



Extração e Quantificação Simultânea de Polifenoloxidasas de Extratos Proteicos Solúveis e Insolúveis de Folhas

Juliana Martins Ribeiro¹

Eduardo Alves Gamosa de Oliveira²

Kátia Valevski Sales Fernandes³

Márcio dos Santos Teixeira Pinto⁴

Introdução

Polifenoloxidasas (PFOs), assim como peroxidases (POX), superóxido dismutase (SOD) e outras oxidases, são enzimas que oxidam substratos orgânicos. Porém, PFOs se diferenciam das demais por catalisarem uma reação de oxidação dependente de oxigênio de monofenóis (ex. tirosinases ou cresolases) ou Orto-difenóis (ex. catecolases, lacases) a *o*-diquinonas (STEFFENS et al., 1994). Por esse motivo, também são chamadas de orto-difenol-oxireductases, por reduzirem o oxigênio, um de seus substratos, à água. Embora PFOs atuem catalisando uma reação de segunda ordem, a sua cinética enzimática pode ser considerada de primeira ordem, considerando-se somente o consumo do substrato difenólico, em um padrão de reação previsto por Michaelis-Menten.

Em plantas, PFOs estão presentes aderidas fracamente à face luminal da membrana interna ou no lúmen de tilacoides (STEFFENS et al., 1994), sendo encontradas em múltiplas isoformas. As

o-diquinonas produzidas, são compostos altamente reativos que se ligam a resíduos de aminoácidos de moléculas de proteínas, produzindo compostos coloridos insolúveis e com baixo potencial nutritivo (CHAZARRA et al., 1997). Muitas polifenoloxidasas de plantas apresentam latência, avaliadas por um aumento de atividade no pH 6,0, ou pela ativação por tratamento com proteases (tripsina ou protease K) ou sob concentrações milimolares do detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS) (SELLÉS-MARCHART et al., 2006).

Os mecanismos que regulam a ativação de polifenoloxidasas em plantas ainda não foram esclarecidos, assim como não é conhecido o porquê da existência de polifenoloxidasas ativas e latentes em um mesmo organismo, e nenhuma suposição foi ainda considerada (MAYER, 2006).

Embora as PFOs já tenham sido encontradas em plantas há mais de 1 século (BERTRAND, 1896), um conhecimento completo sobre seu papel nestes organismos ainda não foi totalmente elucidado.

¹ Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br.

² Bolsista, BFT FACEPE, Petrolina, PE, eduardobio@yahoo.com.br.

³ Bióloga, D.Sc., professora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. cowpkat@uenf.br.

⁴ Bolsista, DCR FACEPE/CNPq, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, marciostp@yahoo.com.br.

Funções distintas têm sido atribuídas às PFOs, tais como: pigmentação e escurecimento do tecido vegetal (BOONSIRI et al., 2007; VALENTINES et al., 2005); ação na reação de Mehler, uma vez que atua transferindo elétrons de um substrato fenólico para o oxigênio em uma cadeia transportadora de elétrons, aumentando o consumo deste durante a fotorrespiração (THIPYAPONG et al., 2004) e proteção de plantas contra pragas e patógenos (CONSTABEL; RYAN, 1998). Este amplo espectro de idéias sobre os papéis das PFOs reflete o parcial entendimento das suas funções nas plantas (MAYER, 2006). A habilidade natural de uma PFO em oxidar fenóis ou polifenóis reflete seu mecanismo de ação como proteína de defesa, desde que as diquinonas originárias que liguem e precipitem proteínas sejam mais tóxicas aos predadores de plantas do que os fenóis originais (FELTON et al., 1992).

O procedimento de medição de PFOs descrito no presente trabalho permitiu a observação do aumento da atividade polifenoloxidásica somente na fração de proteínas solúveis em plantas de feijão-de-corda submetidas à ação de fermento. Observou-se que a atividade de PFO na fração solúvel era dependente de SDS para ativação tratando-se, portanto, de uma enzima latente. Diferentemente da atividade vista em frações insolúveis que, embora correspondesse a mais de 80% da atividade enzimática total, não foi alterada em plantas de feijão-de-corda pelo tratamento de fermento. Constatou-se, ainda, que a fração de PFO insolúvel é constitutivamente ativa, não sofrendo efeito da adição de SDS e portanto, de natureza diferente da PFO encontrada na fração solúvel minoritária.

