

Caracterização cinética da enzima *polifenol oxidase*, usando extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*)

Kinetic characterization of enzyme polyphenol oxidase, utilizing crude of extract of pell of stunded banana (Musa acuminata)

Cássia Aparecida Signori Perone*
Marcela Petrolini Capobianco**
Sergio Paparelli Junior**

Resumo

Introdução – Extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*); melhor fonte de enzima *polifenol oxidase* (*PFO*) [EC.1.14.18.1] foi estudado como material biocatalítico para a oxidação aeróbica de substratos fenólicos¹³. **Material e Métodos** – Foi estudada a extração da *PFO* dessa fonte. A atividade da enzima *PFO* e proteína total foram determinadas nesse extrato. O estudo da quantidade e do tempo de contato do polímero SB-100 com esse extrato foi realizado. A caracterização cinética da *PFO* foi determinada com temperatura ótima, estabilidade ao calor, pH ótimo de atividade e de estabilidade. Os valores obtidos foram comparados com a *PFO* da polpa de banana nanica. **Resultados** – Os resultados mostraram que a quantidade de polímero SB-100 foi maior usando o extrato da casca de banana nanica do que para a polpa, mas o tempo de contato não houve alteração. O pH de atividade (pH 6,0), de estabilidade (pH 6,5) e a temperatura ótima (30°C), não apresentaram variações comparando os dois extratos utilizados. **Conclusões** – Verificou-se, portanto que o uso do extrato bruto da casca de banana nanica apresentou maior atividade enzimática de *PFO* do que para a polpa da fruta; enquanto a caracterização cinética praticamente não variou nos dois extratos. O que se pode concluir é que, para a construção do biossensor a casca da banana é melhor que a polpa por apresentar maior atividade da enzima. A seguir, um biossensor será construído, para detecção de fenólicos e os resultados serão comparados com os da polpa.

Palavras-chave: *Polifenol oxidase*/isolamento & purificação; Cinética; Estabilidade enzimática; *Musa*; *Musa*/química

Abstract

Introduction – Crude extract of the pell of stunded banana (*Musa acuminata*); the best source enzyme polyphenol oxidase (PPO) [EC.1.14.18.1] was studied as material biocatalitic for the aerobic phenolic substratum oxidation. **Material and Methods** – The extraction of the PPO of this source was studied. The activity of enzyme PPO and total protein had been determined in this extract. The study of the amount and the contact time of polymer SB-100 with this extract was done. The kinetic characterization of the PPO was determined with great temperature, stability to the heat, great pH of activity and stability. The gotten values had been compared with the PPO of the pulp of stunded banana. **Results** – The results had shown that the amount of polymer SB-100 was bigger used in the extract of the pell of stunded banana than the pulp, but the contact time did not have any alteration. The pH of activity (pH 6,0), of stability (pH 6,5) and the great temperature (30°C), had not presented variations comparing the two used extracts. **Conclusions** – It was verified, therefore that the use of the crude extract of the pell of stunded banana presented greater enzymatic activity of PPO than in the pulp of fruit; while the kinetic characterization practically did not vary in two extracts. We can conclude that for the construction of the biosensor the pell of the banana is better than the pulp for presenting greater activity of the enzyme. Next, a biosensor will be constructed, for detection of phenolics and the results will be compared with ones the pulp.

Key words: Polyphenol oxidase/isolation & purification; Kinetics; Enzyme stability; *Musa*; *Musa*/chemistry

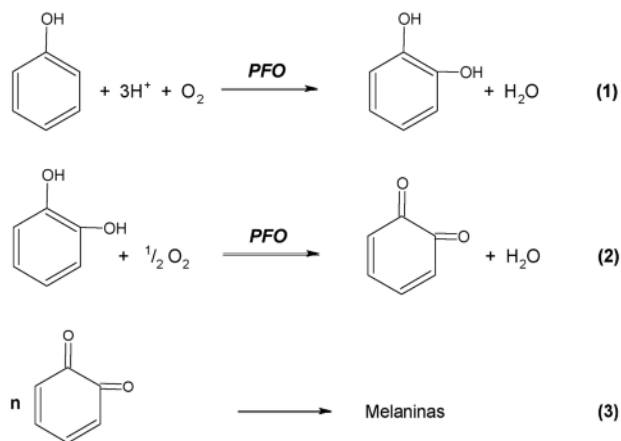
* Professora Titular da Disciplina de Química Analítica do Curso de Farmácia e Bioquímica do campus JK da Universidade Paulista, São José do Rio Preto (UNIP – SJRP). E-mail: casperone@terra.com.br

