

Estudo da Enzima Polifenol Oxidase Extraída de *Musa acuminata* para o Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico para a Determinação de Polifenóis

Patrícia Ferrante Draghi¹ e Julio Cesar B. Fernandes²

1. Estudante de IC da Universidade Municipal de São Caetano do Sul – USCS-Campus Centro; *pdraghi@live.com

2. Pesquisador da Universidade Municipal de São Caetano do Sul – USCS-Campus Centro

Palavras Chave: *Polifenol oxidase, biossensor, potenciometria.*

Introdução

Polifenol oxidase (PPO) é uma enzima encontrada em diversas espécies de plantas, microrganismos e animais. A PPO catalisa a decomposição de polifenóis e derivados através do oxigênio molecular como co-substrato. A mesma possui dupla atividade enzimática, como monofenolase ou cresolase, caracterizada pela hidroxilação de monofenóis em o-difenóis; e como difenolase, oxidação dos o-difenóis em o-quinonas, sendo as o-quinonas polimerizadas a melanina.

Uma alternativa para detecção de polifenóis é através do uso de biossensores. Estes são dispositivos analíticos que acoplam a um transdutor para o reconhecimento de uma substância molecular biológica. Na literatura, poucos trabalhos descrevem o uso de PPO para a construção de biossensores potenciométricos, a sua grande maioria aplica a enzima em medidas amperométricas.

Transdutores potenciométricos são bastante atrativos para o desenvolvimento de biossensores, principalmente devido ao seu baixo custo, associado também a uma eletrônica de medição simplificada.

A potenciometria se baseia na medição do potencial de células eletroquímicas em condições de corrente “nula”, sendo necessário apenas um potenciômetro de alta impedância, um eletrodo indicador e um eletrodo de referência.

O objetivo deste trabalho foi estudar a enzima polifenol oxidase extraída de *Musa acuminata* (banana nanica) para aplicação no desenvolvimento de um biossensor potenciométrico para a determinação de polifenóis.

Resultados e Discussão

Bananas nanicas adquiridas em supermercados da região foram usadas como fonte natural para a extração da enzima PPO. Cerca de 400 g de casca do fruto foi pré-congelada (-20 °C) e pesada em balança técnica. As cascas foram trituradas em liquidificador por 20 min com 100 ml de tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ a pH 7,0, contendo 2% polivinilpirrolidona (PVP-K30) e 1% de Triton X-100. O material foi pré-purificado em peneira com uma camada de gaze e o filtrado foi centrifugado a 3400 rpm durante 60 min à temperatura ambiente. A solução sobrenadante foi usada como fonte enzimática [1]. A atividade enzimática para cresolase e catecolase foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 420 nm usando uma cubeta de 1,00 cm de caminho óptico. Neste comprimento de onda foi monitorado a transformação da L-tirosina (cresolase) e do catecol (catecolase) no derivado melanina devido a polimerização das quinonas. A atividade enzimática do extrato bruto foi determinada na região linear da curva cinética. Uma unidade enzimática foi definida como a unidade de enzima PPO que causa uma mudança de absorbância de 0,001 unidades por minuto a 30°C e pH 7 (Fig. 1).

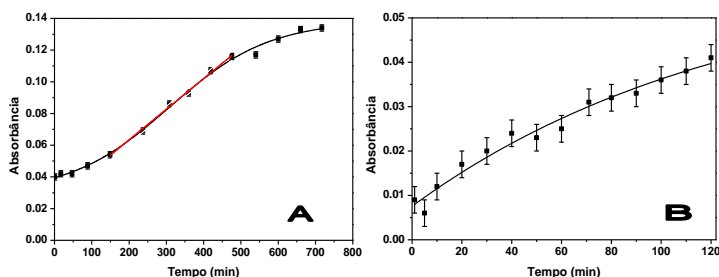


Figura 1. Gráficos para a determinação da atividade enzimática para A. Cresolase e B. Catecolase.

Tabela 1. Resultados para a atividade enzimática do extrato bruto de PPO para cresolase e catecolase usando oxigênio gasoso como co-substrato.

Substratos	Atividade Enzimática (U ml ⁻¹)
L-Tirosina (Cresolase)	3±01
Catecol (Catecolase)	4,9±0,1

O extrato bruto enzimático foi imobilizado sobre um transdutor potenciométrico e respondeu para catecol devido à alteração na capacitância causada pela mudança na densidade de carga elétrica quando o sítio ativo da enzima passa do estado oxy e met para deoxy (Fig. 2).

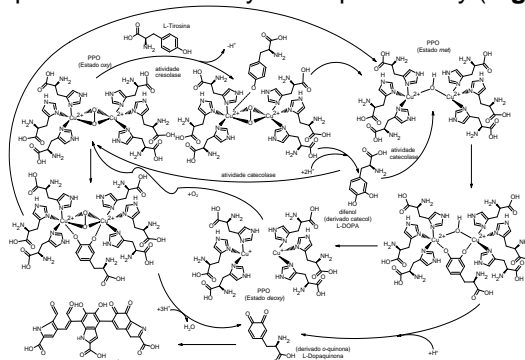


Figura 2. Ilustração esquemática do mecanismo de atuação da PPO como cresolase e catecolase [2].

A resposta do biossensor foi linear na faixa de concentração entre $1,28 \times 10^{-5}$ a $6,74 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com $r = 0,9997$.

Conclusões

Os resultados indicam que a PPO extraída da casca de banana apresenta atividade enzimática suficiente para ser utilizada na elaboração de biossensores potenciométricos.

Agradecimentos

FAPESP, Processos: 2015/18299-8 e 2007/55627-7.

- Nematpour, F. S., Haghbeen, K., Babaei, M. K., Jazii, F. R., Nouraeen, O., Yancheshmeh, M. B. The Banana Pulp Polyphenol Oxidase is a Tyrosinase J Bio Sci 8[3] (2008) 526-533.
- Boeckx, T., Winters, A. L., Webb, K. J., Kingston-Smith A. H. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? J Exp Botany 66 [12] (2015) 3571–3579.