a estudos em diversos vegetais pela sua importância tanto na fisiologia quanto na bioquímica, sua atividade varia em função da espécie, variedade, estádio de maturação e condições de cultivo; de forma geral a atividade enzimática da PPO é mais elevada nos frutos mais jovens (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; VAN LELYVELD et al., 1984; OLESZEK et al., 1989; MILLER; KELLEY; MUJER, 1990; PÉREZ-ILZARBE; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 1991; FINGER, 1994; NICOLAS et al., 1994; GOUPY et al., 1995).

A denominação "polifenoloxidase" tem sido usada desde cedo na literatura para denotar duas enzimas diferentes. Ambas eram registradas sob o número 1.14.18.1 com o nome sistemático "monofenol, di-hidroxifenilalanina: oxigênio redutase (MAYER, 1987; MAYER; HAREL, 1991). Em meados dos anos 80 a comissão de enzimas da "International Union of Biochemistry" (IUB) revisou a classificação colocando a PPO em duas categorias chaves: EC 1.14.18.1 monofenol mono-oxigenase, e EC 1.10.3.2 o-difenol: oxigênio oxidoredutase (MAYER, 1987). Além da denominação "lacase" alguns nomes triviais baseados em seus principais

substratos estão ainda em uso, tais como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A primeira observação de uma reação catalisada por uma polifenoloxidase foi feito por Schoenbein em 1856; onde ele relatou a formação de pigmentos azuis em extratos de cogumelos, *Boletus luciferus*. Porém a primeira investigação bioquímica da PPO foi realizada em 1895 no cogumelo da espécie *Russula nigricans*, que quando cortado se tornava vermelho e depois preto quando exposto ao ar (BOURQUELOT; BERTRAND, 1895). Desde a realização deste estudo, a enzima foi encontrada amplamente distribuída na escala filogenética, desde bactérias aos mamíferos (SÁNCHEZ-FERRER; LAVEDA, GARCÍA-CARMONA, 1993).

A grande importância dada a estas enzimas está principalmente relacionada ao processamento de alimentos (ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991), pois a sua presença tem um grande impacto na indústria de alimentos por ser a principal enzima envolvida no indesejável escurecimento de frutas e vegetais durante o processamento e armazenamento (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2003); por essa razão, estudos vêm sendo realizados visando à purificação, caracterização e esclarecimento sobre os possíveis mecanismos de reação deste sistema enzimático em diferentes espécies vegetais.

2.1. OCORRÊNCIA E LOCALIZAÇÃO

A PPO está amplamente distribuída na natureza, principalmente no reino vegetal, mas ocorre também em bactérias, fungos, plantas, mamíferos, artrópodes e crustáceos tais como camarão, lagosta e caranguejo (ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991; MARTINEZ; WHITAKER, 1995). As características dessa enzima têm sido amplamente estudadas em várias plantas, destacando-se uva (RAPEANU et al., 2006), maçã (VALDERRAMA et al., 2001; OKTAY; KÜCAÇALISKAN;

SAKIROGLU, 1995), batata-doce (LOURENÇO; NEVES; DA SILVA, 1992), banana (WUYTS; WAELE; SWENNEN, 2006), batata (BATISTUTI; LOURENÇO, 1985), pêra (GAUILLARD; RICHARD-FORGET, 1997), framboesa (GONZÁLEZ; ANCOS; CANO, 1999), abacate (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002), berinjela (PÉREZ-GILABERT; CARMONA, 2000), manga (GUERRERO-BELTRÁN; SWANSON; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), pinha (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001), alcachofra (TCHONÉ; BÄRWALD; MEIER, 2005), cherimóia (MARTINEZ-CAYUELA; FAUS; GIL, 1988) e yacon (NEVES; DA SILVA, 2007).

Em vegetais a PPO parece não estar restrita a um órgão em particular, porém, em animais superiores é confinada a pele, pêlos, penas e olhos (ROBB, 1984). Sua atividade enzimática em diferentes vegetais varia enormemente com a espécie e cultivar; e sua localização na célula depende da espécie, idade, e maturidade (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). A PPO está relativamente presente em todos os estágios de desenvolvimento da planta, porém sua atividade é mais elevada nos frutos mais jovens e após uma injúria mecânica ou ataque microbiano (YORUK; MARSHALL, 2003). Em folhas verdes uma parte considerável da atividade da enzima está associada aos cloroplastos (WHITAKER, 1972; TOLBERT, 1973); em talos de espinafre sua localização foi associada aos plastídios e mitocôndrias (PARISH, 1972); em maçãs ela se encontra quase que exclusivamente nos cloroplastos e mitocôndrias (HAREL; MAYER; SHAIN, 1964); e em algumas raízes e tubérculos ela pode ser encontrada em quase todas as frações sub-celulares, em quantidade proporcional ao conteúdo protéico, porém concentra-se principalmente nas porções mais externas como a casca e as gemas laterais (STEPHENS; WOOD, 1974). Mayer e Staples (2002) relataram a ocorrência de laccase no xilema de pinheiros e nos dutos resiníferos e na própria resina secretada pelas árvores da

família Anacardiaceae. Estudos citoquímicos forneceram evidências que a PPO é uma enzima de plastídio, localizada em uma série de plastídios variados: plastídios de raízes, amiloplastos de tubérculos de batata, plastídios epidérmicos, plastídio de cultura de tecido de cenoura, etioplasto, cromoplastos e cloroplastos (HUTTERMANN; MAI; KHARAZIPOUR, 2001); tem sido associada à membrana do tilacóide no cloroplasto (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; YORUK; MARSHALL, 2003).

Técnicas histoquímicas revelaram que uma pro-PPO de alto peso molecular é sintetizada no ribossomo citoplasmático (YALOVSKY et al., 1992; MARQUES et al., 1995) que é transportada para o cloroplasto onde uma seqüência amino-terminal é removida por peptidases estromais específicas (KOUSSEVITZKY et al., 1998) produzindo a proteína madura de menor peso molecular (SOMMER et al., 1994). Este fenômeno tem sido verificado em várias espécies, incluindo damasco (CHEVALIER et al., 1999), maçã (BOSS et al., 1995; HARUTA et al., 1998), uva (DRY; ROBINSON, 1994), batata (HUNT et al., 1993), espinafre (HIND; MARSHAK; COUGHLAN, 1995) e tomate (NEWMANS et al., 1993; SOMMER et al., 1994). A PPO de plantas superiores e fungos ocorrem em várias isoformas: imatura, madura latente e ativa (SÁNCHEZ-FERRER; VILLALBA; GARCÍA-CARMONA, 1989; SÁNCHEZ-FERRER; BRU, GARCÍA-CARMONA, 1990), no entanto, a enzima só é ativada quando entra em contato com seus substratos fenólicos (YORUK; MARSHALL, 2003).

Os compostos fenólicos, substratos da PPO, são sintetizados no retículo endoplasmático (HRAZDINA; WAGNER, 1985), por uma seqüência de reações iniciadas pela enzima felilalanina amônia-liase na via dos fenilpropanóides (MATEOS et al., 1993). Uma vez formados estes compostos são glicosilados e expulsos através de vesículas formadas pela membrana do retículo endoplasmático.

Essas vesículas são os veículos pelos quais os compostos fenólicos são transportados ao vacúolo (onde ocorre em maior quantidade) e à parede celular (HRAZDINA; WAGNER, 1985). A localização da PPO e seu substrato estão ilustrados na figura 2.

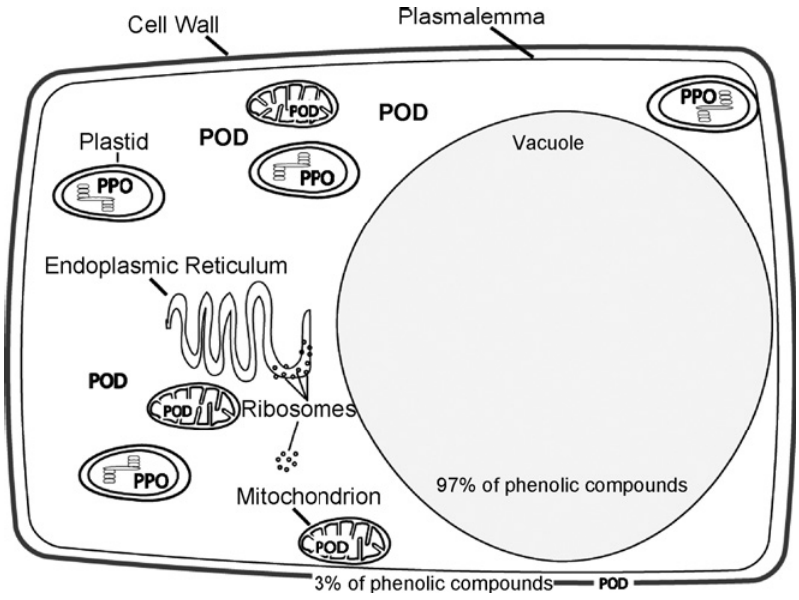


Figura 2. Localização interna e externa de compostos fenólicos e das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em uma célula vegetal. (reproduzido de TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).

O fato da PPO e seus substratos estarem presentes em diferentes compartimentos celulares, o escurecimento enzimático acaba sendo uma conseqüência direta da desintegração do tecido (NICOLAS et al., 1994; DIXON; PAIVA, 1995); a integridade da membrana é perdida após danos causados nos tecidos durante a senescência ou injúra resultando na destruição da barreira biológica entre a PPO e seus substratos, levando a rápida oxidação de fenóis e conseqüente produção de pigmentos escuros (JIMENEZ; GARCÍA-CARMONA, 1996). Segundo Vaugn e Duke (1984), a PPO é encontrada nos plastídios em

tecidos saudáveis e somente na degeneração ou em tecido senescente ela ocorre livre no citoplasma.

2.2. REAÇÕES CATALIZADAS E MECANISMO DE REAÇÃO DA PPO

A PPO é uma enzima que contém cobre no sítio ativo (figura 3) e atua como oxidase de função mista, catalisando dois tipos diferentes de reações, ambas na presença de oxigênio molecular: hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e a oxidação de o-difenóis em compostos de cor ligeiramente amarela, as o-quinonas (figura 4). Estas duas reações são denominadas de monofenolase ou cresolase EC 1.14.18.1, e difenolase ou catecolase EC 1.10.3.2, respectivamente. As quinonas formadas, subsequentemente, sofrem uma série de reações não enzimáticas para formar pigmentos escuros denominados genericamente de melaninas (VAUGN; DUKE, 1984). Este biopolímero é o principal pigmento encontrado na pele, cabelo e olhos dos seres humanos (NÚÑEZ-DELICADO et al., 1996).

A o-quinona formada também pode interagir com grupos amina e tiol, reduzindo a disponibilidade da lisina, metionina, tiamina e de outros nutrientes essenciais por sua interação com proteínas e outros nutrientes (ARAÚJO, 2004). Todas possuem habilidade para converter difenóis em quinona, utilizando oxigênio como substrato secundário, mas nem todas as PPOs são capazes de hidroxilar monofenóis (MARTINEZ; WHITAKER, 1995), como são os casos das PPOs de folhas de hortelã (KAVRAYAN; AYDEMIR, 2001) e néspera (DINCER et al., 2002).

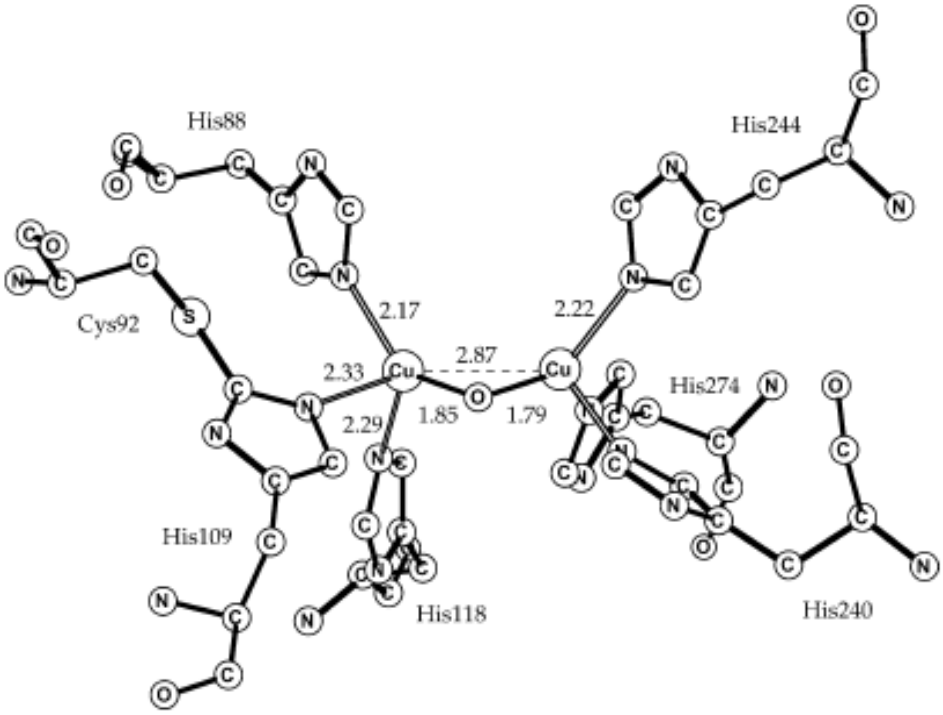


Figura 3. Estrutura oxidada da catecolase de batata doce. (Reproduzido de SIEGBAHN, 2004).

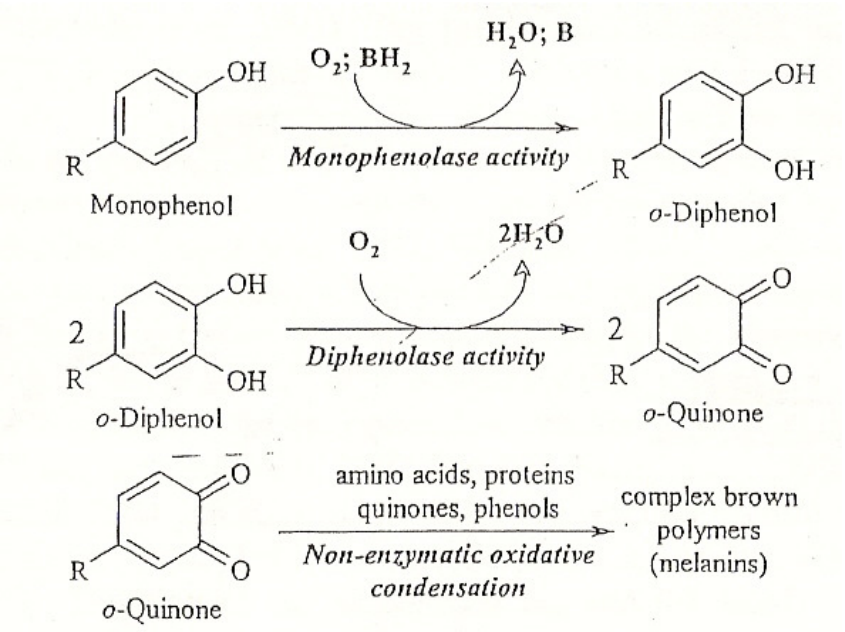


Figura 4. Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas). (reproduzido de TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).

Mudanças físicas e químicas durante as preparações enzimáticas podem provocar alterações na posição dos dois átomos de cobre, com isso as porções de cobre livre no sítio ativo da enzima podem ser alteradas resultando na perda da atividade monofenolase (MASON, 1956). Preparações enzimáticas com falta ou atenuada habilidade de hidroxilação são comuns, mas preparações apresentando somente a atividade monofenolase também têm sido relatadas, como foi descrito por Taneja e Sachar (1974), durante os últimos estágios de maturação de grãos de trigo e por Sttafford e Dresler (1972) em sorgo. Quando tanto a mono como a difenolase estão presentes nos vegetais, encontram-se numa proporção monofenolase:difenolase, em termos de atividade, de 1:10 até 1:40 (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; PEREZ-GILABERT; CARMONA, 2000); que pode ser explicado pelo fato da difenolase ser a forma da PPO que prevalece nas plantas (YORUK; MARSHALL, 2003).

De maneira geral, a reação de hidroxilação envolve a introdução de um átomo de oxigênio ao monofenol e redução de outro à água; o envolvimento do cobre como um grupo prostético da PPO é essencial para a reação catalítica (WILCOX et al., 1985). Isso foi confirmado pelo experimento clássico realizado por Kubowitz em 1938 onde havia perda de atividade da PPO quando o cobre era removido por cianeto de potássio e, restauração da atividade quando o cobre era novamente adicionado (ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991); ele também concluiu que a PPO possuía cobre binuclear no seu centro ativo envolvido na transferência de dois elétrons, na qual a valência do cobre é alterada (figura 5). No entanto essa teoria foi combatida por uma série de pesquisadores, que encontraram apenas um átomo de cobre por molécula, e assim seria impossível de participar na transferência de dois elétrons (FLING; HOROWITZ; HEINEMANN, 1963; GUTTERIDGE; ROBB, 1975).

Mas, a teoria de KUBOWITZ foi suportada por uma série de estudos mais recentes mostrando a existência de um par de átomos de cobre nas reações catalisadas pela PPO e que a valência varia durante a reação de hidroxilação para o estado cuproso (SCHOOT UITERKAMP; MASON, 1973; LERCH, 1976).

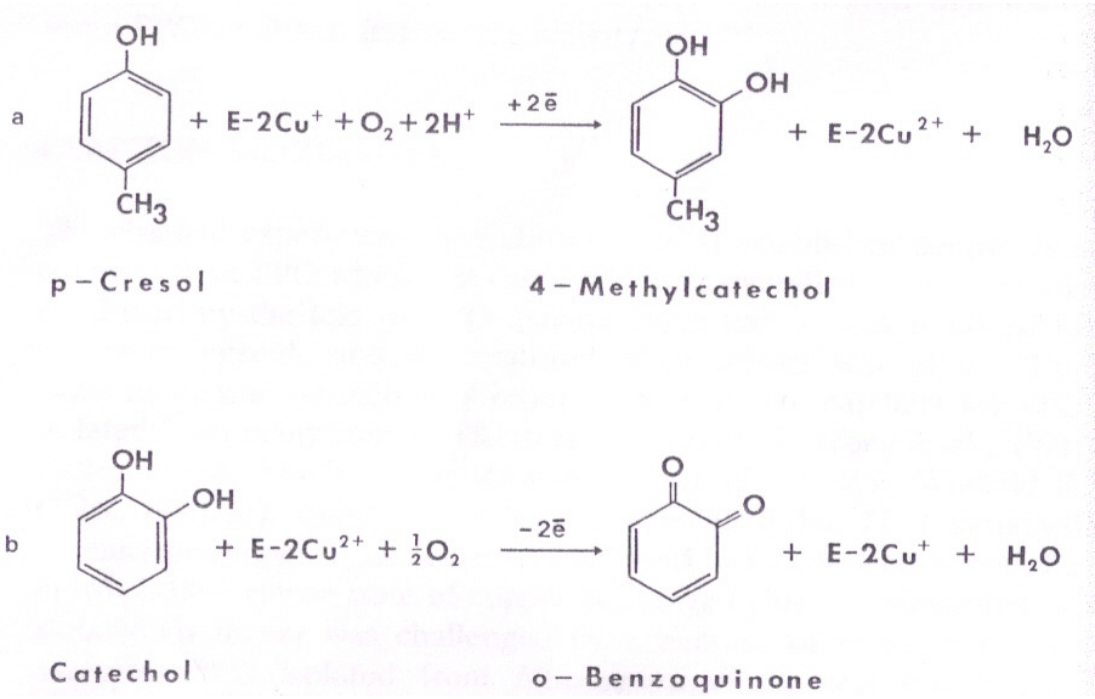


Figura 5. Reações catalisadas pela PPO. (a) monofenolase. (b) difenolase. (reproduzido de ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

A oxidação de o-dihidroxifenóis por PPO ocorre, mais provavelmente, de acordo com um mecanismo seqüencial (WHITAKER, 1972). O oxigênio é o primeiro substrato a ser ligado à enzima em batatas, como relatado por Matheis e Belitz (1977), mas outros pesquisadores afirmam que o mecanismo varia com o substrato (RIVAS; WHITAKER, 1973). Estudos posteriores mostraram que a reação ocorre via formação de radical livre, onde o cobre do sítio ativo altera sua valência (BRESLER et al., 1979).

De acordo com o mecanismo molecular da ação da PPO (figura 6), existem três formas dessa enzima, met-PPO(Cu^{+2}), deoxy-PPO (Cu^{+1}) e oxy-PPO (Cu^{+2}). Acredita-se que met-PPO seja a forma latente da enzima (HIMMELWRIGHT et al., 1980; SOLOMON; BALDWIN; LOWERY, 1992). Ela é reduzida a deoxy-PPO via oxidação de uma molécula de catecol a o-benzoquinona. Na oxidação de monofenóis o sítio ativo da enzima combina com o oxigênio formando uma oxy-PPO intermediária. Os substratos monofenólicos podem reagir somente com a oxy-PPO formando um complexo ternário PPO-O_2-monofenol. A formação do difenol é seguida pela liberação da enzima na forma met que está pronta para outra volta no ciclo. Na via de oxidação de difenóis, substratos difenólicos não reagem somente com a oxy-PPO, mas também com a met-PPO (LERCH, 1995); esta é inicialmente reduzida à forma deoxy, com a oxidação de uma molécula de o-difenol que combina com o oxigênio formando a oxy-PPO, que forma o complexo difenol-PPO. Depois da oxidação do catecol a o-benzoquinona, a enzima é reduzida à forma met (YORUK; MARSHALL, 2003).

Os peso molecular (PM) das diferentes PPOs varia de 35-100 kDa (VÁMOS-VYGYÁZO, 1981; LOURENÇO; NEVES; DA SILVA, 1992; CHO; AHN, 1999; DOGAN et al., 2005), à exceção para a PPO de cogumelo, com PM de 128 kDa (ARAÚJO, 2004).

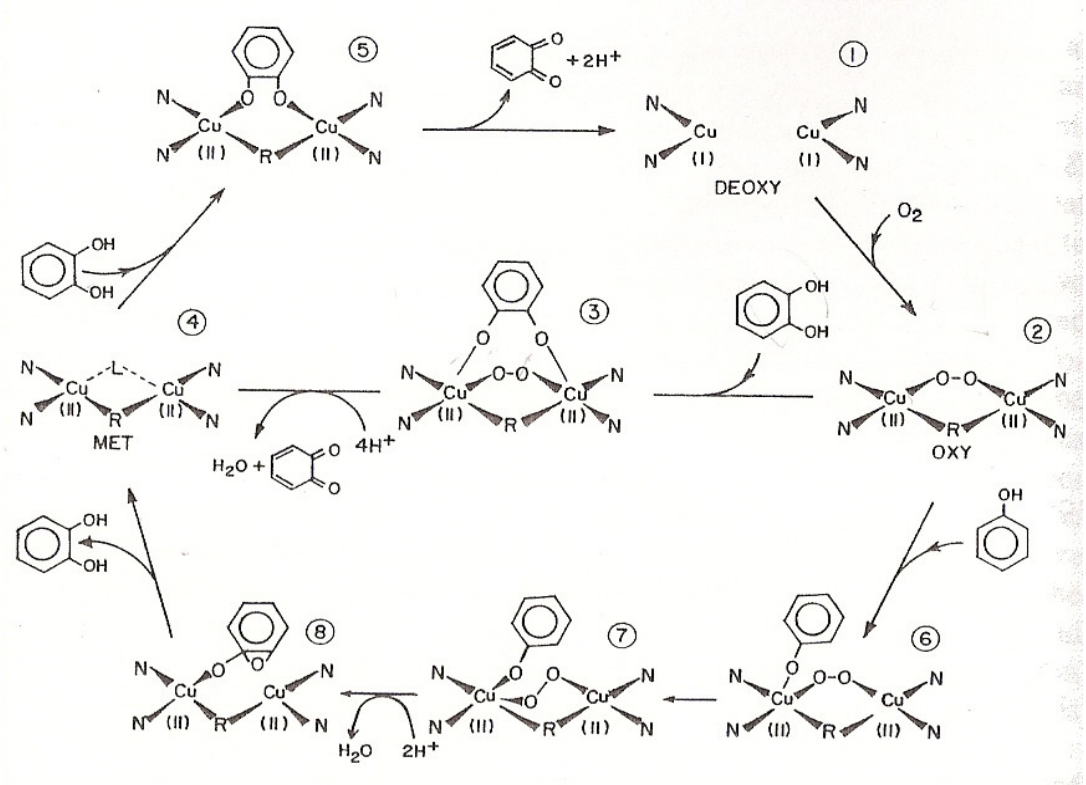


Figura 6. Mecanismo de reação das atividades de monofenolase e difenolase da PPO. (reproduzido de ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

2.3. FUNÇÃO BIOLÓGICA DA POLIFENOLOXIDASE

O papel desempenhado pela polifenoloxidase na natureza é amplo. Atribui-se à enzima um papel na cadeia respiratória das plantas superiores como uma das oxidases terminais, idéia apoiada pela ocorrência de PPO ligada às membranas das mitocôndrias e tilacóides, onde ocorre a respiração e a fotossíntese, respectivamente (MASON, 1957; SONDHEIMER, 1964).