** Acadêmicos do 5º ano do Curso de Farmácia e Bioquímica do Campus JK (UNIP – SJRP).

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 tipos²⁶. 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, mas por outro lado é extremamente econômico, simples e geralmente possuem um tempo de vida superior a aqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que estas enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos (seu habitat natural) são mais estáveis⁹. Além dessas vantagens, esses procedimentos geralmente não necessitam de cofatores, pois os extratos brutos empregados normalmente já possuem cofatores naturais para a reação enzimática do analito de interesse.

A enzima *polifenol oxidase* (PFO) [EC 1.10.3.1] do extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*), melhor fonte de PFO¹³, foi utilizada no presente trabalho para a caracterização cinética dessa enzima. Essa proteína contém cobre como grupo prostético e a diferença da maioria das enzimas é que, pode catalisar dois tipos de reações diferentes²⁰. 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)¹⁵.



Essa enzima PFO é de grande importância na determinação da qualidade de frutas e hortaliças já que através de suas reações podem produzir mudanças de cor, sabor e valor nutritivo em produtos vegetais frescos, enlatados e congelados⁸.

Este processo indesejável é devido à oxidação de compostos fenólicos, em reação catalisada pela enzima PFO ("enzymatic browning" – reações 1, 2 e 3).

Outros nomes dados a esta enzima são: *fenolase*, *fenol oxidase*, *tirosinase*, *catecolase*, *catecol oxidase* etc.)

Tem-se realizado uma grande quantidade de trabalhos sobre a *polifenol oxidase* principalmente em frutos, em comparação com trabalhos realizados em hortaliças e raízes. Tem sido estudada em frutos tais como: abacate^{4,5}; pera^{14,21}, manga¹⁹ e polpa de banana nanica^{10-11,13}. Também em espinafre¹⁶; batata¹⁸ e inhame².

A enzima *polifenol oxidase* é uma oxido-redutase de grande importância nos vegetais e frutas, não só pela aparência escura de produtos agrícolas descascados e do desenvolvimento de cor em alguns grãos como café, mas também por sua participação em outros processos tais como a síntese de lignina, a oxidação do ácido indol acético e seu papel em aspectos patológicos relacionado com resistência a doenças.

Fenolases também têm sido investigadas no aumento da resistência de plantas para vários microrganismos; concluíram que quinonas produzidas pela intensa oxidação de fenolases em tecidos de plantas são tóxicos para alguns microrganismos patogênicos.

Evidências têm sido apresentadas às quais indicam que plantas contêm várias fenolases diferentes. A presença de dois ou mais tipos de enzimas separadas por técnicas físicas tem sido mostrada no caso de fenolases do cogumelo¹⁷.

Um dos principais problemas encontrados de muitos produtos agrícolas (que contêm fenolases), depois de descascados ou durante o processamento industrial é a formação ou o desenvolvimento de um escurecimento dos tecidos, o qual lhes confere um aspecto indesejável para o consumidor.

Material e Métodos

Equipamentos

A solução tampão fosfato 0,1 mol/L com pH 6,0 – 8,0; a solução tampão acetato 0,1 mol/L com pH 3,0 – 5,5 e a solução tampão citrato 0,1 mol/L com pH 3,0 – 8,5 foram preparadas utilizando-se um pH-metro da Analyser modelo 300, para o estudo do pH ótimo de estabilidade e de atividade do extrato bruto enzimático. Para a obtenção do extrato bruto da casca de banana nanica foram utilizados um triturador (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.

Um espectrofotômetro da Analyser Orion modelo VIS 7220 foi utilizado nas medidas de absorvância, para a determinação da atividade enzimática, proteína total, determinação do pH ótimo de estabilidade, pH de atividade, temperatura ótima e estabilidade ao calor no extrato bruto da casca de banana nanica.

