

## ESTUDO DA ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASES DE UMBÚ-CAJÁ (*SPONDIAS SPP.*)

Patrícia Souza Lima<sup>1</sup>; Marília Lordêlo Cardoso<sup>2</sup>; Cíntia Reis da Silva<sup>3</sup>; Maria Gabriela Bello Koblitz<sup>4</sup>.

1. Estudante PEVIC, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: [patystricia@gmail.com](mailto:patystricia@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [marilialordelo@uefs.br](mailto:marilialordelo@uefs.br);
3. Participante do Projeto, Mestranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana;
4. Participante do Projeto, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, e-mail: [mkoblitz@gmail.com](mailto:mkoblitz@gmail.com);

**PALAVRAS-CHAVE:** enzimas, polifenoloxidasas, umbu-cajá.

### INTRODUÇÃO

A umbu-cajazeira (*Spondia spp*) pertencente à família Anacardiaceae e ao gênero *Spondia* é considerada um híbrido natural entre o umbuzeiro e a cajazeira (Giacometti, 1993). Os frutos possuem excelente sabor e aroma, boa aparência e qualidade nutritiva e são muito consumidos na forma "in natura". O rendimento médio em polpa é em torno de 55 a 65 %, o que significa um bom potencial para a sua utilização na forma processada como polpa congelada, sucos, néctares e sorvetes. (Lima, 2002).

A polifenol-oxidase (PFO) é uma enzima, oxido-redutase, que oxida compostos fenólicos na presença de oxigênio molecular. É a principal responsável pelo escurecimento enzimático de frutas e vegetais, quando estes são cortados e expostos ao ar. Este escurecimento é causado pela ação dessa enzima sobre os compostos fenólicos naturais, na presença do oxigênio atmosférico, que são oxidados a orto-quinonas, que em seguida podem se polimerizar e formar as melaninas. (Koblitz, 2008).

A ação dessa enzima em várias frutas e vegetais *in natura*, como o umbu-cajá, acarreta perdas econômicas consideráveis, além de diminuição da qualidade nutritiva e alteração do sabor. Por conta do efeito de escurecimento causado no fruto e na polpa processada, o estudo da atividade e a avaliação do efeito térmico e uso de aditivos que inativa esta enzima é de fundamental importância para encontrar métodos capazes de garantir boa aparência e qualidade ao produto.

### METODOLOGIA

#### *Obtenção do extrato enzimático*

Para avaliar os efeitos do pH e da concentração de NaCl foi montado um delineamento experimental rotacional, conforme planilha de ensaios no software STATISTICA (6.0). Como variável dependente foi avaliada a atividade de polifenoloxidase (PFO). Para extração da enzima foi utilizada uma mistura de polpa de umbu-cajá (acesso Suprema, fornecido pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical) e tampão (0,1M) na proporção de 1:1, no pH e concentração de NaCl variando de acordo com o ensaio, conforme Tabela 1. A amostra foi homogeneizada em liquidificador por 3 minutos, sendo em seguida centrifugada durante 20 minutos a 4°C sob 6000 rpm. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e congelado.

#### *Determinação da atividade de polifenoloxidase*

Para determinar a atividade de polifenol-oxidase foi utilizado o método de Babu *et al.* (2008), Fang *et al.* (2007) e Kumar *et al.* (2008), modificado. O substrato foi composto por 2,0 mL de solução de catecol (pirocatequina) 50 mM em tampão fosfato 0,1M (pH=6,5). A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de extrato enzimático incubada a 35°C em banho-maria (Cientec CT-232). Após o período de incubação adicionou-se 0,8 mL de ácido perclórico 2N. O aumento da absorbância a 420 nm foi determinado em espectrofotômetro

(Biospectro SP-220) fazendo leituras a cada 1 minuto até 10 minutos, contra um branco, no qual o extrato enzimático foi mantido em banho de ebulição por dois minutos (com o propósito de desativar a enzima) e centrifugado a 13.000 rpm/5 minutos. As determinações foram realizadas em triplicata.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto de reação.

