

# Caracterização cinética da enzima catecolase (*Polifenol oxidase*) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.)

*Kinetic characterization of enzyme catecolase (Polyphenol oxidase) in crude extracts of the pulp and peel of eggplant (Solanum melongena L.)*

Daniel Ninello Polesel<sup>1</sup>, Ana Letícia Castellan Sinhorini<sup>1</sup>, Cassia Aparecida Signori Perone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil.

## Resumo

**Objetivo** – Foi analisado como material biológico os extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.), que é fonte da enzima *Polifenol oxidase* (PFO) [EC.1.14.18.1] e estes foram estudados como materiais biocatalíticos para a oxidação aeróbica de substratos fenólicos<sup>19</sup>. **Métodos** – Extraíu-se a PFO dos extratos por trituração, filtração e centrifugação. Através da medida de absorbância e método do Biureto, obteve-se a atividade e a proteína total. Quantidade e tempo de contato do polímero foram determinados espectrofotometricamente. A caracterização cinética da PFO baseou-se na temperatura ótima, estabilidade ao calor, pH ótimo de atividade e de estabilidade. Os valores obtidos foram comparados com os da polpa e casca de banana nanica. **Resultados** – A atividade específica da PFO na banana nanica (1056 u/mg da polpa e 1537,5 u/mg da casca) é superior à do extrato de berinjela (376,5 u/mg da polpa e 500 u/mg da casca). Os valores de pH de atividade (pH 5,0) e de estabilidade (pH 7,0), tempo de contato com o polímero (zero) e de armazenamento (34 dias) foram iguais para ambos os extratos. A atividade da PFO foi superior na casca quando comparada a polpa de berinjela. A massa de polímero PVP necessária para adsorção de compostos polifenólicos excedentes foi três vezes maior na polpa do que na casca. A temperatura ótima de atividade para a polpa foi de 40°C e para a casca de 15°C. **Conclusões** – A caracterização da PFO da berinjela é similar a da banana nanica, porém, a maior atividade específica desta última a torna mais propícia na construção do biossensor para quantificar fenóis/polifenóis em amostras.

**Descritores:** *Polifenol oxidase*; Extratos vegetais, *Solanum melongena*

## Abstract

**Objective** – Biological material was analyzed as the crude extracts of the pulp and peel of eggplant (*Solanum melongena* L.), which is the source of the enzyme *Polyphenol oxidase* (PPO) [EC.1.14.18.1] and these have been studied as materials for the biocatalytic aerobic oxidation of phenolic substrates<sup>19</sup>. **Methods** – Drew to PPO extracts by grinding, filtering and centrifuging. By measuring the absorbance and the Biuret method, we obtained activity and total protein. Amount and contact time of the polymer were determined spectrophotometrically. The kinetic characterization of PPO was based on the study of the optimum temperature, heat stability, pH optimum of activity and stability. The values obtained were compared with those of banana pulp nanica. **Results** – Results showed that the specific activity of PPO in the banana nanica (1056 u/mg of pulp and 1537.5 u/mg of peel) is higher than in the extract of eggplant (376.5 u/mg of pulp and 500 u/mg of peel). The pH values of activity (pH 5.0) and stability (pH 7.0), time of contact with the polymer (zero) and storage (34 days) were similar for both extracts. The activity of PPO was higher in peel compared to the eggplant pulp. The mass of polymer PVP required for adsorption of polyphenolics compounds was three times higher in the pulp than in peel. The optimum temperature for activity of the pulp was 40°C and the peel of 15°C. **Conclusions** – The characterization of PPO eggplant is similar to the banana, however, the highest specific activity that makes it more conducive to the construction of biosensor to quantify phenols / polyphenols in the samples.

**Descriptors:** *Polyphenol oxidase*; Plant extracts, *Solanum melongena*

## Introdução

O Brasil possui uma grande variedade de vegetais que podem constituir em uma fonte inesgotável de enzimas para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento. Em química analítica, por exemplo, elas podem ser usadas na construção de biossensores e/ou outros procedimentos enzimáticos para a detecção de compostos dos mais variados tipos<sup>1-2</sup>. Há uma tendência mundial de se usar extratos brutos e/ou tecidos de vegetais no lugar de enzimas purificadas em procedimentos bioanalíticos. O uso de extratos brutos pode apresentar em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico. Por outro lado é extremamente econômico, simples e geralmente possui um tempo de vida superior a aqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, já que estas enzimas naturalmente imobilizadas proporcionam maior estabilidade devido a interação com os componentes naturalmente presentes no vegetal<sup>3</sup>.