A PPO é apontada como uma das enzimas importantes de defesa vegetal. Em danos nos tecidos causados por injúrias mecânicas, ataque de herbívoros e insetos e infecção por patógenos, a compartimentalização é perdida e a PPO de plastídeos reage com os substratos fenólicos do vacúolo, levando a formação das quinonas e suas conseqüências. Os tecidos impregnados com os polímeros atuam como barreiras para as infecções formando uma defesa contra a penetração de

microorganismos ou retardando sua proliferação (KOSUGE, 1969; MAYER & HAREL, 1979; VAUGHN; LAX; DUKE, 1988). Porém, tais substâncias conferem muitas vezes características comerciais e nutricionais indesejáveis aos produtos vegetais.

De acordo com Yoruk e Marshall, (2003) estudos têm discutido o papel da PPO na proteção de plantas contra doenças e invasão por patógenos ou insetos; baseado nas observações que os produtos secundários da reação da PPO previnem a expansão da infecção. Os efeitos potenciais mais extensivamente aceitos dos produtos de reação em resistência a doenças podem ser classificados em três grupos:

1) A polimerização oxidativa de quinonas para melaninas insolúveis em cima dos ferimentos, sela os tecidos infectados (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

2) Efeitos bactericidas e fungicidas de hidroxifenóis e quinonas atacam os microorganismos, e efeitos tóxicos dos fenólicos polimerizados nos vírus de tecidos injuriados (MAYER; HAREL,1979; ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

3) Modificação covalente de proteínas através das quinonas como um mecanismo de defesa “antinutritivo” (FELTON et al., 1992). As quinonas geradas pela reação da PPO com uma variedade de substratos fenólicos podem modificar as proteínas através de reações com grupos amino, sulfidrilas, fenólicos e imidazol (MATHEIS; WHITAKER, 1984), reduzindo o valor nutritivo para insetos herbívoros (FELTON et al., 1992).

Em fungos, o papel da melanina está correlacionado com a diferenciação dos órgãos reprodutivos e formação de esporos (GADD, 1980; ZIMMERMAN et al., 1995).

Para pesquisar o papel da PPO na resistência vegetal a doenças, Li e Steffens (2002) desenvolveram tomates transgênicos capazes de expressar DNA de batata para produção da enzima, com capacidade de transcrever 30 vezes mais PPO, com atividades de 5 a 10 vezes maiores; e induziram infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae*. Verificaram que as taxas de oxidação de compostos fenólicos endógenos aumentaram, correlacionando com o aumento da resistência aos patógenos em relação às plantas controle.

Para os pesquisadores da área de alimentos, a maior preocupação está relacionada com o fenômeno do escurecimento enzimático, que é uma conseqüência indireta da ação da enzima; nesses casos os produtos primários da reação oxidativa catalisada pela PPO, as o-quinonas podem: a) reagir entre si para formar polímeros de maior massa molecular; b) formar complexos macromoleculares com aminoácidos ou proteínas e c) oxidar compostos com potenciais de óxido-redução mais baixos (MATHEW; PARPIA, 1971).

As reações não enzimáticas, (a) e (b), levam à formação de pigmentos marrons, sendo que sua coloração é mais escura quanto maior for sua massa molecular. Os produtos da reação (c) são incolores (VAMÓS-VIGYÁZÓ, 1981). Esses pigmentos marrons característicos do escurecimento enzimático, que ocorre durante o manejo, armazenamento e processamento de frutas e vegetais (DINCER et al., 2002) levam a modificação organolépticas e nutricionais, resultando na maioria dos casos em produtos de aparência ruim com conseqüente rejeição (MATHEIS; WHITAKER, 1984).

Por outro lado, a ação da PPO e, como conseqüência o escurecimento enzimático, são necessários em alguns casos como passas, cacau e chás fermentados (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). O chá é uma bebida conhecida mundialmente, e é classificado de acordo com o processo de fabricação em chá fermentado (chá preto) e chá não fermentado (chá verde). A PPO tem um papel fundamental durante a fermentação do chá preto por oxidar os polifenóis (SANDERSON, 1964). O maior grupo de polifenóis em chá são as catequinas e seus derivados; durante a fermentação as catequinas são oxidadas a o-quinonas, que sofrem uma oxidação secundária para formar teaflavina (TF) e galato de teaflavina (TFG). Esses últimos compostos são pigmentos amarelos que se oxidam a tearubigina (TR), pigmentos marrons escuros responsáveis pela cor do chá preto (CLOUGHLEY, 1980) (reações resumidas na figura 7). A qualidade do chá, baseado em avaliações sensoriais de cor e amargor tem sido relacionado com o conteúdo total de teaflavina; sendo o alto teor de teaflavina atribuído ao aumento da atividade da PPO (HILTON; ELLIS, 1972).

A ação da PPO afeta favoravelmente o gosto e o aroma de bebidas fermentadas (AMORIM; SILVA, 1968) e o sabor característico do chocolate, pois em ambos os casos ela reduz o sabor adstringente (REEVES et al., 1988).

As polipenoloxidases também podem participar de um grande número reações oxidativas e de biodegradação, tais como mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético, biossíntese de lignina, e muitos destes fatores também podem ser associados com aroma/sabor, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001).

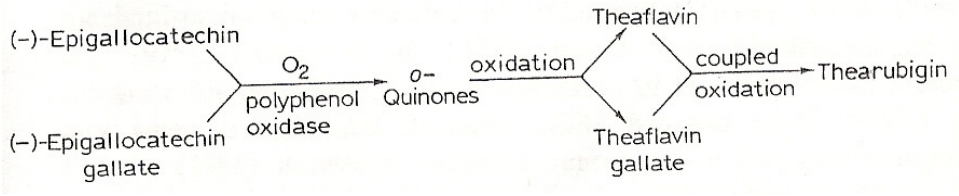


Figura 7. Transformações oxidativas dos derivados de catequina durante a fermentação do chá preto. (reproduzido de ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

De acordo com Vela et al. (2003), a PPO é responsável por desordens fisiológicas que causam descoloração de polpas e cascas de manga quando armazenadas em temperaturas inferiores a 13°C. Em muitos frutos a PPO leva a perda da cor vermelha por ser responsável pela degradação dos pigmentos de antocianinas (MARKAKIS, 1974). Frutos de lichia são altamente perecíveis, eles perdem a cor vermelho brilhante da casca e se tornam marrons com 1-2 dias à temperatura ambiente (ZHANG; QUANTICK, 1997); esse fenômeno é atribuído principalmente pela degradação das antocianinas com oxidação dos fenóis pela polifenoloxidase ou peroxidase. A PPO não oxida as antocianinas diretamente. Estudos sugerem que as antocianinas podem ser primeiro hidrolizadas por antocianases, formando antocianidinas; processo que pode ser acelerado pelos produtos resultantes da ação da PPO, tais como 4-metil catecol. Como consequência, a PPO pode oxidar as antocianidinas, resultando em pigmentos escuros, característicos do escurecimento enzimático (figura 8) (JIANG et al., 2004).

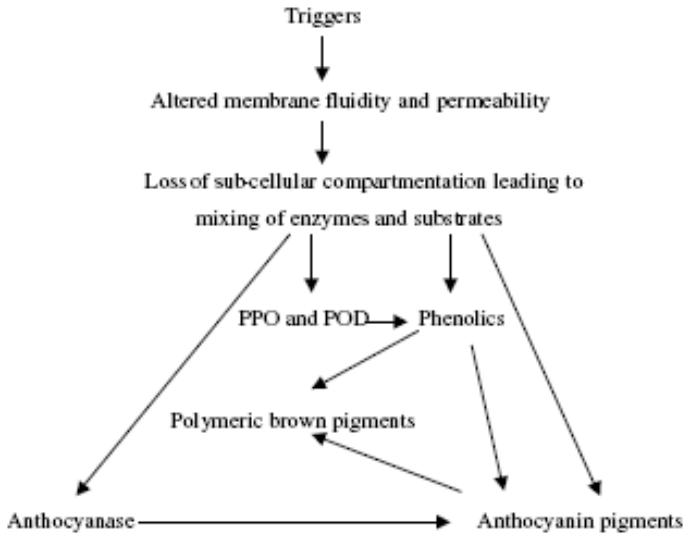


Figura 8. Esquema proposto para o escurecimento enzimático no pericarpo de frutos de lichia. (reproduzido de JIANG et al., 2004).

A “descoloração da beterraba” é uma modificação indesejável por alterar a cor do alimento, e também porque os polímeros, produtos indiretos da atividade da polifenoloxidase levam a cristalização do açúcar, diminuindo seu aproveitamento tanto na dieta com em processos industriais (VAMÓS-VIGYÁZÓ, 1981). Em lentilhas minimamente processadas e armazenadas o aumento da concentração de fenóis devido à indução por injúria foi correlacionado com o aumento da atividade da PPO independentemente da temperatura de armazenamento, causando depreciação do produto (CASTAÑER; GIL; RUÍZ, 1999). A alta atividade de PPO, presente em alguns tipos de farinhas pode ocasionar escurecimento de produtos posteriores, como pão e macarrão (NAZAROV; MAZANASHVILI, 1976).

3. OBJETIVOS

Gerais

- Conhecer as características do escurecimento pós-colheita da atemóia através do estudo da enzima polifenoloxidase.

Específicos

- Proceder à purificação e estudo das propriedades bioquímicas da polifenoloxidase de atemóia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Os frutos de atemóia foram adquiridos no comércio de Araraquara, mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento da extração da polifenoloxidase.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. EXTRAÇÃO

A extração da PPO de atemóia foi realizada de acordo com o método proposto por Sojo, Nuñez-Delicado e García-Carmona (1998) com algumas modificações; onde as amostras de frutos de atemóia descascadas e picotadas foram adicionadas à solução tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,0 contendo 4% de Triton X-114* e 0,2g Policlar aT/10g de fruto, seguidas de homogeneização em homogeneizador do tipo Ultra Turrax. O homogenato obtido foi centrifugado a 7000 rpm durante 40 minutos, desprezou-se então o resíduo precipitado; no sobrenadante foi acertada a concentração do Triton X-114 para 6% (previamente testada), seguido de imersão em banho Maria em temperatura de 37°C, por aproximadamente 10 minutos ou até separação das fases. O homogenato foi centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos a 25°C, o precipitado foi desprezado, constituindo-se assim o extrato bruto. No extrato bruto foram determinadas a atividade enzimática e concentração total de proteína. Com exceção da segunda centrifugação, todas as etapas do processo foram realizadas a 4°C ou em banho de gelo.

* A pré-condensação do Triton X-114 foi feita de acordo com o método descrito por Bordier (1981) utilizando-se tampão tris-HCl 10mM pH 7,4 e 150mM de NaCl.

4.2.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Foram realizados estudos referentes às condições de extração da polifenoloxidase de atemóia para obtenção do melhor rendimento do extrato bruto utilizando inibidores do escurecimento, onde se verificou o efeito da suas concentrações. Cada extração foi obtida a partir de uma relação massa:volume de 1:2, com uso de tampão adequado. Verificou-se o efeito da adição de Triton X-114 nas concentrações de 6, 10 e 12% no meio extrator. Também foi testado o efeito da concentração do Policlar aT (polivinilpirrolidona insolúvel) na extração da enzima, onde foram feitas extrações utilizando-se uma adição de 0,1g, 0,2g e 0,4g/10g de polpa. Por fim, foi verificada a melhor concentração desses inibidores do escurecimento quando Triton X-114 e Policlar aT estavam presentes na mesmo meio extrator.

4.2.3. PURIFICAÇÃO

O extrato bruto foi submetido a um processo de concentração que consistiu de precipitação com sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$). O fracionamento foi realizado inicialmente a 30% de saturação pela adição do sal ao extrato bruto, sob agitação lenta constante e banho de gelo. Ao término da operação, o material permaneceu sob agitação lenta por aproximadamente 2 horas. A seguir foi centrifugado a 7000 rpm por 40 min e a 4°C. Ao sobrenadante obtido foi adicionado novamente sulfato de amônio até 90% de saturação. Após a adição total do sal seguiu-se a agitação lenta overnight. O material foi centrifugado novamente e o precipitado obtido dissolvido no tampão de extração, determinando-se em seguida a atividade enzimática e a concentração de proteína total.

O material da etapa anterior foi aplicado em coluna de cromatografia de filtração em gel Sepahdex G-100 (59,5 cm x 2,5 cm) equilibrada com solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0; e eluída com o mesmo tampão. A fração referente ao pico de atividade foi utilizada nos estudos subseqüentes.

4.2.4. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da polifenoloxidase foi determinada de acordo com o método adotado por Lourenço, Neves e Da Silva (1992) utilizando-se como substrato 4-metilcatecol e tampão citrato-fosfato pH 6,0. Uma unidade de atividade enzimática será definida como a diferença de 0,001 unidade de absorbância por minuto sob as condições de ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação do teor de proteínas totais nas etapas de purificação da polifenoloxidase foi feita de acordo com microensaio do kit “Bio-Rad”, baseado no método de Bradford (1976), 0,8 mL de solução protéica adicionou-se 0,2mL do corante “Coomassie Brilliant Blue G-250”, 10 minutos após homogeneização foi realizada a leitura de absorvância a 595 nm. A curva de calibração foi obtida usando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão (apêndice figura 1).

4.2.6. ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da PPO de atemóia foi estimado pela eluição em coluna de filtração em gel (ANDREWS, 1965) Sephadex G-100 (59,5 cm x 2,5 cm), previamente calibrada com soroalbumina bovina (PM 67000), ovoalbumina (PM

45000), inibidor de tripsina (PM 21500) e citocromo C (PM 12400); e o Vo encontrado nessa calibração foi de 95,7mL utilizando-se blue dextrana 2000.

4.2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Os experimentos de eletroforese em disco foram realizados de acordo com o método proposto por Davis (1964). A coloração da proteína foi feita com a técnica Coomassie brilliant blue. A coloração das bandas enzimáticas foi realizada a 35°C com a imersão dos géis em solução tampão citrato fosfato pH 6,0, contendo 4-metil catecol de acordo com o ensaio previamente descrito. A interrupção da reação se deu pela retirada do meio de reação seguido de enxágüe dos géis em água destilada.

4.2.8. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática em função do pH foi determinada usando-se soluções tampão citrato-fosfato, com valores de pH entre 3,0 e 7,0 e fosfato de sódio com valores de pH entre 7,0 e 8,0. O pH ótimo de atividade foi determinado utilizando como substratos o 4-metil catecol e o catecol.

4.2.9. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade da polifenoloxidase ao pH foi verificada pela incubação da enzima em soluções tampão citrato-fosfato, com valores de pH entre 3,0 e 7,0 e fosfato de sódio com valores de pH entre 7,0 e 8,0 por 12 e 24 horas a 4°C, e leitura da atividade residual.

4.2.10. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da polifenoloxidase em função da temperatura foi realizada entre 10°C e 55°C e 10°C e 50°C utilizando 4-metil catecol e catecol como substratos, respectivamente. A energia de ativação (Ea) para reação direta foi calculada pela equação de Arrhenius, utilizando-se a atividade crescente até a temperatura ótima de reação pela seguinte relação:

$$\text{Log } k_2/k_1 = Ea\ (T_2 - T_1)/2.3\ R\ (T_2 \times T_1)$$

Onde:

Temperaturas em °K na fase ascendente de atividade

k_1 e k_2 = velocidade referentes às temperaturas 1 e 2

R = constantes dos gases e equivalente a 8,314 J/mol.°K ou 1,987 cal/mol °K.

4.2.11. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A estabilidade térmica da polifenoloxidase foi verificada pela incubação da enzima às temperaturas entre 30°C e 55°C durante 15 e 30 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo por 1 a 2 minutos, e leitura da atividade residual.

4.2.12. ESPECIFICIDADE A SUBSTRATOS

Foram testados os compostos p-cresol, L-Dopa, pirogalol, catequina, 4-metil catecol, catecol, ácido clorogênico e ácido caféico como potenciais substratos da polifenoloxidase, adaptando-se o ensaio descrito acima para o 4-metil catecol e utilizando-se comprimentos de onda específico para cada substrato.

4.2.13. CÁLCULO DAS CONSTANTES CINÉTICAS (Km e Vmax)

O efeito da concentração de substratos na atividade enzimática da polifenoloxidase foi verificado para 4-metil catecol e catecol. Os valores de Km e Vmax foram determinados segundo o método gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (1934).

4.2.14. EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A capacidade de inibição enzimática de alguns compostos foi testada com sua adição no ensaio sob diferentes concentrações. Os valores das constantes de inibição (Ki) foram obtidos segundo o método gráfico proposto por Dixon (1953).

4.2.15. ESTUDOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

4.2.15.1. EFEITO DA TEMPERATURA NA INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E CÁLCULO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO (Ea)

A inativação da PPO foi realizada pela exposição da enzima às temperaturas de 45°C, 55°C, 65°C e 70°C por diferentes períodos de tempo. A atividade residual foi medida após resfriamento em banho de gelo por 1 a 2 minutos. Após a inativação enzimática foi feita a determinação da energia de ativação (Ea) para inativação da PPO, de acordo com a equação de Arrhenius.

4.2.15.2. EFEITO DE SAIS NA INATIVAÇÃO TÉRMICA

Foram verificados os efeitos de cloreto de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de sódio na inativação térmica da polifenoloxidase. Os ensaios foram realizados com a adição dos sais na solução enzimática nas concentrações de 0,1M, 0,5M e 1,0M, e

incubação sob as condições de inativação descritas em 4.2.14.1, diferindo apenas nas temperaturas de exposição da enzima, que foram de 55℃, 60℃, 65℃ e 70℃.

4.2.15.3. EFEITO DA SACAROSE NA INATIVAÇÃO TÉRMICA

Foi verificado o efeito da sacarose na inativação térmica da polifenoloxidase. Os ensaios consistiram na adição do açúcar na solução enzimática em concentrações finais de 10%, 20% e 30%, e incubação sob as condições descritas em 4.2.15.1, diferindo apenas nas temperaturas de exposição da enzima, que foram de 50℃, 55℃, 60℃ e 70℃.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXTRAÇÃO

O escurecimento enzimático observado em frutos pode ser considerado intenso, e se inicia imediatamente após o descascamento. Tal fenômeno se deve principalmente à ruptura das células e estruturas celulares que contém enzimas e seus substratos, colocando-os em contato com o meio aquoso, levando a rápida oxidação de fenóis e conseqüente produção de pigmentos escuros. Após o corte polpa de atemóia passava de branca a marrom em poucos minutos; e a fim de minimizar tal escurecimento, todas as etapas dos processos de extração e purificação foram realizadas a 4°C ou em banho de gelo, sendo também realizado um estudo de extração na presença de inibidores do escurecimento visando controlar a reação.

5.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Os estudos de otimização das condições de extração consistiram da verificação do efeito de inibidores do escurecimento. Cada extração realizada nos estudos de otimização se obteve a partir de uma relação massa:volume de 1:2 (gramas de polpa de atemóia:mL de solução tampão).

Em nosso estudo a extração da enzima de atemóia foi verificada em relação a adição do Triton X-114 sobre a atividade enzimática. O efeito de sua concentração na extração da enzima foi testado nas concentrações de 6%, 10% e 12% no meio extrator. O escurecimento foi avaliado subjetivamente com base na comparação visual em relação à amostra padrão, a qual não continha inibidor de escurecimento; além da atividade enzimática.

A concentração de 12% apresentou melhores resultados, porém quando se fez a precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ foi impossível solubilizar o precipitado que formou grumos de difícil solubilização, separando-se em duas fases, a de cima, escura com pequenos grumos, e a parte de baixo branca opaca. O mesmo ocorreu com o Triton 10%. Portanto o Triton X-114 na concentração de 6% mostrou-se o ideal para a extração e purificação da PPO conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da concentração de Triton X-114 na extração da PPO de atemóia no extrato bruto.

Concentração Triton X-114	Volume (mL)	Atividade (UA/mL)	UA total	UA/g	Escurecimento após extração
0	25,5	420	10710	1071	++
6%	28,5	2200	62700	6270	+
10%	39	1670	65130	6513	-
12%	36,5	3300	120450	12045	-

(++) escurecimento máximo; (+) escurecimento mínimo; (-) ausência de escurecimento.

Marques et al. (1994) descreveram a PPO como uma proteína hidrofílica com uma curta cauda hidrofóbica que a prende a membrana dos tilacóides, portanto a extração da enzima da maioria das espécies requer o uso de detergentes tais como Triton X-110, Triton X-114 ou SDS (NICOLAS et al., 1994).

Dentre as concentrações de Policlar aT utilizadas, 0,1g, 0,2g e 0,4g/10g de polpa; aquela de 0,1g se mostrou ideal para extração de PPO de atemóia, resultando em um valor superior de atividade por grama de material (tabela 2).

Tabela 2. Efeito da concentração de Policlar aT na extração da PPO de atemóia.

Gramas Policlar aT/10g de fruta	Volume (mL)	Atividade enzimática (UA/mL)	UA total	UA/g tecido	Escurecimento após a extração	Atividade em relação ao controle (%)*
0	28	720	20160	2016	++	100
0,1	31	988	30643	3064	-	152
0,2	31	820	25420	2542	-	126
0,4	34	840	28560	2856	-	141,66

(++) escurecimento máximo; (+) escurecimento mínimo; (-) ausência de escurecimento.
* cálculo feito através dos resultados da UA/g.

Foram testadas as concentrações de 0,1g, 0,2g e 0,3g/10g de Policlar aT, na presença de 6% de Triton X-114 para a extração da PPO de atemóia. A amostra que continha 0,2g de Policlar aT apresentou os melhores resultados com um valor superior de atividade por grama de material na presença do Triton (tabela 3).

Tabela 3. Efeito da concentração de Policlar aT na extração da PPO de atemóia contendo 6% de Triton X-114.

Gramas Policlar aT/10g de fruta	Volume (mL)	UA/mL Extrato bruto	UA total	UA/g	Escurecimento após a extração	Atividade em relação ao controle (%)*
0	25,5	350	8925	892,5	++	100
0,1	25	3400	85000	8500	++	952,38
0,2	29,5	3400	100300	10030	+	1123,8
0,3	30	2320	69600	6900	-	773,1

(++) escurecimento máximo; (+) escurecimento mínimo; (-) ausência de escurecimento. * cálculo feito através dos resultados da UA/g.

