

POLIFENOLOXIDASE DE CASCA DE COCO VERDE (*Cocos nucifera L.*): OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAIS

Joana Ferro Machado de Almeida ¹; Antonia Miwa Iguti ²

¹ Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. A polifenoloxidase de casca de coco verde foi extraída e precipitada com etanol e acetona. O precipitante mais eficaz foi o etanol, na faixa entre 30 e 70% (v/v). A atividade específica resultante foi de 18,9 UE/mg proteína, com rendimento de 34,7%, e grau de purificação de 1,52 vezes. A acetona, por sua vez, considerada a faixa entre 30 e 70%, resultou em atividade específica de 7,80 UE/mg proteína, que corresponde a somente 63,1% da atividade do extrato bruto, o que indica ausência de purificação. A enzima obedeceu a cinética de Michaelis-Menten, sendo que os valores de velocidade máxima (V_m) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) resultaram em $27,26 \text{ UE} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $5,93 \text{ mmol/L}$, tendo sido utilizado o catecol como substrato.

Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de coco tendo atingido, em 2008, a marca de 2,149 bilhões de frutos (IBGE, 2008). De acordo com o Ministério da Ciência e Tecnologia, cerca de 15% da produção é consumida como fonte da água de coco, conhecida popularmente como isotônico natural com excelentes qualidades nutricionais (Senhoras, 2005). Entretanto, o consumo do coco verde em larga escala traz um inconveniente: a geração de enorme quantidade de casca, de lenta degradação, que representa cerca de 70% do lixo sólido gerado no litoral de grandes centros urbanos (Barroso, 2005), material esse que corresponde a cerca de 85% do fruto, em massa.

Embora já haja, na literatura científica, estudos de aplicações para a casca de coco verde, nada há sobre a obtenção e nem sobre as características da polifenoloxidase dessa potencial matéria prima.

Nos trabalhos com a polpa de cocos verdes, realizados nos laboratórios do Instituto Mauá de Tecnologia, foi verificado que logo após o corte da casca, ocorre um escurecimento muito rápido do material celulósico. Isso despertou o interesse em estudar as enzimas responsáveis pelo fenômeno, em especial polifenoloxidases, que comprovadamente estão presentes na água e na polpa do coco verde (Abreu & Faria, 2007; Matsui et al., 2008).

Polifenoloxidases ou tirosinases são enzimas que contêm cobre no seu sítio ativo, e são capazes de inserir oxigênio na posição orto a um grupo hidroxila presente em um anel aromático, seguida pela oxidação do difenol à quinona correspondente (figura 1). Oxigênio molecular é consumido na reação. No sítio ativo da enzima, o cobre é ligado a seis ou sete resíduos de histidina e a um resíduo de cisteína. A enzima ocorre em plantas, animais, bactérias e bolores (Mayer, 2006).

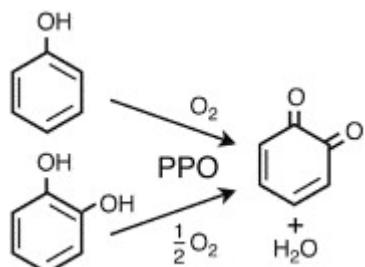


Figura 1- Conversão do fenol e do difenol à quinona.

Embora essa enzima esteja quase sempre associada a problemas, já que causam escurecimento de frutas e vegetais, tanto antes quanto durante o processamento industrial de alimentos, já há estudos que demonstram potencial aplicação desse catalisador.

Em Química Analítica, por exemplo, há trabalhos de desenvolvimento de eletrodos para a análise quantitativa de substâncias fenólicas; no tratamento de efluentes industriais, é sugerida a aplicação como auxiliar da biorremediação. Em processos de fabricação de alimentos como o chá e chocolate a aplicação já é bem conhecida e utilizada no desenvolvimento do escurecimento desses alimentos durante a fermentação, por exemplo.

Em se sabendo que uma das dificuldades do aproveitamento da casca reside no alto teor de água nela contida, surgiu o interesse em se obter a polifenoloxidase e estudar suas características.