Reagentes e soluções

Policlar SB-100 (Indústria ISP do Brasil Ltda) foi utilizado para remoção de compostos fenólicos naturais do extrato bruto da casca de banana nanica, através de ligações de ponte de hidrogênio. Age como estabilizador em sucos, vinhos e cerveja, insolúvel em água, apresentando fácil remoção.

Reagentes de grau analítico foram usados para prepa-

rar tampão, soluções padrão de fenóis como catecol (Sigma Chemical Co-St. Louis, Mo, USA), foi preparada diariamente em solução tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5.

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

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada.

Procedimento analítico

Material biológico

A banana nanica foi adquirida em supermercados da região.

Obtenção do extrato bruto

Cinquenta gramas da casca da fruta, descascados e picados em pequenos pedaços, foram homogeneizados em liquidificador com 100 ml de solução tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5, contendo 15,0 g de policlar SB-100 e tempo de contato de 30 minutos¹³. O polímero foi usado para remoção de compostos fenólicos naturais presentes nesse extrato, durante o processo. A seguir, o material foi filtrado em gaze e centrifugado a 14000 r.p.m (rotações por minuto) 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, proteína total, pH de atividade de estabilidade, temperatura ótima e estabilidade ao calor¹³.

Determinação da atividade da polifenol oxidase e proteína total

A atividade da *polifenol oxidase* solúvel presente na casca de banana nanica foi determinada pela medida de absorvância em $\lambda = 410$ nm, da melanina resultante da quinona formada após reação entre 0,2 ml da solução sobrenadante e 2,8 ml de solução 0,05 mol/L de catecol em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5 a 25°C². A reação foi monitorada durante 2 minutos¹ tempo necessário para atingir $V_{máx}$.

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

$$a = \frac{\Delta A \times 60 \times 1000}{\Delta t \times d \times V_{amostra}}$$

onde: a = atividade (u/ml)

ΔA = variação de absorvância

Δt = variação de tempo (min.)

d = diâmetro da cubeta

$V_{amostra}$ = volume da amostra (ml)

A proteína total das soluções sobrenadantes foi determinada pelo método do biureto³. O procedimento expe-

rimental é simples e econômico; o sulfato de cobre dissolvido em solução alcalina é adicionado à proteína. Esta reação é caracterizada pela formação de ion 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 a 540 nm. A curva padrão foi construída empregando-se albumina de soro bovino.

Influência da quantidade do polímero SB-100 na atividade da enzima PFO no extrato bruto da casca de banana nanica

Foram feitas três amostras do extrato bruto da casca de banana nanica variando-se a quantidade de policlar SB-100 a ser adicionada (10,0; 15,0 e 20,0 g) em 50,0g da casca, juntamente com 100 ml de solução tampão fosfato 0,1 mol/L pH 6,5. Em seguida o material foi filtrado em gaze e centrifugado por 20 minutos a 5°C a 14.000 r.p.m. A solução sobrenadante (fonte enzimática) foi armazenada a 5°C, para as determinações.

Influência do tempo de contato do extrato bruto da casca de banana nanica estudado com o polímero SB-100, na atividade da enzima PFO presente nesse extrato

Usando a melhor quantidade do polímero SB-100 determinada para a casca da banana nanica, no item anterior foram feitas três amostras variando-se o tempo de contato de 0, 15 e 30 minutos para o extrato bruto utilizado.

Depois de realizado esse procedimento o material foi filtrado, centrifugado e armazenado para as determinações.

Determinação da estabilidade (tempo de armazenamento) do extrato bruto da casca de banana nanica usando catecol como substrato

A atividade da *polifenol oxidase* (PFO) solúvel presente no extrato bruto da casca de banana nanica foi determinada, usando as melhores condições experimentais, por um período de 50 dias para estudar a estabilidade dessa enzima.

Determinação do pH de estabilidade da enzima PFO no extrato bruto da casca de banana nanica

A estabilidade da enzima foi determinada incubando-se 0,5 ml da enzima em 2,0 ml de tampão acetato 0,1 mol/L com pH variando-se de 6,0 a 7,5 durante 24 horas. A seguir, a atividade foi determinada como descrito anteriormente para cada pH.