A metodologia descrita nesse estudo permite a análise simultânea de diferentes PFOs com diferentes propriedades de solubilidades em um mesmo tecido vegetal, bem como o monitoramento de um tipo de polifenoloxidase em particular relacionado com sua solubilidade, o que não é possível pelas análises de atividade polifenoloxidásica total descritas em alguns trabalhos (CONSTABEL; RYAN, 1998).

Procedimento para a extração e quantificação de PFOs em folhas

1) Inicialmente, o tecido vegetal deve ser macerado preferencialmente em nitrogênio líquido (-190 °C)

em gral, até a sua redução a pó. Após esse passo, a extração deverá ser feita com tampão fosfato de sódio 10 mM, EDTA 5 mM, pH 6 resfriado em gelo (0 °C), na proporção de 1:2, obtendo-se um extrato bruto que será centrifugado a 20.000 x g, 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante obtido deverá ser definido como “fração proteica solúvel” por apresentar proteínas hidrossolúveis (CONCELLON et al., 2004).

2) Após a obtenção da primeira fração, o sedimento da primeira centrifugação deve ser novamente suspenso e homogeneizado em tampão com a mesma composição descrita anteriormente, diferindo somente com o acréscimo de 1% de Triton X-100 em sua composição. O triton X-100 é um detergente não iônico que permite a solubilização de proteínas hidrofóbicas. O homogenato obtido deve ser centrifugado (20.000 x g, a 4 °C, 20 minutos) e o sobrenadante obtido, definido como “fração proteica insolúvel” por não apresentar proteínas hidrossolúveis, necessitando do acréscimo de 1% de triton para sua solubilização (PINTO et al., 2008).

3) As frações proteicas solúveis e insolúveis obtidas, conforme descrito anteriormente, devem ser dosadas em relação à presença de polifenoloxidasas (PFO), segundo metodologia descrita por Shin et al. (1997) e Pinto et al. (2008). Teste de atividade deve ser feito utilizando-se como substrato metil-catecol, em meio de ensaio apresentando a seguinte composição: tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0; catecol 5 mM e amostra em um volume total de ensaio de 1.000 µL. Alíquotas de extratos proteicos obtidos, conforme os itens 1 e 2, deverão ser usadas na proporção de 50 µL a 300 µL de acordo com o nível de atividade observada, sendo que volumes maiores são recomendados para medição de valores menores de atividade polifenoloxidásica, no entanto, reduzindo-se a proporção de tampão fosfato de forma proporcional, de modo que o volume total de reação seja mantido em 1.000 µL.

4) As leituras espectrofotométricas devem ser feitas medindo-se a variação de absorbância em um comprimento de onda de 410 nm, durante os primeiros minutos de reação, com um tempo total de leitura variando de 2 a 10 minutos, dependendo do nível de atividade enzimática (maiores níveis exigem maiores tempos de leitura), com intervalos

de 10 segundos para cada ponto de leitura. Os pontos para o cálculo da cinética enzimática deverão ser considerados na fase inicial da reação, antes de ocorrer o início do esgotamento do substrato.

5) Todas as medições devem ser feitas em temperatura de 25°, aproximadamente, sendo estabelecido como unidade enzimática (UE), o aumento de absorvância em leitura de atividade correspondente a 0,01 por minuto.

