

The crude extract is obtained by crushing the April flower pulp, and then it is placed for analysis in the spectrophotometer together with aliquots of guaiacol and catechol to observe the enzymatic activity.

ESTUDO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS IDEAIS DAS ENZIMAS PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE DA FLOR DE ABRIL (*DILLENIA INDICA L.*)

**Claudio Tomáz Jubanski^{a*}, João Gabriel Schonrock^a, Luan Krüger^a, Marina Zoccatelli^a
Suellen Cadorin Fernandes^a, Fernanda Witt Cidade^a.**

^aDepartamento de Química, IFC Campus Araquari, 89245-000 Araquari – SC, Brasil

Manuscrito com material suplementar

Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: tomazjubanski@hotmail.com

STUDY OF THE KINETIC PARAMETERS OF THE ENZYMES PEROXIDASE AND POLYPHENOLOXIDASE OF THE FLOWER OF APRIL (DILLENIA INDICA L.)

Through the crude extract of elephant-apple (DILLENIA INDICA L.), it was possible to obtain the peroxidase and polyphenoloxidase enzymes. The choice of this fruit for the research was taken by consideration of the rapid darkening that it undergoes after being opened. Crude extract was prepared with 25 g of vegetable tissue and beaten with 100 mL of phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} pH 7. The enzymatic determination of peroxidase and polyphenoloxidase had the intention to observe in which pH these demonstrate better enzymatic performance. Being pH 6 and 5.5 demonstrated the best enzymatic activity for peroxidase and polyphenoloxidase, respectively. In the change in catechol concentrations the results were not very different, and the concentration of 0.0055 g.mL^{-1} indicated by the literature maintained the best result.

Keywords: Flower of april; Elephant-apple; Polyphenoloxidase; Peroxidase.

INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de sistemas biológicos que diminuem a energia de ativação das reações, sendo altamente específicas para os substratos sobre os quais atuam, pois cada enzima possui uma organização estrutural diferente. Como consequência disso, a mesma permite ligações apenas com seu ou seus substratos em específico atuando em soluções aquosas sob determinadas faixas de temperatura e pH.¹

Existem seis classificações em relação às enzimas e essas divisões são feitas por meio das reações que as mesmas têm capacidade de catalisar sendo elas Ligases, Hidrolases, Transferases, Liases, Isomerases e Oxirredutases. As enzimas peroxidase e polifenoloxidase que foram estudadas neste trabalho são classificadas como oxirredutase e têm como característica a atuação em reações biológicas de oxidação e redução.²

O estudo cinético de uma enzima tem como objetivo primariamente caracterizar a atividade dessa enzima. *In vitro* é estudada a atividade da enzima visando saber quais formas de reações podem catalisar, com quais substratos pode interagir e como se altera essa atividade (qualitativa e/ou quantitativamente) quando alteradas as condições em que é ensaiada, como o valor de pH, a temperatura, o tempo de incubação, as concentrações dos substratos, de cofactores ou de outras substâncias (inibidores ou ativadores). Por isso, recorre-se a cinética enzimática, pois a mesma visa estudar as enzimas em ação, suas atividades catalíticas.³

A atividade enzimática de uma preparação impura é expressa em termos em Unidades Internacionais. Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade de atividade (U) é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto” nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). A análise da atividade enzimática do substrato ou do produto é estudada de maneira mais eficiente quando os mesmos apresentam cor ou a característica de absorver na região do UV, pois dessa forma pode-se utilizar o espectrofotômetro, possibilitando um registro contínuo do conteúdo que está sendo analisado.⁴⁻⁵

A enzima peroxidase (EC 1.11.1.7) têm como função proteger os tecidos do vegetal, tendo como objetivo combater os impactos que a água oxigenada (H_2O_2) causa, sendo que a sua formação ocorre durante o processo de metabolismo celular. Esta enzima é usada para desenvolver

métodos confiáveis de determinação do H₂O₂ e ainda pode ser empregada na determinação da peroxidação lipídica em amostras de produtos alimentícios.⁶