Foi realizada uma extração da PPO de atemóia contendo 6% de Triton X-114 e 0,2g de Policlar aT/10g de polpa e uma extração controle, na qual não continha

inibidor de escurecimento. A amostra que continha os inibidores de escurecimento se mostrou mais eficiente para a extração da enzima tanto na etapa de extração quanto na precipitação de até 90% com sulfato de amônio, resultando na diminuição do escurecimento e aumento substancial da atividade enzimática (tabela 4).

Tabela 4. Efeito do uso de Triton X-114 (6%) e 0,2g Policlar aT/10g fruta na extração da PPO de atemóia.

Amostra	Etapas da extração e purificação	Vol. (mL)	UA/mL	UA total	UA/g	Escurecimento após a extração	Atividade em relação ao controle (%)*
Controle	Extrato bruto	25	400	10000	1000	++	100
	Precipitado 0-80%	5	1700	8500	850	+++	100
Triton X-114 e policlar aT	Extrato bruto	26	3900	101400	10140	-	1014
	Precipitado 0-80%	5	19400	98000	9800	++	1152,94

(+++) escurecimento máximo; (+) escurecimento mínimo; (-) ausência de escurecimento.
* cálculo feito através dos resultados da UA/g.

5.3. PURIFICAÇÃO

A purificação da polifenoloxidase de atemóia a partir do extrato bruto se iniciou com a concentração da amostra pela precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ até 30% de saturação. Ao sobrenadante obtido foi adicionado novamente sulfato de amônio a 90% de saturação; a realização de um fracionamento foi necessária, pois a amostra apresentou problemas com perda de atividade.

O precipitado protéico obtido pela saturação com sulfato de amônio (30-90%) foi dissolvido em solução tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,0, e aplicado na coluna contendo Sephadex G-100 (59,5 cm x 2,5 cm). A fração referente ao pico de atividade foi utilizada nos estudos subseqüentes. Esse perfil se repetiu nas várias

extrações realizadas. A PPO perdeu muita atividade durante o processo de purificação, foram realizadas muitas tentativas de minimizar esse problema, porém, essas foram infrutíferas. O fluxo da coluna de Sephadex G-100 foi de aproximadamente 5 mL a cada 11 minutos.

A tentativa de obter uma maior purificação da enzima, o eluato proveniente da coluna de Sephadex G-100 foi reunido e aplicado em coluna de DEAE-celulose (20,0 cm x 1,5 cm), no entanto observou-se uma perda de atividade enzimática com o progresso da purificação, e que mesmo após várias tentativas não pode ser controlada.

Os dados experimentais referentes às etapas de purificação da PPO de atemóia estão resumidos na tabela 5. Comparando-se a relação entre proteína total e volume, do extrato bruto e da concentração com $(NH_4)_2SO_4$ 30-90% de saturação, verificou-se que houve uma concentração de 1,53 vezes entre as etapas. Essa retirada de proteína mesmo associada uma perda de atividade enzimática (68%) entre as etapas manteve um fator de purificação de 1,20.

Tabela 5. Quadro de purificação da polifenoloxidase de atemóia.

Procedimento	**Volume (mL)**	**Atividade total (UA)**	**Proteína total (mg)**	**A.E. (UA/mg de proteína)**	**Fator de purificação**
Extrato bruto	57	387600	13,5945	28511,53	1
$(NH_4)_2SO_4$ 30-90%	10	124000	3,66	34444,44	1,20
Sephadex G-100	4,8	12480	0,06144	203125	7,12

(A.E.) Atividade específica

O fator de purificação final da PPO de atemóia foi de 7,12 vezes em relação ao extrato bruto (figura 9). Apesar do modesto fator de purificação, a grande retirada de proteínas e a sensível perda de atividade durante o processo representou um fator importante na redução da atividade específica, o que pode significar que a purificação da proteína em si pode ser maior do que o constatado, já que não foi possível controlar a perda de atividade enzimática no processo.

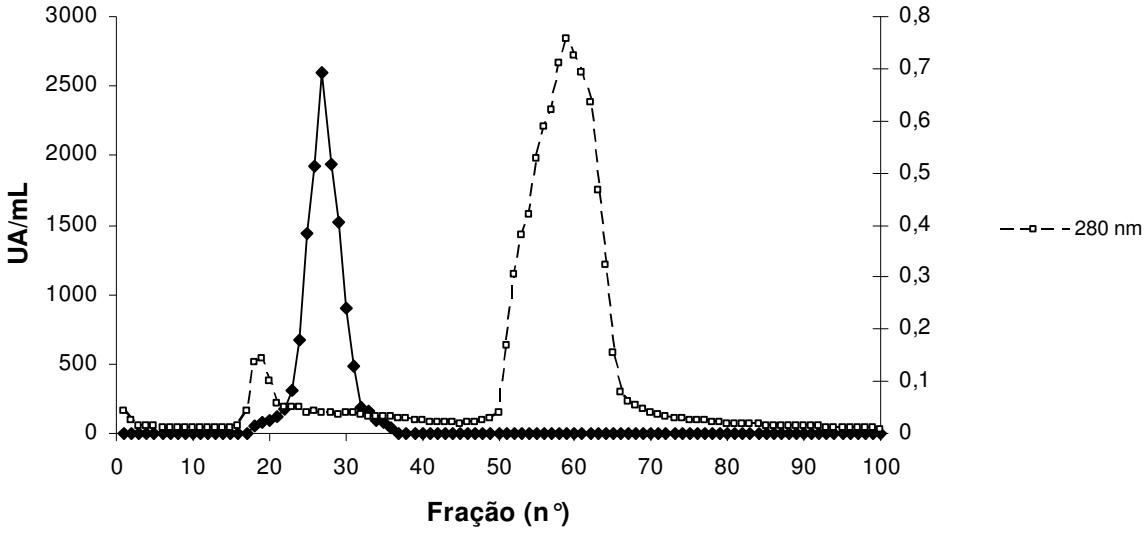


Figura 9. Perfil cromatográfico da PPO em coluna de Sephadex G-100. Atividade enzimática (UA/mL).

O primeiro pico de proteína, na leitura a 280 nm, é observado com 94,1 mL de eluição; logo após esse pico houve a eluição da polifenoloxidase purificada, com 136,1 mL. O segundo pico protéico foi eluído com 296,8 mL. Com exceção da proteína eluída no pico da Sephadex-G-100, em todas as etapas de purificação anteriores, foram necessárias as diluições das amostras para quantificar a proteína

pelo método de Bradford. Os valores obtidos com a leitura de absorvância e a curva de calibração estão no apêndice (tabela 1 e figura 1, respectivamente).

A literatura revela fatores de purificação das polifenoloxidases variando com a fonte da enzima, condições de extração e métodos de purificação. Yagar e Sagiroglu (2002) purificaram parcialmente a PPO de marmelo e, após diálise eles obtiveram um fator de purificação de 5,84. Dogan et al., (2007) encontraram um fator de purificação de 11,5 após cromatografia por afinidade na PPO de manjericão. Neves e Da Silva (2007) purificaram a PPO de yacon e obtiveram um fator de purificação igual a 7,9, após cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100.

5.4. ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR

O volume de eluição da enzima na coluna Sephadex G-100 (59,5 cm x 2,5 cm) foi de 136,1 mL. A curva de calibração, os respectivos padrões protéicos e a representação da eluição da PPO de atemóia estão na figura 10, a partir do qual foi estimado o peso molecular da enzima de atemóia em 82 kDa (82,000 daltons).

Os valores de peso molecular das polifenoloxidases de muitos vegetais estão numa faixa entre 35-100 kDa (VÁMOS-VYGYÁZO, 1981; LOURENÇO; NEVES, DA SILVA, 1992; CHO; AHN, 1999; DOGAN et al., 2005). Gauillard e Richard-Forget (1997) isolaram uma polifenoloxidase de pêra com PM igual a 40 kDa, peso molecular semelhante ao da PPO de couve que está entre 39 e 40 kDa (FUGITA et al.,1995). Gawlik-Diziki, Szymanowska e Baraniak (2007) estudaram a PPO de brócolis e obtiveram um peso molecular de 57 kDa. Lima et al., (2001) purificaram a PPO de pinha (*Annona squamosa* L.) e obtiveram um peso molecular de 90,700 daltons, valores bem próximos ao da atemóia obtidos em nosso estudo.

Estudando a polifenoloxidase de yacon, Neves e Da Silva (2007) obtiveram um peso molecular de 45,5 kDa. Mdluli (2005) purificou a polifenoloxidase de marula e obteve um peso molecular de 71 kDa.

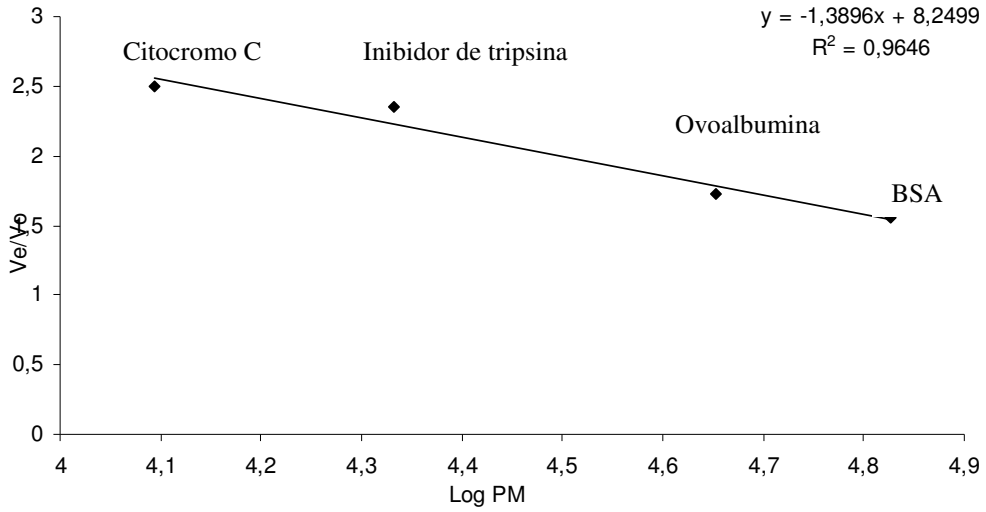


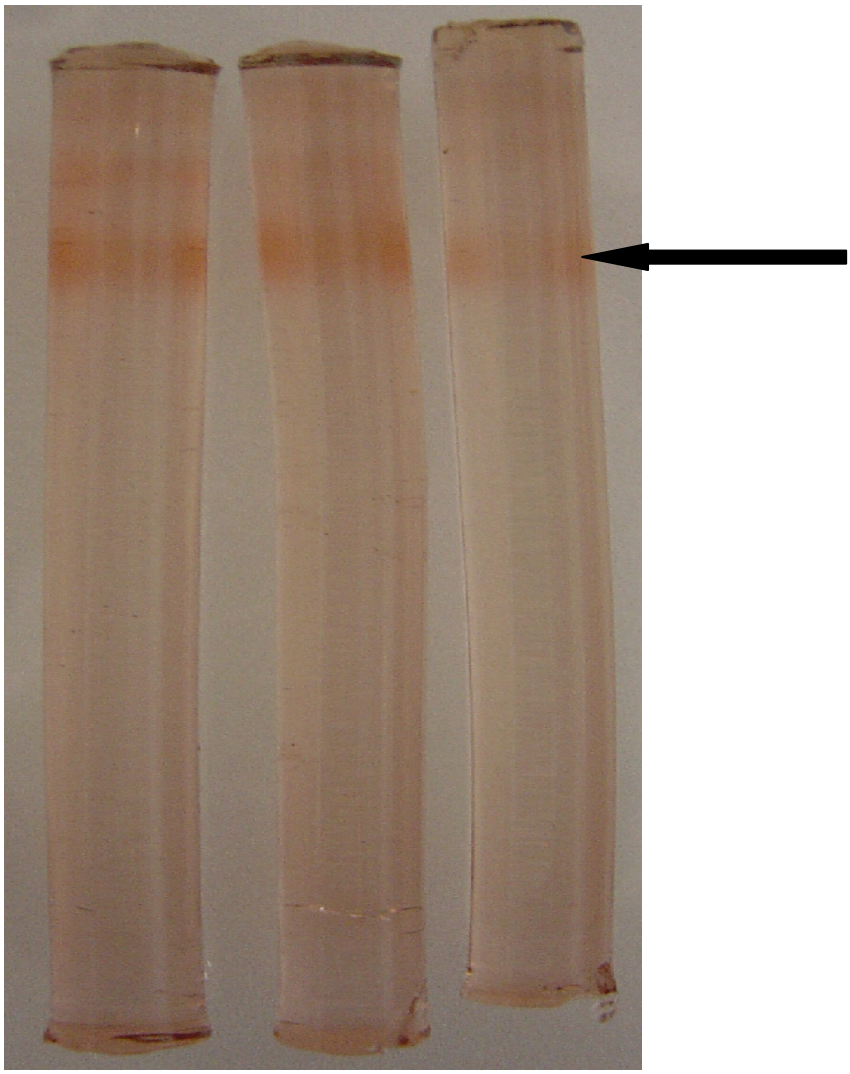
Figura 10. Curva de calibração com padrões protéicos: soroalbumina bovina (BSA), ovoalbumina, inibidor de tripsina, citrocomo C. (Ve) volume de eluição, (V0) volume de eluição de "blue dextran", (PM) peso molecular.

5.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A polifenoloxidase isolada da polpa de atemóia apresentou apenas uma isoforma após purificação em cromatografia em Sephadex G-100 (figura 11). Estudos de isolamento e purificação de PPO têm sido realizados em muitos vegetais, e em vários deles a enzima tem apresentado apenas uma isoforma, como a PPO de brócolis (GAWLIK-DZIKI, 2007), pinha (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001) e de yacon (NEVES; DA SILVA, 2007).

Para caracterização da atividade da PPO nos géis de poliacrilamida foram aplicadas alíquotas proporcionais à atividade de cada etapa de purificação: 50 µL de extrato bruto, 30 µL da solução precipitada com $(NH_4)_2SO_4$, 80 µL do eluato da

Sephadex G-100. Devido aos baixos teores de proteína na atemóia, não foi possível realizar a eletroforese utilizando o corante “Coomassie brilliant blue”, mesmo após a concentração do material por liofilização, não foi possível sua detecção no gel.



1 2 3

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das etapas de purificação da PPO de atemóia. Etapas: (1) extrato bruto, (2) concentrado protéico precipitado com $(NH_4)_2SO_4$, (3) cromatografia em Sephadex G-100, corada pela atividade enzimática. Concentração do gel foi 10%. Reação descrita em material e métodos.

5.6. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A ação catalítica das enzimas geralmente é alcançada dentro de uma estreita faixa de pH. Cada reação tem um valor ótimo, geralmente situado entre 4,5 e 8,0, no qual sua atividade é máxima. Para a enzima de atemóia o pH ótimo foi de 6,0 e 7,0 com valores máximos de atividade iguais a 900 e 700 UA/mL, utilizando 4-metil catecol e catecol como substratos respectivamente. Sob valores abaixo de 5,0 e acima de 7,0 a atividade da PPO caiu rapidamente (figuras 12 e 13). O pH ótimo para a atividade da polifenoloxidases de diferentes fontes se situa entre pH 5,0 e 7,0 (LAMBRECHT, 1995). Esses ótimos de pH variam também com métodos de extração, pureza da enzima, substratos e soluções tampão utilizadas (AYLWARD; HAISMAN, 1969; JIANG; ZAUBERMAN; FUCHS, 1997; SIDDIQ; SINHA; CASH, 1992; DOGAN; DOGAN, 2004). Sendo assim, uma série de PPOs estudadas possuem pHs nessa faixa, como por exemplo o de framboesa, com pH 7,0 (GONZÁLEZ; ANCOS; CANO, 1999); uva pH 5,5 (RAPEANU et al., 2006); feijões pH 7,2 (GOMES et al., 2001); polpa de banana pH ótimo de 6,5 (MELO; VILAS BOAS, 2006), polpa de manga pH ótimo de 7,0 (WANG et al.; 2007); graviola pH ótimo de 7,5 (BORA; HOLSCHUH; DA SILVA VASCONCELOS, 2004).

Kavrayan e Aydemir (2001) purificaram e caracterizaram a PPO de hortelã e observaram que o pH ótimo usando catecol como substrato foi 7,0 e com DL-dopa e L-dopa foi 7,5; em outro estudo realizado com hortelã, o pH ótimo foi 4,5, 5,0 e 6,5 para ácido caféico, 4-metil catecol e catecol, respectivamente (NEVES; PICCHI; DA SILVA, 2009). Oktay, Kücaçaliskan e Sakiroglu (1995) mostraram que o pH ótimo de atividade da PPO de maçã foi 7,0 para catecol, 9,0 para 4-metil catecol, 8,6 para pirogalol e 6,6 para L-dopa. Para a PPO brócolis o pH ótimo de atividade foi 5,72 para ambos os substratos, catecol e 4-metil catecol (GAWLIK-DZIKI; SZYMANOWSKA; BARANIAK, 2007). A PPO de lichia apresentou pH ótimo de

atividade para o extrato bruto de 7,5 utilizando (-)-epicatequina como substrato (LIU et al., 2007).

Em morangos, o pH ótimo de atividade da PPO é 5,5 e 4,5, usando catecol e 4-metil catecol, respectivamente (WESCHE-EBELING; MONTGOMERY, 1990) e no yacon o pH ótimo de atividade é 6,6 usando o ácido caféico como substrato e 5,0 com o ácido clorogênico (NEVES; DA SILVA, 2007). As PPOs são freqüentemente inativadas a valores de pH abaixo de 4,0, fornecendo assim um método de controle do escurecimento enzimático (ZEMEL et al., 1990); um exemplo é o pH ótimo de atividade de nêspera (6,5) com 4-metil catecol como substrato, a enzima foi praticamente inativada em pH abaixo de 4,5 e acima de 8,5 na presença do mesmo substrato (DINCER et al., 2002).

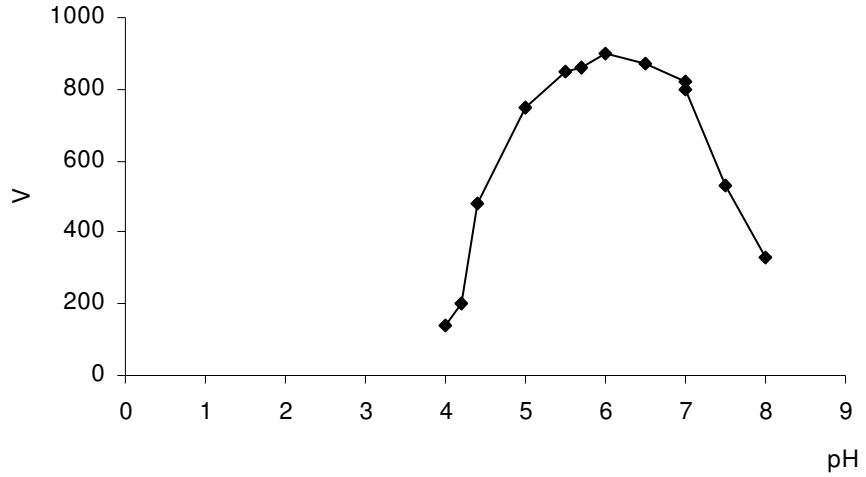


Figura 12. Atividade da PPO em função do pH utilizando 4-metil catecol como substrato. (V) velocidade de reação (UA/mL). Condições de ensaio descritos em material e métodos.

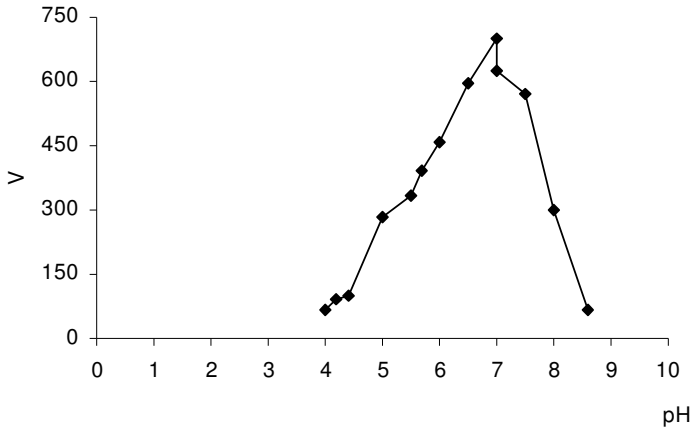


Figura 13. Atividade da PPO em função do pH utilizando catecol como substrato. (V) velocidade de reação (UA/mL). Condições de ensaio descritos em material e métodos.

5.7. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A PPO foi mais estável quando incubada por 12 horas, mostrando apenas um pico de atividade no pH 5,0; quando incubada por 24 horas a PPO exibiu dois pico de atividade, nos pHs 5,0 e 6,5; e mostrou os mesmos valores de atividade para 12 e 24 horas nos pHs 6,0 e 7,0-8,0 (figura 14).

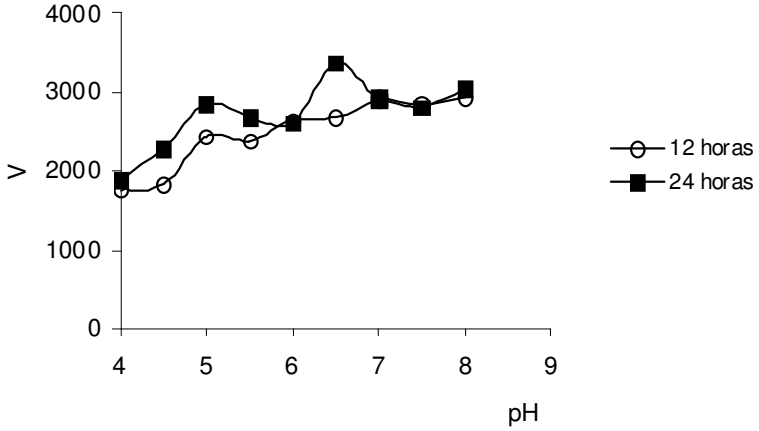


Figura 14. Efeito do pH na estabilidade da PPO utilizando 4-metil catecol como substrato. (V) velocidade residual (UA/mL).

Comportamento semelhante foi observado com PPO de marula, que se mostrou estável ao pH 6,0 quando incubada por 30 min. (MDLULI, 2005).

5.8. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Assim como nas reações químicas, a velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura. Porém isto ocorre até que se atinja a velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer (BOBBIO; BOBBIO, 1992). A PPO de atemóia apresentou maior valor de atividade sob temperatura de reação de 35°C utilizando 4-metil catecol como substrato, com valores relativamente altos entre 20°C e 45°C; a velocidade de reação caiu para 64,64% e 87,87% do máximo, quando ocorreu sob as temperaturas de 10°C e 55°C, respectivamente (figura 15). Quando foi utilizado catecol como substrato, o maior valor de atividade foi sob temperatura de 28°C, com valores relativamente altos entre 22°C e 35°C; a velocidade de reação caiu para 56,28% e 75,4% do máximo, quando ocorreu sob as temperaturas de 10°C e 50°C, respectivamente (figura 16).

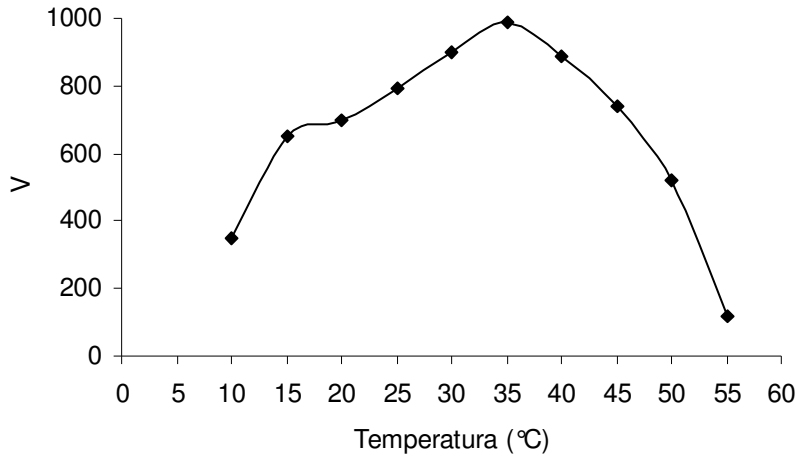


Figura 15. Atividade da PPO em função da temperatura utilizando 4-metil catecol como substrato. (V) velocidade de reação (UA/mL).