Determinação do pH de atividade da enzima PFO no extrato bruto da casca de banana nanica

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 tampão citrato-fosfato 0,1 mol/L com pH variando-se de 3,0 a 8,0.

Determinação da temperatura ótima da enzima PFO no extrato bruto da casca de banana nanica

O efeito da temperatura, ou seja, a temperatura ótima sobre a atividade da enzima PFO parcialmente purificada foi determinada incubando-se 0,5 ml dessa enzima com sulfato de amônio (40%) a diferentes temperaturas. A faixa de temperatura estudada foi de 4,0 a 100°C.

A seguir, foi determinada a atividade enzimática para cada valor de temperatura.

Determinação da estabilidade ao calor, sobre a atividade da enzima PFO do extrato bruto da casca de banana nanica

Foi determinada a variação da atividade enzimática da enzima PFO, por intervalos de tempo até 48 horas, e a duas temperaturas diferentes 4,0°C e 25°C. A seguir a atividade enzimática foi determinada a tempos e temperaturas diferentes.

Resultados e Discussão

Determinação da atividade da polifenol oxidase e proteína total em extrato bruto da casca de banana nanica

O extrato bruto da casca de banana nanica foi estudado como material biocatalítico para a oxidação de

substrato fenólico (catecol). A Tabela 1 mostra as atividades (unidades/ml), encontradas nesse extrato, a proteína total (mg/ml) e a atividade específica (unidades de PFO/mg de proteína total).

Determinação da quantidade do polímero SB-100 na atividade da enzima polifenol oxidase presente no extrato bruto da casca de banana nanica

A Tabela 2 apresenta o estudo da variação da quantidade de policlar SB-100 no extrato bruto da casca de banana nanica. Pode-se observar que a melhor performance foi com 15,0 g do polímero, usando 50,0 g do material biológico estudado para as três determinações.

Determinação do tempo de contato do polímero policlar SB-100 na atividade da enzima PFO presente no extrato bruto da casca de banana nanica

A Tabela 3 fornece o estudo do tempo de contato do polímero policlar SB-100 com extrato bruto da casca de banana nanica. Nesse estudo foi utilizado 50,0 g do material biológico estudado e a melhor quantidade desse polímero para esse extrato.

Pode-se observar através dessa tabela que o extrato bruto da casca de banana nanica apresentou melhor atividade com o tempo de 30 minutos [mesmo valor encontrado para a polpa da fruta¹³]. Esse polímero age dire-

Tabela 1. Atividade, proteína total e atividade específica da polifenol oxidase encontrada no extrato bruto da casca e da polpa de banana nanica

Material	Atividade (u/ml)	Proteína total (mg/ml)	Atividade específica (u/mg de proteína)
Extrato bruto da casca de banana nanica	30750	20,0	1535,5
Extrato bruto da polpa de banana nanica	13200	12,5	1056
Enzima pura ♣ (cogumelo)	—	—	2400
Enzima purificada ♥ (cogumelo)	1075	23,0	47

♣ Sigma; ♥ [Macholán Schánel⁷, 1977]

Tabela 2. Influência da quantidade de policlar SB-100 na atividade da enzima PFO, presente no extrato bruto da casca de banana nanica

Massa (g) de Policlar SB-100	Atividade (u/ml)
10,0	19725
*15,0	30750
20,0	19000

* melhor quantidade de polímero SB-100

Tabela 3. Influência do tempo de contato do polímero SB-100 na atividade da enzima PFO, presente no extrato bruto da casca de banana nanica

Tempo de contato do polímero SB-100 (minutos) com o extrato bruto da casca de banana nanica	Atividade (u/ml)
0	16050
15	24375
*30	30750

* melhor quantidade de polímero SB-100

Tabela 4. Determinação do pH de estabilidade para o PFO proveniente do extrato bruto da casca de banana nanica, usando solução tampão fosfato 0,1 mol/L a 25°C

Ph	Extrato bruto da casca de banana nanica Atividade PFO (u/ml)
3,0	1800
3,5	3300
4,0	3900
4,5	4500
5,0	5250
5,5	6000
6,0	9000
*6,5	10500
7,0	7500
7,5	7000
8,0	30750

* melhor pH de estabilidade

tamente sobre polifenóis que causam o escurecimento do extrato bruto pela formação de melaninas (coloração marrom escuro) que diminuem a atividade enzimática.