A enzima polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) exerce a função catalítica em temperatura ambiente, mas é facilmente desnaturada quando elevado a temperatura. Se encontra distribuída na natureza, sendo primeiramente relacionada com o escurecimento enzimático dos vegetais *in natura*, ocasionando perda da cor dos produtos de frutas e hortaliças processados e ou congelados, diminuição do valor nutricional, modificando as propriedades organolépticas.⁷⁻⁸

As enzimas podem ser encontradas em uma ampla diversidade de organismos, porém as extraídas de vegetais, em sua maioria frutos, possuem grandes vantagens pela simplicidade na extração, baixo custo e alta estabilidade. Dessa forma, o uso de extrato bruto, tecido ou fibra de diversos vegetais vem sendo bastante utilizados como fonte enzimática, em função dos privilégios que os mesmos proporcionam, fazendo com que isso desperte um grande interesse para o desenvolvimento de pesquisas na área.⁹⁻¹⁰

O fruto da Flor de Abril vem de uma árvore caducifólia (*Dillenia indica* L.), de 10-12 m de altura, originária da Ásia Tropical, de tronco espesso, com casca fendilhada em todos os sentidos, expondo um fundo avermelhado. Os frutos possuem cor verde-amarelados, são representados pelas sépalas que recobrem-se a si mesmas, mais desenvolvidas, carnosas e rijas, formando um conjunto globoso, sulcado pela junção das sépalas, sendo este fruto utilizado como fonte do extrato bruto para o desenvolvimento desta pesquisa.¹¹

Desta forma o objetivo da pesquisa é investigar os parâmetros cinéticos das enzimas peroxidase e polifenoloxidase proveniente de extrato bruto do fruto da Flor de Abril por meio da avaliação dos fatores como, tempo de armazenamento ideal, temperatura, pH, além da melhor concentração.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtenção dos materiais

A execução do projeto foi realizada entre os meses de junho e outubro de 2018. Todos os materiais para a realização do projeto foram fornecidos pelo Instituto Federal Catarinense - *Campus* Araquari, exceto o fruto Flor de Abril, que foi obtido em Joinville - Santa Catarina.

Obtenção do extrato bruto

O procedimento inicia-se com a lavagem e secagem do fruto (Flor de Abril) em temperatura ambiente. Logo em seguida foi realizado a pesagem de 25 g do tecido vegetal descascado e posteriormente picados e colocados em um Liquidificador (Philco Inox Filter Ph 127V) com 100 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), contendo 2,5 g de proteína protetora (PVPs: polivinilpirrolidonas). Em seguida, o material obtido foi filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado (FANEM Excelsa 2) durante 15 min. A solução foi separada em várias alíquotas, armazenada em refrigerador a 4°C para ser utilizada como fonte enzimática.⁹

Determinação da atividade da polifenoloxidase

A atividade da enzima polifenoloxidase foi determinada medindo-se a variação de absorvância ($\lambda = 420 \text{ nm}$) da quinona formada na reação enzimática espectrofotometricamente (RayLEIGH UV - 9200). Nessa determinação é usada 2,8 mL de uma solução de catecol ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,2 mL do extrato bruto a 25°C conforme mostrado na Figura 1. Uma unidade de atividade (unidades mL^{-1}) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto nas condições mencionadas.¹²

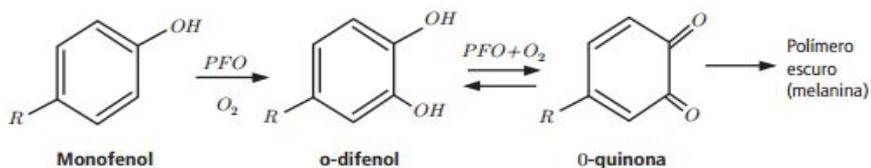


Figura 1: Reação de quinona

Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da enzima peroxidase foi avaliada através da medida da variação da absorvância ($\lambda = 470 \text{ nm}$) utilizando 2,7 mL de guaiacol ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), 0,2 mL de extrato bruto e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio ($9,79 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) conforme pode ser observado na Figura 2. Esta análise foi realizada a uma temperatura de 25°C .¹³

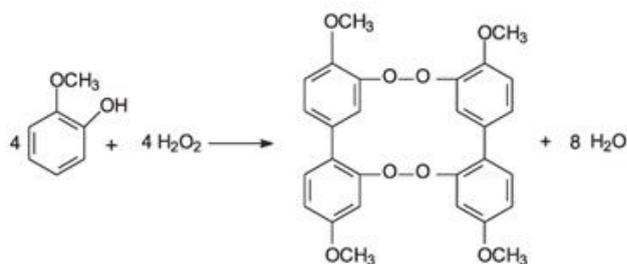


Figura 2: Reação do guaiacol para tetraguaiacol.