Muitos fatores afetam a cinética da reação catalisada por enzimas: concentração do substrato, concentração da enzima, ativas, inibidores, temperatura, pH e força iônica.

Em 1895, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina. Em 1896, foi atribuído o nome de *tirosinase* à enzima presente no cogumelo. Atualmente, a enzima é denominada *Polifenol oxidase*, designação mais precisa do substrato sensível à sua ação<sup>4-5</sup>.

Enzimas como a *Polifenol oxidase* (PFO) [EC 1.14.18.1] têm sido imobilizadas por diferentes métodos, segundo Rehnitz<sup>6</sup> (1986) e Wang e Lin<sup>7</sup> (1988), para a análise destes compostos fenólicos. O desempenho analítico destes biossensores depende do método de imobilização utilizado<sup>8</sup> e do material biológico empregado (enzimas, tecidos, etc.). Essa proteína contém cobre como grupo prostético e a diferença da maioria das enzimas é que, pode catalisar dois tipos de reações diferentes<sup>9</sup>. Como se observa na Figura 1, estas reações incluem a hidroxilação de monofenóis para produzir o-difenóis (1) e a remoção de hidrogênios dos o-difenóis para produzir quinonas (2). As quinonas formadas nessa reação polimerizam-se, formando melaninas (3)<sup>10</sup>.

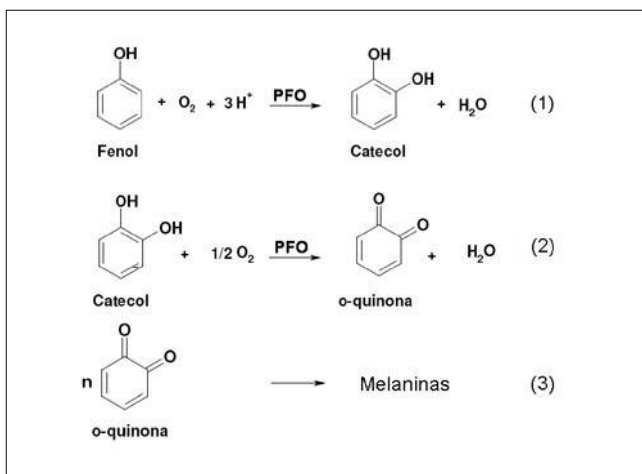


Figura 1. Reações de oxidação de compostos fenólicos pela PFO, (1) atividade cresolase, (2) atividade catecolase<sup>11</sup>

Essa enzima PFO é de grande importância na determinação da qualidade de frutas e hortaliças já que suas reações podem produzir mudanças de cor, sabor e valor nutritivo em produtos vegetais frescos, enlatados e congelados<sup>12</sup>.

A berinjela, botanicamente classificada como *Solanum melongena* L., pertence à família *Solanaceae*, assim como o tomate, pimenta, pimentão, batata e jiló<sup>13</sup>. Originária de clima tropical e subtropical, a berinjela desenvolve-se preferencialmente em regiões de clima quente (temperatura média diurna de 25-35°C e noturna de 20-27°C) e com umidade relativa do ar de 80%.

Os frutos podem ter casca de cor vinho-escuro, quase preta, branca ou rajada. Frutos colhidos muito novos murcham rapidamente e quando colhidos após o ponto ideal ficam sem brilho e com sabor amargo, devido ao desenvolvimento natural das sementes<sup>14</sup>. No Brasil, o tipo mais comum é a berinjela de formato oblongo, de coloração roxo-escuro, brilhante e pedúnculo verde<sup>13</sup>. O período de safra para a compra do fruto vai de setembro a janeiro.

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância<sup>15</sup>. O conteúdo de polifenóis em alimentos pode variar conforme fatores, como: região geográfica de plantio, variação à exposição solar, método de cultivo e fertilização aplicados, cultivar analisado, dentre outros<sup>16</sup>. As ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis já foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante<sup>17</sup>.