A avaliação dos resultados se deu pela construção de tabela de análise de variância, construção de diagrama de Pareto e geração das superfícies de resposta, utilizando o Software Statistica (6.0).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de atividade de PFO encontrados para o acesso Suprema de umbu-cajá.

**Tabela 1.** Planilha de ensaios e atividade de PFO para diferentes valores de pH e concentração de NaCl

Ensaio	pH	NaCl (M)	Atividade de PFO*
1	4,6	0,3	2.733,33
2	4,6	1,7	10.566,67
3	7,4	0,3	6.850,00
4	7,4	1,7	5.650,00
5	4	1	3.266,67
6	8	1	8.350,00
7	6	0	5.316,67
8	6	2	8.216,67
9 (C)	6	1	4.550,00
10 (C)	6	1	4.300,00
11 (C)	6	1	4.250,00
12 (C)	6	1	4.733,33

\* resultados em U/g de amostra fresca

Segundo o gráfico de Pareto (Figura 1), os fatores que exerceram efeitos significativos sobre a extração da enzima polifenoloxidase de umbu-cajá (acesso Suprema) foram a concentração de NaCl e a interação entre pH x concentração de NaCl. O pH de maneira isolada não exerceu efeito significativo. Estas interpretações são baseadas nos valores dos efeitos (barras azuis) que ultrapassam a linha vertical (pontilhada vermelha), uma vez que tal linha demarca o valor do efeito ao nível de 5% de probabilidade. Se os valores encontrados são maiores que este valor, indica que o fator exerce efeito significativo.

A Tabela 2 resume a análise de variância (ANOVA) para o experimento. O valor de F calculado foi maior que o de F tabelado ao nível de 5% de probabilidade, o que indica que a ANOVA foi significativa. Além disso, o valor de  $R^2 = 0,8491$ , significa que 84,91% das variações são explicadas pelo modelo, o qual pode ser usado pra explicar a extração da enzima PFO em função do pH e da Concentração de NaCl.

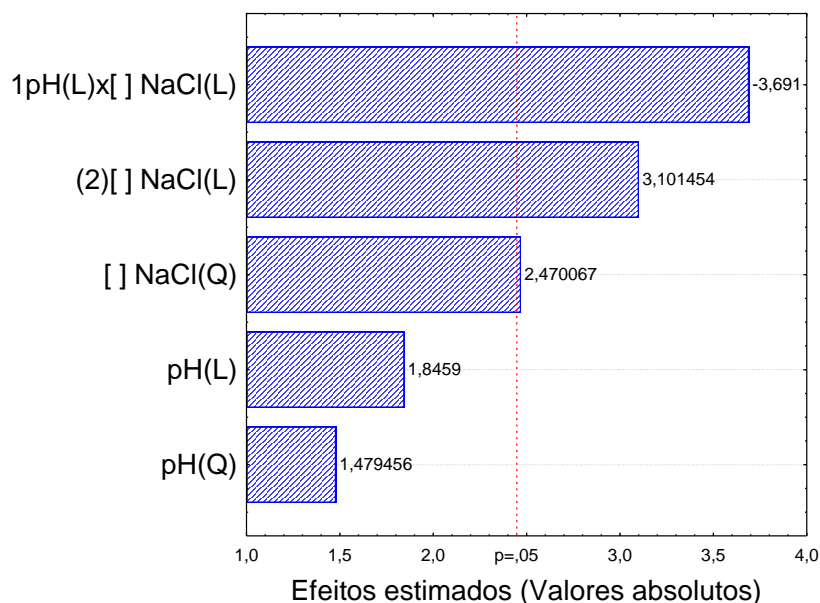


Figura 1: Diagrama de Pareto

Tabela 2: Tabela de Análise de Variância (ANOVA) para o experimento.