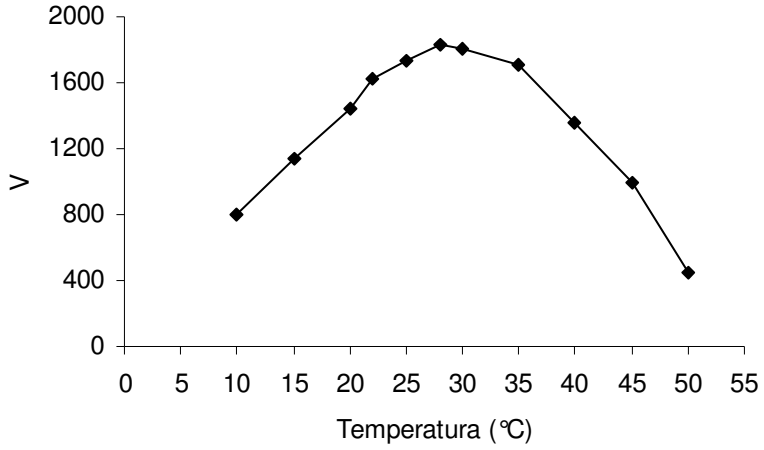


Figura 16. Atividade da PPO em função da temperatura utilizando catecol como substrato. (V) velocidade de reação (UA/mL).

A maioria das PPOs estudadas tem sua temperatura ótima de atividade entre 10 e 60°C; em geral, a temperatura ótima da PPO depende do substrato utilizado no ensaio (VAMÓS-VIGYÁZÓ, 1981; YORUK; MARSHALL, 2003). Estudando a PPO de uva da variedade Victoria Rapeanu et al., (2006) observaram que a maior atividade foi a 25°C usando catecol, seu substrato preferencial. Já a PPO de yacon apresentou temperatura ótima de atividade por volta de 30°C com os quatro substratos testados, 4-metil catecol, catecol, ácido caféico e ácido clorogênico (NEVES; DA SILVA, 2007). Kavrayan e Aydemir (2001) observaram que a temperatura ótima de atividade da enzima em hortelã usando catecol como substrato é 30°C; o mesmo resultado foi observado em mangas com o mesmo substrato (WANG et al., 2007). Yagar e Sagiroglu (2002) purificaram e caracterizaram a PPO de marmelo e observaram que a temperatura ótima de atividade foi 40°C com catecol como substrato. Estudos realizados com a PPO de graviola mostraram que a atividade ótima da enzima está entre 30°C e 32°C,

utilizando catecol como substrato (BORA; HOLSCHUH; DA SILVA VASCONCELOS, 2004).

Em maçã a PPO demonstrou atividade máxima de 15, 56, 50 e 70°C usando catecol, 4-metil catecol, L-dopa e pirogalol como substratos, respectivamente (OKTAY; KÜCAÇALISKAN; SAKIROGLU,1995). Em nêspera a temperatura ótima de atividade foi 35°C com 4-metil catecol como substrato (DINCER et al., 2002)

Para cada substrato foi calculado a Energia de ativação (Ea) a partir dos dados de atividade nas temperaturas inferiores à temperatura ótima. A energia de ativação foi de 3,67 kcal/mol (15,4 kJ/mol) e 7,76 kcal/mol (32,48 kJ/mol) para 4-metil catecol e catecol, respectivamente. Em maçã, a energia de ativação para os mesmos substratos foi 28,3 cal/mol e -107,3 cal/mol; para o catecol a energia de ativação da PPO teve valor negativo pela alta temperatura (OKTAY; KÜCAÇALISKAN; SAKIROGLU,1995). Em estudo com a PPO de kiwi a Ea foi 7 kcal/mol com catequina como substrato (PARK; LUH, 1985).

5.9. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A polifenoloxidase de atemóia mostrou-se estável quando incubada a temperaturas de 30°C e 35°C por 15 minutos e a temperatura de 30°C por 30 minutos, e tornou-se termolábil a partir de 35°C e 30°C quando incubada por 15 e 30 minutos respectivamente, sendo inativada completamente quando incubada a 55°C, utilizando 4-metil catecol como substrato (figura 17). Quando utilizado catecol, a PPO de atemóia mostrou-se termolábil a partir de 30°C quando incubada por 15 e 30 minutos, sendo inativada completamente quando incubada a 55°C (figura 18).

Comportamento semelhante foi observado com a polifenoloxidase de cogumelo, que se mostrou estável entre 25 e 35°C, rapidamente inativada entre 45 e 55°C e inativada completamente a 70°C (GOUZI; BENMANSOUR, 2007).

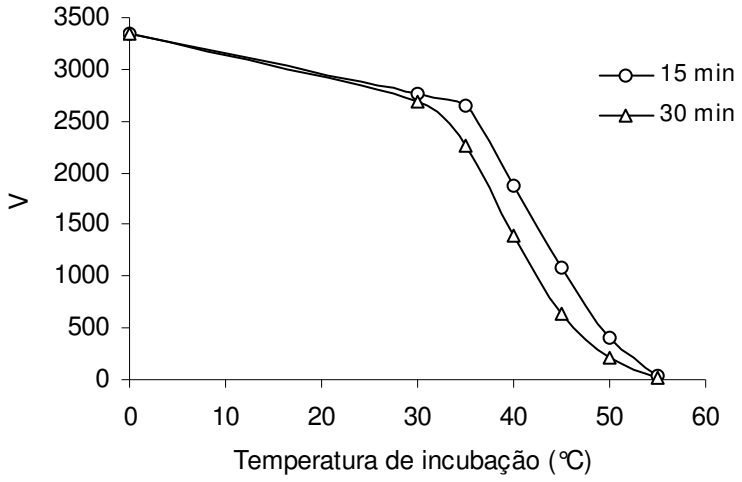


Figura 17. Efeito da temperatura na estabilidade da PPO utilizando 4-metil catecol como substrato. (V) atividade residual (UA/mL); (A_0) atividade inicial (sem incubação, UA/mL).

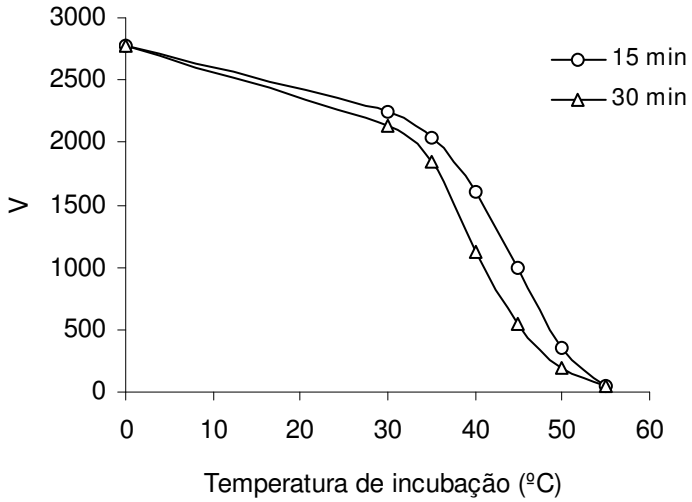


Figura 18. Efeito da temperatura na estabilidade da PPO utilizando catecol como substrato. (V) atividade residual (UA/mL); (A_0) atividade inicial (sem incubação, UA/mL).

Já a PPO de polpa de manga se mostrou estável em temperatura moderada (30-50℃), perdendo pouco de sua atividade por 15 min. a 50℃, 60% por 5 min. a 60℃ e foi praticamente inativada por 5 min. a 80℃ (WANG et al., 2007). Em marmelo, a PPO perdeu 20% da atividade a 60℃ por 30 min., e 65% a 70℃ pelo mesmo período de tempo (YAGAR; SAGIROGLU, 2002).

5.10. ESPECIFICIDADE A SUBSTRATOS E CÁLCULO DAS CONSTANTES CINÉTICAS (Km e Vmax)

Alguns compostos foram testados como potenciais substratos para PPO de atemóia, a qual apresentou maior afinidade pelo 4-metil catecol (400 nm), seguido de catecol (420 nm), ácido clorogênico (410 nm) e ácido caféico (420 nm). A enzima não mostrou capacidade de catalisar a oxidação dos fenóis L-dopa (475 nm), catequina (420 nm), pirogalol (470 nm) e p-cresol (400 nm) nas condições estudadas (tabela 6).

As constantes de Michaelis para 4-metil catecol e catecol foram 5,52 mmol/L e 79,3 mmol/L, respectivamente. Os valores de Vmax foram 1428,57 UA/mL e 5000 UA/mL (figuras 19 e 20). As razões Vmax/Km de 258,79 e 63,05, para 4-metil catecol e catecol, respectivamente, indicam ação preferencial da polifenoloxidase pelo primeiro substrato.

Tabela 6. Atividade da PPO de atemóia com diferentes compostos.

Substrato	Concentração no ensaio (µmol)	Atividade (UA/mL)
4-metil catecol	3,33	2020
	6,66	2600
	16,66	2300
Catecol	3,33	660
	6,66	1250
	16,66	2440
Ácido caféico	0,33	70
	0,66	70
	1,66	100
Ácido clorogênico	0,33	45
	0,66	75
	1,66	120
L-dopa	0,33	0
	0,66	0
	1,66	0
Catequina	0,33	0
	0,66	0
	1,66	0
Pirogalol	0,33	0
	0,66	0
	1,66	0
p-cresol	0,33	0
	0,66	0
	1,66	0

Os ensaios foram realizados conforme descrito em material e métodos utilizando-se a enzima parcialmente purificada e os respectivos substratos nos comprimentos de onda de cada ensaio: 4-metil catecol (400 nm), catecol (420 nm), ácido clorogênico (410 nm), ácido caféico (420 nm), L-dopa (475 nm), catequina (420 nm), pirogalol (470 nm) e p-cresol (400 nm).

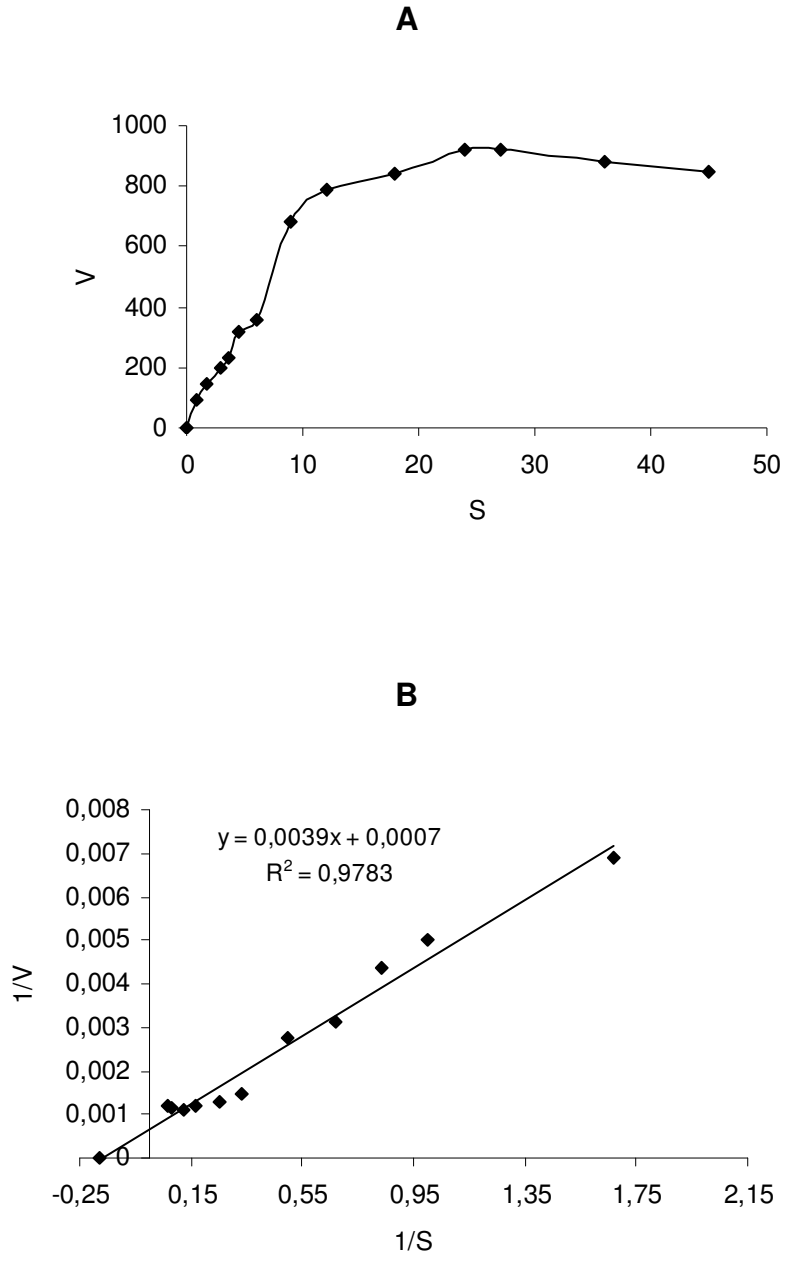


Figura 19. Efeito da concentração de 4-metil catecol na atividade da PPO. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (S) concentração de substrato (mmol/L). (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) gráfico duplo recíproco Lineweaver-Burk.

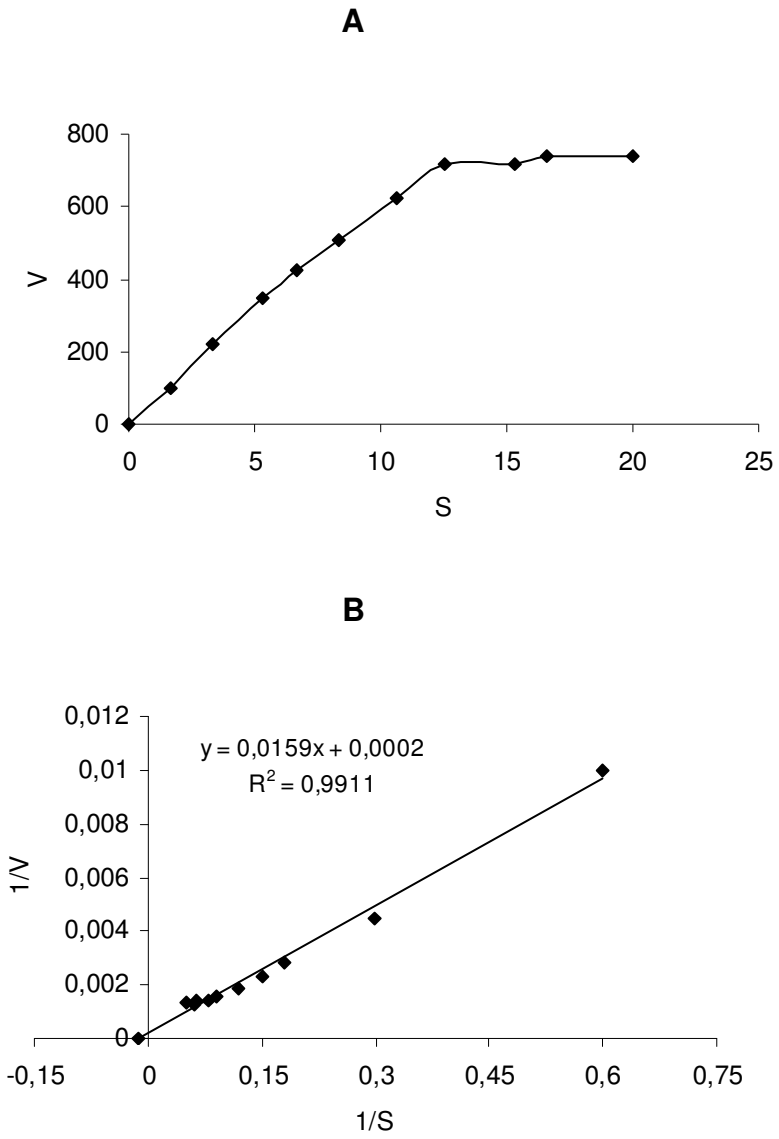


Figura 20. Efeito da concentração de catecol na atividade da PPO. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (S) concentração de substrato (mmol/L). (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) gráfico duplo recíproco Lineweaver-Burk.

As PPOs de plantas superiores podem atuar sobre uma grande variedade de compostos fenólicos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Cita-se *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico como substratos monofenólicos, e catecol, diidroxifenilalanina, ácido clorogênico e 4-metil catecol como substratos difenóis (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). O 4-metil catecol e o catecol são substratos muitas vezes escolhidos para determinar a atividade da polifenoloxidase isoladas de vegetais (MCCALLUM; WALKER, 1990).

Para os mesmos substratos, foram encontradas grandes diferenças nos parâmetros cinéticos (Km e Vmáx) dependendo da fonte vegetal, gênero, cultivar, do tecido de onde é extraída a enzima, e da pureza da enzima (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A PPO de brócolis teve maior afinidade com catecol, seguido de 4-metil catecol (GAWLIK-DZIKI; SZYMANOWSKA; BARANIAK, 2007), o substrato fenólico 4-metil catecol foi mais eficiente para nêspera (DINCER et al., 2002) e abacate (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002), o ácido caféico e o ácido clorogênico no yacon (NEVES; DA SILVA, 2007) e catecol na manga (WANG et al., 2007) quando consideramos a relação Vmáx/Km; em pinha (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001) e em uva da variedade Victoria (RAPEANU et al., 2006) a enzima apresentou maior especificidade pelo catecol. Em hortelã a enzima demonstrou maior afinidade pelo ácido caféico (NEVES; PICCHI; DA SILVA, 2009).

5.11. EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Várias formas de inibição da PPO são conhecidas, agentes antioxidantes, quelantes e até compostos que seriam substratos preferenciais em relação aos presentes no próprio alimento, muito embora os métodos utilizados pelas indústrias sejam relativamente poucos (MARSHALL; KIM; WEI, 2000); pois durante a seleção do inibidor a ser utilizado, sendo ele antioxidantes e outros conservantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muitos maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se

considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (RAMALHO; JORGE, 2006).

Alguns antioxidantes denominados agentes quelantes estão sendo usados como inibidores da PPO; eles atuam formando um complexo com o Cu^{2+} e bloqueando o sítio ativo da enzima (SAPERS et al., 1989; MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, 1990; MCEVILY; IYENGAR, 1992a). A PPO pode ser inibida por vários agentes quelantes tais como cianeto, monóxido de carbono, tropolona, 2-mercaptobenzotiazol, azida, ácido cítrico e ácido etileno diamino tetra cético (EDTA) (WALKER, 1975).

O uso de agentes redutores é um método de controle efetivo do escurecimento pela PPO (OSUGA et al., 1994). O ácido ascórbido (vitamina C) e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes para o uso em frutas e hortaliças e seus sucos visando prevenir o escurecimento e outras reações oxidativas (WILEY, 1994; RAMALHO; JORGE, 2006). Ele atua seqüestrando o cobre, grupo prostético da polifenoloxidase, e reduzindo quinonas, formadas enzimaticamente, a difenóis incolores antes de formarem pigmentos escuros (SAPERS; MILLER, 1998). Também podem reagir irreversivelmente com as o-quinonas formando compostos incolores estáveis; porém o efeito dos agentes redutores é temporal, pois os difenóis são consumidos na reação (LOZANO-DE-GONZÁLEZ; DRUDIS-BISCARRI; IBARZ-RIBAS, 1994).

No grupo de inibidores que tem ação sobre os substratos estão os ácidos carboxílicos aromáticos, que apresentam a estrutura química similar aos substratos fenólicos e, portanto competem na ligação com a enzima, e são relatados como efetivos por fornecerem inibição em longo prazo (SAPERS et al., 1989; MCEVILY; IYENGAR; GROSS, 1992b; NICOLAS et al., 1994). Os ácidos fenólicos

caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metila na molécula. São divididos em dois grupos: o primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1), e o segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo o ácido cinâmico, *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico os sete mais comumente encontrados no reino vegetal (RAMALHO; JORGE, 2006). Vários derivados de ácido cinâmico atuam como substratos análogos e servem como bons inibidores da PPO de maçã. A ação inibitória diminui na seguinte ordem: ácido cinâmico > ácido *p*-cumárico > ácido ferúlico > ácido benzóico (MARSHALL; KIM; WEI, 2000).

Os sais testados foram: sulfato de cobre, sulfato de ferro, cloreto de manganês, sulfato de zinco e cloreto de cálcio (tabela 7). Todos afetaram moderadamente a atividade da enzima, excetuando-se o sulfato de cobre, que promoveu uma inibição com valores inferiores a 10% em todas as concentrações. Dentre os compostos quelantes de metais, a azida sódica foi a mais eficiente, seguida do dietilditiocarbamato, que apresentou fase “lag” de aproximadamente 1 min. e 10 segundos. O EDTA apresentou uma capacidade de inibição moderada sobre a PPO (tabela 8). A constante de inibição para a azida sódica e para o dietilditiocarbamato foram de 0,1238 e 0,0128, respectivamente; ambas do tipo competitivo. Os valores de Ki para os ácidos fenólicos foram determinados pelo método proposto por Dixon (1953) (apêndice figuras 2 e 3, respectivamente).

Entre outros compostos testados (tabela 9), o metabissulfito de sódio foi o mais eficiente, seguido pelo sulfito de sódio e fluoreto de sódio. O metabissulfito de sódio mostrou uma crescente fase “lag” proporcional a sua concentração, comportamento semelhante foi observado para o ácido ascórbico (tabela 10). Foi

testado também o ácido ascórbico e o acido cítrico (tabela 10), que pertencem à classe dos compostos acidulantes, mostrando-se o primeiro mais eficiente.

O efeito de alguns ácidos fenólicos sobre a atividade da polifenoloxidase de atemóia são mostradas na tabela 11. As capacidades de inibição foram acentuadas para todos os compostos testados, seguindo a ordem: ácido transcinâmico, ácido benzóico, ácido 2-nitrobenzóico, ácido ferúlico, ácido protocatéico, ácido p-cumárico, ácido salicílico e ácido 3,5 dinitrosalicílico. A constante de inibição para o ácido benzóico foi de 2,699mmol/L, 1,942, 1,728, 0,372 e 0,293mmol/L para os ácidos 2-nitrobenzóico, transcinâmico, protocatéico e p-cumárico, respectivamente. Apenas a inibição do ácido benzóico e do ácido p-cumárico foi do tipo não competitivo, as demais foram do tipo competitivo. Os valores de Ki para os ácidos fenólicos foram determinados pelo método proposto por Dixon (1953) (apêndice figuras 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente).

Tabela 7. Efeito de sais na atividade da PPO de atemóia.

Composto	Concentração no ensaio (mmol/L)	Inibição (%)[a]
$CuSO_4$	0,033	1,01
	0,083	7,07
	0,33	4,04
	0,83	7,07
$FeSO_4$	0,033	10
	0,083	21
$MnCl_2$	0,033	13,04
	0,083	15,65
	0,33	15,65
	0,83	9,56
$ZnSO_4$	0,033	13,04
	0,083	11,3
	0,33	18,26
	0,83	12,17
$CaCl_2$	0,033	1,74
	0,083	2,6
	0,33	9,56
	0,83	16,52

(a) % inibição em relação ao controle; (b) após fase lag de alguns segundos.
OBS: Fe SO_4 nas concentrações 0,33 e 0,83 mmol/L ficam azul quando entram em contato com o substrato.

