

## ISOLAMENTO E CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DA POLIFENOLOXIDASE EM DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS DE GRÃOS DE *COFFEA ARABICA*

<sup>1</sup>Patrícia de F. P. Goulart **VITORINO**, vitorino@ufla.br <sup>2</sup>José Donizeti **ALVES**, <sup>3</sup>Marcelo Murad **MAGALHÃES**, <sup>4</sup>Rúbia Padilha **PURCINO**, <sup>5</sup>Luiz Carlos de Oliveira **LIMA**

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi o isolamento e o estudo de propriedades cinéticas da polifenoloxidase (PPO) em amostras de grãos de café da espécie *Coffea arabica* de classes distintas de bebida. Os estudos de cinética enzimática foram realizados baseados nas variações de substratos (L 3,4 dihidroxifenilalanina - DOPA, ácido clorogênico, catecol, ácido gálico e ácido pirogálico) cujos dados obtidos se ajustaram ao modelo de Hanes-Woolf. Dos substratos utilizados, o DOPA, o ácido clorogênico e o catecol apresentaram os menores valores de  $K_m$  e as maiores eficiências catabólicas. A PPO presente nos grãos da bebida estritamente mole tem uma preferência pelo ácido clorogênico com um  $K_m$  de 0,25 mM enquanto que a maior afinidade para com o substrato na bebida dura foi pelo catecol, cujo  $K_m$  foi de 0,49 mM. Verifica-se que no café de bebida mole a atividade da PPO apresentou-se com maiores valores. O perfil eletroforético da PPO tendo o DOPA como substrato, evidenciou para a bebida estritamente mole, um banda de 100 kDa e para a bebida rio duas bandas de 56 e 47 kDa.

Palavras-chave: polifenoloxidase, café, atividade enzimática, cinética, eletroforese

**ABSTRACT:** The objective of this paper was to isolate and to study kinetic properties of polyphenoloxidase in coffee grain samples of *Coffea arabica* species from different classes of drink. The kinetic studies were based in substrate variations (DOPA, chlorogenic acid, catechol, galic acid, pirogalic acid), that adjusted to Hanes - Woolf model. From substrates used, DOPA, chlorogenic acid and catechol showed the lower  $K_m$  values and higher catabolic efficiency. The PPO present in grain with strictly soft drink has a preference to chlorogenic acid with a 0,25 mM  $K_m$ , while the higher affinity to substrate in rio drink was obtained using catechol, with  $K_m$  of 0,49 mM. In coffee with soft drink the PPO activity showed the highest values. The PPO electrophoretic profile, using DOPA as substrate, showed for drink strictly soft 100 kDa band and for rio two bands of 56 and 47 kDa.

**INDEX TERMS:** polyphenoloxidase, coffee, enzymatic activity, kinetics, electrophoresis.

### INTRODUÇÃO

Apesar de ser o principal produtor mundial, o café do Brasil tem sofrido restrições relacionadas com a qualidade da bebida tanto no mercado internacional como no nacional. Como em qualquer segmento de alimentação e bebida, a avaliação da qualidade do café está restrita a apreciações subjetivas de aromaticidade, sabor e aspecto uma vez que ela é feita por um grupo de provadores que, sujeitos a variações entre eles e do meio, não apresentam boa reprodutibilidade. Com o objetivo de tornar essa avaliação mais sensível e precisa, diversos pesquisadores tem sugerido a adoção da atividade da polifenoloxidase (PPO) como técnica complementar à atual classificação por prova de xícara (Carvalho, 1994; Amorim e Silva, 1968; Amorim, 1978). Esta sugestão parte da constatação de que existe uma relação positiva entre este indicador bioquímico e a qualidade de bebida do café arábica.

Apesar da concordância entre os autores de que é possível a separação do café por classe de bebida com base na atividade da PPO, observa-se que existem grandes variações na amplitude da atividade dessa enzima quando se considera frutos em diferentes estádios de maturação. Estas diferenças impõem um grande intervalo de atividade dentro das classes de bebidas para satisfazer um mercado, cuja colheita de café é feita com pouco rigor, quando se considera estádios de maturação de frutos e ausência de cuidados que se estendem até a pós-colheita.

