

Papel e caracterização da polifenoloxidase em hastes de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Ait.)⁽¹⁾

JULIANE KARSTEN⁽²⁾, DANIELA VIEIRA CHAVES⁽³⁾,
FERNANDO LUIZ FINGER⁽⁴⁾, JOSÉ GERALDO BARBOSA⁽⁵⁾

RESUMO

A polifenoloxidase (PPO) foi parcialmente purificada e caracterizada a partir de hastes de ave-do-paraíso. A extração da PPO com acetona pura proporcionou aumento de 2,2 vezes a atividade específica quando comparada com a extração realizada com tampão fosfato. Maior atividade da PPO foi encontrada quando a reação se processou com 4-metilcatecol a 10 mM como substrato, pH 6,0 e temperatura de 40°C. Inibição de 96,14% da atividade foi encontrada após a pré-incubação do extrato enzimático em tampão com pH 2,5, por 15 minutos, a 25°C. Extratos pré-incubados a 60°C, por 120 minutos, tiveram redução de 68,37% na atividade da PPO. Essa redução foi maior quando a pré-incubação se realizou a 70 e 80°C, por 10 minutos, com reduções na atividade de 85,73 e 100%, respectivamente. Inativação completa da PPO foi encontrada com a utilização dos inibidores dithiothreitol, L-cisteína, metabissulfito de sódio e β-mercaptoetanol à concentração de 1 mM.

Palavras-chave: flor de corte, bloqueio vascular, inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

Role and characterization of polyphenoloxidase from stems of bird-of-paradise (*Strelitzia reginae* Ait.)

The polyphenoloxidase (PPO) from bird-of-paradise stems was partially purified and characterized. The extraction of PPO with acetone resulted in a 2.2-fold increase in the specific activity when compared with the extraction with phosphate buffer. Higher activity of PPO was determined when 4-methylcatechol at 10 mM was used as a substrate, at pH 6.0 and temperature of 40°C. Inhibition of 96.14% of activity was found when the enzyme preparation was pre incubated in buffer at pH 2.5 for 15 minutes at 25°C. Extracts pre incubated at 60°C for 120 minutes had 68.37% inhibition on the PPO activity. This reduction was higher when the pre incubation was done at 70 and 80°C for 10 minutes, with reduction of 85.73 and 100%, respectively. Complete inactivation on PPO occurred with the use of inhibitors dithiothreitol, L-cysteine, sodium metabissulphite, β-mercaptoethanol at 1 mM concentration.

Keywords: cut flower, vascular blockage, enzyme inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

As plantas ornamentais tropicais, flores e folhagens, destinadas para corte são apreciadas pelo porte, rusticidade e valor comercial que apresentam. A *Strelitzia reginae* é uma das mais importantes espécies tropicais cultivadas atualmente para flor de corte, que se destaca pela beleza, curiosa forma e comprimento das hastes (LUZ et al., 2005). Pertencente a família Strelitziaceae, é uma planta herbácea rizomatosa, entouceirada, com folhas firmes e coriáceas e flores que se abrem sucessivamente de uma bráctea de cor verde-avermelhada (LORENZI e SOUZA, 2001).

As flores em geral são classificadas como produtos altamente perecíveis, pela natureza efêmera dos diferentes tecidos que as formam, pela alta atividade respiratória e pelo reduzido conteúdo de carboidratos de reserva (NOWAK e RUDNICKI, 1990). Nesta espécie, quando nenhum tratamento pós-colheita é aplicado, as flores murcham em poucos dias, seguido por um intenso escurecimento e descoloração, que inicia nas flores abertas por mais tempo (CAMPANHA, et al., 1997). Dentre os vários fatores que

influenciam na longevidade dos órgãos das plantas, o balanço hídrico é considerado determinante, e a perda na vida pós-colheita das flores ave-do-paraíso é devida a um rápido declínio na absorção de água após a sua colheita, associada ao possível bloqueio dos tecidos vasculares da haste (JAROENKIT e PAULL, 2003).

São várias as causas que levam ao bloqueio dos vasos xilemáticos, dentre elas, o embolismo, crescimento bacteriano na água de vaso ou na própria base da haste e os processos de natureza fisiológica, o que inclui a atividade de enzimas como a peroxidase e polifenoloxidase, que tem a atividade aumentada em resposta ao dano (VAN DOORN, 1997), como foi observado em crisântemo (VAN DOORN e CRUZ, 2000), bouvardia (VASLIER e VAN DOOR, 2003) e ave-do-paraíso (MARQUES, 2008). Nessas espécies, a utilização de inibidores enzimáticos em solução de “pulsing” ou de vaso tem aumentado a longevidade das flores, evidenciando a participação dessas enzimas na oclusão dos vasos xilemáticos.

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima que contém em sua estrutura o cobre como grupo prostético, possui

⁽¹⁾ Recebido em 10 de maio de 2013 e aceito para publicação em 30 junho de 2013

⁽²⁾ Doutora pela Fisiologia Vegetal da UFV. Quadra 19, Rua 17, Lote 68. Bairro Cidade Universitária; Luis Eduardo Magalhães-BA CEP:47850-000 - juli-ka4@yahoo.com.br

⁽³⁾ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Universitário Juvino de Oliveira, 45700-000 Itapetinga, BA, Brasil. - danirgs@hotmail.com

⁽⁴⁾ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, Avenida P.H.Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG, CEP: 36570-000 - ffinger@ufv.br

⁽⁵⁾ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, Avenida P.H.Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG, CEP: 36570-000 - jgeraldo@ufv.br

o oxigênio molecular como co-substrato (VAUGHN e DUKE, 1984) e catalisa duas distintas reações: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois (ação da cresolase) e a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas (ação da catecolase) (AYDEMIR, 2004). Quinonas são moléculas eletrofílicas altamente reativas que podem se polimerizar levando à formação de pigmentos de cor marrom ou preta, responsáveis pelo escurecimento dos tecidos. Esta enzima parece estar envolvida nas reações de imunidade, biossíntese de componentes da planta, extravasamento de radicais livres de tecidos fotossintetizantes (HEIMDAL et al., 1994), controle dos níveis de oxigênio no cloroplasto e síntese de compostos fenólicos (VAUGHN e DUKE, 1984). É responsável pelo fenômeno de escurecimento enzimático que ocorre em frutos e vegetais, o que causa diminuição das propriedades sensoriais e valor nutricional (PROTA, 1988).