Tabela 8. Efeito de compostos quelantes na atividade da PPO de atemóia.

Composto	Concentração no ensaio (mmol/L)	Inibição (%)[a]
EDTA	0,033	16,8
	0,083	21,16
	0,33	21,84
Dietilditiocarbamato	0,033	46,95[b]
	0,083	61,3[b]
	0,066	43,95
	0,1166	62,08
Azida sódica	0,033	21,12
	0,083	41,41
	0,33	76,76
	0,83	13,04

% inibição em relação ao controle; (b) após fase lag de 1 minuto e 10 segundos.

Tabela 9. Efeito de outros compostos na atividade da PPO de atemóia.

Composto	Concentração no ensaio (mmol/L)	Inibição (%)[a]
NaF	0,033	2,52
	0,083	2,52
	0,33	5,88
	0,83	4,2
Metabissulfito de sódio	0,033	31,09[b]
	0,083	52,1[c]
Sulfito de sódio	0,033	7,56
	0,083	10,92
	0,33	9,24
	0,83	15,12

(a) % inibição em relação ao controle; (b) após fase lag de 1 minuto e 10 segundos; (c) após fase lag de 4 minutos.

Tabela 10. Efeito de compostos acidulantes da atividade da PPO de atemóia.

Composto	Concentração no ensaio (mmol/L)	Inibição (%)[a]
Acido ascórbico	0,066	15,7 [b]
	0,166	16,52 [b]
	0,33	33,88[c]
	0,83	75,20[c]
Acido Cítrico	0,033	5,78
	0,083	5,78
	0,33	9,09
	0,83	13,22

(a) % inibição em relação ao controle; (b) após fase lag de alguns segundos; (c) após fase lag de 5 minutos.

Tabela 11. Efeito de substratos análogos na atividade da PPO de atemóia.

Composto	Concentração no ensaio (mmol/L)	Inibição (%)[a]
Ac. Benzóico	0,033	4,39
	0,083	10,98
	0,33	31,86
	0,83	58,79
Ac. 2-Nitrobenzóico	0,033	7,69
	0,083	12,08
	0,33	32,96
	0,83	58,24
Ac. p-Cumárico	0,033	7,69
	0,083	10,98
	0,33	20,88
	0,83	36,26
Ac. Ferúlico	0,033	0
	0,083	4,28
	0,33	21,42
	0,83	54,28
Ac. Salicílico	0,033	2,85
	0,083	4,28
	0,33	14,28
	0,83	35,71
Ac. Protocatéico	0,083	4,54
	0,33	35,22
	0,83	52,27
Ac. 3,5 Dinitrosalicílico	0,033	9,09
	0,083	9,09
	0,33	29,54
Ac. Transcinâmico	0,033	4,54
	0,083	23,86
	0,33	44,88
	0,83	66,47

(a) % inibição em relação ao controle.

Em um estudo recente (AYAZ et al., 2008) a Nêspera foi submetida a um teste com quatro inibidores (metabissulfito de sódio, azida sódica, ácido ascórbido e tiouréia), dentre estes, o metabissulfito foi o mais efetivo, seguido pelo ácido ascórbico; o mesmo resultado foi encontrado na PPO de yacon (NEVES; DA SILVA, 2007) e raiz de bananeira (WUYTS; WAELE; SWENNEN, 2006), onde o metabissulfito demonstrou ser um inibidor eficaz.

Em estudos realizados com a PPO de Yacon (NEVES; DA SILVA, 2007) o ácido ascórbico também demonstrou uma fase “lag” variando entre 2 e 5 min. com os três substratos testados, ácido caféico, ácido clorogênico e 4-metil catecol; esse mesmo período “lag” também foi observado por outros autores (VÁMOS-VIGYÁZO, 1981; LOURENÇO; NEVES; DA SILVA, 1992; RAPEANU et al., 2006).

Em PPO de cogumelo, o ácido benzóico e a azida sódica são inibidores do tipo competitivos (GOUZI; BENMANSOUR, 2007) na mesma enzima de hortelã o ácido ascórbico, ácido cinâmico, metabissulfito de sódio e o ácido protocatéico são inibidores competitivos, enquanto o pirogalol, ácido p-cumárico, ácido benzóico e resorcinol são inibidores não competitivos (NEVES; PICCHI; DA SILVA, 2009). Em estudos realizados com a PPO de brócolis o sulfato de sódio, ácido cítrico e o ácido ascórbico são inibidores do tipo não competitivo (GAWLIK-DIZIKI; SZYMANOWSKA; BARANIAK, 2007).

Em geral, o mecanismo de inibição difere de acordo com o composto utilizado. Ensaios de inibição indicam que compostos tiois, tais como o metabissulfito de sódio são um dos inibidores mais potentes da PPO (DING et al., 1998; DUANGMAL; OWUSU APENTEN, 1999).

5.12. ESTUDOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

As proteínas podem ser desnaturadas por diferentes métodos, inclusive o calor, perdendo assim a sua atividade biológica. Grande parte das enzimas é destruída por aquecimento entre 70 e 80°C, durante um intervalo de tempo que varia de dois a cinco minutos (BOBBIO; BOBBIO, 1992). A PPO não pertence às enzimas estáveis ao calor. Exposições curtas à temperatura de 70 a 90°C são, na maioria

dos casos, suficientes para a destruição parcial ou total da sua função catalítica (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Valderrama et al., (2001) estudaram o efeito do tratamento térmico sobre a atividade da PPO de maçã e observaram ser um processo não linear. Eles verificaram que a atividade de PPO diminui com o aumento da temperatura e tempo de exposição do extrato enzimático, sendo que a isoenzima foi inativada após10 minutos de tratamento a 75°C.

A inativação enzimática, através do tratamento térmico, é uma das soluções encontradas pela indústria alimentícia, sendo esse recurso utilizado principalmente na conservação do produto, em seu período de elaboração e armazenamento (LUIZ; HIRATA; CLEMENTE, 2007).

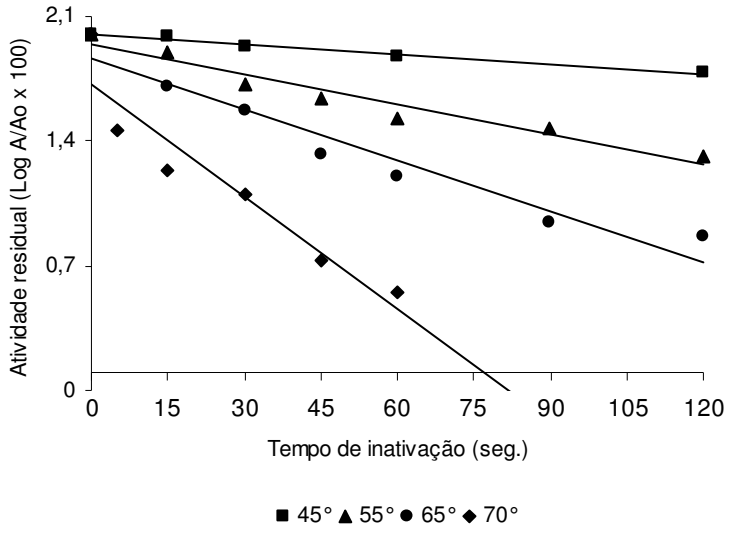


Figura 21. Efeito da temperatura na inativação da polifenoloxidase de atemóia utilizando 4-metil catecol como substrato. Conforme descrito em material e métodos.

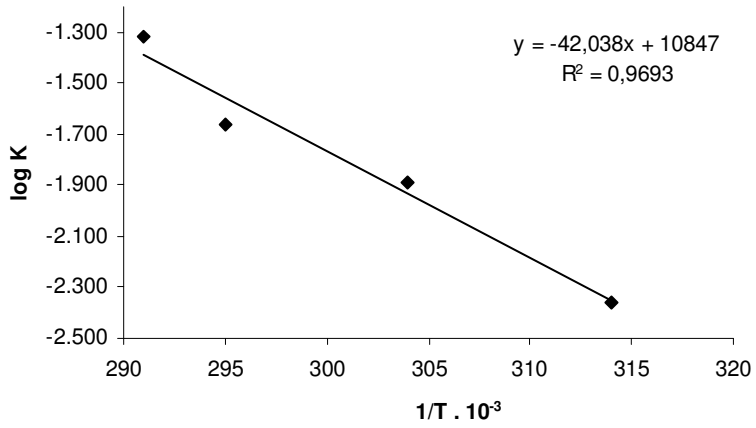


Figura 22. Curva de log k x 1/T para cálculo da Ea (energia de ativação para a reação de inativação). (k) -2,3 x Tg; (T) temperatura absoluta (°K). Os dados das constantes cinéticas referentes ao gráfico estão descritos na tabela 2 do apêndice.

A partir dos dados de inativação térmica mostrados na figura 21, foram obtidos os valores utilizados para o cálculo do valor de energia de ativação (Ea) para a reação de inativação da enzima (figura 22) utilizando 4-metil catecol como substrato, que foi de 342,31 kJ/mol (83,53 cal/mol). Os dados referentes às constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica estão resumidos na tabela 2 do apêndice. É importante observar que valores de Ea mais altos estão associados com maior estabilidade térmica, da mesma forma, valores de Ea mais baixos correspondem a menos estabilidade térmica. Rapeanu et al., (2006) utilizaram o mesmo substrato e relataram valores de Ea de 225 kJ/mol de PPO em uvas da variedade Victoria. Valores de energia de ativação mais baixos, de 28,3 cal/mol, 93,69 kJ/mol^{-1} e 78,13 kJ/mol^{-1}, foram obtidos com PPO de maçã (OKTAY; KÜCAÇALISKAN; SAKIROGLU, 1995), yacon (NEVES; DA SILVA, 2007) e hortelã (NEVES; PICCHI; DA SILVA, 2009), respectivamente. Também foi estudado o efeito da inativação térmica com o catecol como substrato, representado nas figuras 23 e 24.

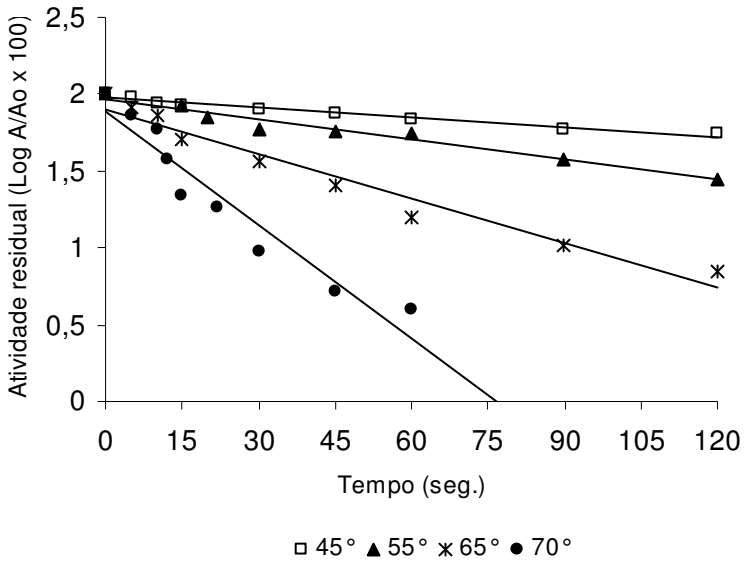


Figura 23. Efeito da temperatura na inativação da polifenoloxidase de atemóia utilizando catecol como substrato. Conforme descrito em material e métodos.

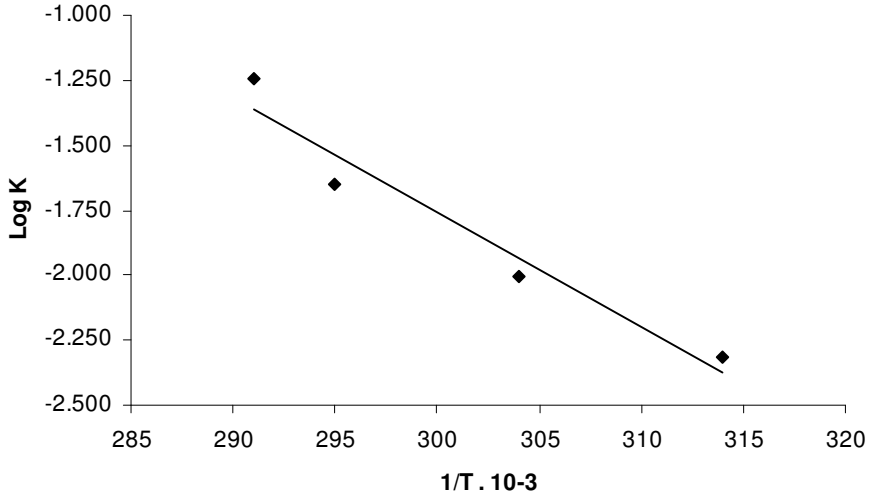


Figura 24. Curva de log k x 1/T para cálculo da Ea (energia de ativação para a reação de inativação). (k) -2,3 x Tg; (T) temperatura absoluta (°K). Os dados das contantes cinéticas referentes ao gráfico estão descritos na tabela 3 apêndice.

A partir dos dados de inativação térmica mostrados na figura 23, foram obtidos os valores utilizados para o cálculo do valor de energia de ativação (Ea) para a reação de inativação da enzima (figura 24) utilizando catecol como substrato, que foi de 357,04 kJ/mol (87,12 cal/mol). Os dados referentes às constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica estão resumidos na tabela 3 do apêndice. Estudos feitos com a PPO de alcachofra de Jerusalém utilizando o mesmo substrato mostraram que a Ea para polpa e pele foram 42,56 e 29,34 kcal/mol, respectivamente (ZIYAN; PEKYARDIMCI, 2003); a PPO de taro apresentou Ea de 21 $kcal.mol^{-1}$ (YEMENICIOGLU; ÖZKAN; CEMEROGLU, 1999).

É reconhecida a ação de alguns agentes químicos na estabilização de proteínas em solução. Estudos sobre a ação protetora dos agentes químicos sobre a desnaturação pelo calor foram realizados com um número de proteínas provenientes de diferentes fontes; e embora os açúcares e sais tenham sido utilizados como agentes estabilizadores para a manutenção da atividade biológica de macromoléculas, existem poucos relatos sobre os efeitos desses agentes sobre a inativação térmica dessa enzima em vegetais (LOURENÇO; NEVES; DA SILVA, 1992). O efeito protetor de açucares e sais na atividade de enzimas depende da concentração, da natureza do sal e de características estruturais da molécula (LEE; TIMASHEFF, 1981; INOUYE; KUZUYA; TONOMURA, 1998; NEVES; LOURENÇO, 1998).

O efeito dos sais sobre a atividade enzimática e sua inativação térmica é muito complexo, envolvendo efeitos diretos sobre a termoestabilidade, estrutura de água e reações com diversos constituintes da proteína, incluindo seu sítio ativo, bem como reações com os seus potenciais substratos e eventuais produtos de catálise (HIPPEL; WONG, 1965; PARK; RAINES, 2001). Sabe-se que certos sais neutros

interagem com sistemas protéicos de maneira que vão além dos simples e não específicos efeitos de carga. A presença de sais em uma solução protéica pode ter efeito protetor (INOUYE; KUZUYA; TONOMURA, 1998) ou favorável (HIPPEL; WONG, 1965) em relação a desnaturação, porém o efeito desestabilizante predomina (HIPPEL; WONG, 1965; LU; WHITAKER, 1974; WANG et al., 1999). Independentemente do tipo de efeito exercido pelo sal na termoestabilidade protéica, ele é linearmente proporcional à concentração do meio.

No presente trabalho foram verificados os efeitos de cloreto de sódio, cloreto de potássio e cloreto de cálcio nas concentrações de 0,1M, 0,5M e 1,0M sobre a inativação térmica da PPO às temperaturas de 55°C, 60°C, 65°C e 70°C (figuras 25, 26, 27, 28, 29 e 30). O NaCl não se mostrou eficiente agente protetor à inativação térmica da PPO de atemóia em todas as temperaturas testadas, desde aquelas que menos afetaram a estabilidade da enzima (55°C e 60°C) até valores mais elevados (65°C e 70°C), que foram capazes de promover a inativação da enzima em menos de dois minutos. Não se observou diferenças no efeito protetor entre as concentrações de NaCl, com exceção da temperatura de 70°C, em que o NaCl 1M se mostrou mais eficiente que as demais concentrações, e consequentemente não houve possibilidade de variação nos valores de energia de ativação (Ea) pela presença do sal. O KCl também não foi um agente protetor hábil para a PPO de atemóia, porém, nas diferentes concentrações utilizadas mostrou-se um pouco mais eficiente que o NaCl; no entanto a semelhança no efeito protetor entre as concentrações testadas foram pequenas e, consequentemente não afetou a Ea. Resultados contrários foram observados em estudos realizados com a PPO de batata-doce, onde o NaCl teve um efeito protetor maior que o KCl (LOURENÇO; NEVES; DA SILVA, 1992).

O efeito da ação de diferentes concentrações de $CaCl_2$ sobre a PPO de atemóia demonstrou uma inativação da enzima, com uma pequena exceção da concentração 0,1M nas temperaturas de 65°C e 70°C. Em 50°C e 55°C houve uma inativação crescente, enquanto que em 65°C e 70°C, 0,1M protegeu enquanto as outras concentrações inativaram; no entanto não houve possibilidade de cálculo da Ea, conforme pode ser observado pela variação nas curvas de inativação, um comportamento característico da enzima (figuras 29 e 30). Resultados semelhantes foram encontrados por Gonçalves, Carvalho e Gonçalves (2000) onde o cloreto de cálcio reduziu significativamente a atividade da mesma enzima de abacaxi. Os dados das constantes cinéticas na presença de sais estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6 do apêndice.

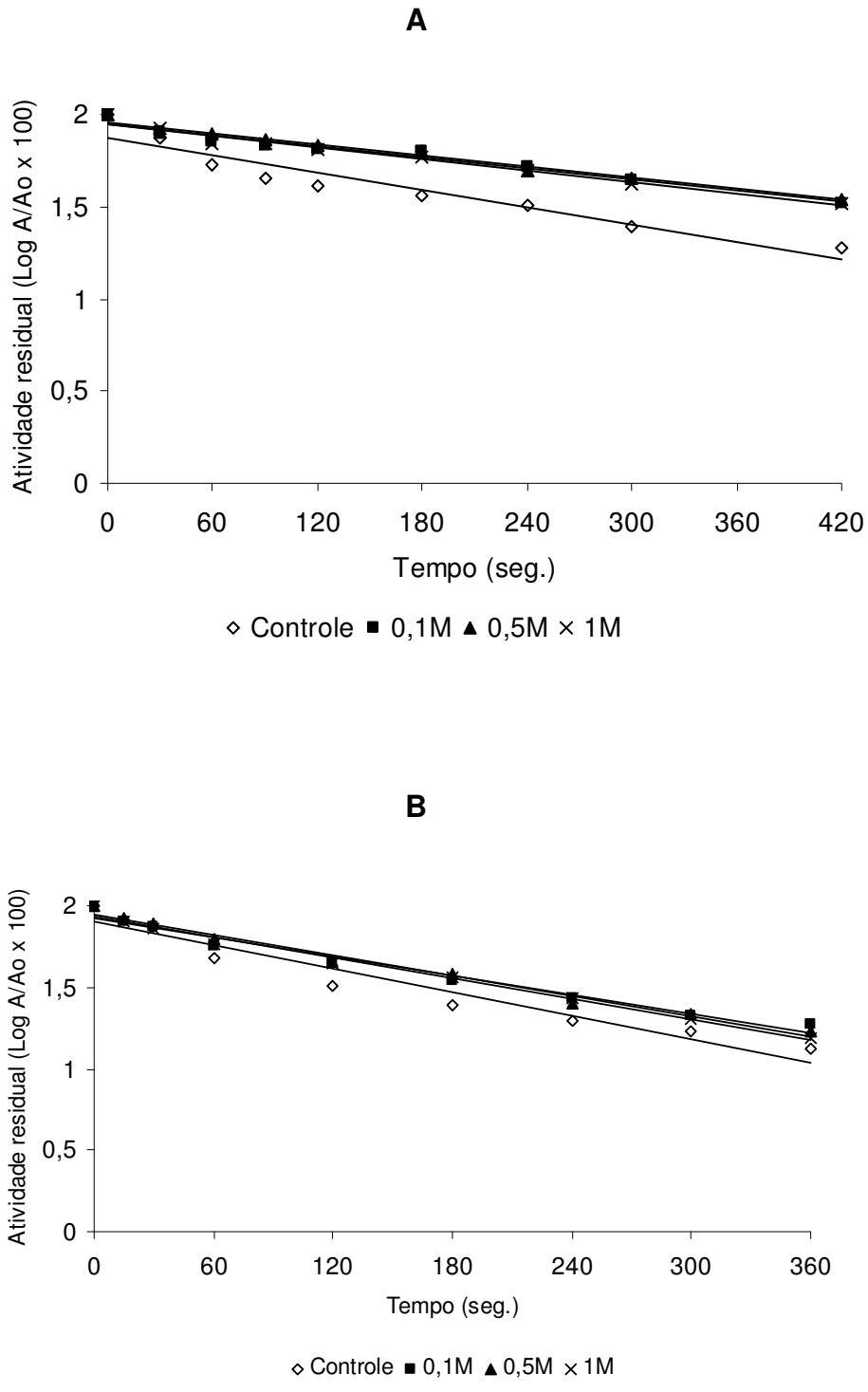


Figura 25. Efeito do NaCl na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 55°C; (B) 60°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de NaCl, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

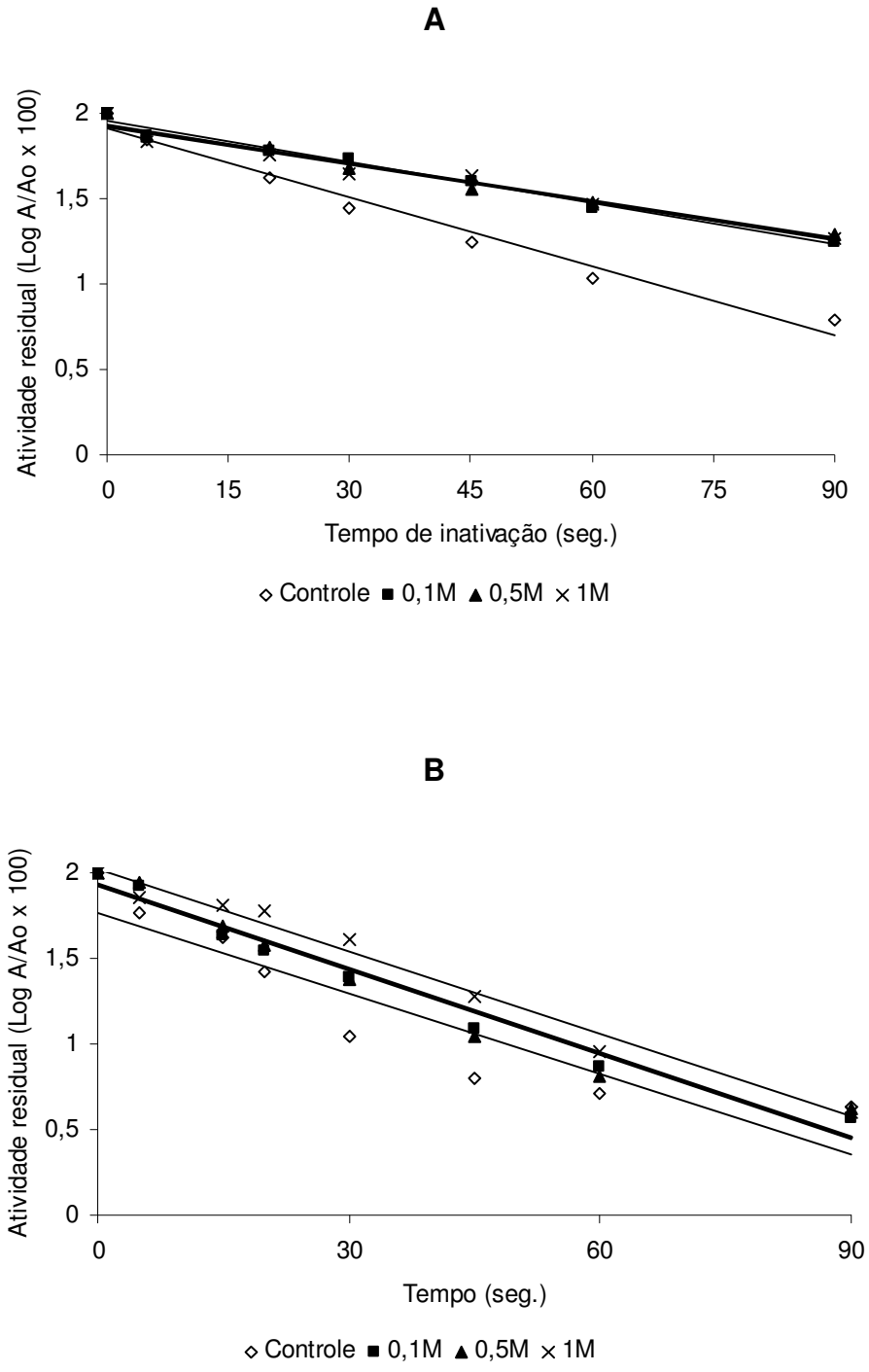


Figura 26. Efeito do NaCl na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 65°C; (B) 70°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de NaCl, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