A idéia do projeto é obter um produto que possa, no futuro, conter valor comercial. Para isso, tem-se como objetivo extrair a enzima da casca do coco verde e realizar uma purificação parcial, tendo em vista suas possíveis aplicações. Além disso, pretende-se caracterizá-la parcialmente.

É importante ressaltar que outras aplicações já estão sendo estudadas para o resíduo da extração da água de coco verde (polpa e fibra).

Material e Métodos

Material

Os cocos verdes (*Cocos nucifera* L) foram provenientes do mercado local.

Métodos

Para extrair a enzima os frutos foram higienizados e, em seguida, acondicionados em caixas plásticas previamente lavadas e higienizadas. A água de coco, também denominada endosperma líquido, foi retirada manualmente e os frutos divididos em duas partes, no sentido longitudinal. Após a remoção manual da polpa, cada metade foi prensada em uma embutidora, processo que permitiu obter um extrato (extrato bruto) e as fibras. Utilizou-se a polivinilpirrolidona 1%, um adsorvente de substâncias fenólicas, para proteger a enzima durante o processo de purificação. Uma alíquota foi analisada quanto à atividade da enzima e ao teor de proteínas solúveis.

A purificação parcial foi feita da seguinte maneira: foram testados dois precipitantes diferentes: acetona e etanol. O extrato foi submetido à precipitação fracionada para se identificar, com cada precipitante, a melhor faixa de concentração que resultasse em maior atividade específica e maior rendimento. Cada precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação a $10950 \times g$, sob refrigeração.

Os precipitados foram suspensos em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e analisados quanto à atividade enzimática e ao teor de proteínas.

Os precipitantes foram testados, um de cada vez, adicionando-se quantidades que permitissem obter concentrações pré-determinadas. Exemplo: primeira adição: etanol até se obter 10% em volume. A solução resultante foi centrifugada e o sobrenadante separado do precipitado. O precipitado foi suspenso em tampão. O sobrenadante sofreu, então, outra adição de etanol até atingir 20% em volume. O processo foi repetido de 10 em 10% até alcançar a concentração de 80%. Em cada etapa uma alíquota da suspensão de precipitado foi retirada para análise.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método descrito por Hyodo & Yang (1973) com modificações. Em duplicata, foram colocados 3,6 mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 6,0 em tubo de ensaio gelado, 1 mL do extrato enzimático, 0,1 mL de catecol 0,1 M. A mistura foi agitada em vortex por 15 segundos e colocada em um banho a 30 °C por 30 minutos. Após este tempo, a mistura foi transferida para um banho de gelo e um volume de

0,2 mL de ácido perclórico a 1,4% foi transferido ao tubo. Após agitação em vortex por 15 segundos, o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos e a absorbância foi lida em 395 nm em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em UE (unidade de atividade enzimática), sendo que uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto, nas condições do ensaio.

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1984) e convertido em proteína utilizando-se o fator de 6,25.

Os parâmetros cinéticos, Km e Vm, foram determinados medindo-se a atividade da enzima com concentrações do catecol variando entre zero e 0,030 mol/L. O tempo de reação, entretanto, foi de 60 segundos, mantidas as demais condições de ensaio. Os resultados de velocidades de reação em função das concentrações de substrato foram ajustados de acordo com o modelo de Lineweaver-Burk para a obtenção do Km e do Vm.

Resultados e Discussão

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados de atividade enzimática da PPO, teor de proteína, atividade específica, purificação e rendimento dos precipitados com etanol e acetona, respectivamente. A atividade da PPO no extrato bruto foi de 6,78 EU/mL, mais alta do que a encontrada na água de coco por Abreu & Faria (2007), de 2,33 UE/mL a 25 °C. Deve-se observar, entretanto, que as condições de ensaio não foram exatamente as mesmas, pois embora o pH tenha sido idêntico, a temperatura e o tempo (10 minutos) foram diferentes. Além disso, estes resultados não podem ser comparados com os desse trabalho, pois ainda não se sabe se a PPO da água de coco é a mesma PPO do líquido da casca de coco.