Definição da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase

A atividade enzimática pode ser definida pela seguinte equação, que resulta em unidades de atividade por mL.

$$\text{Atividade} = (\Delta \text{Abs} \times 1000) \div (\Delta t \times 0,2)$$

Investigação das melhores condições para obtenção da enzima

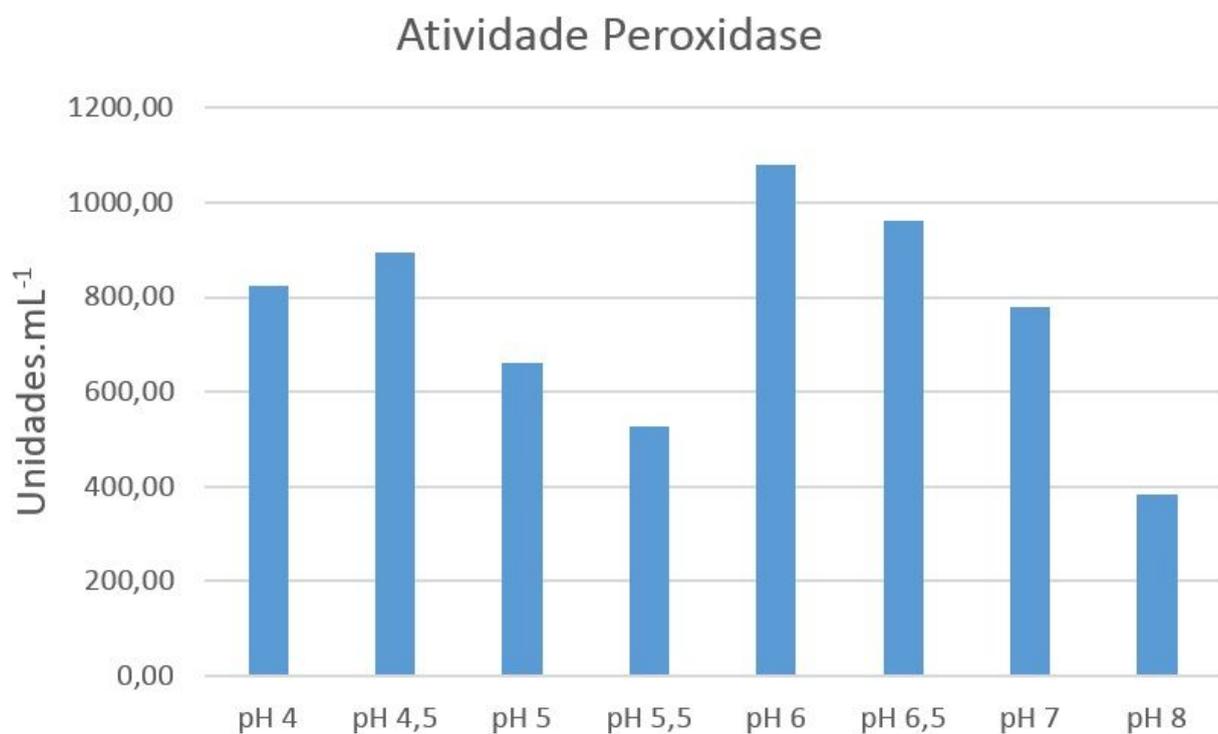
As amostras de extrato bruto foram submetidas a análises para determinação da melhor temperatura de armazenamento e processamento e pH ideal. As amostras do extrato foram submetidas a análises espectrofotométricas para detecção e possível quantificação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Os comprimentos de onda que sofrem absorvância por estas enzimas ficam situados entre 400 e 500 nm, dentro da região do UV-Vis. A análise da temperatura ideal de obtenção e conservação das enzimas foi feita através das enzimas em diferentes temperaturas, sendo elas: temperatura ambiente e a 8°C (extrato conservado em geladeira) . Da mesma forma a faixa de pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da peroxidase