Polifenóis são encontrados em organismos vegetais superiores (raízes, folhas, caules, frutos). Podem ser flavonóides ou não-flavonóides, sendo os flavonóides a maior família.

Taninos podem ser usados no meio farmacêutico como adstringente do tubo digestivo (contraem os tecidos), como hemostáticos (impedem o sangramento devido à precipitação de proteínas) e para tratamento de escoriações cutâneas e queimaduras (formam um revestimento protetor, também devido à precipitação de proteínas)<sup>18</sup>.

O presente trabalho relata o estudo de caracterização enzimática da PFO presente no extrato bruto da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.) e compara com os dados do extrato bruto da polpa e da casca de banana nanica<sup>19</sup> com o objetivo de analisar qual a melhor fonte para posterior construção de um biossensor capaz de quantificar fenóis/polifenóis em diversas amostras nas áreas das análises clínicas e biotecnológicas.

## Métodos

### Equipamentos

As soluções tampão (fosfato 0,100 mol/L, acetato 0,100 mol/L e citrato 0,100 mol/L) foram preparadas utilizando-se um pHmetro da Analyser modelo 300, para o ajuste e/ou confirmação dos pH de-

sejados. Para a obtenção dos extratos brutos enzimáticos foram utilizados um liquidificador e uma centrífuga da Du Pont Instruments Sorvael, modelo RC-5B Plus, provida de um rotor com diâmetro igual a 23 cm, modelo SS 34.

Além disso, foi utilizado um espectrofotômetro da Analyser Orion modelo VIS 7220, nas medidas de absorvância para a determinação da atividade enzimática.

### Reagentes e soluções

Reagentes de grau analítico foram usados para preparar solução tampão fosfato, solução tampão acetato, solução tampão citrato e solução padrão de catecol (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA).

A polivinilpirrolidona (PVP) empregada no procedimento de extração, comercialmente conhecida como Polyclar<sup>®</sup> SB-100 (indústria ISP do Brasil Ltda), foi utilizada para remoção de compostos fenólicos naturais dos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela. Esse polímero age como estabilizador em sucos, vinhos e cerveja, além de ser de fácil remoção. O bom desempenho deste agente protetor é atribuído à sua baixa solubilidade e à formação de ligação de hidrogênio entre os substratos naturais e o polímero PVP<sup>20</sup>. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada.

A solução de albumina de soro bovino (1%) m/V (Sigma Chemical Co) foi preparada em solução tampão fosfato 0,100 mol/L, (pH 6,5) e utilizada como padrão em análise de proteína total (Gráfico 1).

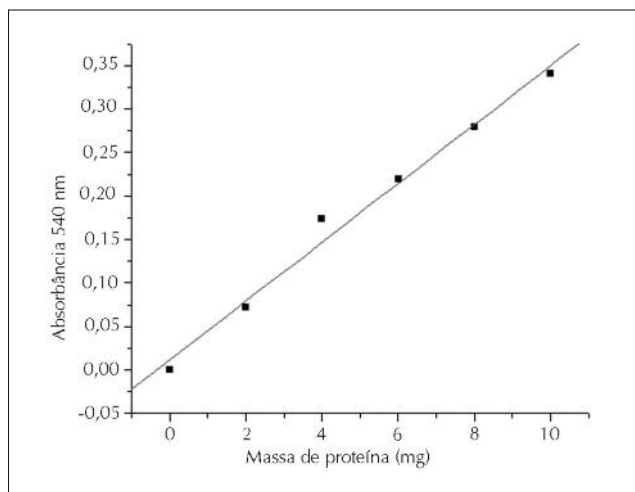


Gráfico 1. Curva de calibração para determinação de proteína total utilizando albumina de soro bovino como padrão

### Procedimento analítico

#### Material biológico

A berinjela foi adquirida de um mesmo produtor da região. As berinjelas escolhidas apresentaram as seguintes características: brilho na casca, consistência firme, coloração uniformemente vinho-escuro, casca lisa e sem manchas ou áreas amassadas. A escolha dos frutos foi entre 180 g e 250 g, com 17 a 20 cm de comprimento.