A PPO geralmente é codificada por uma família multigênica e é expressa diferentemente nas partes da planta (THYNGESEN et al., 1995), sendo o seu nível dependente da espécie, cultivar, maturidade e idade (VAMOS-VIGYAZO, 1981). Apresenta uma grande heterogeneidade acerca do substrato específico, sensibilidade a inibidores, pH ótimo, latência, inativação térmica, número de isoformas e massa molecular (MAYER e HAREL, 1979).

Conhecendo a importância da PPO no bloqueio dos vasos xilemáticos de algumas espécies de flores de corte, vê-se a necessidade de estudos para determinar as condições *in vitro* em que a atividade desta enzima possa ser reduzida ou inativada para, posteriormente, utilizar destas informações para aplicações *in vivo*, no intuito de controlar a atividade da mesma, e conseqüentemente reduzir a oclusão vascular e prolongar a vida pós-colheita das flores. O objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar a polifenoloxidase associada ao bloqueio xilemático das hastes de ave-do-paraiso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Hastes florais de ave-do-paraiso, contendo uma flor aberta, foram colhidas no campo de cultivo da Universidade Federal de Viçosa (latitude 20°45' sul, longitude 42°51' oeste e altitude de 651 m) e levadas ao Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, onde passaram por um processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento. Após isto, as hastes com suas inflorescências, foram colocadas em frascos contendo 400 mL de água destilada, sendo essa trocada a cada 48 horas. No final do 8º dia, seções de aproximadamente 2 cm da base da haste foram removidas, cortadas em pequenos pedaços, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20° para posterior análise enzimática.

Extração e purificação parcial da polifenoloxidase

Aproximadamente dois gramas de material vegetal foi triturado usando-se homogeneizador Ultra-Turrax (T 25) com 10 mL de tampão de extração, até a completa homogeneização. Esse homogeneizado foi centrifugado a 17.000 g durante 30 minutos, a 4°C, sendo o

sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da polifenoloxidase. Diferentes composições do tampão de extração foram testadas: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Polivinilpirrolidona (PVP); tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Triton X-100; e tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% PVP + 1% de Triton X-100 (CONCELLÓN et al., 2004).

Também na tentativa de purificar a polifenoloxidase, foi utilizada a precipitação das proteínas com acetona resfriada. Para isso, dois gramas de material vegetal foi triturado usando-se homogeneizador Ultra-Turrax (T 25) com 10 mL de acetona pura à -20°C até a obtenção de uma massa homogênea, que foi então filtrada em uma camada de papel filtro. O material retido no filtro foi levado até a geladeira onde permaneceu por 15 horas até a completa secagem e o filtrado foi descartado. O material retido no filtro foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% PVP), homogeneizado durante cinco minutos em agitador magnético, filtrado em duas camadas de gaze, centrifugado por 15 minutos a 17.000 g a 4°C e a atividade enzimática foi determinada (SERRADELL et al., 2000).

Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase e concentração de proteína

A atividade da polifenoloxidase foi determinada segundo o método de KAVRAYAN e AYDEMIR (2001) com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo 0,5 mL de 4-metilcatecol (10 mM) e 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). A quantidade de extrato enzimático utilizado variou com a amostra, totalizando 1,5 mL da reação. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro (Schimadzu UV 1601), observando-se a variação na absorbância a 420 nm e 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina soro bovino como padrão.

Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase

A atividade enzimática da PPO foi determinada utilizando diferentes substratos: catecol (420 nm), 4-metilcatecol (420 nm), pirocatequina (420 nm), ácido clorogênico (420 nm), ácido cafeico (400 nm), L-dopa (480 nm) e L-tirosina (420 nm), à concentração de 10 mM. O substrato que proporcionou maior atividade foi considerado como 100% de atividade relativa e foi utilizado nos ensaios subsequentes (GAWLIK-DZIKI et al., 2008).

Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase

O efeito do pH na atividade da PPO foi determinado utilizando diferentes soluções-tampão de reação na concentração de 0,1 M: ácido cítrico (pH 2,5 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 7,5) e ácido bórico (pH 8,0 a 9,0), em intervalos de 0,5 unidades de pH. Os pHs foram corrigidos utilizando NaOH e HCl 1 M. A atividade relativa foi considerada como 100% no pH ótimo de reação.

Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH

Para determinar a estabilidade da PPO em função do pH, extratos enzimáticos foram pré-incubados em soluções tampão 0,1 M (1:1), pHs 2,5 e 9,0 por um período de 0 a 120 minutos, sendo retiradas amostras ao longo da incubação. A pré-incubação foi realizada a 25°C e a 4°C e a atividade residual foi determinada utilizando o tampão com pH ótimo de reação para a enzima e temperatura de 25°C.

Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase

A temperatura ótima foi determinada pela incubação dos extratos enzimáticos e tampão de reação por 10 minutos em temperaturas que variaram de 10 a 80°C, em intervalos de 10°C. Imediatamente após a incubação, foi efetuada a leitura da atividade em espectrofotômetro à mesma temperatura e a atividade da PPO foi calculada como a percentagem residual de atividade na temperatura ótima.

Estabilidade térmica da polifenoloxidase

O extrato enzimático foi incubado com tampão fosfato a 60°C, por 120 minutos e a 70 e 80°C por 10 minutos, sendo retiradas amostras ao longo do período de incubação. Essas foram rapidamente resfriadas a 4°C, por 30 minutos, e posteriormente, determinada a atividade residual em temperatura ambiente.

Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase

O efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO foi verificado pela incubação dos extratos enzimáticos por 50 minutos, a 4°C, e 10 minutos, a 25°C, em tampão de reação contendo 1 mM dos seguintes compostos: EDTA, L-cisteína, β -mercaptoetanol, metabissulfito de sódio, dithiothreitol (DTT), ácido ascórbico e sulfato de sódio e, após isso, a atividade específica foi determinada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e purificação parcial da polifenoloxidase

Quando a extração foi realizada com as três diferentes composições do tampão, os melhores resultados foram encontrados com o tampão contendo somente 1% de PVP (Tabela 1). Em raízes de banana, os melhores resultados foram encontrados com a adição de 0,25% de Triton X-100 e 5% de PVPP ao tampão de extração (WUYTS et al., 2006), enquanto em peras Williams, GAUILLARD e RICHARD-FORGET (1997) não encontraram nenhum aumento na atividade quando o tampão de extração foi suplementado com Triton X-100 ou Tween 20, sugerindo que todo o conteúdo da enzima é fração solúvel.