Tabela 1-Resultados obtidos com etanol como precipitante.

Frações (%)	Vol. (mL)	Atividade (UE/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (UE/mg prot.)	Purif. (vezes)	Rendimento (%)
0	46,0	6,78	0,549	12,4	1,00	100
0-30	10,2	10,5	0,283	37,2	3,01	34,4
30-40	11,8	2,48	0,154	16,0	1,30	9,36
40-60	11,6	2,88	0,103	27,9	2,26	10,7
60-70	13,2	3,45	0,206	16,8	1,36	14,6
70-80	37,5	2,68	0,206	13,0	1,05	32,2

Tabela 2-Resultados obtidos com acetona como precipitante.

Frações (%)	Vol (mL)	Atividade (UE/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (UE/mg prot.)	Purif. (vezes)	Rendimento (%)
0	45,5	6,78	0,549	12,4	1,00	100,0
0-30	13,0	4,72	0,206	22,9	1,85	19,9
30-50	10,4	2,29	0,309	7,42	0,601	7,73
50-60	11,2	2,45	0,206	11,9	0,964	8,90
60-70	18,8	2,64	0,395	6,69	0,542	16,1
70-80	17,1	2,38	0,438	5,44	0,440	13,2

O resultado da fração de 0-30% foi desconsiderado, para ambos precipitantes, pois durante a análise de atividade houve turbidez devido à presença de partículas muito finas de PVPP residual, não separado pela centrifugação, logo após a extração da enzima da casca do coco.

O fracionamento com a acetona não apresentou resultados satisfatórios, pois não se observou purificação em relação ao extrato bruto. Em se reunindo as frações correspondentes à precipitação entre 30 e 70%, seria obtido um extrato com atividade específica de 7,80 UE/mg proteína. Esse valor é 63,1% da atividade do extrato bruto, indicando ausência de purificação, com rendimento de 32,7%. É possível que tenha ocorrido desnaturação da enzima.

Já os do etanol apresentaram resultados melhores. Para a caracterização cinética foram reunidas as frações correspondentes à precipitação entre 30 e 70%. Essas frações reunidas correspondem a uma atividade específica de 18,9 UE/mg proteína, com rendimento de 34,7% e grau de purificação de 1,5 vezes. A fração de correspondente a precipitação com 80% de etanol não foi incluída, pois apesar de aumentar o rendimento, ocorre diminuição do grau de purificação.

Não foram encontrados na literatura científica trabalhos em que PPO de casca coco tenha sido purificada. Nagai e Suzuki (2001) purificaram PPO de repolho. Na fase de precipitação, utilizaram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40 e 80% e obtiveram purificação de 1,8 vezes e um rendimento de 57,9%. Yue-Ming et al. (1997) extraíram e purificaram PPO de lichia. Também fracionando com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 50 e 80% de saturação, obtiveram 50,3% de rendimento e purificação de 3 vezes. São resultados melhores do que os obtidos nesse trabalho até o presente momento. Entretanto, deve-se salientar que esses resultados ainda são preliminares, pois são exploratórios. Existe a possibilidade de que as condições de análise de atividade não sejam as melhores para a enzima em estudo, já que os valores de temperatura e pH ótimos, assim como as soluções de extração, variam de acordo com a fonte da qual a enzima polifenoloxidase tenha sido extraída.

Os resultados dos ensaios cinéticos estão apresentados nas figuras 2 e 3.