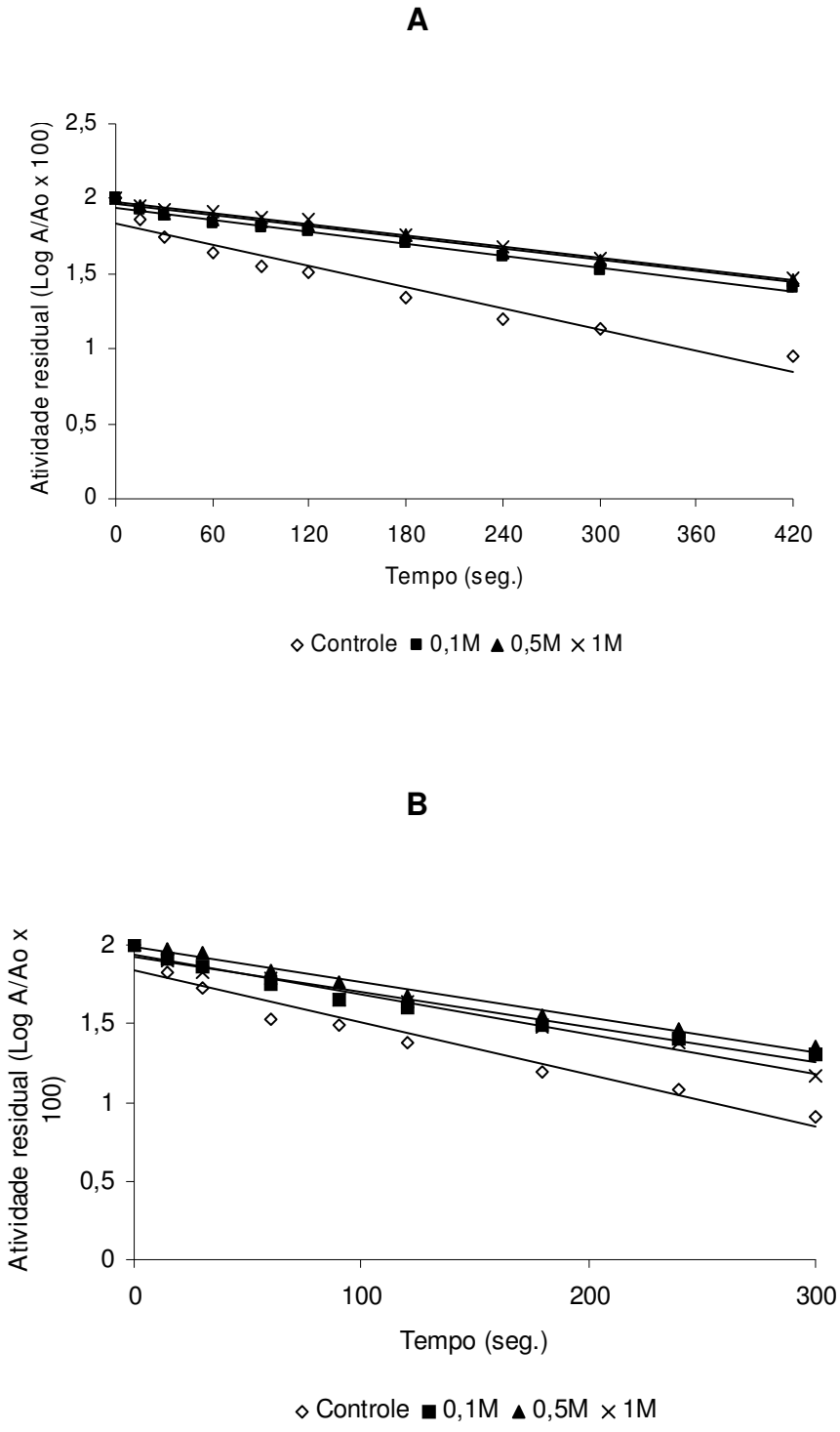


Figura 27. Efeito do KCl na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 55°C; (B) 60°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de KCl, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

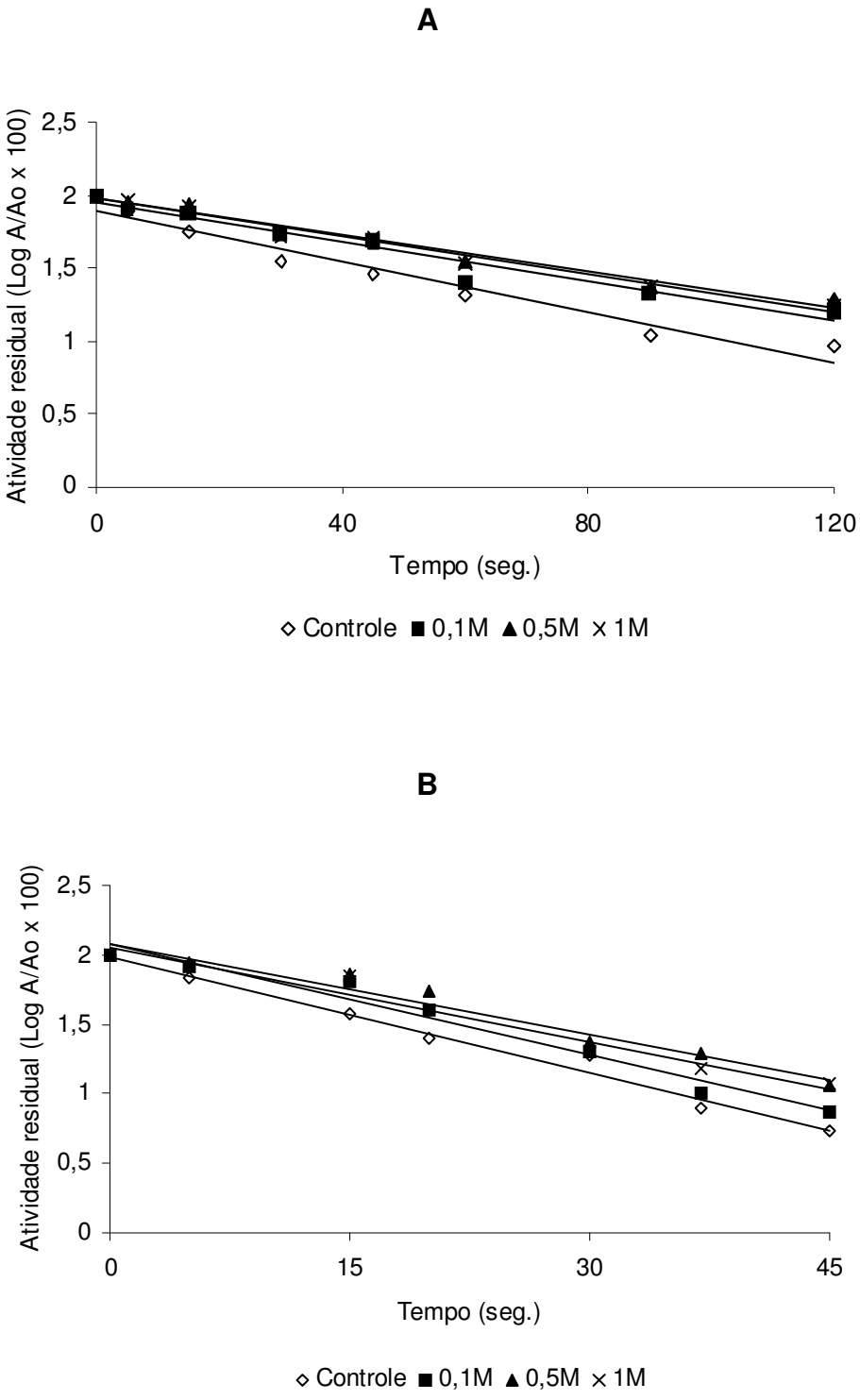


Figura 28. Efeito do KCl na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 65°C; (B) 70°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de KCl, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

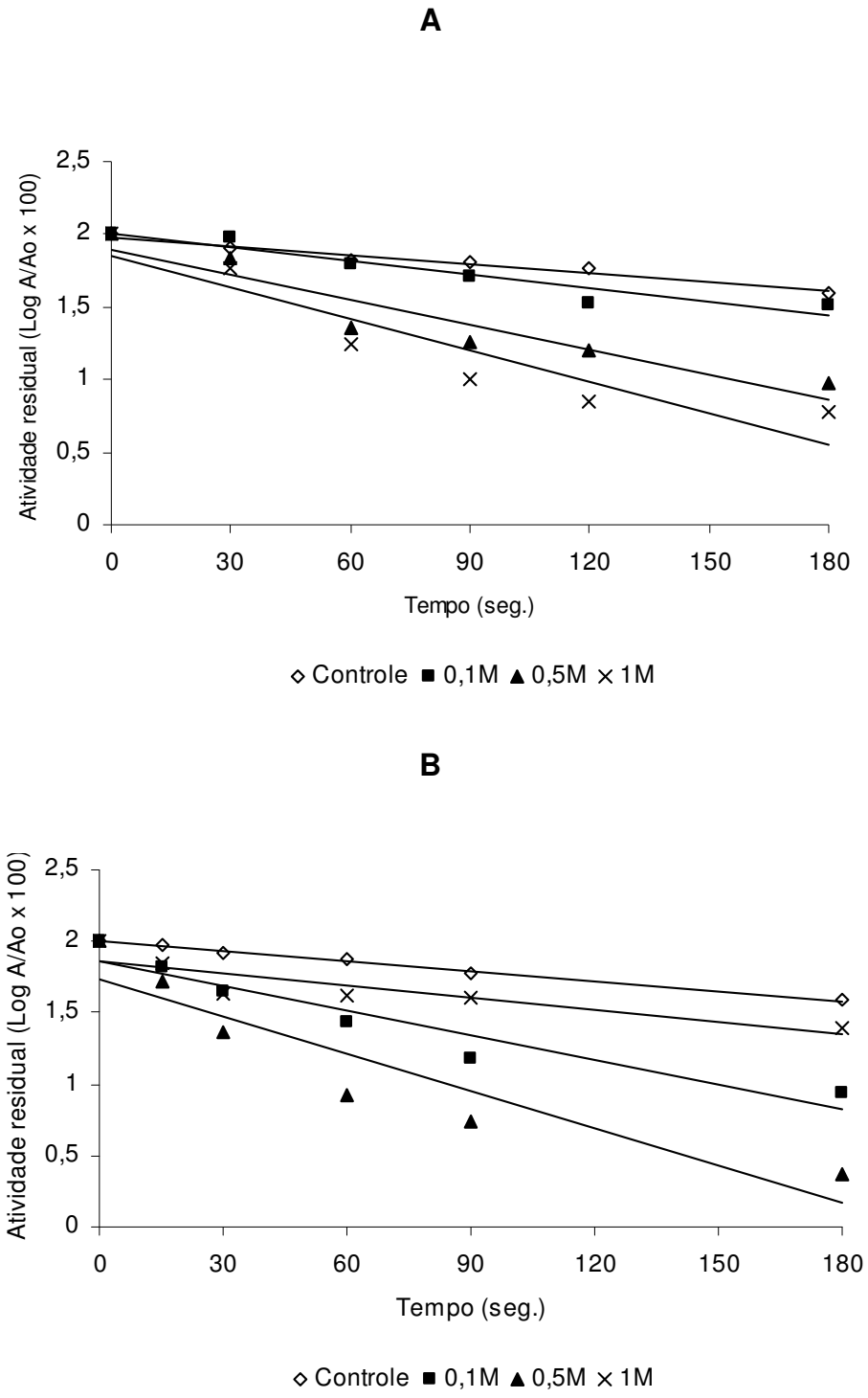
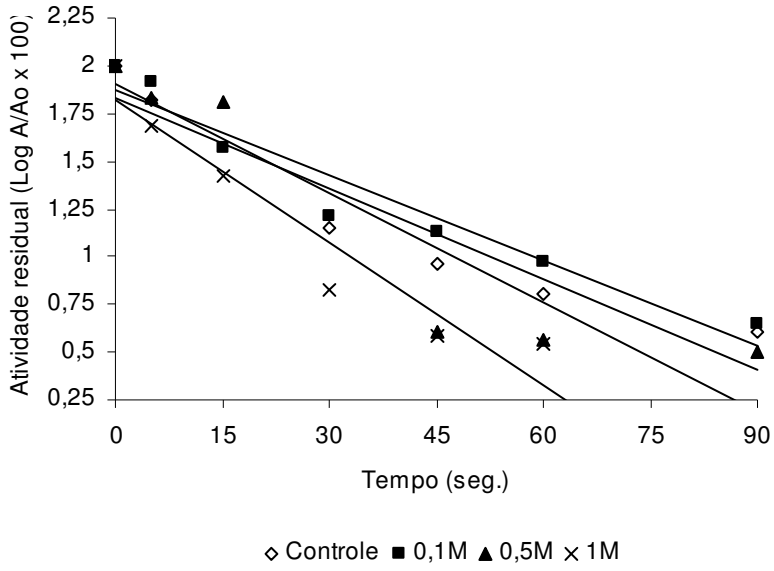


Figura 29. Efeito do $CaCl_2$ na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 55°C; (B) 60°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de $CaCl_2$, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

A



B

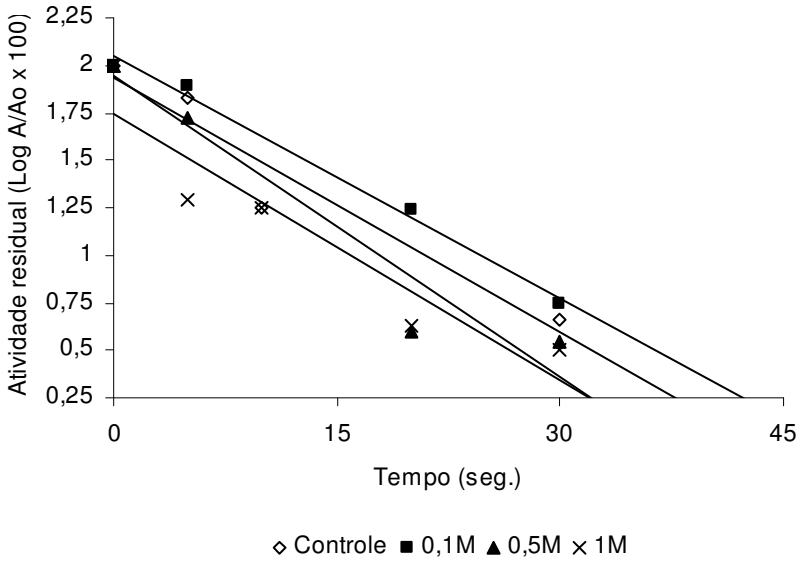


Figura 30. Efeito do $CaCl_2$ na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 65°C; (B) 70°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 0,1M, 0,5M e 1M de $CaCl_2$, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

Alguns autores (BACK; OAKENFULL; LUND, 1979; LEE; TIMASHEFF, 1981) afirmam que o efeito protetor dos açúcares na estabilidade térmica das proteínas se deve, principalmente, ao efeito desses na estrutura da água onde a proteína se encontra. O que determina a força das interações hidrofóbicas da macromolécula sobre sua desnaturação. É sugerido em alguns trabalhos (BACK; OAKENFULL; LUND, 1979; LEE; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF, 2002; XIE; TIMASHEFF, 1997) que os açúcares, em geral, não interagem diretamente com a estrutura protéica. Assim, em um sistema trifásico constituído de água, proteína e um co-solvente, no caso o açúcar; este seria excluído da água de hidratação da proteína. Na desnaturação, a superfície da proteína aumenta devido; principalmente, ao rompimento das pontes de hidrogênio e pela exposição de regiões apolares, que na forma nativa estariam cercadas no interior de estruturas globulares. Tal incremento em porções apolares expostas ao solvente pela macromolécula pode corresponder a um aumento na hidratação preferencial, pois há uma maior necessidade de água disponível para hidratação da proteína na forma desenovelada em relação à forma nativa (TIMASHEFF, 2002; XIE; TIMASHEFF, 1997). Assim, as alterações na estrutura da água, promovida pelos açúcares, contribuiriam para tornar as interações hidrofóbicas da macromolécula tanto mais estáveis, quanto maior fosse a concentração do co-solvente.

A sacarose mostrou-se discreto agente protetor à inativação térmica da PPO de atemóia apenas nas temperaturas menores (50°C e 55°C); porém não teve diferença significativa entre as concentrações testadas. Nas temperaturas mais elevadas (60°C e 70°C), apenas a concentração de 30% a 70°C apresentou um pequeno efeito protetor; a partir desses resultados, a semelhança do que ocorreu com os sais, há clara indicação de que as variações de Ea são desprezíveis (figuras

31 e 32). Lourenço, Neves e Da Silva (1992) mostraram que a sacarose agiu como agente protetor à inativação térmica da PPO de batata doce a 80℃ nas concentrações de 20% e 40%; o que não ocorreu a 70℃ nas mesmas condições. Em PPO de hortelã, a sacarose nas concentrações de 20% e 40% protegeu a enzima por mais 20 min. em relação ao controle em 80℃; em 70℃ a sacarose não protegeu a enzima da inativação térmica em relação ao controle sem o açúcar (KRAVAYAN; AYDEMIR, 2001). Em outro estudo realizado com PPO de hortelã revelou que um aumento na concentração de sacarose correspondeu a um aumento na estabilidade da enzima, independentemente da temperatura de aquecimento, quando comparados ao controle sem o açúcar (NEVES; PICCHI; DA SILVA, 2009).

Yoovidhya, Combes e Monsan (1986) sugerem que para diferentes enzimas o efeito do mesmo aditivo pode ser contrário. De acordo com esses autores, isso ocorre principalmente devido a natureza da enzima e, sobretudo, o seu balanço hidrofílico-hidrofóbico.

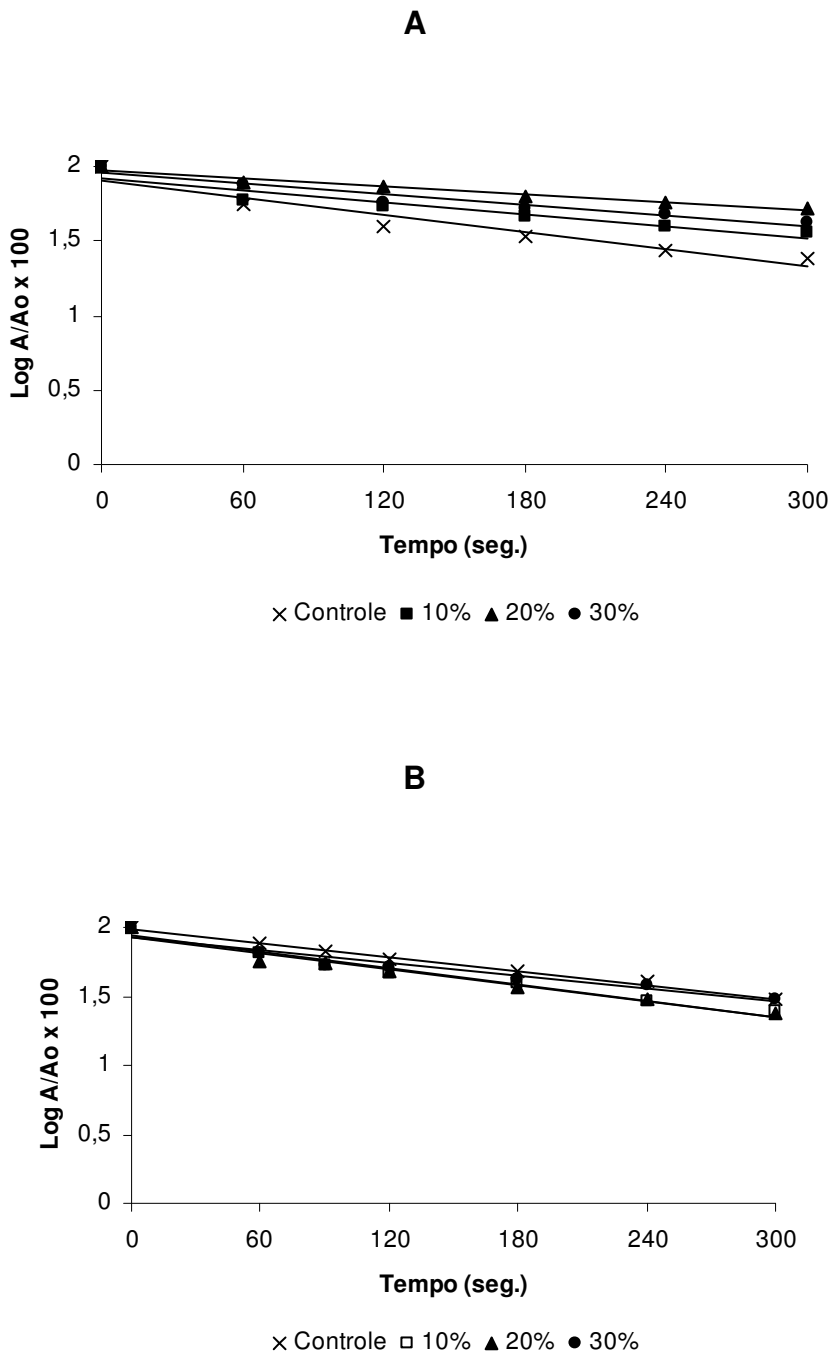


Figura 31. Efeito da sacarose na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 50°C; (B) 55°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 10%, 20% e 30% de sacarose, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

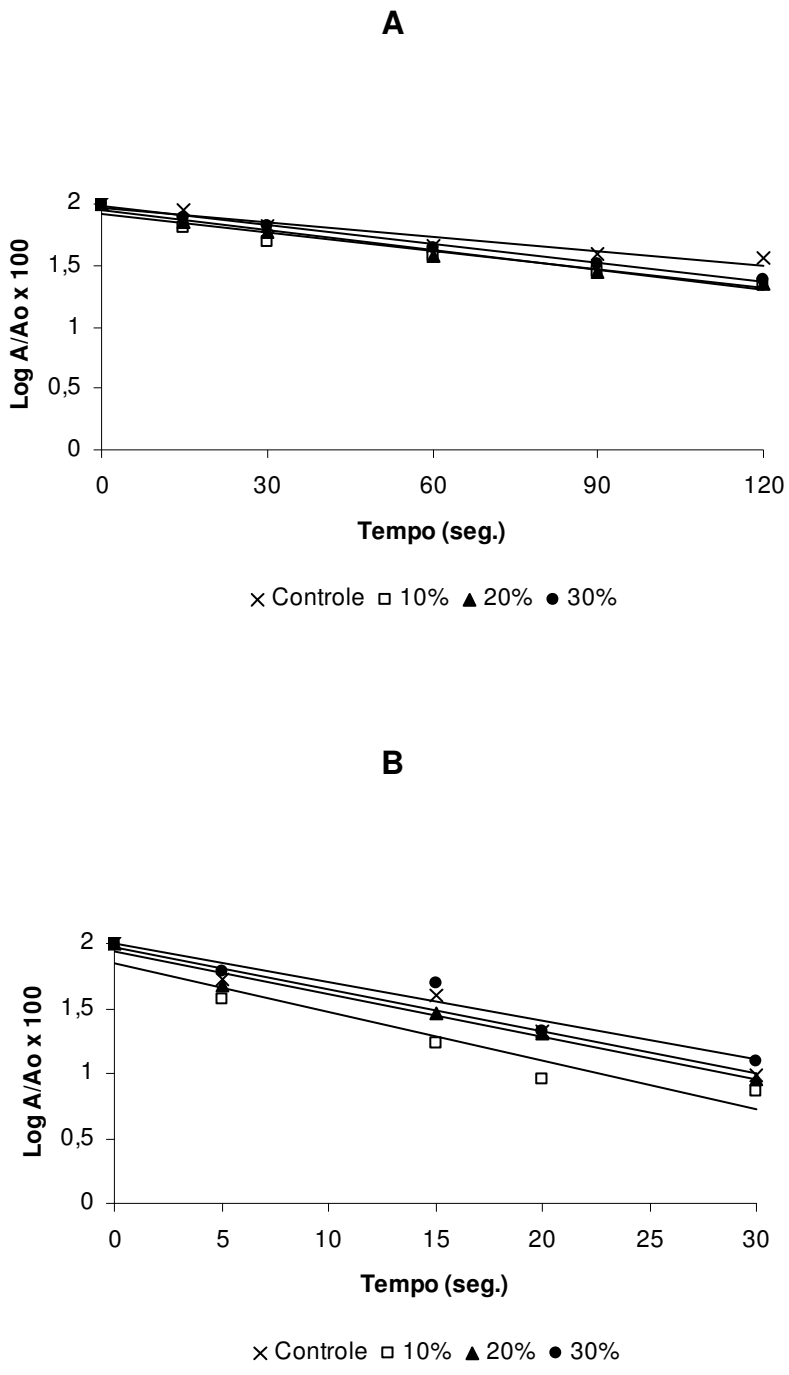


Figura 32. Efeito da sacarose na inativação térmica da PPO de atemóia. (A) 60°C; (B) 70°C. A PPO purificada foi incubada na presença de 0, 10%, 20% e 30% de sacarose, a inativação térmica acompanhada conforme descrito em material e métodos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

• O isolamento da PPO de atemóia indicou uma necessidade de uso de detergentes e inibidores do escurecimento enzimático na etapa de extração.