Recomendações importantes para a execução do protocolo de dosagem de PFOs

- Para a otimização do ensaio, é importante que o tampão fosfato esteja bem aerado, uma vez que o oxigênio é um dos substratos da reação.
- A cubeta utilizada na leitura espectrofotométrica deste ensaio deve ser adequada para o volume de 1 mL. Caso não haja similar disponível, um novo cálculo deverá ser feito para ensaio com volumes maiores.
- A amostra de extrato proteico deve ser o último componente adicionado no meio de reação. Deve ser feita uma mistura com os outros componentes antes da adição da amostra de extrato (contendo enzima), e outra, também rápida, após a adição. A leitura espectrofotométrica deve ser iniciada logo em seguida.
- Como descrito anteriormente, muitas PFOs possuem latência (SELLÉS-MARCHART et al., 2006). Em muitos casos a latência pode ser eliminada pela adição de SDS e a presença desse reagente no meio de reação pode ser necessária para detecção de atividade. No entanto, curvas de atividade com concentrações crescentes de SDS no meio de reação devem ser feitas. Não somente para a avaliação desta propriedade, mas também para determinação da concentração ótima de SDS no meio reacional. PFOs que não apresentam latência são, inicialmente, ativas sem a presença de SDS, podendo até ser inibidas por ele.

Referências

- BERTRAND, G. Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. Comptes Rendus l'Academie des Sciences, Paris, v. 122, p. 1.215-1.217, 1896.
- BOONSIRI, K.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. G. Seed browning of hot peppers during low temperature storage. Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v. 45, p. 358-365, 2007.
- CHAZARRA, S.; CABANES, J.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1.339, p. 297-303, 1997.
- CONCELLON, A.; ANON, M. C.; CHAVES, A. R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. Food Chemistry, [Amsterdam], v. 88, p. 17-24, 2004.
- CONSTABEL, C. P.; RYAN, C. A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. Phytochemistry, New York, v. 47, p. 507-511, 1998.
- FELTON, G. W.; DONATO, K. K.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. Journal of Insect Physiology, [New York], v. 38, p. 277-285, 1992.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places?: a review. Phytochemistry, New York, v. 67, p. 2318-2331, 2006.
- PINTO, M. S. T.; SIQUEIRA, F. P.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. S. A wounding-induced PPO from cowp plants (*Vigna unguiculata*) seedlings. Phytochemistry, New York, v. 69, p. 2297-2302, 2008.
- SELLÉS-MARCHART, S.; CASADO-VELA, J.; BRU-MARTÍNEZ, R. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): kinetic characterization and comparison with the active form. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 446, p. 175-185, 2006.
- SHIN, R.; FRODERMAN, T.; FLURKEY, W. H. Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. Phytochemistry, New York, v. 45, p. 15-21, 1997.
- STEFFENS, J. C.; HAREL E.; HUNT, M. D. Polyphenol oxidase. Recent Advances in Phytochemistry, New York, v. 28, p. 275-312, 1994.
- THIYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. Planta, [Buenos Aires], v. 220, p. 105-117, 2004.
- VALENTINES, M. C.; VILAPLANA, R.; TORRES, R.; USALL J.; LARRIGAUDIÈRE, C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. Postharvest of Biology and Technology, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 227-234, 2005.

Comunicado Técnico, 146

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Semiárido**
 Endereço: BR 428, km 152, Zona Rural, Cx. Postal 23, 56302-970, Petrolina, PE
 Fone: (87) 3866-3600
 Fax: (87) 3866-3815
 E-mail: sac@cpatsa.embrapa.br

1ª edição (2011): Formato digital

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.*
Secretário-Executivo: Anderson Ramos de Oliveira.
Membros: Ana Valéria de Souza, *Andrea Amaral Alves, Gislene Feitosa Brito Gama, José Maria Pinto, Juliana Martins Ribeiro, Magna Soelma Bezerra de Moura, Patrícia Coelho de Souza Leão, Sidinei Anunciação Silva, Vanderlise Giongo, Welson Lima Simões.*

Expediente

Supervisão editorial: *Sidinei Anunciação Silva.*
Revisão de texto: *Sidinei Anunciação Silva.*
Tratamento das ilustrações: *Nivaldo Torres dos Santos.*
Editoração eletrônica: *Nivaldo Torres dos Santos.*