O PVP é um agente adsorvedor de fenol que pode ser adicionado no tecido ou no tampão de extração, para remoção de substratos fenólicos da PPO e assim prevenir a polimerização e inativação da enzima, durante a extração. Triton X-100 é um detergente, e a sua utilização como constituinte do tampão de extração tem efeito positivo na atividade por causar a lise dos plastídeos, solubilização da PPO ligada à membrana e ativação da PPO latente (MAYER e HAREL, 1979).

Existe uma grande dificuldade no processo de isolamento

de PPO a partir de plantas (ZAWISTOWSKI et al., 1991). A PPO é localizada exclusivamente em plastídeos em tecidos de plantas intactos, e os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (VAUGHN e DUKE, 1984). Uma vez que os vacúolos e plastídeos se misturam, devido à perda da organização celular, tem-se como consequência os fenólicos endógenos sendo oxidados enzimaticamente para quinonas, que se polimerizam levando ao escurecimento enzimático (ZAWISTOWSKI et al., 1991). Devido a isso, é importante a utilização do PVP como componente do tampão de extração.

A extração da polifenoloxidase de hastes de ave-do-paraiso com acetona aumentou 2,2 vezes a atividade específica se comparado com o tampão de extração (Tabela 2). Precipitação com acetona seguida por extração com tampão é um dos métodos mais usados para isolamento da PPO. Essa técnica oferece a vantagem de obtenção de um extrato com alto rendimento e livre de interferentes (ZAWISTOWSKI et al., 1991).

Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase

O substrato que proporcionou maior atividade para a PPO foi o 4-metilcatecol, seguido pela pirocatequina e catecol (Tabela 3). Maiores atividades quando o 4-metilcatecol foi utilizado como substrato também foi encontrado em frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra* (MDLULI, 2005), berinjela (CONCELLÓN et al., 2004), abacate (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002), batata, taro (DUANGMAL e APENTEN, 1999), e raízes aéreas de *Aranda* 'Christine 130' (HO, 1999). O 4-metilcatecol parece ser um dos substratos mais utilizados e eficientes para determinação da atividade da PPO.

A utilização de L-tirosina (monofenol) como substrato foi ineficiente, proporcionando uma atividade muito baixa quando comparada com os demais substratos (Tabela 3), o que sugere a falta de atividade da enzima cresolase que catalisa a hidroxilação de monofenóis para difenóis. O mesmo também foi encontrado em feijão (GUO et al., 2009), alface (GAWLIK-DZIKI et al., 2008), hastes e folhas de *Ferula* sp. (ERAT et al., 2006), raízes de banana (WUYTS et al., 2006), castanha (XU et al., 2004), feijão (NAGAI e SUZUKI, 2003), abacate (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002) e *Mentha piperita* (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001). A razão da atividade da difenolase:monofenolase varia com a planta, mas a difenolase geralmente é cinco a dez vezes maior que a monofenolase (VAMOS-VIGYAZO, 1981). Segundo ZAWISTOWSKI et al. (1991), são comuns extratos enzimáticos que não apresentam atividade da monofenolase.

Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase

Maior atividade da polifenoloxidase foi encontrada quando o meio de reação utilizado foi o tampão fosfato com pH 6,0 (Figura 1). ERAT et al., (2006) também encontraram um pH ótimo de 6,0 para folhas e hastes de *Ferula* sp. assim como SHIN et al. (1997) em feijão Mungo.

Em geral, a maioria das plantas apresenta máxima atividade da PPO em valores de pH próximos ao neutro. Em *Beta vulgaris* subsp. *cicla*, o pH ótimo foi de 7,5 (GAO

et al., 2009), alface 6,8 (GAWLIK-DKIZI et al., 2008), lichia 6,5 (SUN et al., 2008), frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra 7,0 (MDLULI, 2005), e *Mentha piperita* 7,0 (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001). Variações no pH ótimo de atividade podem ocorrer devido a propriedades genéticas (variedade), natureza do substrato fenólico, método de extração (DUANGMAL e APENTEN, 1999), estágio de maturidade, pureza da enzima e forma da isoenzima (ZAWISTOWSKI et al., 1991). Segundo MAYER e HAREL (1981), o pH ótimo da PPO também está relacionado com a sua localização subcelular e idade do tecido.

Sob pH 2,5 e 9,0 observou-se redução de 87,4% e 94,3% da atividade respectivamente, em comparação com o pH ótimo (Figura 1). PPO de frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra (MDLULI, 2005) e *Colocasia esculenta* e *Solanum tuberosum* var. Romano (DUANGMAL e APENTEN, 1999) apresentam baixas atividades sob pHs menores que 4,0, enquanto que em feijão mungo, não foi encontrada atividade em pHs abaixo de 4,0, devido à instabilidade dessa enzima nessas condições (SHIN et al., 1997). Alteração da atividade enzimática com a variação do pH ocorre devido a mudanças na protonação de grupos essenciais do sítio ativo da enzima e/ou de seus próprios substratos (SEGEL, 1979).

A maioria das enzimas é ativa em um estreito intervalo de pH, devido a uma combinação de fatores como: a ligação do substrato à enzima, o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica da enzima, a ionização do substrato e a variação da estrutura da proteína (significativo em valores extremos de pH) (VOET et al., 2002).

Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH

Pré-incubação sob pH 2,5, a 25°C por 15 minutos, levou à inibição de 96,1% da atividade da PPO, enquanto a 4°C, 24,5% da atividade inicial foi mantida após esse período (Figura 2A). A PPO de frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra também se apresentou instável após 30 minutos de incubação em pHs ácidos e temperatura ambiente, e em pHs abaixo de 3,0 nenhuma atividade foi detectada (MDLULI, 2005), enquanto em taro e batata esse fenômeno foi observado em pHs abaixo de 4,0 (DUANGMAL e APENTEN, 1999).

Pré-incubações sob pH 9,0, a 4°C e 25°C, mantiveram a atividade enzimática da PPO integral e constante durante os 120 minutos de avaliação (Figura 2B). Polifenoloxidases de outras espécies também se mostraram mais estáveis sob pHs básicos do que em ácidos, como em *Mentha piperita* onde a incubação por 30 minutos, em pH 9,0, levou à perda de 33% da atividade (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001) e em *Beta vulgaris* subsp. *cicla*, em que a incubação por uma hora em pH 11 manteve 74% da atividade (GAO et al., 2009).