#### Extração da enzima Polifenol oxidase (PFO) da polpa e da casca de berinjela

Cinquenta gramas da polpa e da casca da fruta, descascados e picados em pequenos pedaços, foram homogeneizados separadamente em liquidificador com 100 mL de solução tampão fosfato 0,100 mol/L, pH 6,5, contendo 5,0 g de polyclar SB-100 para a casca e 15,0 g do mesmo para a polpa.

Em seguida, o material foi filtrado em gaze e centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos a 5°C. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4°C e utilizada como fonte enzimática para medida de atividade e proteína total<sup>19</sup>.

### Determinação da atividade da PFO e proteína total nos extratos brutos da polpa e casca de berinjela

A atividade da PFO solúvel presente nesses materiais biológicos foi determinada pela medida de absorvância em  $\lambda$  igual a 410 nm, da melanina resultante da polimerização da quinona, formada após reação entre 0,2 mL da solução sobrenadante (enzima) e 2,8 mL de solução de 0,05 mol/L de catecol (substrato) em solução tampão fosfato 0,100 mol/L, pH 6,5 a 25°C<sup>1</sup>. A reação foi monitorada durante 2 minutos 21, tempo necessário para atingir Vmáx.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidade de absorvância por minuto nas condições mencionadas acima<sup>21</sup>.

$$a = \frac{\Delta A \times 60 \times 1000}{\Delta t \times d \times V \text{ (amostra)}}$$

Onde: **a** = atividade (U/mL); **ΔA** = variação de absorvância; **Δt** = variação do tempo (min.); **d** = diâmetro da cubeta; **V (amostra)** = volume da amostra (mL).

A proteína total das soluções sobrenadantes dos extratos brutos foi determinada pelo método do Biureto<sup>22</sup>, empregando-se albumina de soro bovino como padrão.

O procedimento experimental é simples e econômico; o sulfato de cobre dissolvido em solução alcalina é adicionado à proteína. Esta reação é caracterizada pela formação de íon complexo, no qual cada átomo de cobre está ligado a quatro nitrogênios peptídicos. Estes complexos de coordenação produzem uma cor azul que é medida espectrofotometricamente em 540 nm.

### Influência da quantidade do polímero Polyclar (Polivinilpirrolidona ou PVP) na atividade da enzima PFO presente nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela

Foram feitas três amostras do extrato bruto da polpa e da casca de berinjela variando-se a quantidade de polyclar PVP a ser adicionada (5,0 g, 10,0 g e 15,0 g) em 50,0 g da casca, juntamente com 100 mL de solução tampão fosfato 0,100 mol/L pH 6,5. Em seguida, os materiais foram filtrados em gaze e centrifugados por 20 minutos a 50C a 14.000 rpm. As soluções sobrenadantes (fontes enzimáticas) foram armazenadas a 40C, para as determinações espectrofotométricas<sup>19</sup>.

### Influência do tempo de contato dos extratos brutos estudados com o polímero PVP, na atividade da enzima PFO presente nesses extratos

Usando a melhor quantidade do polímero PVP obtida, para cada material biológico, foram preparadas três amostras para cada extrato, com tempos variando-se de 0, 15 e 30 minutos de contato do polímero com cada extrato estudado. Depois de realizado esse procedimento, o material foi filtrado, centrifugado e armazenado para as determinações.

### Determinação do pH de estabilidade da enzima PFO nos extratos brutos estudados

A estabilidade da enzima foi determinada incubando-se 0,5 mL da enzima em 2,0 mL de solução tampão acetato 0,100 mol/L (pH 4,0 a 5,5) e solução tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 6,0 a 7,5), durante 24 horas. A seguir, a atividade foi determinada para cada faixa de pH (pH 4,0 a 7,5).

### Determinação do pH de atividade da enzima PFO nos extratos brutos estudados

O pH de atividade da enzima foi determinado usando-se 0,2 mL da solução da enzima e 2,8 mL de catecol 0,05 mol/L em solução tampão citrato 0,100 mol/L, com pH de 4,0 a 7,0. Após este procedimento, a atividade será determinada para cada faixa de pH.

### Estudo da estabilidade ao calor da enzima nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela

O estudo da estabilidade da enzima PFO frente ao calor relaciona o acondicionamento dos extratos brutos da polpa e da casca durante o período de 26 horas com a temperatura mantida a 4°C e em 25°C. Em seguida, a atividade foi determinada para ambos os extratos.