Determinação do pH de estabilidade

A faixa encontrada para o pH de estabilidade envolvendo a *PFO* do extrato bruto da casca de banana nanica parcialmente purificada com 40% de sulfato de amônio foi de 6,0 a 6,5 e o pH ótimo de estabilidade encontrado para esse extrato foi de 6,0 (Tabela 4).

Comparando o resultado do melhor pH de estabilidade da *PFO* de extrato bruto da casca de banana nanica, com o melhor pH de estabilidade dessa enzima no extrato da polpa da fruta¹⁹, verificou-se que a faixa do pH de estabilidade e o valor de pH ótimo, manteve-se inalterada.

Determinação do pH de atividade

A enzima *PFO* presente no extrato da casca de banana nanica parcialmente purificada apresentou atividade numa faixa de pH de 6,0 a 7,5. Abaixo desse pH a enzima é menos ativa e acima desse pH ocorre a auto-oxidação do catecol. O pH ótimo de atividade encontrado foi de 6,5 (Tabela 5).

Comparando o resultado do melhor pH de atividade

Tabela 5. Determinação do pH de atividade para o *PFO* presente no extrato bruto da casca de banana nanica, usando tampão citrato-fosfato 0,1 mol/l a 25°C

pH	Extrato bruto da casca de banana nanica Atividade <i>PFO</i> (u/ml)
3,0	3000
3,5	6000
4,0	7350
4,5	7550
5,0	10500
5,5	13500
*6,0	28950
*6,5	10900
7,0	9000
7,5	7500
8,0	2890

* melhor pH de estabilidade

Tabela 7. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima *PFO* parcialmente purificada da casca de banana nanica com 40% de sulfato de amônio

T (°C) da Fração enzimática de <i>PFO</i> parcialmente purificada	Atividade (u/ml)
4,0	13050
10	18500
25	33000
*30	36000
35	22000
40	15000
50	9000
60	5000
80	0

* Temperatura ótima do extrato de *PFO*

da *PFO* de extrato bruto da casca de banana nanica, com o melhor pH de atividade dessa enzima no extrato da polpa da fruta¹⁹, verificou-se que a faixa do pH de atividade manteve-se inalterada e o valor de pH ótimo diminui em relação à polpa.

Determinação da estabilidade (tempo de armazenamento) do extrato bruto da casca de banana nanica

A Tabela 6 fornece a estabilidade da enzima com o tempo de armazenamento.

O que pode-se observar, mesmo conservando o extrato à baixa temperatura e usando as melhores condições experimentais, foi que a atividade da *PFO* parcialmente purificada da banana nanica diminuiu com o tempo, mas essa diminuição foi significativamente menor quando comparada como o extrato bruto da casca de banana nanica¹⁹; mostrando que a enzima parcialmente purificada possui maior estabilidade.

Estudo do efeito da temperatura sobre a atividade da enzima *PFO* parcialmente purificada da casca de banana nanica (40% de sulfato de amônio).

A Tabela 7 mostra nesse estudo, que se pode trabalhar com a enzima *PFO* proveniente do extrato da casca

Tabela 6. Estudo do tempo de estabilidade do extrato bruto da casca de banana nanica em relação a atividade da *PFO* usando o melhor tempo de contato e a melhor quantidade de polímero

Tempo de estabilidade (Dias)	Extrato bruto da casca de banana nanica Atividade (u/ml)
1	30750
7	30520
15	30375
20	29050
30	28800
40	28000
50	18000
60	10000
70	7355

* melhor pH de estabilidade

Tabela 8. Determinação da atividade enzimática da *PFO* da casca de banana nanica, parcialmente purificada à tempos e temperaturas diferentes / I = 4°C / II = Temperatura ambiente (25°C)

Fração	Atividade (u/ml)	Tempo (horas)
I	19500	1,5
II	19000	1,5
I	17600	3,0
II	17650	3,0
I	40000	25,0
II	39000	25,0
I	21000	48,0
II	15600	48,0

de banana nanica até a temperaturas próximas de 35°C; ocorrendo pouca alteração em sua atividade. O mesmo foi observado com a polpa da fruta¹³.