Quando se determinou o pH ótimo da PPO, observou-se uma baixa atividade desta enzima em pH 9,0 (Figura 1). No entanto, quando as amostras foram pré-incubadas em pH 9,0 e a atividade processada em pH ótimo (pH 6,0), estas tiveram capacidade de retomar a atividade (Figura 2B). O mesmo não foi observado com as amostras pré-incubadas com pH 2,5 (Figura 2A), que devem ter sofrido danos irreversíveis em sua estrutura quando expostas ao pH ácido. Portanto, somente a utilização de pHs ácidos possibilita resultados

satisfatórios para a inibição da atividade da polifenoloxidase em *Strelitzia reginae* devido à sua alta instabilidade nessas condições.

Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase

PPO de *strelitzia* não apresentou pico de atividade ao longo das diferentes temperaturas utilizadas, sendo a atividade praticamente constante entre 10 e 40°C (Figura 3). A maioria das PPOs apresenta temperatura ótima de atividade, dentro dessa faixa encontrada em ave-do-paráiso. Em berinjela, a máxima atividade foi encontrada em 30°C, mais aproximadamente 80% da atividade é mantida entre 0 e 40°C (CONCELLÓN et al., 2004). PPO de lichia apresenta sua temperatura ótima a 35°C (SUN et al., 2008), alface 35°C (GAWLIK-DZIKI et al., 2008), *Ferula* sp. 25°C (ERAT et al., 2006) e *Mentha piperita* 30°C (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001).

Temperaturas de 70 e 80°C levaram a uma forte redução na atividade da PPO de ave-do-paráiso, que manteve somente 15,3 e 10% da atividade, respectivamente (Figura 3). GUO et al., (2009) encontraram inativação completa nas duas frações da PPO de feijão verde em temperaturas de 70°C, após cinco minutos de incubação.

Estabilidade térmica da polifenoloxidase

Pré-incubação por 60°C, por 120 minutos, causou redução de 68,4% na atividade da PPO (Figura 4). PPO de *Ferula* sp. apresentou inativação completa após 40 minutos de exposição a 60°C (ERAT et al., 2006), enquanto temperaturas maiores que 65°C em exposição por 30 minutos causaram perda completa na atividade da PPO em morango (SERRADELL et al., 2000).

Quando a temperatura utilizada foi 70°C, a exposição por 10 minutos, levou a uma redução de 85,7% da atividade (Figura 4). A PPO de batata e taro são inativadas quando aquecidas por dez minutos a 70°C (DUANGMAL e APENTEN, 1999), enquanto a exposição por 30 minutos a mesma temperatura causou uma redução de 92% da atividade da PPO em castanha (XU et al., 2004).

A 80°C, por dois minutos, observou-se redução de 94,1% da atividade da PPO em *strelitzia* e, após dez minutos, a inativação foi completa (Figura 4). A exposição por cinco minutos a 80°C em lichia, levou à redução da atividade da PPO em 92,4% e 63,2% quando (-) epicatequina e catecol foram usados como substratos, respectivamente (SUN et al., 2008). Em *Anethum graveolens* L. a pré-incubação por 15 minutos a 80°C levou à redução de 50% da atividade (ARSLAN e TOZLU, 1997), e a PPO de *Beta vulgaris* subsp. *cicla* após 20 minutos a 80°C manteve 18% da sua atividade (GAO et al., 2009).

Esse comportamento bifásico observado (Figura 4), ou seja, rápida redução da atividade quando a enzima é exposta às altas temperaturas, e, após, um declínio gradual durante a exposição contínua, também foi encontrado em vagens de baunilha (WALISZEWSKI et al., 2009) e frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra (MDLULI, 2005) quando exposta às altas temperaturas. Segundo GÓMEZ-LÓPEZ (2002), a primeira fase deste comportamento é chamada de termolábil e a seguinte de termoresistente, e isso pode refletir na existência de isoenzimas com diferentes propriedades

térmicas.

A temperatura influencia na atividade enzimática de duas maneiras; um aumento na temperatura de incubação aumenta a velocidade da reação, mas simultaneamente leva à desnaturação da enzima (SUN et al., 2008). PPO não é considerada uma enzima termoestável, e curtos tempos de exposição a temperaturas de 70 - 90°C são suficientes para causar a destruição total ou parcial da atividade catalítica (VAMOS-VIGYAZO, 1981). A estabilidade térmica da enzima parece estar relacionada à maturidade da planta e em alguns casos também é pH dependente. Diferentes formas moleculares de uma mesma fonte parecem ter diferentes termoestabilidade (PARK e LUH, 1985).

Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase

Dithiotreitol (DTT), L-cisteína, β-mercaptoetanol e metabissulfito de sódio 1 mM foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição da atividade da PPO. O EDTA e o sulfato de sódio apesar de serem classificados como inibidores, não mostraram esse efeito sobre a atividade da PPO de *Strelitzia*, pelo contrário, pequena ativação foi observada quando esses compostos foram utilizados (Tabela 4). Em casca de banana 1 mM de ácido ascórbico ou de L-cisteína resultou em 100% de inibição desta enzima (YANG et al., 2001) e 1 mM de ácido ascórbico também levou à inativação completa da PPO em *Chrysanthemum coronarium* L. (NKYA et al., 2003).

Segundo VAMOS-VIGYAZO (1981), os inibidores de PPO podem ser divididos em três classes: os que atuam sobre o substrato, os que atuam sobre os produtos da reação (ácido ascórbico e os tióis) e os que agem sobre a enzima em si (agentes complexantes que interagem com o cobre do sítio ativo da enzima).

Como a PPO é uma metaloproteína, pode ser inibida por agentes quelantes como DIECA, tropolone, cianeto, 2-mercaptobenzotiazole e EDTA (VAMOS-VIGYAZO, 1981). O EDTA tem a capacidade de formar um complexo com o Cu²⁺ da PPO levando à redução na atividade. Segundo LUH e PHITHAKPOL (1972) o pH da mistura de reação pode afetar a afinidade do EDTA para com o cobre. Vários são os relatos que demonstram que o EDTA não tem se mostrado bom inibidor da PPO, como foi observado em *Beta vulgaris* subsp. *cicla*, (GAO et al., 2009), cereja (KUMAR et al., 2008), lichia (SUN et al., 2008), raízes de banana (WUYTS et al., 2006), alcachofra (AYDEMIR, 2004) e casca de banana (YANG et al., 2001).