### Determinação da temperatura ótima da enzima nos extratos brutos estudados

A temperatura de melhor atividade da enzima foi determinada, usando-se 0,2 mL da solução de enzima e 2,8 mL de catecol 0,05 mol/L em solução tampão fosfato 0,1 mol/L com pH 6,5. Os extratos brutos da polpa e da casca de berinjela foram submetidos à variação de temperatura de 4°C a 95°C. Em seguida, a atividade foi determinada para cada temperatura.

### Determinação do tempo de armazenamento dos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela usando catecol como substrato

A atividade da PFO solúvel, presente nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela foi determinada usando as melhores condições experimentais em relação ao PVP; por um período de 55 dias para estudar a estabilidade dessa enzima sob a temperatura de 15°C negativos, a fim de manter as atividades de decomposição e de degradação baixas.

## Resultados

### Determinação da atividade da PFO e proteína total nos extratos brutos estudados

A partir da Tabela 1, pode-se fazer a comparação dos valores obtidos para atividade, proteína total e atividade específica dos

**Tabela 1. Atividade total, proteína total e atividade específica da PFO encontrada nos extratos brutos da polpa e casca de berinjela e de banana nanica<sup>19</sup>**

Material	Atividade (u/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade específica (u/mg de proteína)
Extrato bruto da polpa de berinjela	16000	42,5	376,5
Extrato bruto da casca de berinjela	20000	40,0	500,0
Extrato bruto da casca de banana nanica	30750	20,0	1537,5
Extrato bruto da polpa de banana nanica	13200	12,5	1056
Enzima pura ♣ (cogumelo)	—	—	2400
Enzima purificada ♥ (cogumelo)	1075	23,0	47

♣ Sigma; ♥ [Macholán e Schánel<sup>23</sup>, 1977]

extratos brutos da polpa e casca da berinjela e da banana nanica.

Determinação da quantidade ideal de PVP e tempo de contato deste para melhor atividade da enzima *PFO* presente nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela

A Tabela 2 mostra as quantidades ideais de PVP, em 50 g da polpa e casca de berinjela, para se obter a melhor atividade da *PFO* (30000 u/mL), enquanto pela Tabela 3, observa-se que esta é atingida no tempo zero de contato do polímero com os extratos, tanto para a polpa quanto para a casca.

**Tabela 2. Influência da quantidade ideal de PVP na atividade enzimática dos extratos brutos da polpa e casca de berinjela**

Massa (g) de Polyclar SB-100	Atividade (u/mL)	
	Polpa	Casca
<b>5,0*</b>	20000	<b>30000</b>
10,0	15000	10000
<b>15,0*</b>	<b>30000</b>	15000

(\*) melhor quantidade de polímero SB-100

**Tabela 3. Atividade da *PFO* dos extratos brutos da polpa e casca de berinjela estudada em função do tempo de contato com PVP (SB-100)**

Tempo de contato com o polímero SB-100 (min.)	Atividade (u/mL)	
	Polpa	Casca
<b>0*</b>	<b>30000</b>	<b>30000</b>
15	15000	12000
30	11500	8625

(\*) melhor tempo de contato com o polímero SB-100

#### Determinação do pH ótimo de estabilidade e de atividade da *PFO* nos extratos brutos estudados

Os resultados dos estudos de determinação do pH ótimo de estabilidade (7,0 para a *PFO* da polpa e da casca de berinjela) e o pH de atividade enzimática (5,0 para ambos os extratos) nos extratos são sintetizados nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4. pH ótimo de estabilidade da *PFO* nos extratos brutos da polpa e casca de berinjela**

Solução tampão utilizado	pH	Atividade (u/mL)	
		Polpa	Casca
Acetato	4,0	900	1500
Acetato	4,5	825	3375
Acetato	5,0	1500	2250
Acetato	5,5	1250	4000
Fosfato	6,0	1350	4250
Fosfato	6,35	1500	6000
Fosfato	<b>7,0*</b>	<b>2250</b>	<b>7500</b>
Fosfato	7,5	1425	4500