<sup>1</sup> Doutoranda, Fisiologia Pós Colheita, UFLA, vitorino@ufla.br, <sup>2</sup> Professor DBI/UFLA, jdalves@ufla.br, <sup>3</sup> Bolsista recém doutor FAPEMIG, <sup>4</sup> Mestranda em Fisiologia Vegetal, UFLA, <sup>5</sup> Professor DCA/UFLA, lcolima@ufla.br

Desde a década de 70 até o presente, vários trabalhos foram realizados (Draetta e Lima, 1976; Oliveira *et al* 1976; Amorim, 1978; Leite, 1991 e Carvalho, 1994) e os resultados encontrados proporcionaram pouco avanço na área da bioquímica da qualidade do café. Com base em resultados obtidos por Carvalho *et al.*, (1994), estudando a relação entre a atividade da PPO e a qualidade do café foi proposta uma classificação complementar à prova de xícara.

Apesar da importância da PPO para o café, verifica-se para esta cultura, ausência de estudos envolvendo isolamento e purificação da enzima. Para outras espécies, entretanto, existem na literatura trabalhos que apresentam metodologias de utilização de colunas cromatográficas de troca iônica e exclusão molecular que propiciam a obtenção de um extrato enzimático com alto grau de purificação (Chevalier *et al.*, 1999; Robinson e Dry, 1993). Como resultados destas pesquisas, atualmente já se tem conhecimento para outras espécies, da cinética enzimática, do padrão eletroforético, e das sequências regulatórias da polifenoloxidase. O conhecimento destes parâmetros para o café poderia elucidar diversos aspectos relacionados com a qualidade da bebida.

Devido a importância da PPO e a possível utilização de sua atividade como auxiliar na classificação de bebida de café e a escassez de estudos básicos, mas com grande potencial de uso, teve-se por objetivo o isolamento, e o estudo de propriedades cinéticas da PPO em amostras de grãos de café da espécie *Coffea arabica* de classes distintas de bebida.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do grão de café, previamente classificadas em bebidas estritamente mole e rio, foram trituradas em presença de nitrogênio líquido em triturador de bola (Prolabo, Paris) durante 3 minutos. Aproximadamente 5 g destas amostras, foram homogeneizadas com tampão de extração (tampão fosfato pH 6,0, 0,1M a 4°C) e submetidas a centrifugações, onde coletou-se o sobrenadante. O processo de extração da enzima foi adaptado visando aumentar a eficiência para a obtenção do extrato enzimático. Utilizou-se o PVP para a remoção dos compostos fenólicos e a glicina com o propósito de ativar a reação. Obteve-se então o extrato enzimático que foi utilizado para os ensaios enzimáticos com os diversos substratos.

**Cinética enzimática-** Os estudos de cinética enzimática foram realizados baseando-se nas variações de substratos (DOPA, ácido clorogênico, catecol, ácido gálico e ácido pirogálico) cujos dados obtidos se ajustaram ao modelo de Hanes-Woolf. Antes porém foram também otimizados os tempos de incubação e as melhores concentrações.

**Eletroforese-** A eletroforese foi realizada a partir do extrato proteico utilizando-se a metodologia proposta por Laemmli (1970) com algumas modificações. As proteínas foram separadas utilizando-se o sistema SDS-PAGE. Nas condições de corrida utilizou-se 100V e 25mA. Nos ensaios de atividade da polifenoloxidase, as amostras foram submetidas às condições de desnaturação parcial nos quais os extratos proteicos não foram aquecidos e o tampão foi utilizado sem os agentes redutores e com SDS a 0,1%. Para o ensaio de atividade da polifenoloxidase o gel foi incubado com DOPA a 20mM em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 a 35°C por 2 horas. Após este tempo, descartou-se a solução e tratou-se o gel com solução aquosa de p-fenilenodiamina a 0,1%. Depois de aproximadamente 30 minutos, fixou-se o gel em solução aquosa de glicerol a 10%. Foram utilizados padrões da Bio-Rad para estimar o peso molecular da proteína

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos substratos utilizados, o DOPA, o ácido clorogênico e o catecol apresentaram os menores valores de  $K_m$  e as maiores eficiências catabólicas (Tabela 1). A PPO presente nos grãos da bebida estritamente mole tem uma preferência pelo ácido clorogênico com um  $K_m$  de 0,25 mM enquanto que a maior afinidade para com o substrato na bebida rio foi pelo catecol, cujo  $K_m$  foi de 0,49 mM. Independentemente da qualidade da bebida, a PPO mostrou pouca eficiência catalítica quando se considera o ácido gálico como substrato, uma vez que o valor de  $V_{max}$  foi em média, 10 vezes menor. Estes resultados demonstraram que provavelmente há diferenças nas estruturas moleculares da proteína.

TABELA 1- Valores de  $K_m$  (mM) e  $V_{max}$  ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) para a polifenoloxidase obtida de dois substratos distintos utilizando cinco substratos distintos.

SUBSTRATO	RIO		ESTRITAMENTE MOLE	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
DOPA	1,089	0,0595	0,4273	0,06403
Ácido clorogênico	0,7473	0,0682	0,2586	0,0578
Catecol	0,491	0,09420	0,3784	0,0871
Ácido gálico	2,392	0,1172	3,727	0,1738
Ácido pirogálico	3,590	0,2598	3,072	0,2665

Os resultados expressos na tabela 2 mostram haver diferenças com relação às atividades da PPO nos diferentes tipos de bebidas e com a utilização de diferentes substratos. Verifica-se que no café de bebida estritamente mole a atividade da PPO apresenta-se com maiores valores, confirmando os resultados verificados por Oliveira (1972) e Carvalho (1994). Deve-se considerar que no processamento pós-colheita do café classificado como de excelente qualidade, esta enzima permanece compartimentalizada e por conseguinte, sem contato com o substrato (Amorim, 1978). Desse modo, durante a extração da enzima, a PPO sofre uma descompartimentalização e em contato com o substrato, exogenamente adicionado, resulta uma alta atividade “in vitro” (Tabela 2). Por outro lado, em cafés de qualidade inferior, advindos da falta de cuidados pós-colheita, a enzima sofre descompartimentalização colocando-se em contato com o substrato, o que resultará, em uma elevada atividade “in vivo”. Essa alta atividade da enzima leva ao acúmulo de fenóis que em determinadas quantidades irá se ligar a enzima, inibindo sua atividade (Amorim e Silva, 1968). Assim, durante o processo de determinação da atividade, esta enzima estará negativamente modulada, rendendo uma baixa atividade “in vitro” (Tabela 2).

TABELA 2- Valores de atividades da polifenoloxidase em grãos de café ( U/min/g de amostra), referentes a dois tipos de bebidas e quatro diferentes substratos.

SUBSTRATO	RIO	ESTRITAMENTE MOLE	
		POLIFENOLOXIDASE	
DOPA	17,41	20,64	
Ácido clorogênico	17,45	22,82	
Catecol	16,16	17,30	
Ácido gálico	5,60	6,85	

Em SDS-PAGE, o número de bandas correspondentes a proteína e PPO, variou de acordo com o tipo de bebida (Fig.1). Para o café de bebida estritamente mole, foram evidenciadas várias bandas de proteínas onde apenas uma banda de peso molecular de 100 kDa correspondeu a PPO, tendo o DOPA como substrato (Fig.1 A-III). Por outro lado para o café de bebida rio, duas isoformas de 56 e 47 kDa de PPO foram reveladas (Fig.1 B-III). Os resultados de literatura tem apontado para a PPO uma ampla faixa variando de 33 a 200 kDa (Robinson e Eskin, 1991). Para o café, esta faixa varia de 14 a 148 kDa (Amorim, 1978). O significado biológico dessas isoformas e seu efeito na qualidade do café serão posteriormente estudados em extratos purificados da proteína.

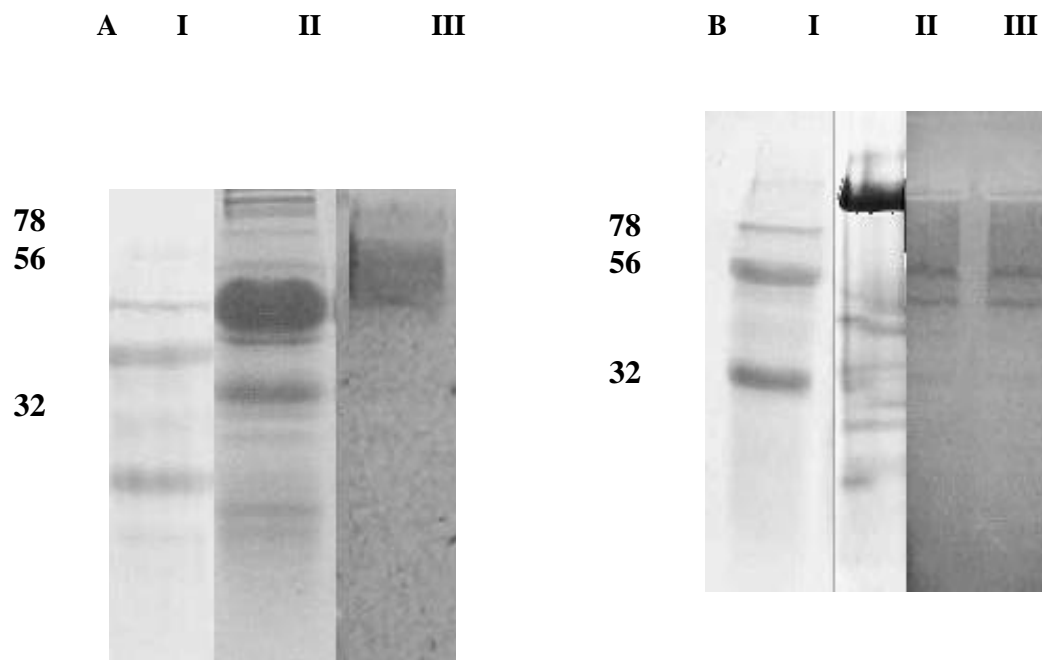


Figura 1- Perfil eletroforético PAGE de proteínas (II) e de polifenoloxidase (III) de café bebida estritamente mole (A) e rio (B). (I: padrão de peso molecular).

## CONCLUSÕES

Dos substratos utilizados, o DOPA, o ácido clorogênico e o catecol apresentaram os menores valores de

$K_m$  e as maiores eficiências catabólicas.

2- Verifica-se que no café de bebida mole a atividade da PPO apresenta-se com maiores valores.

3- O perfil eletroforético da PPO tendo o DOPA como substrato, evidenciou para a bebida estritamente mole, uma banda de 100 kDa e para a bebida rio duas bandas de 56 e 47 kDa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; SILVA, O.M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. *Nature*, v.219, p.381-382. Sept. 1968
- AMORIM, H.V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão do café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. Piracicaba: ESALQ, 1978. 85p. Tese de Livre-docência.
- CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J. DE R.; CHALFOUN, S.N.; BOTREL, N.; JUSTE.; JÚNIOR, E.S.G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.29, n.3, p.449-454, mar. 1994.
- CHEVALIER, T.; RIGAL, D.; MBÉGUIÉ, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; FILS-LYCAON, B.R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, v.119, p.1261-1270, 1999.
- DRAETTA, I.S.; LIMA, D.C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidases do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v.7, p.13-28, jun. 1976.
- LEITE, I.P. **Influência do local de cultivo e tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café. (Coffea arabica L.)** Lavras: ESAL, 1991. 131p. Tese de Mestrado.
- OLIVEIRA, J.C.; AMORIM, H.V.; SILVA, D.M.; TEIXEIRA, A.A. Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento. *Científica*, v.4, n.2, p.114-119, 1976.
- ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. Polyphenol oxidase. *Oxidative enzymes in foods*. New York, p. 217-273, 1991.

ROBINSON,S.P.; DRY, I.B. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60- kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. **Plant Physiology**, v.99, 317-323, 1992.

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425