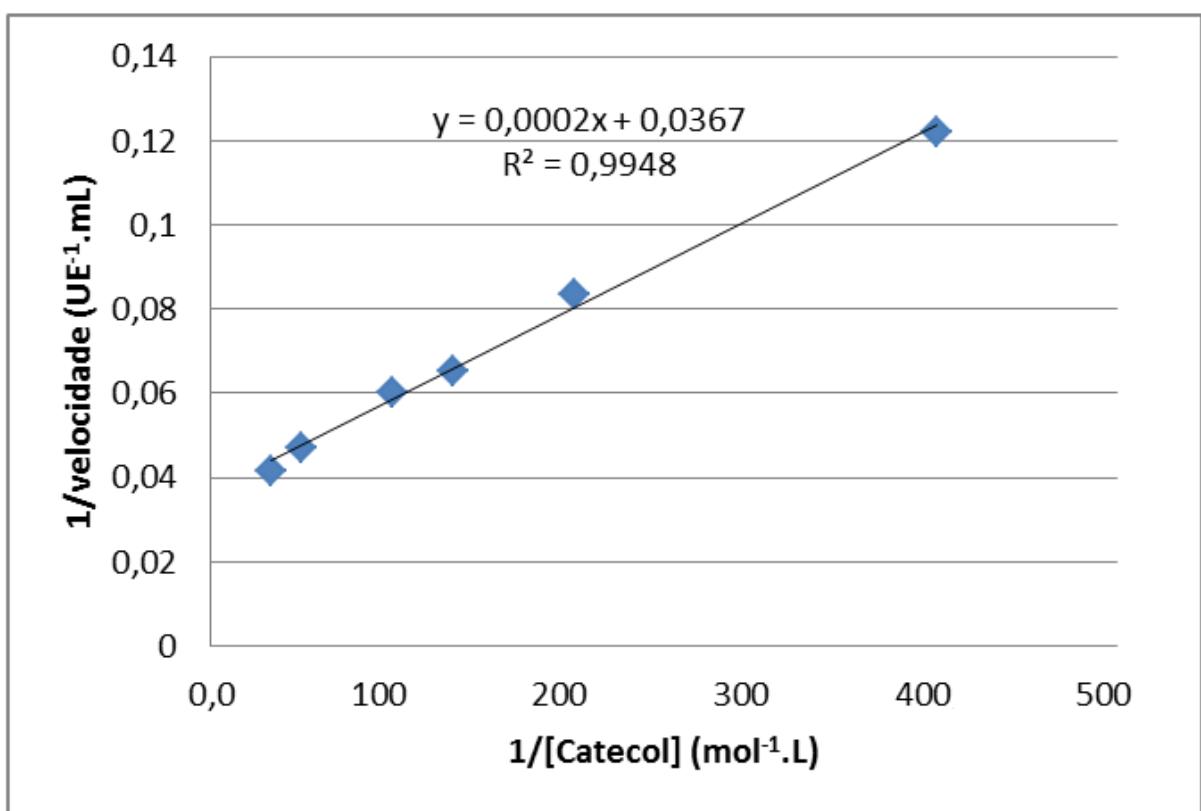


Figura 2 – Gráfico de Lineweaver-Burk para obtenção do V_m e do K_m da PPO.

Observa-se na figura 2 que os resultados experimentais apresentam bom ajuste ao modelo de Lineweaver Burk ($r^2 = 0,995$). Foram obtidos os valores de velocidade máxima (V_m) e de constante de Michaelis-Menten (K_m), de $27,3 \text{ UE}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $5,93 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, tendo o catecol como substrato.

Aydemir (2004), pesquisando PPO de alcachofra, encontrou valores de K_m e de V_m de $10,2 \text{ mmol/L}$ e $19,66 \text{ UE}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, utilizando o catecol como substrato. O pesquisador demonstrou que os valores de K_m e V_m são diferentes quando se utilizam diferentes substratos.

O método diferencial não linear (FOGLER, 2009) também foi utilizado para determinação de V_m e K_m . Os valores encontrados foram de $28,3 \text{ UE}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $6,57 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, correspondendo a diferença de 3,5% e 9,7%.

Utilizando-se os valores de K_m e V_m obtidos neste trabalho e aplicando na equação de velocidade de Michaelis-Menten, pode-se avaliar o ajuste dos resultados ao modelo (figura 3).