(\*) melhor pH de estabilidade do extrato da polpa e da casca de berinjela

**Tabela 5. pH de atividade para a *PFO* presente nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela**

pH	Atividade (u/mL)	
	Polpa	Casca
4,0	1050	5100
4,5	3000	5250
<b>5,0*</b>	<b>3750</b>	<b>6000</b>
5,5	3000	5250
6,0	1800	3000
6,35	1750	4000
7,0	1050	3000

(\*) melhor pH de atividade do extrato da polpa e da casca de berinjela

#### Estudo da estabilidade ao calor da enzima nos extratos brutos da polpa e casca de berinjela

A Tabela 6 expõe os resultados obtidos no estudo de determinação da atividade da enzima *PFO*, presente nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela, em condições diferentes de temperatura (4°C e 25°C) e tempo (zero a 26 horas).

**Tabela 6. Estabilidade da *PFO* da polpa e da casca de berinjela em relação ao tempo e a temperatura**

Fração (°C)	Tempo (h)	Atividade (u/mL)	
		Polpa	Casca
4	0	4500	20000
4	1,5	5500	14250
4	3	3000	14500
4	26	3750	13500
25	0	8500	31000
25	1,5	3000	13300
25	3	3750	12000
25	26	4500	11250

#### Determinação da temperatura ótima da enzima nos extratos brutos de berinjela

As temperaturas ideais de trabalho com os extratos da polpa (15°C) e da casca (40°C) de berinjela são aquelas em que a enzima *PFO* apresenta maior atividade e estão relacionadas na Tabela 7.

**Tabela 7. Temperatura ótima da enzima *PFO* nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela**

T (°C) da fração enzimática	Atividade (u/mL)	
	Polpa	Casca
4	2550	19500
10	2250	15000
<b>15*</b>	3750	<b>30500</b>
25	4500	13000
30	3500	14250
35	4000	10750
<b>40*</b>	<b>5750</b>	7000
50	4000	15750
60	3500	12500
70	3000	15375
80	3000	15000
95	2175	6000

(\*) temperatura ideal da *PFO* presente no extrato da polpa e da casca de berinjela

A atividade da *PFO* solúvel, sob as melhores condições experimentais e mantida congelada a 15°C negativos, se apresentou útil para a sua utilização na imobilização do extrato na membrana do biossensor. Após a preparação de ambos os extratos, o período ótimo foi de 34 dias, onde houve um acréscimo aproximado de 50% da atividade inicial da polpa (Gráfico 2) e um acréscimo menor de aproximadamente 15% para a casca (Gráfico 3), lembrando que esta apresenta um valor de atividade bem superior à polpa. Além disso, os resultados revelam que a enzima presente no extrato bruto da casca apresenta um comportamento mais estável, enquanto que o extrato bruto da polpa tende ao decréscimo gradual da atividade.



**Gráfico 2. Atividade enzimática em relação ao tempo de armazenamento do extrato da polpa de berinjela**

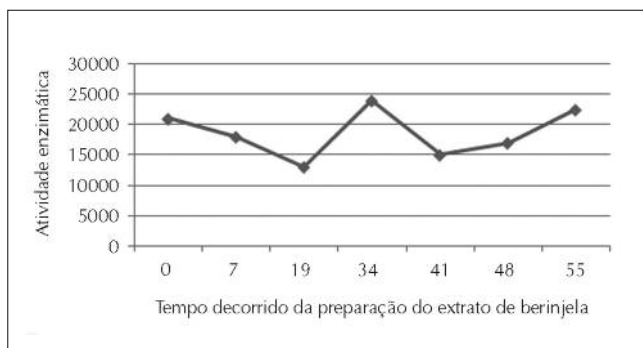


Gráfico 3. Atividade enzimática em relação ao tempo de armazenamento do extrato da casca de berinjela

## Discussão e Conclusões

O extrato bruto da casca de berinjela apresentou melhor atividade específica que o da polpa, entretanto, o extrato bruto da casca de banana nanica mostrou ser melhor fonte enzimática de *PFO* que o de berinjela. Ainda comparando as duas fontes biológicas, tendo a Tabela 1 como base, pode-se observar que tanto na berinjela como na banana nanica, a casca apresentou melhor atividade enzimática que a polpa, evidenciando sua utilização para fins analíticos e também na área nutricional. A atividade enzimática específica de cada extrato está relacionada às dosagens de proteína total. Para as dosagens, é necessária a construção de uma curva de calibração utilizando a proteína albumina de soro bovino como padrão, esta pode ser observada pelo Gráfico 1.