O mecanismo de inibição do ácido ascórbico envolve a redução de quinonas geradas pela PPO. A PPO catalisa a oxidação de substâncias fenólicas para *o*-quinonas enquanto o ácido ascórbico converte as quinonas para compostos fenólicos. O ácido ascórbico atua mais como antioxidante do que como inibidor enzimático, reduzindo as quinonas antes que elas sofram as reações secundárias que levam ao escurecimento (RAPEANU et al., 2006). Outros dois mecanismos de inibição envolvem a interação direta com a enzima: quelação do cobre do sítio ativo e redução do Cu²⁺ para Cu⁺ (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002). Em lichia, quando catecol foi utilizado como substrato, o ácido ascórbico foi o inibidor mais eficaz (SUN et al., 2008). Em manga, 0,1 mM de ácido ascórbico levou a 100% de inibição da atividade da PPO (PRABHA e PATWARDHAN, 1982), enquanto

em feijão foram necessários 3 mM (NAGAI e SUZUKI, 2003), uva Victoria 5 mM (RAPEANU et al., 2006) e *Beta vulgaris* subsp. *cicla* 10 mM (GAO et al., 2009) para se obter o mesmo efeito.

DTT é um agente redutor, além de ser considerado um efetivo inibidor pela capacidade de se ligar ao cobre no sítio ativo da PPO (MAYER e HAREL, 1979). DTT foi um dos inibidores mais efetivos da PPO em *Beta vulgaris* subsp. *cicla* (GAO et al., 2009), raiz de banana (WUYTS et al., 2006) e em alcachofra (AYDEMIR, 2004).

O β-mercaptoetanol, outro agente redutor, atua reduzindo as quinonas formadas pela PPO para polifenóis, enquanto ele próprio é oxidado (ARSLAN e TOZLU, 1997). Em cereja 10 mM de β-mercaptoetanol causou 72% de inibição da polifenoloxidase (KUMAR et al., 2008), enquanto em castanha, 1 mM e 5 mM levaram a inibição de 19 e 61,3%, respectivamente (XU et al., 2004). A inativação completa da PPO com β-mercaptoetanol foi encontrada com 10 mM em *Beta vulgaris* subsp. *cicla* (GAO et al., 2009) e 3 mM em feijão (NAGAI e SUZUKI, 2003).

O metabissulfito de sódio pode atuar como um agente redutor para *o*-benzoquinonas (WONG et al., 1971). A ação de sulfitos na prevenção do escurecimento enzimático pode ser explicada por vários processos: 1) ação sobre as quinonas, formando os complexos quinonas-sulfito, prevenindo assim a sua polimerização (EMBS e MARKAKIS, 1965); 2) a ação do metabissulfito diretamente sobre a estrutura da PPO, em que ele reage com as pontes dissulfídicas, levando à ocorrência de mudanças na estrutura terciária da enzima e consequente inativação (GOLAN-GOLHIRSH e WHITAKER, 1984), e 3) pela redução dos intermediários quinonas. O metabissulfito foi o inibidor que apresentou maior poder de redução da atividade da PPO em *Ferula* sp. (ERAT et al., 2006), raízes de banana (WUYTS et al., 2006) e *Mentha piperita* (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001). Em uva Victoria 0,5 mM de metabissulfito resultou em inativação completa da PPO (RAPEANU et al., 2006).

A inibição por L-cisteína pode ser explicada por três vias: 1) redução nos níveis de oxigênio, devido ao aumento na duração da fase lag; 2) complexação do inibidor com produtos da reação levando à formação de complexos incolores (RICHARD-FORGET et al., 1992), e 3) a cisteína pode se ligar irreversivelmente à proteína enzimática (VALERO et al., 1991). Esse inibidor mostrou ser efetivo em lichia, quando a (-) epicatequina foi usada como substrato (SUN et al., 2008), assim como em abacate (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002). Concentração de 10 mM de L-cisteína resultou em 98% de inibição em cereja (KUMAR et al., 2008) e 100% em *Beta vulgaris* subsp. *cicla* (GAO et al., 2009) e *Chrysanthemum coronarium* L. (NKYA et al., 2003).

A capacidade de diferentes compostos em inibir a PPO depende da natureza e concentração do inibidor, fonte de PPO, disponibilidade de substrato (O₂, fenóis), pH e temperatura (VAMOS-VIGYAZO, 1981).

4. CONCLUSÃO

A polifenoloxidase presente na base de hastes de ave-do-paráíso foi extraída, purificada parcialmente com acetona e caracterizada para a cinética de atividade. Esta polifenoloxidase é uma catecolase, atuando sobre

substratos difenólicos, com maior atividade para o substrato 4-metilcatecol. O pH ótimo para a atividade da enzima foi 6,0 e a temperaturas entre 10 a 40°C. A atividade da enzima é reduzida em altas temperaturas acima de 60°C, pH ácido e na presença dos inibidores ditioneitol, L-cisteína, β-mercaptopetanol e metabisulfito de sódio.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARSLAN, O.; TOZLU, I. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenoloxidase from *Anethum graveolens* L. **Italian Journal of Food Science**, v. 9, p. 249-253, 1997.
- AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. **Food Chemistry**, v. 87, p. 59-67, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMPANHA, M. M. et al. Water relations of cut bird-of-paradise (*Strelitzia reginae* Ait.) inflorescences. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.3, n.1, p.27-31, 1997.
- CONCELLÓN, A.; AÑÓN, M. C.; CHAVES, A. R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. **Food Chemistry**, v. 88, p. 17-24, 2004.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, p.351-359, 1999.
- EMBS, R. J.; MARKAKIS, P. The mechanism of sulphite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. **Journal of Food Science**, v.30, p. 753-758, 1965.
- ERAT, M.; SAKIROGLU, H.; KUFREVIOGLU, O. I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**, v. 95, p. 503-508, 2006.
- GAO, Z-J.; HAN, X-H.; XIAO, X-G. Purification and characterization of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. **Food Chemistry**, v.117, p.342-348, 2009.
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L, cv Williams): activation, purification and some properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, p. 49-56, 1997.
- GAWLIK-DZIKI, U.; ZLOTEK, U.; ŚWIECA, M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). **Food Chemistry**, v.107, p.129-135, 2008.
- GOLAN-GOLDHIRSH, A.; WHITAKER, J. R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1003-1009, 1984.
- GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**, v.77, p.163-169, 2002.
- GUO, L., et al. The purification e characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v.117, p.143-151, 2009.
- HEIMDAL, H.; LARSEN, M. L.; POLL, L. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1428-1433, 1994.
- HO, K. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* 'Christine 130'. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.841-848, 1999.
- JAROENKIT, T.; PAULL, R. E. Postharvest handling of *Heliconia*, red ginger and bird-of-paradise. **HortTechnology**, v.13, p.259-266, 2003.
- KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, v.74, p.146-154, 2001.
- KUMAR, V. B. A.; MOHAN, T. C. K.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**, v.110, p.328-333, 2008.
- LORENZI, H., SOUZA, H. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p.
- LUH, B. S.; PHITHAKPOL, B. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. **Journal of Food Science**, v.37, p.264-268, 1972.
- LUZ, P. B. et al. Cultivo de flores tropicais. **Informe Agropecuário**, v.26, p.62-72, 2005.
- MAYER, A. M.; HAREL E. Review. polyphenol oxidase in plants. **Phytochemistry**, v.18, p.193-215, 1979.
- MARQUES, A. E. **Estudos sobre o bloqueio do xilema na pós-colheita das inflorescências de ave-do-paraiso (*Strelitzia reginae* Aiton)**, 2008. 60f. (Dissertação Mestrado em Fisiologia Vegetal). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in fruits.