• Apesar de um baixo fator de purificação a eletroforese e a baixa concentração de proteína indicam uma enzima com alto grau de pureza.

• O processo de purificação adotado resultou em um único pico de atividade com fator de purificação final de 7,12.

• A eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima purificada demonstrou a ocorrência de uma única forma enzimática sem a presença de isoenzimas.

• A PPO de atemóia apresentou um peso molecular de 82 kDa, pH ótimo de 6,0 e 7,0, temperatura ótima de 35°C e 28°C, utilizando 4-metil catecol e catecol como substratos, respectivamente.

• A enzima apresentou maior especificidade para o 4-metil catecol comparativamente a outros substratos comumente utilizados nos estudos de polifenoloxidases de vegetais. Valores da razão Km/Vmax para os substratos 4-metil-catecol e catecol, respectivamente; indicam maior afinidade pelo primeiro substrato.

• A enzima não mostrou capacidade de oxidação de alguns compostos fenólicos como L-dopa, catequina, pirogalol e p-cresol.

• Dentre os inibidores enzimáticos usados, a azida sódica foi a mais eficiente dos compostos quelantes de metais, seguida pelo dietilditiocarbamato; ambos apresentando uma ação do tipo competitiva. Com exceção do sulfato de cobre, os sais metálicos tiveram um efeito moderado na inibição da enzima.

• Entre outros compostos testados como inibidores da atividade da PPO de atemóia, o metabissulfito de sódio foi o mais eficiente. Dos acidulantes testados, o ácido ascórbico demonstrou grande destaque em relação ao ácido cítrico.

• Vários ácidos fenólicos apresentaram capacidade de inibição sobre a PPO, o ácido transcinâmico mostrou-se o mais eficiente, seguido pelo ácido benzóico, 2-nitrobenzóico, ferúlico, protocatéico, p-cumárico, salicílico e 3,5 dinitrosalicílico. Apenas a inibição do ácido benzóico e do p-cumárico foi do tipo não competitivo, as demais foram do tipo competitivo.

• Os estudos de inativação térmica revelaram um valor de energia de ativação (Ea) para inativação de 342,31 kJ/mol (83,53 cal/mol) e 357,04 kJ/mol (87,12 cal/mol) utilizando-se 4-metil catecol e catecol, respectivamente.

• Os sais NaCl, KCl e $CaCl_2$ protegeram a enzima, porém não houve diferença entre as concentrações testadas (de 0,1 até 1,0M); com exceção do $CaCl_2$, que só protegeu na concentração 0,1M nas temperaturas de 65°C e 70°C.

• A sacarose mostrou-se discreto agente protetor à inativação térmica da PPO de atemóia apenas nas temperaturas mais baixas (50℃ e 55℃). Nas temperaturas mais elevadas (60℃ e 70℃), apenas a concentração de 30% a 70℃ apresentou um pequeno efeito protetor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. W. D.; SILVA, D. M. Relationship between the polyphenol oxidase activity in coffee beans and the quality of the beverage. **Nature**, v. 219, p. 381-385, 1968.

ANDREWS, P. The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochem. J.** v. 95, p. 595-606, 1965.

ARAÚJO, J.M.A. Escurecimento enzimático. In: **Química de alimentos:** teoria e prática. 3.ed. Viçosa: UFV, p. 287-303, 2004.

AYAZ, F. A.; DEMIR, O.; TORUN, H.; KOLCUOGLU, Y.; COLAK, A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. **Food Chem.,** v. 106, p. 291-298, 2008.

AYLWARD, F.; HAISMAN, D. R. Oxidation systems in fruits and vegetables-their relation to the quality of preserved products. **Adv. Food Res.,** v. 17, p. 1-76, 1969.

BACK, J. F.; OAKENFULL, D.; LUND, D. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. **Biochemistry,** v.18, p. 5191-5196, 1979.

BATISTUTI, J. P.; LOURENÇO, E. J., Isolation and purification of polyphenoloxidase from a new variety of potato. **Food Chem.,** v. 18, p.251-263, 1985.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** São Paulo: Varela, 1992. 223p.

BONAVENTURE, L. **A cultura da cherimóia e de seu híbrido, a atemóia.** São Paulo: Nobel, 1999.184 p.

BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J.; DA SILVA VASCONCELOS, M. A. Characterization of polyphenol oxidase of soursop (*Annona muricata* L.) fruit and a comparative study

of its inhibition in enzyme extract and in polp. **Cienc. Tecnol. Aliment.,** v. 4, n. 4, p. 267-273, 2004.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution*. **Biol. Chem.,** v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981.

BOSS, P. K.; GARDNER, R. C.; JANSSEN, B.; ROSS, G. S. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. **Plant Mol. Biol.,** v. 27, p. 429-433, 1995.

BOURQUELOT, E.; BERTRAND, A. A re-examination of the raper's scheme: cyclodopa as a biological precursor of eumelanin. **C. R. Soc. Biol.,** v. 47, p. 582-584, 1895.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESLER, S. E.; KASBEKOV, E. N.; SUKHOLODOVA, A. T.; SHADRIN, V. N. The mechanism of catalysis by o-difenol oxidase. **Biokhimiya,** v. 44, p. 741-746, 1979.

CASTAÑER, M.; GIL, M. I.; RUÍZ, M. V. Browning susceptibility of minimally processed baby and romaine lettuces. **Eur. Food Res. Technol.** v. 209, p. 52-56, 1999.

CHEVALIER, T.; RIGAL, D.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; FILS-LYCAON, B. R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. **Plant Physiol.,** v. 119, p. 1261-1269. 1999.

CHO, Y. K.; AHN, H. K. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. **J. Food Biochem.,** v. 23, p. 577-592, 1999.

CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry,** v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

CLOUGHLEY, J. B. The effect of temperature on enzyme activity during the fermentation phase of black tea manufacture. **J. Sci. Food Agric.,** v. 31, p. 920-923,1980.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II – Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 121, p. 404-427, 1964.

DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). **Food Chem.,** v. 77, p. 1-7, 2002.

DING, C. K.; CHACHIN, K.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. **J. Agric. Food Chem.,** v. 46, p. 4144-4149, 1998.

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochem. J.** v. 55, p. 170-171, 1953.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell.,** v. 7, p. 1085–1097, 1995.

DOGAN, S.; DOGAN, M. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). **Food Chem.**, v. 88, p. 69-77, 2004.

DOGAN, S.; TURAN, P.; DOGAN, M.; ALKAN, M.; ARSLAN, O. Inhibition kinetic of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. **Int. J. Chem. React. Eng.,** v. 5, A 46, 2007.

DOGAN, S.; TURAN, Y.; EUTÜRK, H.; ARSLAN, O. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **J. Agric. Food Chem.,** v. 53, p. 776-785, 2005.

DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. **Plant Mol. Biol.,** v. 26, p. 495-502, 1994.

DUANGMAL, K.; OWUSU APENTEN, R. K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chem.,** v. 64, p. 351-359, 1999.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Crit. Rev. Anal. Chem.,** v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

FELTON, G. W.; DONATO, K. K.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutricional quality of fietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. **J. Insect Physiol.,** v. 38, p. 277-285, 1992.

FINGER, A. In vitro studies on the effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation of polyphenolic black tea constituents. **J. Sci. Food Agric.,** v. 66, p. 293-305, 1994.

FLING, M.; HOROWITZ, N. H.; HEINEMANN, S. F. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. **J. Biol. Chem.,** v. 238, p. 2045-2052, 1963.

FUJITA, S.; SAARI, N. B.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **J. Agric. Food Chem.,** v. 43, p. 1138-1142, 1995.

GADD, G. W. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 9, p. 237-240, 1980.

GAUILLARD, F., RICHARD-FORGET, F. Polyphenoloxidase from Williams Pear (*Pyrus communis*, cv Williams): Activation, Purufication and Some properties. **J. Sci. Food Agric.,** v.74, p. 49-56, 1997.

GAWLIK-DZIKI, U.; SZYMANOWSKA, U.; BARANIAK, B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food Chem.,** v. 105, p. 1047-1053, 2007.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n.1, p. 69-72, 2001.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical proprieties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado**. Food Chem.,** v. 77, p. 163-169, 2002.

GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D.; GONÇALVES, J. R. A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 10, p. 2075-2081, 2000.

GONZÁLEZ, E. M.; ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial Caracterization of Polyphenol oxidase activity in Raspberry Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4068-4072, 1999.

GOUPY, P., AMIOT, M.J., RICHARD-FORGET, F., DUPRAT F., AUBERT S., NICOLAS, J. Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple polyphenol oxidase. **J. Food Sci.,** v. 60, p. 497-505, 1995.

GOUZI, H.; BENMANSOUR, A. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) imbach. **Int. J. Chem. React. Eng.,** v. 5, p. 1-11, 2007.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. **LWT**, v. 38, p. 625-630, 2005.

GUTTERIDGE, S.; ROBB, D. A. The catecholase activity of *Neurospora* tyrosinase. **Eur. J. Biochem.,** v. 54, p. 107-116, 1975.

HAREL, E.; MAYER, A. M.; SHAIN, Y. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. **Physiol. Plant.,** v. 17, p. 921-930, 1964.

HARUTA, M.; MURATA, M.; HIRAIDE, A.; KADOKURA, H.; YAMASAKI, M.; SAKUTA, M.; HOMMA, S. Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in apple. **Biosci. Biotechnol. Biochem.,** v. 62, p. 358-362, 1998.

HILTON, P. J.; ELLIS, R. T. Estimation of the market value of central african tea by theaflavin analysis. **J. Sci. Food Agric.,** v. 23, p. 227-232, 1972.

HIMMELWRIGHT, R. S.; EICKMAN, N. C.; LUBIEN, C. D.; LERCH, K.; SOLOMEN, E. I. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora tyrosinase*: comparison to hemocyanins. **J. Am. Chem. Soc.,** v. 102, p. 7339-7344, 1980.

HIND, G.; MARSHAK, D. R.; COUGHLAN, S. J. Spinach thylakoid polyphenol oxidase: cloning, characterization, and relation to a putative protein kinase. **Biochemistry,** v. 34, p. 8157-8164, 1995.

HIPPEL, P. H.; WONG, K. The effects of various electrolytes and nonelectrolytes on the thermal ribonuclease transition. **J. Biol. Chem.,** v. 240, n. 10, p. 3909-3923, 1965.

HRAZDINA, G.; WAGNER, G. J. Compartmentation of plant phenolic compounds: Sites of synthesis and accumulation. **Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.,** 1985, v. 25, p.133–199, 1985.

HUNT, M. D.; EANNETA, N. T.; YU, H.; NEWMAN, S. M.; STEFFENS, J. C. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. **Plant Mol. Biol.,** v. 21, p. 59-68, 1993.

HUTTERMANN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v. 55, p. 387-394, 2001.

INOUYE, K.; KUZUYA, K.; TONOMURA, B. Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1388, p. 209-214, 1998.

JIANG, Y. M.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. **Postharv. Biol. Technol.**, v. 10, p. 221-228, 1997.

JIANG, Y.; DUAN, X.; JOYCE, D.; ZHANG, Z.; LI, J. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. **Food Chem.,** v. 88, p. 443-446, 2004.

JIMENEZ, M.; GARCÍA-CARMONA, F. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenoloxidase. **Phytochemistry,** v. 42, p. 1503-1509, 1996.

KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and chacacterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chem.**, v. 74, p.147-154, 2001.

KOSUGE, T. The rate of phenolics in host response to infection. **Annu. Rev. Phytopathol.,** v. 7, p. 195-222, 1969.

KOUSSEVITZKY, S.; NE'EMAN, E.; SOMMER, A.; STEFFENS, J. C.; HAREL, E. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. **J. Biol. Chem.,** v. 273, p. 27064-27069, 1998.

LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. **J. Boil. Chem.,** v. 256, n. 14, p. 7193-7201, 1981.

LERCH, K. *Neurospora* tyrosinase:molecular weight, copper content and spectral properties. **FEBS Lett.,** v. 69, p. 157-160, 1976.

LERCH, K. Tyrosinase: molecular and active-site structure. In: LEE, C. Y., WHITAKER, J. R. (Ed.), **Enzymatic browning and its prevention,** Washington: American Chemical Society, 1995. p. 64-80.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polypehnol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistence. **Planta.,** v. 215, p. 239-247, 2002.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. A. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Ciênc. Tecnol. Alim.,** Campinas, v. 21, n.1, p. 98-104, 2001.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.,** v. 56, p. 658-666, 1934.

LIU, L.; CAO, S.; XIE, B.; SUN, Z.; LI, X.; MIAO, W. Characterizations of polyphenol oxidase from litchi pericarp using (-)-epicatechin as substrate. **J. Agric. Food Chem.,** v. 55, p. 7140-7143, 2007.

LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A.; DA SILVA, M. A. Polyphenoloxidase from sweet potato: purification and properties. **J. Agric. Food Chem.,** v. 40, p. 2369-2373, 1992.

LOZANO-DE-GONZÁLEZ, P. G.; DRUDIS-BISCARRI, R.; IBARZ-RIBAS, A. Enzymatic browning in apple pulps. **J. Food Sci.,** v. 59, p. 564-567, 1994.

LU, A. T.; WHITAKER, J. R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **J. Food Sci.,** v. 39, p. 1173-1178, 1974.

LUIZ, R. C.; HIRATA, T. A.; CLEMENTE, E. Cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*Persea americana* MILL.). **Ciênc. Agrotec. Lavras,** v. 31, n. 6, p. 1766-1773, 2007.

MARKAKIS, P. Anthocyanins and their stability in foods. **Crit. Rev. Food Technol.,** v. 4, p. 337-341,1974.

MARQUES, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 33, p. 193-200, 1995.

MARQUES, L.; FLEURIET, A.; CLEYET-MAREL, J. C.; MACHEIX, J. J. Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion. **Phytochemistry,** v. 36, p. 1117-1121, 1994.

MARSHALL, R.M.; KIM, J.; WEI, C-I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. **FAO**, 2000. Disponível em:http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/enzimatic%20browning.html. Acesso em: 06 Jul. 2006.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Sci. Technol.,** v. 6, p. 195-200, 1995.

MARTINEZ-CAYUELA, M.; FAUS, M. J.; GIL, A. Effects some reductants on the activity of cherimoya polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1589-1592, 1988.

MASON, H. S. Comparative biochemistry of the pehnolase complex. **Adv. Enzymol. Rel. Subj. Biochem.,** v. 16, p. 105, 1957.

MASON, H. S. Mechanisms of oxygen metabolism. **Adv. Enzymol.,** v. 19, p. 79-231, 1956.

MATEOS, M.; KE, D.; CANTWELL, M.; KADER, A. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to C2-enriOched atmosphere. **Postharvest Biol. Tech,** v. 3, p. 225-233, 1993.

MATHEIS, G. Enzymatic browning of foods. **Z. Lebensm Unters. Forsch.,** p. 176-454, 1983.

MATHEIS, G.; BELITZ, H. D. Studies on enzymatic browning in potatoes (*Solanum tuberosum*) III. Kinectics of potato polyphenoloxidase. **Z. Lebensm Unters. Forsch.,** v. 163, p. 191-194, 1977.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J. R. Modification of protein by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. **J. Food Biochem.,** v. 8, p. 137-162,1984.

MATHEW, A.G.; PARPIA, H. A. B. Food browning as a polyphenoloxidase reaction. **Adv. Food Res.,** v.19, n.1, p.75-145, 1971.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidase in plants - recent progress. **Phytochemistry,** v. 26, p. 11-20, 1987.

MAYER, A. M., HAREL, E. Polyphenol oxidase and their significance in fruit and vegetables. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food Enzymol.** London: Elsevier, 1991. p. 373-379.

MAYER, A. M., HAREL, E. Review: polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry,** v. 18, p. 193-215, 1979.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry.,** v. 60, p. 551-565, 2002.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,** v. 32, p. 253-273, 1992a.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R.; GROSS, A. Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds. In: **Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health.** Washington: American Chemical Society. p. 318-325, 1992b.

MDLULI, K. M. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase prom marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chem.,** v. 92, p. 311-323, 2005.

MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. D. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Cien. Tecnol. Alim.,** Campinas, v. 26, n.1, p. 110-115, 2006.

MILLER, A. R.; KELLEY, T. J.; MUJER, C. Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenol oxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. **Phytochemistry,** v. 29, p.705-709, 1990.

MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino-acids. Apples and tomatoes. **J. Agric. Food Chem.,** v. 38, p. 1652-1656,1990.

MORTON, J. (Ed.) Atemoya. In: **Fruits of warms climates.** Miami, 1987. p.72-75. Disponível em: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/atemoya.html. Acesso em: 17 Jul. 2006.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 28 p. (Documentos, 106)

MOSCA, J. L.; LIMA, G. P. P. Desenvolvimento de Frutos de Atemóia (*Annona cherimola* L. x *Annona squamosa* L.) cv. Gefner. Disponível em: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_1577.pdf. Acesso em: 14 Dez. 2008.

NAZAROV, N. I.; MAZANASHVILI, G. G. Role of biochemical factors in the darkening of pasta products. **Khlebopek. Konditer. Promst.,** v. 20, n. 10, p. 34, 1976.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Peroxidase from peach fruit: thermal stability. **Braz Arch. Biol. Technol.,** v. 41, n. 2, p. 179-186, 1998.

NEVES, V. A.; DA SILVA, M. A. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 2424-2430, 2007.

NEVES, V. A.; PICCHI, D. G.; DA SILVA, M. A. Some biochemical properties of polyphenoloxidase from spearmint (*Mentha arvensis*). Braz**. Archiv. Biol. Technol.,** v. 2, n. 1, p. 5-8, 2009.

NEWMANS, M.; EANNETA, N. T.; YU, H.; PRINCE, J. P.; VICENTE, M. C.; TANKSLEY, S. D.; STEFFENS, J. C. Organization of tomato polyphenol oxidase gene family. **Plant Mol. Biol.,** v. 21, p. 1035-1051, 1993.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,** v. 34, p. 109-157, 1994.

NOGUEIRA, E. A. de; MELLO, N. T. C. de; MAIA, M. L.; Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. **Informações econômicas, SP,** v. 35, n. 2, 2005.

NÚÑEZ-DELICADO, E.; BRU, R.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. **J. Chromatography B.,** v. 680, p. 105-112, 1996.

NÚÑEZ-DELICADO, E.; SOJO, M. M; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A., Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2058-2063, 2003.

OKTAY, M.; KÜCAÇALISKAN, I.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **J. Food Sci.,** v.60, n.3, p. 494-496,1995.

OLESZEK, W.; LEE, C. Y.; JAWORSKI, A. W.; PRICE, K. R. Apple phenolics and their contribuition to enzymatic browning reactions. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae,** v. 58, p. 273-283, 1989.

OSUGA, D.; VAN DER SCHAAF, A.; WHITAKER, J. R. In: YADA, R. Y., JACKMAN, R. L., SMITH, J. L. (Ed.). **Protein structure – function relationships in foods,** New York: Champman and Hall, 1994. p. 62-88.

PARISH, R. W. The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (*Beta vulgaris* L.), **Z. Pflanzenphysyol.,** v. 66, p. 176, 1972.

PARK, E. Y.; LUH, B. S. Polyphenoloxidase of kiwifruit. **J. Food Sci.,** v. 50, p. 678, 1985.

PARK, C.; RAINES, R. T. Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis. **J. A. Chem. Soc.,** v. 123, n. 46, p. 11472-11479, 2001.

PÉREZ-GILABERT, M.; CARMONA, F. G. Caracterization of catecholase and cresolase activies of polyphenol oxidase. **J. Agr. Food Chem.,** v. 48, p. 695-700, 2000.

PÉREZ-ILZARBE, J.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA I. Phenolic compounds in apples: varietal differences. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung,** v. 192, p. 551-563, 1991.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gosduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova,** v. 29, n. 7, p. 755-760, 2006.

RAPEANU, G.; LOEY, A. V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chem.,** v. 94, p. 253-261, 2006.

REEVES, S. G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical studies of cocoa bean o-difenol O_2 oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chem.,** Kidligton, p. 210-219, 1988.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J.; PYLE, D. L. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends plant sci.,** v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIVAS, N. J.; WHITAKER, J. R. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. **Plant Physiol.,** v. 52, p. 501-507,1973.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCÍA-CARMONA, F. Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. **Anal. Biochem.,** v. 184, p. 279-282, 1990.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; LAVEDA, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. **J. Agric. Food Chem.,** v. 41, p. 1583-1586, 1993.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; VILLALBA, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. **Phytochemistry,** v. *28*, p.1321-1325, 1989.