Observa-se, através da Tabela 2, a necessidade da adição de uma maior quantidade de polímero para a polpa do que para a casca de berinjela o que pode ser explicado pela quantidade superior de polifenóis excedentes naturalmente presentes na polpa do fruto.

Relacionando os extratos de berinjela aos da banana nanica<sup>19</sup> observou-se a utilização da mesma quantidade do polímero PVP na casca dos dois frutos. Isso pode ser explicado devido à equivalência de polifenóis naturais excedentes nos extratos das cascas de berinjela e de banana nanica.

O estudo revela que para otimizar a atividade da *PFO* de extrato bruto da casca de berinjela, é necessário que parte dos polifenóis presentes naturalmente no vegetal sejam adsorvidos. Caso contrário, o excesso de polifenóis presentes pode favorecer a rápida oxidação e a baixa atividade da enzima nesse extrato.

Pelo estudo da variação do tempo de contato do PVP com a *PFO* nos extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (Tabela 3), observou-se que a melhor atividade para os dois extratos estudados foi obtida com o menor tempo de interação polímero-extrato, ou seja, somente com o tempo usado na turbólise foi possível obter rendimento máximo da enzima.

O pH ótimo de estabilidade apresentou melhor atividade para a *PFO* no pH 7,0 para ambos extratos brutos de berinjela, dessa forma, a enzima presente na casca e na polpa tem maior estabilidade no pH neutro, e a não interferência de íons hidroxila ou hidrônio, favorece um melhor desempenho enzimático da polpa (Tabela 4).

No pH 5,0 ambos os extratos apresentaram melhor desempenho catalizante da enzima sobre as reações de oxidação dos compostos fenólicos (Tabela 5).

Nos dois extratos de berinjela a temperatura de acondicionamento apresentou relação com o resultado da atividade enzimática (u/mL), como mostra a Tabela 6. Para o extrato da polpa, a atividade da *PFO* mantida a 25°C foi excelente quando se obtinha a atividade logo após a preparação do extrato (tempo zero). Verificando somente a faixa mantida a 4°C, o melhor desempenho é visualizado após uma hora e meia de acondicionamento, todavia, não atinge o mesmo nível de atividade obtida com a temperatura consolidada em 25°C.

A temperatura ótima da *PFO* no extrato bruto da polpa de be-

rinjela foi de 40°C, temperatura em que a ação catalisadora funciona melhor. Para a casca, a melhor atividade é de 15°C, apresentando cerca de duas vezes maior do que nas outras temperaturas. Um fato interessante a ser mencionado é que a 40°C, temperatura na qual a enzima da polpa reagiu melhor, para a casca a atividade nesta temperatura não foi satisfatória (Tabela 7).

Para a determinação da temperatura ótima da enzima, uma característica observada foi que nos dois extratos das temperaturas mais baixas (4°C e 10°C) a interação com o catecol manteve a solução dentro da cubeta oxidada, mas translúcida, enquanto que, em temperaturas maiores houve turvação.

O armazenamento da enzima dos dois extratos a baixas temperaturas colabora para a baixa atividade de degradação dos extratos brutos da polpa e da casca. Os Gráficos 2 e 3 mostram que a *PFO*, tanto da polpa quanto da casca de berinjela, manteve sua atividade crescente até o 34º dia (tempo da máxima atividade), depois da preparação do extrato (tempo zero). Após este período a atividade decresce.

Os testes demonstraram uma quantidade protéica maior para o extrato de berinjela (casca e polpa do fruto), em comparação ao extrato de banana nanica<sup>19</sup>. Esse dado revela que em valores nutricionais, a preparação de farinha a partir de berinjela é melhor que a de banana, pois disponibiliza mais proteína para o organismo. Isto pode ser aplicado, por exemplo, nas merendas de escolas e nas refeições oferecidas nos albergues que são lugares mantidos pelo Estado, sendo que o baixo custo favorece sua implantação. Com base neste estudo, pode-se afirmar que a construção de um biossensor amperométrico para fenóis usando essa enzima, é mais eficaz com a imobilização da *PFO* presente nos extratos envolvendo a casca das duas frutas analisadas. Esse biossensor será útil para analisar fenóis em amostras alimentícias, drogas, águas residuais etc.