- Changes during ripening. In: FRIEND, J., RHODES, M. J. C. (ed.). **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetable**. London: Academic Press, 1981. p.161-180.
- MAYER, A.; HAREL, E. **Review Polyphenol oxidase in plants**. *Phytochemistry*, v.18, p.11-20, 1991.
- MDLULI, K. M. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**, v.92, p.311-323, 2005.
- NAGAI, T.; SUZUKI, N. Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). **Journal of Food Science**, v.68, p.16-20, 2003.
- NKYA, E. et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5467-5471, 2003.
- NOWAK, J.; RUDNICKI, R. **Postharvest handling and storage of cut flowers, florist greens and potted plant**. Portland: Timber Press, 1990. 210p.
- PARK, E. Y.; LUH, B. S. Polyphenoloxidases of kiwifruit. **Journal of Food Science**, v.50, p.678-684, 1985.
- PRABHA, T. N.; PATWARDHAN, M. V. Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). **Journal of Bioscience**, v. 4, p.69-78, 1982.
- PROTA, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. **Medicinal Research Reviews**, v.8, p.525-556, 1988.
- RAPEANU, G. et al. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. Sativa). **Food Chemistry**, v.94, p.253-261, 2006.
- RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; NICOLAS, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.2108-2113, 1992.
- SEGEL, I. H. **Bioquímica, teorias e problemas**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1979.
- SERRADELL, M. A. et al. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1421-1427, 2000.
- SHIN, R.; FRODERMAN, T.; FLURKEY, W. H. Isolation e characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, v.45, p.15-21, 1997.
- SUN, J. et al. comparative analysis of property of lychee polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. **Food Chemistry**, v.108, p.818-823, 2008.
- THYNGESEN, P. W.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Polyphenol oxidase in potato: A multigene family that exhibits differential expression patterns. **Plant Physiology**, v.109, p.525-531, 1995.
- VALERO, E.; VARÓN, R.; GARCIA-CARMONA, F. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. **Biochememical Journal**, v.277, p.869-874, 1991.
- VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.15, p.49-127, 1981.
- VAN DOORN, W. G. Water relations of cut flowers. **Horticultural Reviews**, v.18, p.1-85, 1997.
- VAN DOORN, W. G.; CRUZ, P. Evidence for a wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers. **Postharvest Biology and Tecnology**, v.19, p.73-83, 2000.
- VASLIER, N.; VAN DOORN, W. G. Xylem occlusion in bouvardia flowers: evidence for a role of peroxidase and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Tecnology**, v.28, p.231-237, 2003.
- VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Plant Physiology**, v.60, p.106-112, 1984.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Enzimas. In: BASSO, L. A. (ed.) **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.279-349.
- WALISZEWSKI, K. N.; MÁRQUEZ, O.; PARDIO, V. T. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. **Food Chemistry**, v.117, p.196-203, 2009.
- WONG, T. T.; LUH, B. S.; WHITAKER, J. R. Isolation and purification of polyphenol oxidase isozymes of Clinstone peach. **Plant Physiology**, v.48, p.19-23, 1971.
- WUYTS, N.; WAELE, D.; SWENNWN, R. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.308-314, 2006.
- XU, J. et al. Purification and characterization polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). **Journal Wood Science**, v.50, p.260-265, 2004.
- YANG, C. P. et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1446-1449, 2001.
- ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, A. A. M. Polyphenol oxidase. In: ROBINSON, D. S., ESKIN, N. A. M. (eds.) **Oxidative Enzymes in Foods**. London & New York: Elsevier Applied Science, 1991. p.217-274.

Tabela 1. Efeito de diferentes composições do tampão de extração sobre a atividade específica da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Table 1. Effect of different extraction buffer composition on the specific activity of the polyphenoloxidase from stems of *Strelitzia reginae*.

Tampão de extração	PVP 1%	Triton X-100 1%	UA/min/mg de proteína
Tampão fosfato 0,1MpH 6,5	+	-	18,62 ± 0,78*
Tampão fosfato 0,1MpH 6,5	+	+	16,34 ± 0,89
Tampão fosfato 0,1MpH 6,5	-	+	14,01 ± 0,22

* Valor médio de quatro repetições ± erro padrão da média

Tabela 2. Atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae* com uso de diferentes substâncias extratoras.

Table 2. Polyphenoloxidase activity of stems of *Strelitzia reginae* with use of different extraction substances.

Ex trator	UA/min/mg de proteína	Atividade Relativa (%)
Tampão Fosfato 0,1MpH 6,5; 1% PVP	19,1*	100
Acetona	42,1	220,4

* Valor médio de cinco repetições

Tabela 3. Efeito de diferentes substratos sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Table 3. Effect of different substrates on polyphenoloxidase activity from stems of *Strelitzia reginae*.