SANDERSON, G. W. Changes in the level of polyphenoloxidase activity in tea flush on storage after plucking. **J. Sci. Food Agric.,** v. 15, p. 634-638,1964.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B.; PHILLIPS, J. G.; GARZARELLA, L. G.; PONDISH, D. L.; MATULAITIS, R. M.; MCCORMAC, T. J.; SONDEY, S. M.; SEIB, P. A.; EL-ATAWY, Y. S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. **J. Food Sci.,** v. 54, p. 997-1002,1989.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **J. Food Sci.,** v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.

SCHOENBEIN, C. F. **Phil. Mag.,** v. 11, p. 137-139, 1856.

SCHOOT UITERKAMP, A. J. M.; MASON, H. S. Magnetic dipole-dipole coupled Cu (II) pairs in nitric oxide-trated tyrosinase: a structural relationship between the active sites of tyrosinase and hemocyanin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 70, p. 993-996, 1973.

SEO, S-Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 2837-2853, 2003.

SIDDIQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 1177-1179, 1992.

SIEGBAHN, P. E. M. The catalytic cycle of catechol oxidase. **J. Biol. Inorg. Chem.,** v. 9, p. 577–590, 2004.

SOJO, M. M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; GARCÍA-CARMONA, F. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for renoval of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 4924-4930, 1998.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Eletronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. **Chem. Rev.,** v. 92, p. 521-542, 1992.

SOMMER, A.; NE'EMAN, E.; STEFFENS, J. C.; MAYER, A. M.; HAREL, E. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. **Plant Physiol.,** v. 105, p. 1301-1311, 1994.

SONDHEIMER, E. Chlorogenic acids and related depsides. **Bot. Rev.,** v. 30, p. 667, 1964.

STENZEL, N. M. C; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Rev. Bras. Frutic.,** Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 305-308, 2003.

STEPHENS, G. J.; WOOD, R. K. S. Release of enzymes from cells walls by an endopectate-trans-eliminase. **Nature,** v. 251, p. 358, 1974.

STTAFFORD, H. A.; DRESLER, S. 4-hydrocinnamic acid hydroxylase and polyphenolase activities in *Sorghum vulgare.* **Plant Physiol.,** v. 49, p. 590-595, 1972.

TANEJA, S. R.; SACHAR, R. C. Separate monophenolase and o-diphenolase enzymes in *Triticum aestivum*. **Phytochemistry,** v. 13, p. 1367-1371, 1974.

TCHONÉ, M.; BÄRWALD, G.; MEIER, C. Polyphenoloxidase in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **Br. Food J.,** v. 107, nº 9, p. 693-701, 2005.

TIMASHEFF, S. N. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. **Biochem.,** v. 32, p. 1352-1354, 2002.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Review: biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biol.Technol.,** v. 48, p. 1-14, 2008.

TOKUNAGA, T. **A cultura da atemóia**. Campinas: CATI, 2000. 80p. (B. técnico 233)

TOLBERT, N. E. Activation of ploy phenol oxidase of chloroplasts. **Plant Physiol.,** v. 51, p. 234-244, 1973.

TUCK, K. L.; HAYBALL, P. J. Major phenolics compounds in olive oil: metabolism and health effects. **J. Nutr. Biochem.,** v. 13, p. 636-644, 2002.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciênc. Tecnol. Alim.,** Campinas, v.21, n. 3, p. 321-325, 2001.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VAN LELYVELD, L. J.; GERRISH, C.; DIXON, R. A. Enzyme activities and polypehnols related to mesocarp discolouration of avocado fruit. **Phytochemistry,** v. 2, p. 1531-1535, 1984.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenoloxidase in higher plants. **Plant Physiol.,** v. 60, p. 106-112, 1984.

VAUGHN, K. C.; LAX, S. O.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiol. Plant.**, v. 72, p. 659-665, 1988.

VELA, G.; LEOND, M.; GARCIA, H. S.; DE LACRUZ, J. Polyphenoloxidase activity during ripening and chilling stress in Manila mangoes. **J. Hortic. Sci. Biotech.,** v. 78, p. 104-107, 2003.

WALKER, J. R. L. Enzymic browning in food. A review. **Enzyme Technol. Dig.,** v. 4, n. 3, p. 89-100, 1975.

WANG, J.; JIANG, W.; WANG, B.; LIU, S.; GONG, Z.; LUO, Y. Partial properties of polypehnol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. CV. “Tainong”) pulp. **J. Food Biochem.,** v. 31, p. 45-55, 2007.

WEBB, E. C. **Enzyme nomenclature:** recommendations of the nomenclature committee of internationsl union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes. San Diego, California, USA: Academic Press, 1992. 862 p.

WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. **J. Sci.,** v. 55, n. 5, 1990.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the foods sciences,** New York: Marcel Dekker, 1972. p. 571-575.

WILCOX, D. E.; PORRAS, A. G.; HWANG, Y. T.; LERCH, K.; WINKLER, M. E.; SOLOMON, E. I. Substrate analogue dinding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. **J. Am. Chem. Soc.,** v. 107, p. 4015-4027, 1985.

WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables,** London: Chapman & Hall, 1994. 357 p.

WUYTS, N.; WAELE, D. D.; SWENNEN, R. Extraction and partial chacacterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 44, p. 308-314, 2006.

XIE, G.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. **Protein Sci.,** v. 6, p. 211-221, 1997.

YAGAR, H.; SAGIROGLU, A. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. **Turk J. Chem.,** v. 26, p. 97-103, 2002.

YALOVSKY, S.; PAULSEN, H.; MICHAELI, D.; CHITNIS, P. R.; NECHUSHTAI, R. Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 5616-5619, 1992.

YAMASHITA, F.; MIGLIORANZA, L. H. da S.; MIRANDA, L, de A.; SOUZA, C. M. de A. **Efects of packaging and temperature on postharvest of atemoya.** Rev. Bras. Frutic., v. 24, n. 3, p. 658-660, 2002.

YEMENICIOGLU, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROGLU, B. Some characteristics of polyphenol oxidase and peroxidase from taro (*Colocasia antiquorum*). **Tr. J. Agriculture Forestry,** v. 23, p. 425-430, 1999.

YOOVIDHYA, T.; COMBES, D.; MONSAN, P. Kinetic and thermal stability studies of rulactine, a proteolytic enzyme from *Micrococcus caseolyticus*. **Biotechnol. Lett.,** v. 8, p. 333-338, 1986.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical proprieties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **J. Food Biochem.,** v. 27, p. 361-422, 2003.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol oxidase In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Oxidative enzymes in foods.** London: Elsevier Science Publishers, 1991. p. 217-273.

ZEMEL, G. P.; SIMS, C. A.; MARSHALL, M. R.; BALABAN, M. Low pH inativation of polyphenol-oxidase in apple juice. **J. Food Sci.,** v. 55, p. 562-563, 1990.

ZHANG, D. L.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of lichi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biol. Technol.,** v. 12, p. 195-202,1997.

ZIMMERMAN, W. C.; BLANCHETTE, R. A.; BURNES, T. A.; FARREL, R. L. Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum*. **Mycology,** v. 87, p. 857-863, 1995.

ZIYAN, E.; PEKYARDIMCI, S. Characterization of polyphenol oxidase from jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus). **Turk J. Chem.,** v. 27, p. 217-225, 2003.

8 – APÊNDICE

8.1 – TABELAS DO APÊNDICE

Tabela 1. Leituras de absorbância a 595nm.

Tréplicas	Extrato Bruto	$(NH_4)_2SO_4$	Pico G-100
1	0,129	*0,165	*0,085
2	0,134	0,178	0,090
3	0,124	0,184	0,091
Média	0,129	0,181	0,0905

* Valores desconsiderados

Tabela 2. Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da PPO de atemóia utilizando 4-metil catecol como substrato.

Temperatura	Eq. da reta Log (A/Ao100) x tempo(seg.)	Log K	Eq. da reta 2 Log K x 1/T	Ea (cal/mol)	Ea (kJ/mol.)
45°	y = -0,0019x + 1,9995	-2.359			
55°	y = -0,0056x + 1,9395	-1.891	y = -42,038x + 10847	83,53	342,31
65°	y = -0,0095x + 1,8589	-1.660			
70°	y = -0,0209x + 1,7195	-1.318			

(k) -2,3 Tg; (T) temperatura absoluta.

Tabela 3. Dados referentes as constantes cinéticas envolvidas no processo de inativação térmica da PPO de atemóia utilizando catecol como substrato.

Temperatura	Eq. da reta Log (A/Ao 100) x tempo (seg.)	Log K	Eq. da reta 2 Log K x 1/T	Ea (cal/mol)	Ea (kJ/mol.)
45°	y = -0,0021x + 1,9734	-2.316			
55°	y = -0,0043x + 1,9645	-2.004	y = -42,038x + 10847	87,12	357,04
65°	y = -0,0098x + 1,9064	-1.647			
70°	y = -0,0246x + 1,8871	-1.247			

Tabela 4. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de NaCl em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq.da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (seg.)	Log K
NaCl 0,1M	55°C	y = -0,001x + 1,9493	-2,638
	60°C	y = -0,002x + 1,9239	-2,337
	65°C	y = -0,0081x + 1,9526	-1,729
	70°C	y = -0,0164x + 1,9195	-1,423
NaCl 0,5M	55°C	y = -0,001x + 1,9612	-2,638
	60°C	y = -0,0021x + 1,9493	-2,316
	65°C	y = -0,0075x + 1,9346	-1,763
	70°C	y = -0,0164x + 1,928	-1,423
NaCl 1M	55°C	y = -0,001x + 1,9612	-2,638
	60°C	y = -0,0021x + 1,9365	-2,316
	65°C	y = -0,0073x + 1,9201	-0,774
	70°C	y = -0,0161x + 2,0183	-1,431

Tabela 5. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de KCl em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq.da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (seg.)	Log K
	55℃	y = -0,0013x + 1,945	-2,524
KCl	60℃	y = -0,0022x + 1,9216	-2,295
0,1M	65℃	y = -0,0068x + 1,9587	-1,805
	70℃	y = -0,0268x + 2,081	-1,21
	55℃	y = -0,0012x + 1,962	-2,559
KCl	60℃	y = -0,0022x + 1,9825	-2,295
0,5M	65℃	y = -0,0062x + 1,9757	-1,845
	70℃	y = -0,0218x + 2,0822	-1,299
	55℃	y = -0,0012x + 1,983	-2,559
KCl	60℃	y = -0,0025x + 1,942	-2,24
1M	65℃	y = -0,0066x + 1,9813	-1,818
	70℃	y = -0,0224x + 2,0468	-1,288

Tabela 6. Dados sobre as constantes cinéticas no processo de inativação térmica na presença de $CaCl_2$ em diferentes concentrações.

Amostra	Temperatura	Eq.da reta Log (A/Ao 100) x Tempo (seg.)	Log K
	55℃	y = -0,0031x + 2,0038	-2,146
$CaCl_2$	60℃	y = -0,0057x + 1,8644	-1,882
0,1M	65℃	y = -0,0149x + 1,8708	-1,465
	70℃	y = -0,0426x + 2,054	-1,008
	55℃	y = -0,0058x + 1,8986	-1,874
$CaCl_2$	60℃	y = -0,0087x + 1,7288	-1,698
0,5M	65℃	y = -0,0191x + 1,9002	-1,357
	70℃	y = -0,0527x + 1,9405	-0,916
	55℃	y = -0,0073x + 1,8517	-1,774
$CaCl_2$	60℃	y = -0,0029x + 1,8626	-2,175
1M	65℃	y = -0,0249x + 1,8175	-1,242
	70℃	y = -0,0468x + 1,7429	-0,968

8.2 – FIGURAS DO APÊNDICE

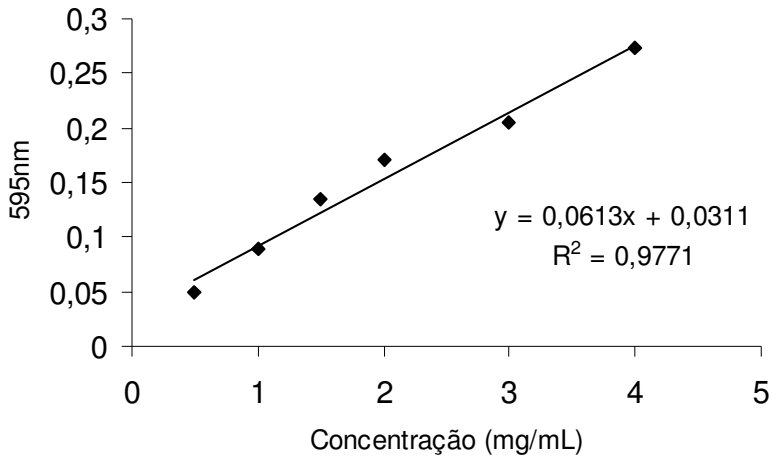


Figura 1. Curva de calibração com BSA pelo método de Bradford (1976).

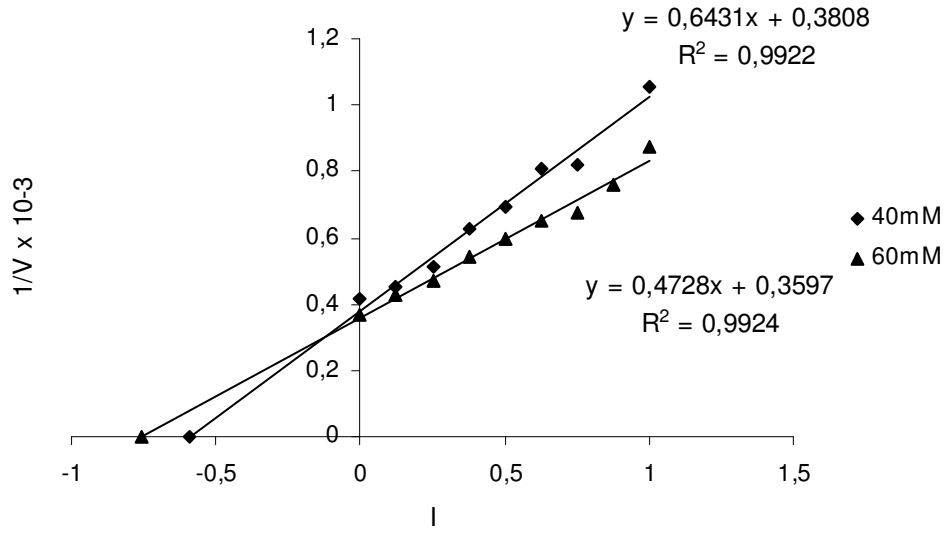


Figura 2. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para azida sódica. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

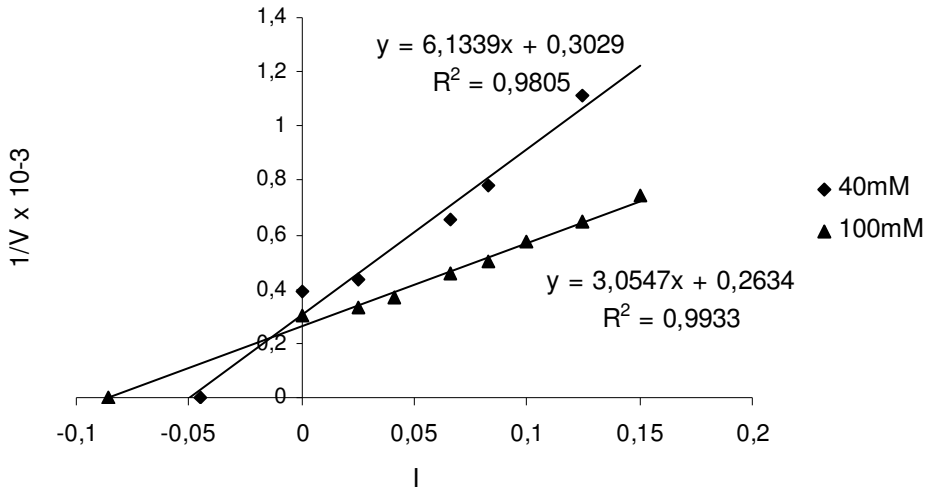


Figura 3. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para dietilditiocarbamato. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

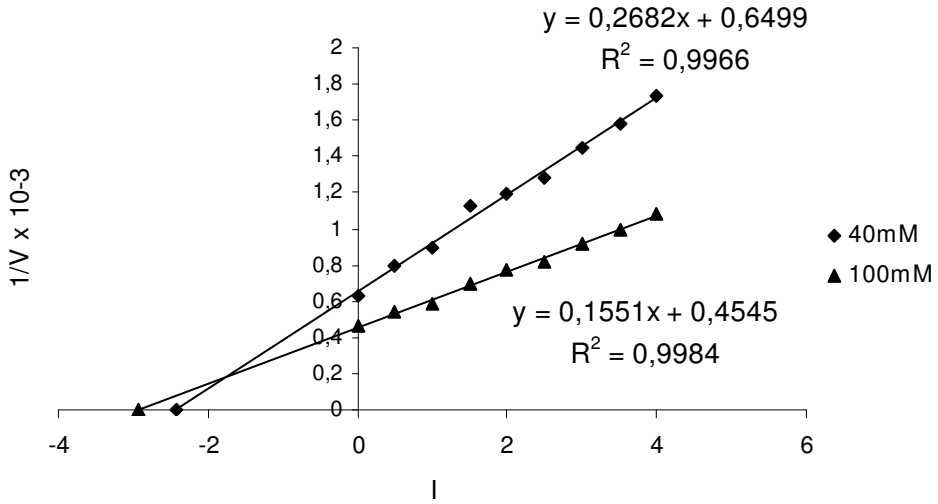


Figura 4. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para ácido transcinâmico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

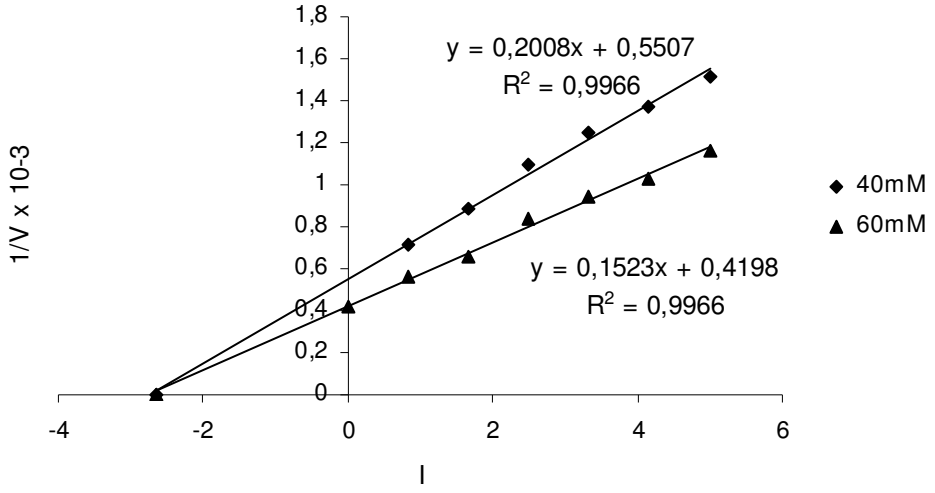


Figura 5. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para ácido benzóico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

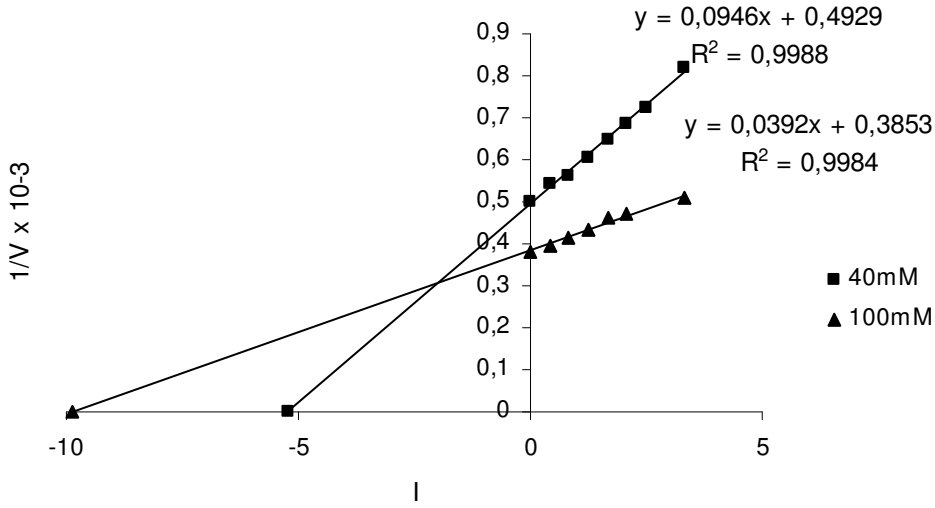


Figura 6. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para ácido 2-nitrobenzóico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

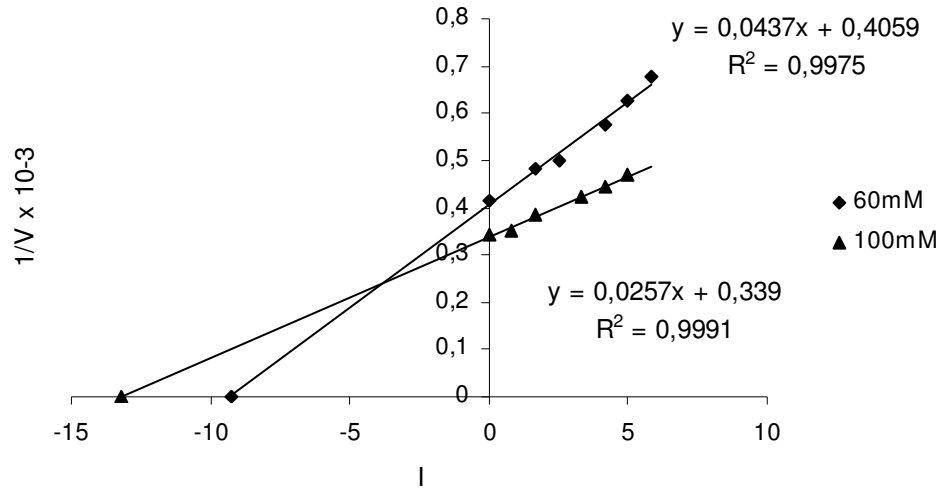


Figura 7. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para ácido protocatéico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.

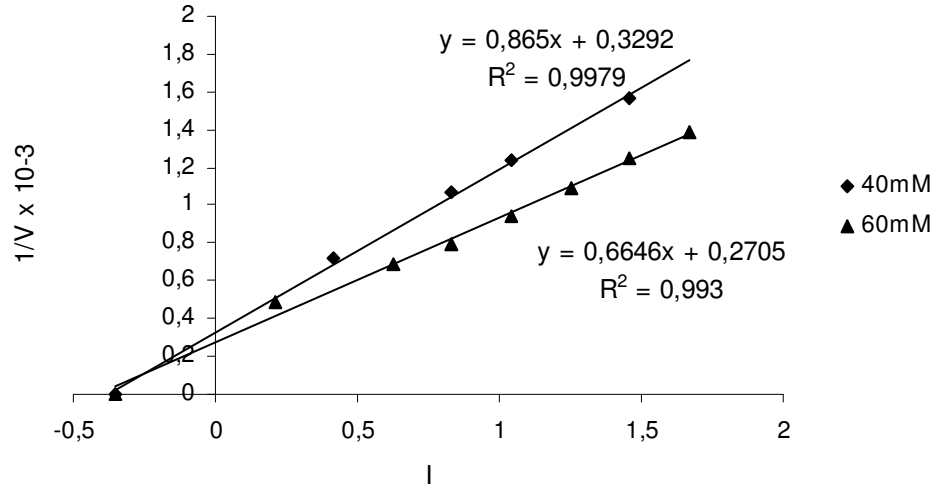


Figura 8. Determinação da Ki (Dixon, 1953) para ácido p-cumárico. (V) Atividade enzimática (UA/mL); (I) concentração do inibidor (mM). Substrato, 4-metil catecol.