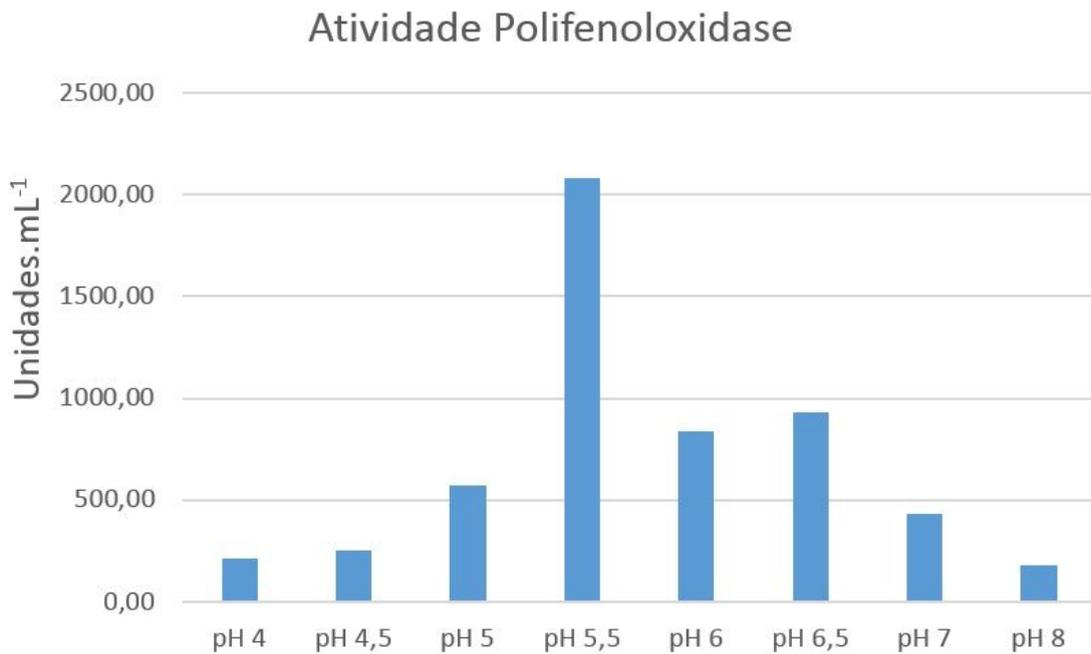
Estudo do pH

A enzima peroxidase possui uma faixa de pH ideal para a cinética, esta faixa foi determinada através das análises realizadas na faixa entre 4,0 a 8,0 tendo o pico em pH 6,0 observado na Figura 3. Valores acima de 6,0 ou abaixo de 6,0 a atividade enzimática decai de forma acentuada, voltando a ter uma boa atividade em pH 4,5. Em estudos da enzima peroxidase presentes na literatura feitos com brotos de vegetais, tem-se os seguintes resultados: pH ideal 6,5, melhor pH é 7,4.¹⁵ Dessa forma pode-se observar que os resultados ficaram próximos dos resultados encontrados por outros autores.



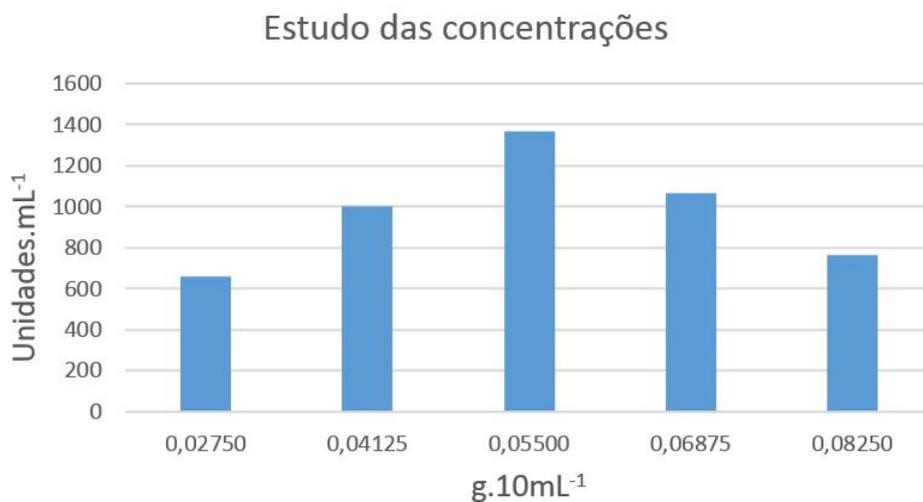
A enzima polifenoloxidase possui a faixa de pH ideal entre 5,5 e 6,5, atingindo o ápice da cinética em 5,5, pHs superiores a 6,5 ou inferiores a 5,5 a atividade decai de maneira brusca.¹⁶ O pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase de diferentes fontes se situa entre pH 5,0 e 7,0, com