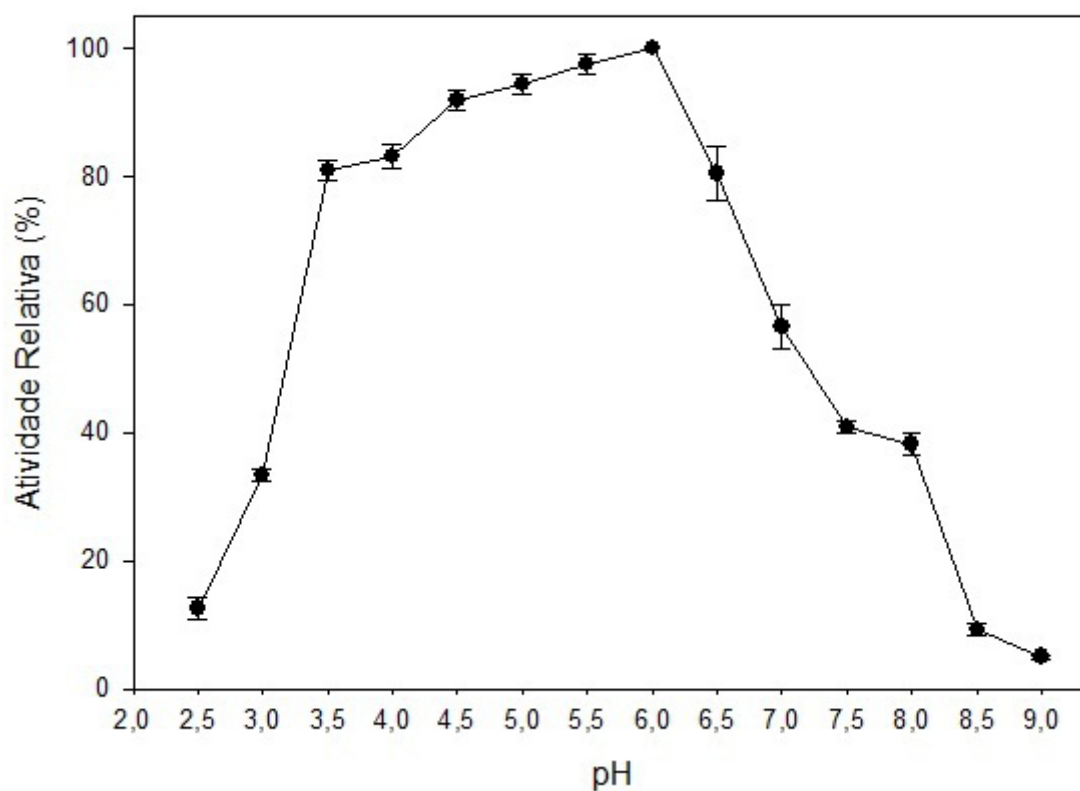
Substratos (10 mM)	Atividade Relativa (%)
4-metilcatecol	100*
Pirocatequina	86,31 ± 1,79
Catecol	85,04 ± 1,00
Ácido Cafeico	42,00 ± 2,41
L-DOPA	32,95 ± 0,81
Ácido Clorogênico	13,19 ± 0,40
L-tirosina	1,66 ± 0,38

* Valor médio de cinco repetições ± erro padrão da média

Tabela 4. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.**Table 4.** Effect of different compounds on the activity of polyphenoloxidase from stems of *Strelitzia reginae*.

Inibidor (1 mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100 *
EDTA	110,33 ± 1,55
Sulfato de Sódio	107,53 ± 2,55
Ácido Ascórbico	33,60 ± 1,70
DTT	0
β-mercaptoetanol	0
Metabissulfito de Sódio	0
L-cisteína	0

* Valor médio de cinco repetições ± erro padrão da média

**Figura 1.** Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Cada valor é a média de cinco amostras ± erro padrão da média

Figure 1. Effect of pH on the polyphenoloxidase activity from stems of *Strelitzia reginae*.

Each value is the mean of five replicates ± standard error of mean

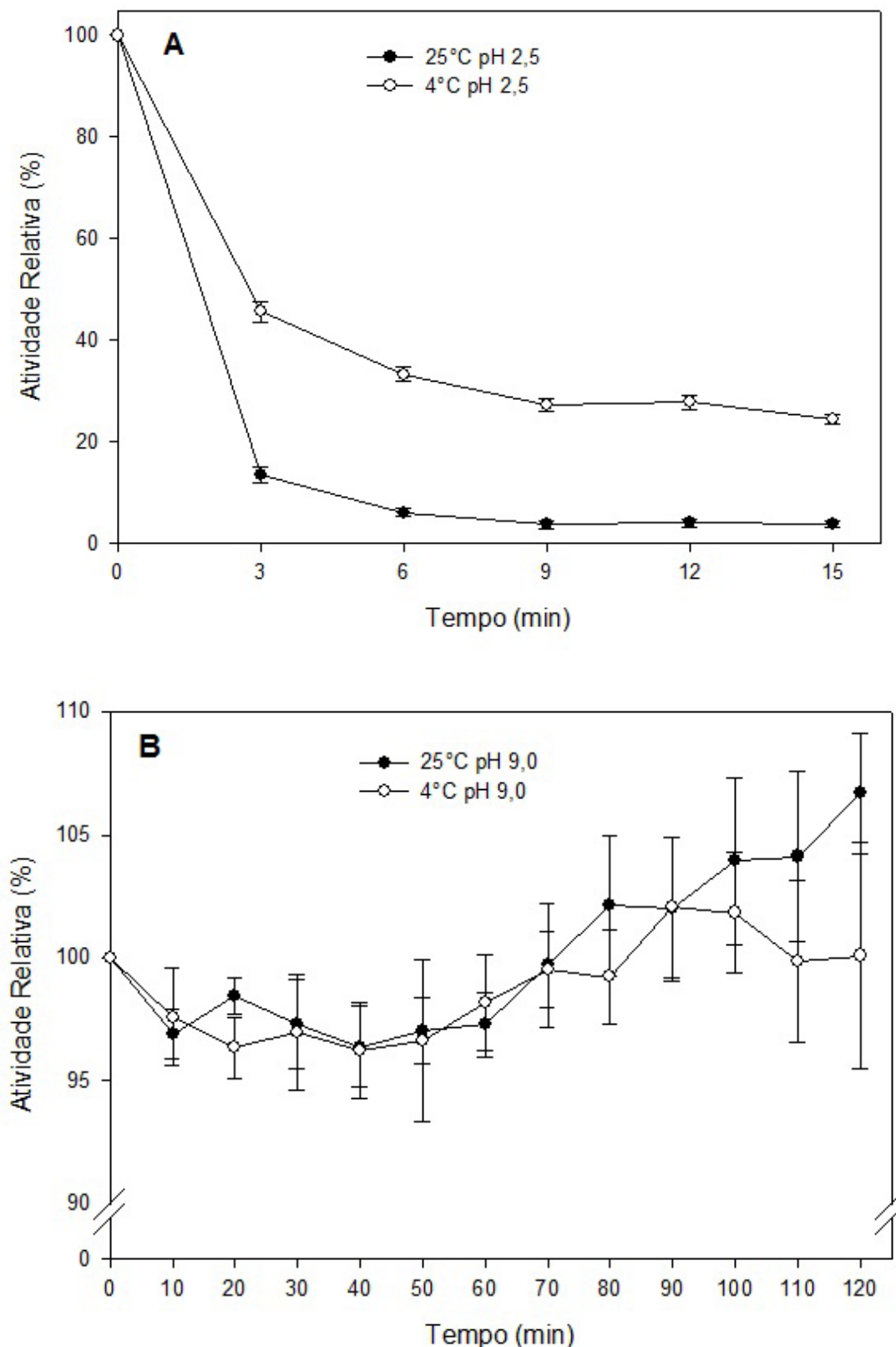


Figura 2. Efeito do tempo de pré-incubação em pH 2,5 (A) e 9,0 (B), a 4 e 25°C, sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25°C. Cada valor é a média de cinco amostras \pm erro padrão da média