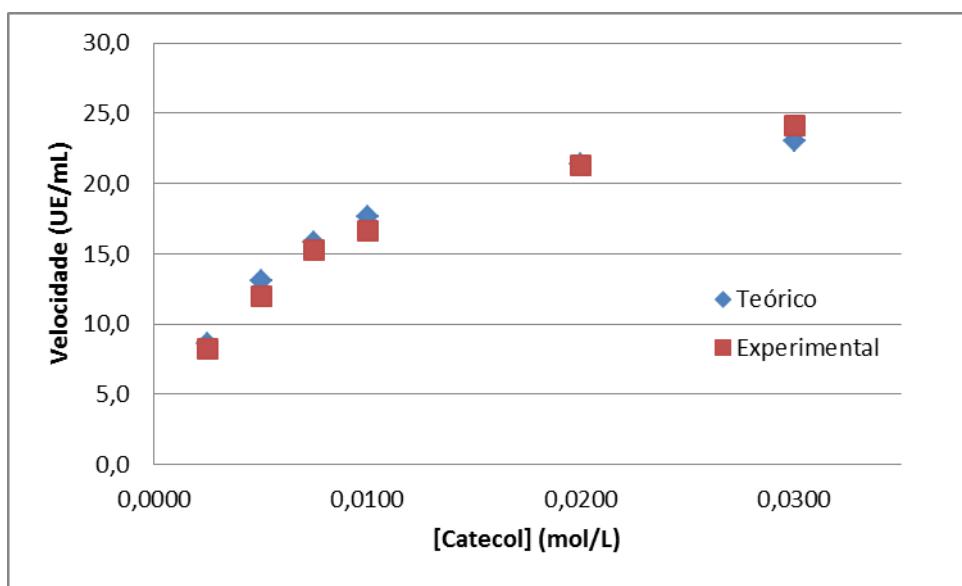


Figura 3- Curva de velocidade de catálise da PPO sobre o catecol. Comparação entre os resultados experimentais com os teóricos.

Pode-se observar na figura 3 que a curva experimental é praticamente coincidente com a teórica.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, a precipitação com etanol entre 30 e 70% (v/v) resultou em purificação de 1,5 vezes e rendimento de 34,7%. A suspensão resultante apresentou atividade específica de 18,9 UE/mg proteína.

A PPO de casca de coco verde apresenta equação de velocidade que se ajusta bem ao modelo de Michaelis-Menten, com V_m de $27,26 \text{ UE}\cdot\text{mL}^{-1}$ e K_m de $5,93 \text{ mmol/L}$, nas condições de ensaio (catecol como substrato, temperatura de 30°C e pH 6,0).

Referências Bibliográficas

- Abreu, L.; Faria, J.A.F. (2007) Influência da temperatura e do ácido ascórbico sobre a estabilidade físico-química e atividade enzimática da água de coco (*Cocos nucifera L.*) acondicionada assepticamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **27**, 226-232.
- AOAC (1984) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th edition. Arlington, AOAC Inc.

- Aydemir, T. (2004) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, **87**, 59–67.
- Barroso, T. *Fortaleza ganha primeira unidade de beneficiamento de casca de coco verde do Nordeste*. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em 15 de Novembro de 2011.
- Fogler, H.S (2009) *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*. 4^a edição. Rio de Janeiro, LTC.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 15 de Novembro de 2011.
- Hyodo, H.; Yang, S.F. (1971) Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia lyase in pea seedlings. *Plant Physiology*, **47**, 765-770.
- Matsui, K.N.; Gut, J.A.W.; Oliveira, P.V.; Tadini, C.C. (2008) Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *Journal of food Engineering*, **88**, 169-176.
- Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, **67**, 2318-2331.
- Nagai, T; Suzuki, N. (2001) Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3922-3926.
- Senhoras, E.M. (2005) Oportunidades da Cadeia Agroindustrial do Coco Verde – Do coco nada se perde, tudo se desfruta. *Revista Urutáguia*. Disponível em: <<http://www.urutagua.uem.br>>. Acesso em 15 de Novembro de 2011.
- Yue-Ming, J.; Zauberman, G.; Fuchs, Y. (1997) Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology*, **10**, 221-228.