Determinação da estabilidade ao calor, sobre a atividade da enzima PFO (parcialmente purificada com 40% de sulfato de amônio) da casca de banana nanica

A Tabela 8 mostra a variação da atividade enzimática, para a enzima PFO de extrato bruto da casca de banana nanica, por intervalos de tempo até 48 horas, e a duas temperaturas (4°C e 25°C). Através dos resultados conclui-se que a PFO da casca de banana nanica, tem boa atividade à temperatura ambiente até 48 horas, e portanto pode ser utilizada para experimentos nestas condições. O mesmo foi observado para a polpa da fruta¹².

Conclusão

Comparando-se a atividade da enzima PFO no extrato bruto da casca de banana nanica com a atividade dessa enzima no extrato da polpa da fruta¹³, observa-se um aumento significativo na atividade enzimática para o extrato bruto usando a casca. As características analíticas como pH de estabilidade, atividade, temperatura ótima e tempo de armazenamento do extrato usando a casca como material biológico, apresentaram faixas correlatas as apresentadas por Perone *et al.*¹² (2000), usando a polpa da fruta. Assim o extrato bruto da casca de banana nanica é mais rico em PFO e, portanto, apresenta melhor opção para a construção de biossensores diminuindo custo na análise de fenóis.

Referências

- Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. New York: Verlag Chemie; 1974.
- Fatibello-Filho O, Signori CA. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). Quím Nova. 17(1):38-42.
- Gornael AG, Bardawill K, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem. 1949;177:751-66.
- Khan V. Effect of proteins, protein hidrolizates and aminoacids on dihydroxi phenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. J Food Sci. 1977;50(1):111-9.
- Khan V. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocados varieties differing in their browning rates. J Food Sci. 1977; 42:32-43.
- Lima AWO, Nascimento VB, Pedrotti JJ, Angnes L. Biosensor of immobilized phenolases. Anal Chim Acta. 1977;34:325-9.
- Macholán L, Shánel L. Enzyme electrode with immobilized Polyphenol oxidase for determination of phenolic substrate. Collect Czech Chem Commun. 1977;42:3667-75.
- Mathew AG, Parpia HA. Food browning as a polyphenol reaction. Adv Food Res. 1971;19(1):75-145.
- 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.
- Perone CAS. Determinação amperométrica de compostos fenólicos em urina humana, usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*) e batata doce (*Ipomoea* (L.) Lam.). [Relatório Final de Pesquisa] São José do Rio Preto: Universidade Paulista, Campus JK; 2002.
- Perone CAS. Determinação amperométrica de polifenóis em urina humana, usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). Rev Inst Ciênc Saúde. 2003;21(1):7-12.
- Perone CAS, Queiroz AS, Dalosso VM, Moreira MEM. Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos em urina humana, usando extrato parcialmente purificado de banana nanica (*Musa acuminata*). Rev Inst Ciênc Saúde. 2005;23(4):253-9.
- Perone CAS, Bonfim E, Migliorança L, Araújo F, Gomes G. Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). Rev Inst Ciênc Saúde. 2000;18(2):87-94.
- Rivas N, Whitaker JR. Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. Plant Physiol. 1973;52(5):501-7.
- Saly RC, Felix JS, Swartz HM. Free radicals in Biology, 3rd. ed. New York: Academic Press; 1980.
- Sato M. Multiplicity of spinach root phenolase and its monophenolase activity. Phytochemistry. 1982;21:1229-31.
- Smith JL, Krueger RC. Purification of green tobacco phenolases. J Biol Chem. 1962;237:1121-6.
- Tanaka Y, Uritani I. Polarity of production of polyphenols and development of various enzyme activities in cut-injured sweet potato root tissue. Plant Physiol. 1977;60(4):563-6.
- Thomas P, Janave M. Polyphenol oxidase activity and browning of mango fruits induced by gamma irradiation. J Food Sci. 1973; 38:1149-52.
- Whitaker JR. Principles of enzymology for the food science. New York: Marcell Dekker; 1972.
- Wissemann KW, Montgomery MW. Purification of d'Anjou pear (*Pirus communis*) polyphenol oxidase. Plant Physiol. 1985;78:256-62.

Recebido em 29/6/2007

Aceito em 13/8/2007