Figure 2. Effect of time of pre-incubation at pH 2.5 (A) and 9.0 (B), 4 and 25 °C, on polyphenoloxidase activity from stems of *Strelitzia reginae*, at pH 6.0 and 25 °C. Each value is the mean of five replicates \pm standard error of mean

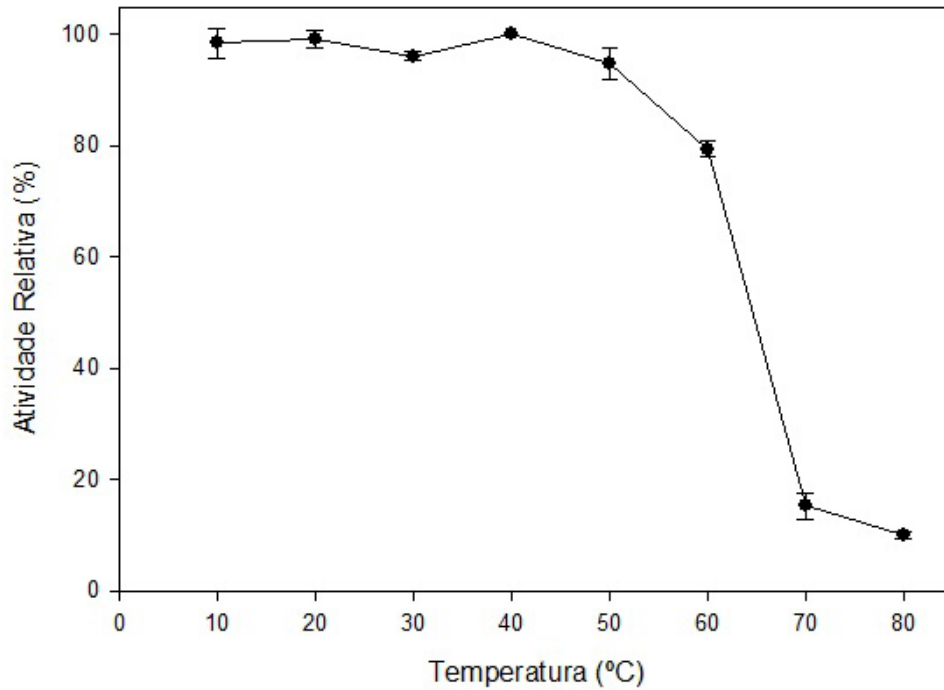


Figura 3. Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. Cada valor é a média de cinco amostras \pm erro padrão da média
Figure 3. Effect of different temperatures on polyphenoloxidase activity from stems of *Strelitzia reginae*. Each value is the mean of five replicates \pm standard error of mean

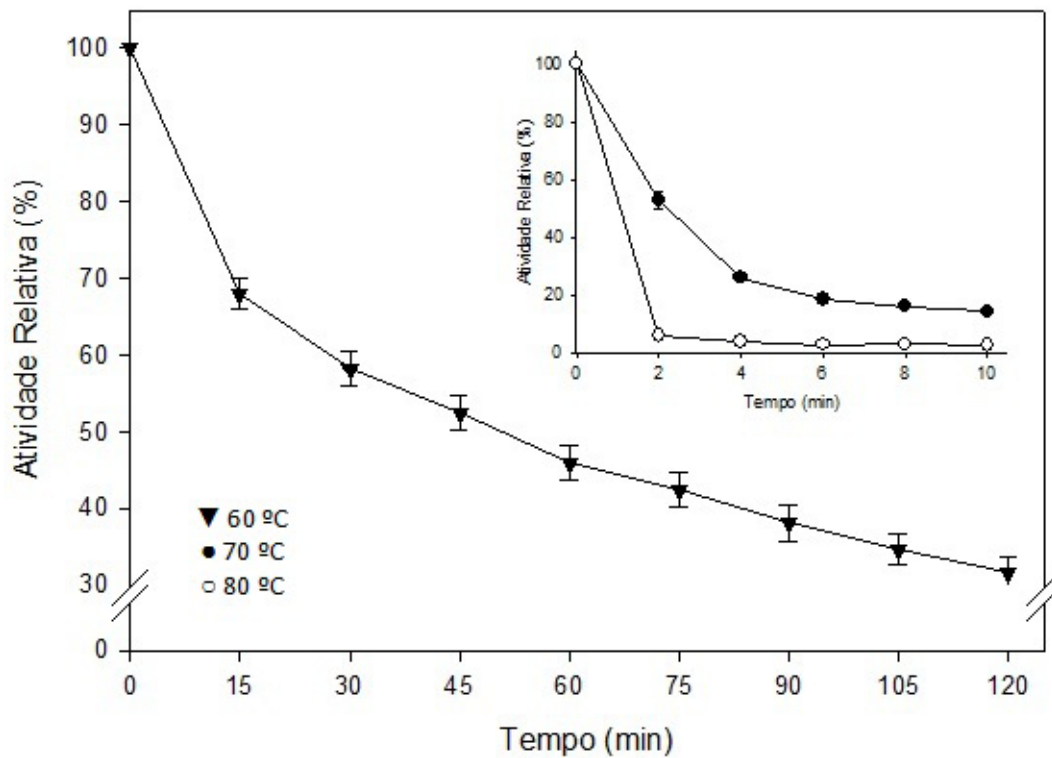


Figura 4. Estabilidade térmica da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae* a 60, 70 e 80°C. Cada valor é a média de cinco amostras \pm erro padrão da média
Figure 4. Thermal stability of polyphenoloxidase from stems of *Strelitzia reginae* at 60, 70 e 80°C. Each value is the mean of five replicates \pm standard error of mean