	SQ*	GL*	QM*	Fcalc*	Ftab*
<b>Regressão</b>	50557305	5	10111461	6,75	1% = 8,75
<b>Resíduo</b>	8984615	6	1497436		5% = 4,39
<b>Falta de Ajuste</b>	8832116	3			10% = 3,11
<b>Erro puro</b>	152500	3			
<b>Total</b>	59541921	11			

**R<sup>2</sup> = 0,8491**

\*SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; Fcalc = valor de F calculado; Ftab = valor de F tabelado

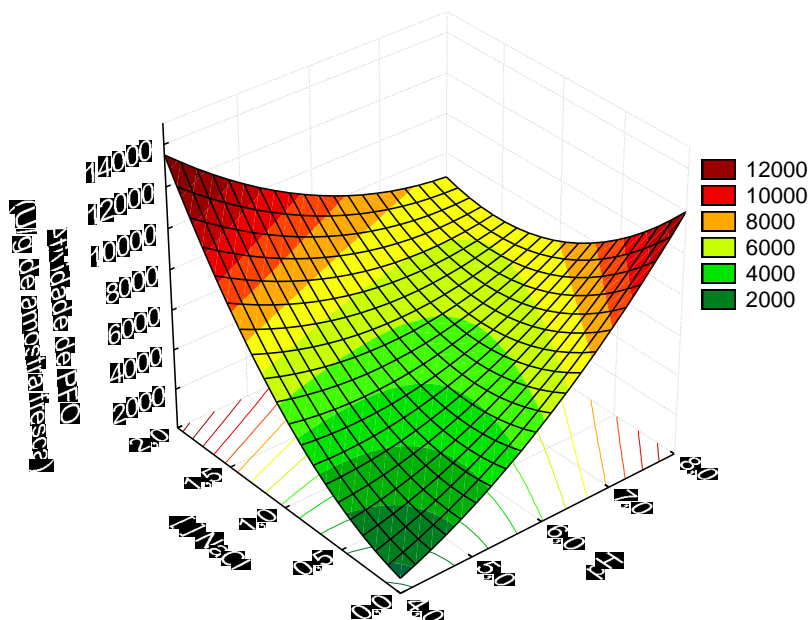


Figura 1 – Efeito do pH e da concentração de NaCl na extração de enzimas PFO de umbu-cajá, acesso Suprema.

De acordo com a superfície de resposta obtida (Figura 2), pode-se observar que duas combinações são consideradas bem sucedidas para extração de PFO: menor pH e maior

concentração de NaCl ou maior pH e menor concentração de NaCl. Os maiores resultados numéricos foram alcançados, dentre as condições testadas, com a primeira combinação pH 4,0 e concentração de NaCl 2,0 M. Wesche-Ebeling & Montgomery (1990) apresentaram resultados semelhantes para extração de PFO de morangos, cujo pH de extração 4,5 apresentou a máxima atividade.

## CONCLUSÕES

De acordo com o experimento realizado, conclui-se que a concentração de NaCl influenciou a extração da enzima polifenoloxidase, bem como, sua interação com a variável pH. A combinação de baixas concentrações de NaCl com elevado pH e altas concentrações de NaCl com baixos valores de pH, dentro da faixa testada, levam aos melhores resultados em termos de atividade de PFO.

Este trabalho encontra-se em andamento e está sendo realizado o estudo da inativação da enzima com uso de tratamento térmico e inibidor químico.

## REFERÊNCIAS

- BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47 :83–89. 2008.
- FANG, Z.; ZHANG, M.; SUN, Y.; SUN, J. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chemistry*. 103: 268–273. 2007.
- GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. Anais... Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1993. p.13-27.
- KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1. 242 p.
- KUMAR, V. B. A; KISHOR MOHAN, T. C; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry* 110 328–333. 2008.
- LIMA, E. D. P. de A. E; LIMA, C. A. de A.; ALDRIGUE, M. L.; GONDIM, P. J. S. Caracterização física e química dos frutos da umbu-cajazeira (*spondias spp*) em cinco estádios de maturação, da polpa congelada e néctar. *Rev. Bras. Frutic.* vol. 24 n°. 2 Jaboticabal. Ago. 2002.
- WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. *Journal of Food Science*, v. 55, p. 1320-1351, 1990