Em relação à temperatura, a *PFO* presente na polpa é mais estável do que a *PFO* presente na casca de berinjela. A temperatura ótima de atividade foi maior para a casca (40°C) do que para a polpa (15°C), e um fato a ser observado é a menor exposição da polpa às temperaturas mais quentes e ao ar do ambiente.

Os dados obtidos para a caracterização da *PFO* da polpa e casca de berinjela, comparados com os de banana nanica, não apresentaram variações significantes, portanto os dois extratos podem ser utilizados para a construção do biossensor enzimático<sup>19</sup>.

## Agradecimentos

À Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Paulista pelo auxílio financeiro no projeto.

## Referências

1. Fatibello-Filho O, Signori CA. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). Quím Nova. 1994;17(1):38-42.
2. Lima AWO, Nascimento VB, Pedrotti JJ, Angnes L. Biosensor of immobilized phenolases. Anal Chim Acta. 1997;354:325-9.
3. Perone CAS. Determinação amperométrica e espectrofotométrica de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 1996.
4. Chlamtac EB. Enzimas no mate: polifenoloxidase. Bol Inst Quím Agríc. 1955;39:7-12.
5. Fatibello-Filho O, Vieira IC. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. Quím Nova. 2002;25(3):455-64.
6. Rechnitz GA. Polyphenol oxidase: food browning. Anal Chim Acta. 1986;180:281-9.
7. Wang J, Lin MS. Miniature tissue based voltammetric bioelectrodes. Anal Chem. 1988;60:1545-51.
8. Macholán L, Lond\_n P, Fischer J. Phenols: biosensors. Collect Czech Chem Commun. 1990;46:2871-80.
9. Whitaker JR. Principles of enzymology for the food science. New York: Marcell Dekker; 1972.
10. Saly RC, Felix JS, Swartz HM. Free radicals in biology. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press; 1980. v. IV, p. 209-59.

11. Primo MS. Efeito do processamento com CO<sub>2</sub> comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). [dissertação de mestrado]. Erechim, RS: Universidade Regional Integrada; 2006. p.9-16.
12. Mathew AG, Parpia HA. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv Food Res.* 1971;19:75-145.
13. Ribeiro CSC. Embrapa. Berinjela (*Solanum melongena* L.). 2007 [acesso 15 jan 2009]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fon-tesHTML/Beringela/Beringela\\_Solanum\\_melongena\\_L/index.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fon-tesHTML/Beringela/Beringela_Solanum_melongena_L/index.html)
14. Lana MM, Santos FF, Luengo LFA, Tavares SA, Melo MF, Matos MJLF. Berinjela [acesso 15 jan 2009]. Disponível em: <http://www2.correioweb.com.br/hot-sites/alimentos/berinjela/alimentos.htm>
15. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):317-25.
16. Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2009;43(2):211-8.
17. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):215-7.
18. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e farmacobiocologia.* São Paulo: Premier; 1997.
19. Perone CAS, Bonfim E, Araújo FH, Gomes GC, Migliorança LH. Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). *Rev Inst Ciênc Saúde.* 2000;18(2):87-94.
20. Fatibello-Filho O, Vieira IC, Lupetti KO. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de aborbrinha (*Cucurbita pepo*). *Quím Nova.* 2003;26(1):39-43.
21. Bergmeyer HU, Bernt E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Verlag Chemie; 1974. p.1205-15.
22. Gornael AG, Bardwill K, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949;177:751-66.
23. Macholán L, Shánel L. Enzyme electrode with immobilized polyphenol oxidase for determination of phenolic substrate. *Collect Czech Chem Commun.* 1977;42:3667-75.

**Endereço para correspondência:**

Daniel Ninello Polesel  
Rua Independência, 2944 apto.11  
São José do Rio Preto-SP, CEP 15010-110  
Brasil

E-mail: [danielpolesel@yahoo.com.br](mailto:danielpolesel@yahoo.com.br)

Recebido em 3 de fevereiro de 2010  
Aceito em 16 de abril de 2010