isso, pode-se perceber que os resultados adquiridos se encaixam na literatura, como representados no gráfico a seguir:



Estudo da concentração

A atividade da enzima varia com a concentração do catecol, sendo que houve diferenças consideráveis da absorbância, que por sua vez resulta na diferença de U mL⁻¹, como demonstrado a seguir:



CONCLUSÃO

As enzimas peroxidase e polifenoloxidase apresentam altas taxas de atividade enzimática em faixas específicas de pH, temperatura e concentração de catecol e guaiacol, sendo que a peroxidase apresentou melhor atividade entre pH 6 e 6,5 tendo como ponto negativo a proximidade com o pH 5,5 que apresentou a segunda menor a atividade nas faixas de pH estudadas.

Já a polifenoloxidase tem tendência inversa e apresenta sua maior atividade em pH 5,5, sendo que em todas as outras faixas de pH testadas a atividade se mostrou abaixo da metade do melhor resultado obtido. A variação de concentração de catecol não mostrou resultados expressivos sendo que a concentração de $0,0055 \text{ g.mL}^{-1}$ indicada pela literatura foi a de maior atividade.

A atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase provenientes do fruto da flor de abril se mostrou em níveis elevados em algumas condições específicas e pouco distantes das constatadas na literatura, porém a combinação de alguns fatores como pH e temperatura se mostraram mais eficientes em relação a variáveis isoladas, mostrando que o controle dessas duas variáveis respectivamente pode trazer resultados bastante positivos quanto a atividade dessas enzimas, mostrando ser viável a utilização desse fruto para fins comerciais e industriais.

REFERÊNCIAS

1. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed, Porto Alegre: Artmed, 2014.
2. **INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY**. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acessado em 17/05/2018.
Alberts, B; et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 4. ed, Rio Grande do Sul: Artmed, 2017.
3. **CONCEITOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA E MODELOS CLÁSSICOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**. Disponível em:<https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2011-2012/cinetica_enzimica_2011_vs02.pdf> . Acessado em 18/05/2018.
4. MONTIBELLER, Gilberto; BELTON, Valerie. Causal maps and the evaluation of decision options—a review. **Journal of the Operational Research Society**, v. 57, n. 7, p. 779-791, 2006.
5. VILLELA, Dora Maria et al. Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 506-516, 2006.
6. ATAMNA, Hani; BOYLE, Kathleen. Amyloid- β peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3381-3386, 2006.
7. SANTOS, Izabella Rodrigues Chaves dos. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (Annona cherimola Mill. X Annona squamosa L.)**. 2009.
8. COSENTEG, M.Y.; LEE, C.Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentration in relation to degree of browning. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 4, p. 985-989, 1987.
9. FATIBELLO-FILHO, Orlando; DA C. VIEIRA, I. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
10. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; GRANATO, A. C.; LUPETTI, K. O. **Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante**. *Eclética Química*, vol. 29, núm. 2, 2004, pp. 7-17.
11. LORENZI, Harri. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003.
12. LUPETTI, Karina O.; RAMOS, Luiz A.; FATIBELLO-FILHO, Orlando. **Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate. (Persea americana)**. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 2, 197-201, 2003.

13. ZERAIK, Ana Eliza et al. **Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação.** 2008.
14. Bradford, M. M.; Anal. Biochem. **1976**, 72, 248.
15. SANTOS, Izabella Rodrigues Chaves dos. Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.). 2009.
16. LAMBRECHT, H. S. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods.