

## Purificação parcial e caracterização da enzima polifenol oxidase em manjeriço ‘Genovese’

Débora Monique Vitor<sup>1\*</sup>, Lucilene da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Sarah Ferreira Guimarães<sup>2</sup>, Ariana Mota Pereira<sup>1</sup>, Fernando Luiz Finger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil.

\* Autor para correspondência: deboramv@yahoo.com.br

**RESUMO:** O manjeriço (*Ocimum basilicum*) possui diversas finalidades como medicinal, culinário, cosmético e possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Entretanto, manjeriço armazenado sob temperaturas baixas pode apresentar sintomas de injúria por frio e escurecimento, causado pela ação da enzima polifenol oxidase. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições ótimas para a atividade da polifenol oxidase e possíveis formas de inativá-las. A extração da polifenol oxidase (EC 1.10.3.1, PPO) em folhas de manjeriço ‘Genovese’ foi otimizada por saturação com 60 e 80% de sulfato de amônio. A PPO purificada apresentou uma afinidade mais elevada para o substrato catecol. Os valores ótimos de pH e temperatura para a atividade da enzima foram de 6,5 e 30 °C, respectivamente. A enzima apresentou estabilidade até os 120 min de avaliação, em pH 9,0 a 4 °C e a 25 °C e pH 2,5 a 25 °C. O tempo de 10 min foi suficiente para inativação de 65% da atividade a 50 °C e a 60 °C ocorreu 80% de redução na atividade da PPO. A ação da enzima foi completamente inibida por ácido ascórbico, L-cisteína, dietilditiocarbamato de sódio, e tropolone.

**Palavra-chave:** Injúria por frio, inibidores, *Ocimum basilicum*, estabilidade.

**ABSTRACT: Partial purification and characterization of the enzyme polyphenol oxidase in basil ‘Genovese’.** Basil (*Ocimum basilicum*) has several purposes as medicinal, culinary, cosmetic and has antimicrobial and antioxidant properties. However, basil stored under low temperatures may present symptoms of cold injury and darkening caused by the action of the enzyme polyphenol oxidase. The objective of this work was to evaluate the optimum conditions for polyphenol oxidase activity and possible ways of inactivating them. The extraction of polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1, PPO) in basil leaves ‘Genovese’ was optimized by saturation with 60 and 80% of ammonium sulfate. The purified PPO had a higher affinity for the catechol substrate. The optimum pH and temperature values for the activity of the enzyme were 6.5 and 30 °C, respectively. The enzyme showed stability up to 120 min of evaluation, at pH 9.0 at 4 °C and at 25 °C and pH 2.5 at 25 °C. The time of 10 min was enough to inactivate 65% of the activity at 50 °C and at 60 °C there was an 80% reduction in PPO activity. The action of the enzyme was completely inhibited by ascorbic acid, L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate, and tropolone.

**Key words:** Cold Injury, inhibitors, *Ocimum basilicum*, stability

### INTRODUÇÃO

Apesar da maioria das ervas aromáticas serem comercializadas como produto seco, o consumo de folhas frescas, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos devido a substituição do sal por ervas aromáticas, visando o preparo de alimentos mais saudáveis e de melhor sabor (Curutchet et al. 2014).

As ervas aromáticas e medicinais da família Lamiaceae, como o *Ocimum basilicum* L., são conhecidas por serem fontes ricas em

compostos polifenólicos, particularmente os ácidos fenólicos (Capecka et al. 2005; Zgórka e Glowinski 2001) que são antioxidantes (Shan et al. 2005; Surveswaran et al. 2007; Lee e Scagel 2009, 2010), e apresentam propriedades antimicrobianas. Entretanto, o uso do manjeriço fresco na culinária é dificultado pela elevada perecibilidade e dificuldade de armazenamento. Uma vez que o manjeriço apresenta sintomas de injúria por frio quando armazenado em temperaturas inferiores a 12 °C, ocasionando escurecimento nas folhas, seguido

Recebido para publicação em 12/01/2018

Aceito para publicação em 14/12/2021

Data de publicação em 25/12/2021

ISSN 1983-084X

© 2019 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

de degeneração e senescência (Lange e Cameron 1994). No entanto, o armazenamento a 12 °C por 9 dias aumentou os compostos fenólicos em três cultivares de manjeriço, o que levou a considerar as folhas de manjeriço como uma boa fonte de moléculas bioativas (Fratianni et al. 2017).

A reação de escurecimento é catalisada pela polifenol oxidase (PPO EC 1.14.18.1), uma enzima que contém cobre e com um centro de cobre dinucleares, catalisa duas reações: a hidroxilação de monofenol no seu correspondente *orto*-difeno (hidroxilação ou atividade monofenolase) e também a oxidação do *orto*-difeno ao correspondente *orto*-quinonas (atividade difenolase, EC 1.10.3.1), na presença de oxigênio molecular, que são polimerizados aos pigmentos escuros (Gao et al. 2009).

Sendo a cor um atributo de qualidade de frutas e hortaliças, o escurecimento das folhas de manjeriço afeta a aceitabilidade do produto pelo consumidor e é uma das principais causas de perda de qualidade. Estando relacionado ao nível de PPO que é dependente da espécie, cultivar, maturidade e idade (Vamos-Vigyazo 1981). Além disso, a PPO tem grande heterogeneidade acerca do substrato específico, sensibilidade a inibidores, pH ótimo, latência, inativação térmica, número de isoformas e massa molecular (Mayer e Harel 1979).

No entanto, na literatura não se encontra trabalhos relacionados a purificação parcial e caracterização da PPO em folhas de manjeriço 'Genovese'. Sendo necessário o seu conhecimento para inativar a enzima e permitir a realização do armazenamento refrigerado, visando o prolongamento da vida de prateleira e consequentemente a disponibilidade do manjeriço fresco para o consumidor.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar a enzima PPO envolvida com a injúria por frio em folhas de manjeriço cv. Genovese pelo estabelecimento das condições ótimas para a atividade da PPO, e inativação da enzima.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de manjeriço cv. Genovese foram semeadas em vasos de 3 l, contendo substrato comercial, na casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no mês de outubro do ano 2013. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da UFV, 3 meses após a semeadura, nos meses de janeiro a fevereiro de 2014.

Na obtenção do extrato enzimático, 10 g de material vegetal fresco foi triturado em politron com 50 ml de tampão de extração, até a completa

homogeneização. A composição do tampão de extração foi: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Polivinilpirrolidona (PVP) + 1% Triton X-100 + 10 mmol/l ácido ascórbico. Após isso, o homogeneizado foi centrifugado a 17.000 g durante 30 min, a 4 °C. Para a purificação parcial da enzima uma alíquota do sobrenadante foi armazenada (extrato bruto) e o restante saturado para 20, 40, 60 e 80% com sulfato de amônio, via homogeneização por 30 min em banho de gelo e posterior centrifugação, para cada etapa. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento resultante de cada etapa de saturação foi ressuspenso com 2 ml de tampão de diálise e dialisado por 15 h em membranas de celulose modelo D-9777 da Sigma. A composição do tampão de extração foi: tampão fosfato 0,01 M pH 6,5 + 100 mmol/l ácido ascórbico. Todas as centrifugações foram realizadas a 4 °C e 17.000 x g por 30 min. As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando soro albumina bovino (BSA) como padrão.

Na determinação da atividade enzimática da PPO uma alíquota de extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo 0,5 ml de 10 mmol/l de catecol e 0,5 ml de tampão fosfato a 0,1 M (pH 6,5) totalizando o volume total da reação de 1,5 ml. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. A atividade da PPO foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorvância em comprimento de onda de 420 nm a 25 °C e expressa em UA/min/mg de proteína (Kavrayan e Aydemir 2001).

Para determinar o substrato que proporcionou maior atividade enzimática na fração com saturação com sulfato de amônio da PPO, diferentes substratos foram testados: Catecol (420 nm), 4-metil-catecol (420 nm), pirocatequina (420 nm), ácido clorogênico (420 nm), ácido cafeico (400 nm), L-dopa (480 nm), L-tirosina (420 nm), pirogalol (420 nm). A concentração de 10 mmol/l de cada substrato foi adicionada ao meio de reação e a atividade enzimática determinada em espectrofotômetro. O substrato que proporcionou maior atividade foi considerado como 100% de atividade relativa e foi utilizado nos ensaios subsequentes (Gawlik-Dziki et al. 2008).

Na determinação do efeito do pH na atividade da PPO, diferentes soluções tampão de reação foram utilizadas à concentração de 0,1 M: ácido cítrico (pH 2,5 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 7,5) e ácido bórico (pH 8,0 a 9,0). Os pHs foram corrigidos utilizando NaOH e HCl a 1 M. A atividade relativa foi considerada como 100% no pH ótimo de reação, e a atividade nos demais pHs foi calculada com base nessa (Neves 2003).

Na análise da estabilidade da PPO sob condições extremas de pH, foram feitas pré-incubações do extrato enzimático em soluções-tampão em que a enzima apresentou baixa atividade, para verificar a possibilidade de inativação da mesma. Para isso o extrato enzimático foi incubado (1:1) em solução tampão 0,1 M em pHs 2,5 e a 9,0 por um período de 0 a 120 min, sendo retiradas amostras a cada 10 min (Neves 2003). A pré-incubação foi realizada a 25 °C e em banho de gelo (4 °C) e a atividade relativa foi determinada utilizando o tampão com pH ótimo de reação para a enzima e temperatura de 25 °C. Atividade relativa de 100% foi considerada na ausência da pré-incubação e ao longo da pré-incubação a atividade foi calculada com base nesta.

Na determinação da temperatura ótima para a atividade, os extratos enzimáticos e o tampão de reação foram incubados, por 4 min, em temperaturas que variaram de 10 a 60 °C, em intervalos de 10 °C e imediatamente foi efetuada a leitura em espectrofotômetro na mesma temperatura da incubação (Neves 2003). Na temperatura ótima, a atividade relativa foi considerada como 100%, e a atividade nas demais temperaturas foi calculada com relação a esta.

Para avaliar a estabilidade térmica, o extrato enzimático foi incubado com o tampão fosfato a 50 e 60 °C por 10 min, sendo retiradas amostras ao longo do período de incubação. Após retirada do banho-maria, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo (4 °C), por 30 min, e posteriormente, determinada a atividade relativa em temperatura ambiente (Neves 2003). Atividade de 100% foi considerada na ausência da pré-incubação e ao longo dos períodos de pré-incubação a atividade foi calculada em relação a esta.

Na verificação do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO, os extratos enzimáticos foram incubados por 30 min a 25 °C, em tampão de reação contendo 1 mmol/l de EDTA, L-cisteína, metabissulfato de sódio, ditioeitol (DTT), ácido ascórbico e sulfato de sódio. Na ausência de inibidores, a atividade foi considerada como 100% e

as demais foram calculadas com base nessa.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, os dados foram submetidos a análises estatísticas descritivas da média e o erro padrão da média foi calculado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração enzimática na qual a PPO apresentou maior atividade foi à saturada entre 60 e 80% com sulfato de amônio (Tabela 1), essa proporcionou uma atividade específica 166% maior comparada ao uso do extrato bruto. Este aumento é considerado relevante para a realização das etapas posteriores do trabalho, para a concentração da PPO e eliminação de compostos moduladores e substratos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ionitã et al. (2017) ao caracterizar a PPO em ameixa, encontraram atividade máxima da enzima na fração enzimática 90% correspondente a maior saturação.

Os substratos difenólicos apresentaram maior afinidade e estabilidade com a PPO em folhas de manjerição 'Genovese'. A atividade máxima da PPO foi na presença do catecol, seguido pela pirocatequina e 4-metil-catecol (Figura 1). Um dos pré-requisitos para escolha do substrato foi à alteração da cor e estabilidade da solução, no momento da reação. A utilização de L-tirosina, substrato monofenol, foi ineficiente (Figura 1), o que sugere a falta de atividade da enzima cresolase que catalisa a hidroxilação de monofenóis para difenóis.

Dogan et al. (2005) observaram que substratos difenólicos como 4-metilcatecol, catecol e pirogalol foram significativamente oxidados pela PPO de *O. basilicum*, entretanto a enzima não oxidou L-tirosina, que é um substrato monofenólico. O mesmo também foi relatado por outros pesquisadores em ameixa (Ionitã et al. 2017), em mirtilo (Siddiq e Dolan 2017), em *Physalis peruviana* L. (Bravo e Osorio 2016) e alface (Gawlik-Dziki et al. 2008), resultados semelhantes ao presente estudo.

**TABELA 1.** Atividade da polifenol oxidase após saturação do extrato bruto de manjerição 'Genovese' com diferentes porcentagens de sulfato de amônio (SA).

SA (% sat)	UA/mim/ml	mg proteína/ml	UA/mim/mg proteína
0	6,634	0,2218	29,909
0-20	4,8	1,5081	3,183
20-40	11	0,7936	13,861
40-60	4,2	0,1273	32,993
60-80	6,28	0,079	79,494

Atividade máxima da PPO foi encontrada quando se utilizou como meio de reação o tampão fosfato com pH 6,5 (Figura 2). Este resultado foi semelhante ao da maioria das pesquisas, realizadas com diferentes espécies, que apresentam máxima atividade da PPO em valores de pH próximos ao neutro, como relatado para PPO da polpa de buriti pH 7,0 (Carvalho e Orlanda 2017), manga 'Ataulfo' faixa de pH ideal entre 5,4 e 6,4 (Cheema e Sommerhalter 2015), frutas de atemóia o pH ótimo foi de 5,6-6,5 (Chaves et al. 2011), alface 6,8 (Gawlik-Dziki et al. 2007).

A PPO de manjeriço 'Genovese' ficou estável dentro da faixa de pH entre 6 e 7 (Figura 2), mantendo mais de 80% da sua atividade. Por outro lado, a enzima foi instável e inativa em pHs extremos. Sob pH 9,0 observou-se redução de 87,4% da atividade em comparação com o pH ótimo. Essa redução é ainda maior sob pH 2,5 com redução de 94,3% (Figura 2).

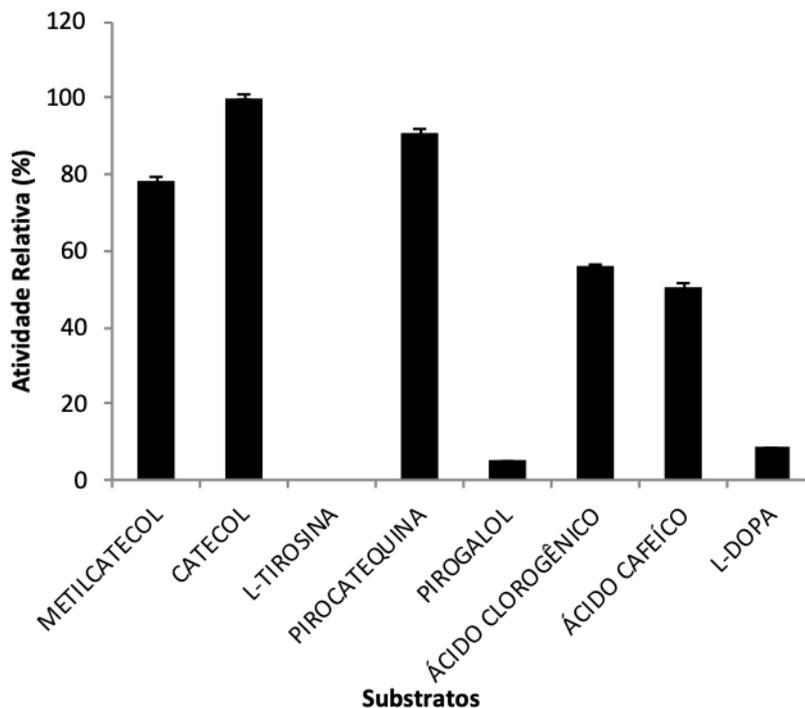
A estabilidade da PPO em pH 9,0 foi diferente do verificado em pH 2,5, ambos com os mesmos tempos de pré-incubação e temperaturas (25 °C ou a 4 °C). Isto porque, não houve redução drástica na atividade da enzima em pH 9,0 nas duas condições de pré-incubação e a estabilidade ocorreu durante todo período (Figura 3a), já em pH 2,5 houve uma queda da atividade da enzima com 10 min de pré-incubação a 25 °C (Figura 3b). Resultado similar foi encontrado em *Lonicera japonica* (Liu et al. 2013),

a PPO foi estável entre o pH 8-10, mantendo mais de 80% de sua atividade, e instável e inativa quando presente em pH abaixo de 3,0, com menos de 20% de sua atividade.

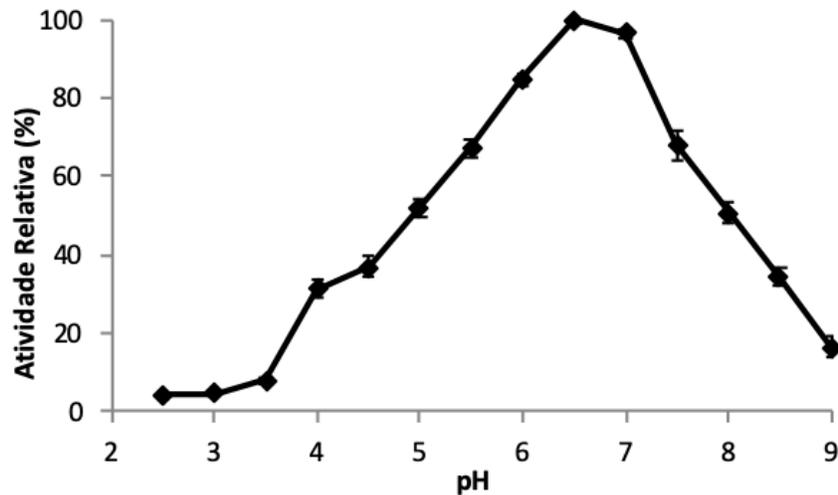
A pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5, a 25 °C, a partir dos 80 min, promoveu redução drástica na atividade da PPO em relação à atividade máxima em pH 6,5, mas não o suficiente para inativá-la completamente. A enzima quando pré-incubada em pH 2,5, a 4 °C manteve a atividade até os 120 min (Figura 3b).

Amostras pré-incubadas em pH 9,0 ao retornarem para condições de ótima atividade (pH 6,5) tiveram capacidade de retornar à atividade (Figura 3a). O mesmo não foi observado com as amostras pré-incubadas em pH 2,5 a 25 °C, que devem ter sofrido danos irreversíveis (Figura 3b). Somente a utilização de valores de pHs ácidos possibilitou resultados satisfatórios na inibição da atividade da polifenoloxidase em *Strelitzia reginae* (Karsten 2009), resultado semelhante ao desse trabalho, devido a sua alta instabilidade nessas condições.

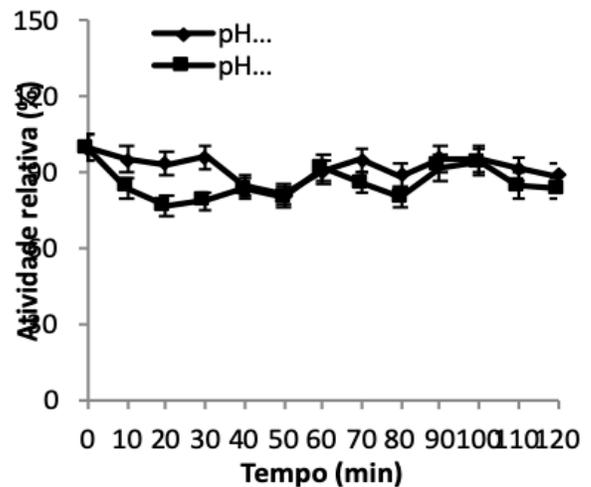
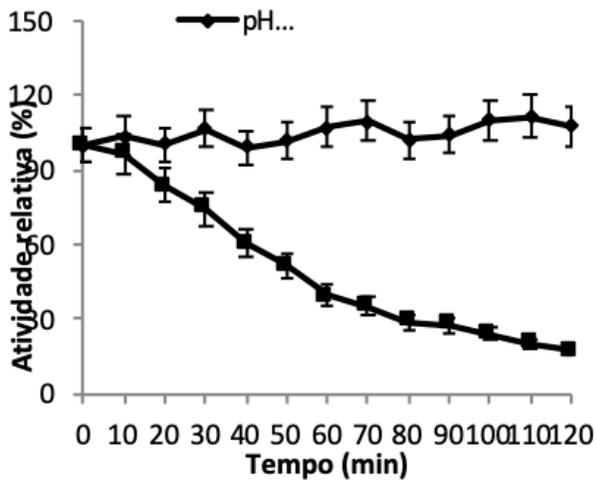
APPO teve máxima atividade em temperatura de 30 °C, representando aumento de 82% em relação a sua atividade a 60 °C (Figura 4a). A temperatura adequada é necessária para conseguir a atividade enzimática ideal. Temperaturas maiores que 30 °C induziram a redução gradativa da atividade, com perda total de sua função catalítica a partir de 70



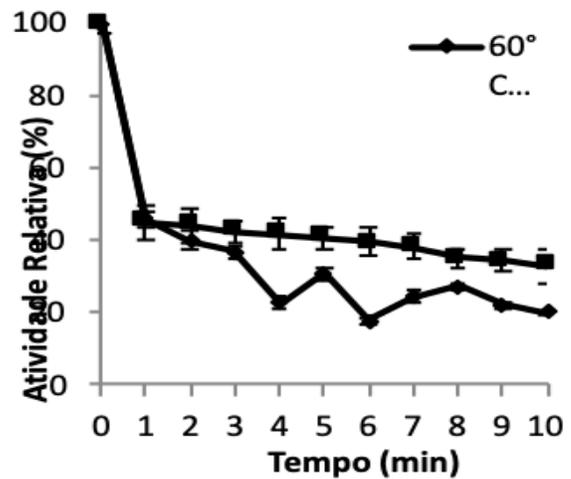
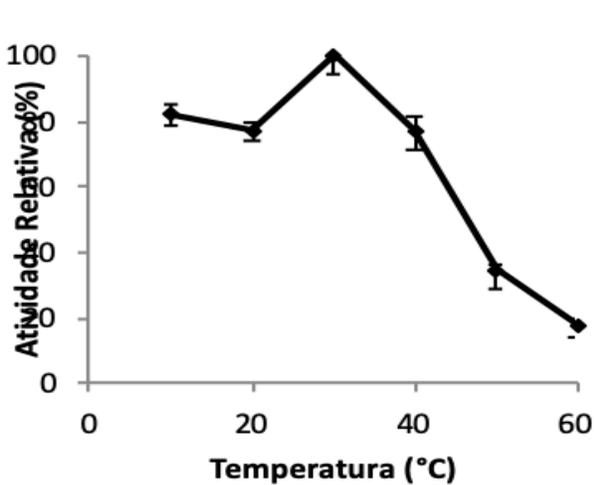
**FIGURA 1.** Efeito de diferentes substratos (30 mmol/l) sobre a atividade da PPO de folhas de manjeriço 'Genovese'. As barras verticais representam o erro padrão da média.



**FIGURA 2.** Efeito do pH no meio de reação sobre a atividade da PPO de manjeriço 'Genovese'. As barras verticais representam o erro padrão da média.



**FIGURA 3.** Efeito do tempo de pré-incubação em pH 9,0, a 4 e 25 °C (a) em pH 2,5, a 4 e 25 °C (b), sobre a atividade da PPO de manjeriço 'Genovese', avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.



**FIGURA 4.** a) Efeito de diferentes temperaturas na atividade da PPO e b) efeito do tempo da pré-incubação à 50 e 60 °C sobre a atividade da PPO de manjeriço 'Genovese', avaliada a pH 6,5 e a temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

°C. De acordo com a literatura, a maioria das PPOs apresentam temperatura ótima, dentro dessa faixa encontrada em manjeriço □ Genovese □. PPO de *Lonicera japonica* apresenta sua temperatura ótima a 25 °C (Liu et al. 2013), frutas de atemóia a 28 °C (Chaves et al. 2011), mirtilo 35 °C (Siddiq e Dolan 2017), alface manteiga 35 °C (Gawlik-Dziki et al. 2008).

A temperatura de 50 °C reduziu em 65% a atividade da PPO, observa-se uma tendência na atividade da enzima em manter constante por 10 min de exposição do extrato, não sendo possível a inativação, enquanto que à 60 °C, 10 min de exposição foram suficientes para uma redução de 80% na atividade enzimática (Figura 4b). Em outros trabalhos de inativação térmica da PPO como em morango, a enzima foi inativada após 30 min de exposição à temperatura de 65 °C (Serradell et al. 2000), em polpa e casca de maçãs das cultivares Fuji e Gala, a PPO foi inativada após 10 min de exposição, à temperatura de 75 °C (Valderrama et al. 2001). Já em frutos de buriti a temperatura de 57 °C durante 20 min inativou cerca de 11% a atividade da PPO e a 77 °C apenas 4 min foram suficiente para inativar aproximadamente 60% da atividade da enzima (Carvalho e Orlanda 2017).

A mudança na estrutura terciária da enzima ocasiona a queda em sua atividade sob temperaturas altas. Um aumento na temperatura de incubação aumenta a velocidade da reação, mas simultaneamente leva à desnaturação da enzima, assim a temperatura influencia na atividade enzimática de duas maneiras (Sun et al. 2008). Segundo Vamos-Vigyazo (1981) a PPO não é considerada uma enzima termoestável, e curtos tempos de exposição a temperaturas de 70-90 °C são suficientes para causar a destruição total ou parcial da atividade catalítica. Resultados semelhantes ao obtidos com a PPO de manjeriço cv. Genovese.

Ácido ascórbico, DTT e L-cisteína foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição, seguido pelo tropolone, agente inibidor específico, com cerca 98% de inibição. O EDTA, bissulfito de sódio e o sulfato de sódio apesar de serem classificados como inibidores, não mostraram efeito sobre a atividade da PPO de manjeriço 'Genovese' (Tabela 2).

O metabissulfito de sódio, a L-cisteína, o ácido dietilditiocarbâmico de sódio e o ácido ascórbico foram os inibidores mais eficazes da PPO de mirtilo, inibiram 80% da atividade da enzima (Siddiq e Dolan 2017). Como observado no presente estudo, o ácido ascórbico e a L-cisteína demonstraram ter um efeito de inibição semelhante na PPO de *Physalis peruviana* L. (Bravo e Osorio 2016). O sulfito, ácido ascórbico e a L-cisteína

**TABELA 2.** Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da polifenol oxidase de manjeriço cv. Genovese.

Inibidor (1mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100
Bissulfito de Sódio	109,91
EDTA	98,02
Sulfato de Sódio	94,14
Tropolone	2,42
Ácido Ascórbico	0
DTT	0
L-cisteína	0

tem sido relatada como sendo os inibidores mais eficazes de PPO em maçã-lobo (Batista et al. 2014) e berinjela (Mishra et al. 2012). Embora neste trabalho não se verificou o efeito inibitório dos sulfitos. A L-cisteína é capaz de ligar os grupos SH da cisteína com o cobre da PPO para formar complexos estáveis e, assim, inibir diretamente a atividade da enzima (Marshall et al. 2000; Robert et al. 1996; Friedman 1996).

Dietilditiocarbamato de sódio (DTT) e derivados de tiourea são agentes redutores e inibem a atividade da PPO devido aos seus efeitos sobre o cobre (Mayer e Harel 1978) de uma maneira semelhante ao fenol (Fan et al. 2009). Assim como em manjeriço o DTT foi um dos inibidores mais efetivos da PPO em raiz de banana (Wuyts et al. 2006) e em alcachofra (Aydemir 2004).

O ácido ascórbico é normalmente utilizado como um agente antiescurecimento, de redução preferível ao invés do metabissulfito de sódio (Palma-Orozco et al. 2011), por meio da sua reatividade dirigida ao sítio para resíduos de histidina é capaz de funcionar com um inibidor da PPO (Yoruk e Marshall 2003). A PPO catalisa a oxidação de substâncias fenólicas para o-quinonas enquanto o ácido ascórbico converte as quinonas para compostos fenólicos. Em lichia, quando o catecol foi utilizado como substrato, o ácido ascórbico foi o inibidor mais eficaz (Sun et al. 2008). Ácido ascórbico 10 mmol/l levou a 96,6% de inibição em folhas de alface (Gawlik-Dziki et al. 2008). Estes resultados estão de acordo com o referente trabalho, relatando a eficiência na utilização do ácido ascórbico como um antioxidante.

Em estudos de inibição, tropolone a 1 mmol/l mostrou 85% de inibição na PPO de uva Dominga (Nunez-Delicado et al. 2005), assim como

PPO de caqui também foi inibida 100% por ácido ascórbico e tropolone a 1 mmol/l (Nunez-Delicado et al. 2003).

Semelhante a este estudo, vários trabalhos demonstraram ineficiência do EDTA como inibidor da PPO, como foi observado em cereja (Kumar et al. 2008), lichia (Sun et al. 2008), raízes de banana (Wuyts et al. 2006).

A capacidade de diferentes compostos em inibir a PPO depende da natureza e concentração do inibidor, fonte de PPO, disponibilidade de substrato ( $O_2$ , fenóis), pH e temperatura (Vamos-Vigyazo 1981). Do ponto de vista prático a aplicação de L-cisteína e o ácido ascórbico são capazes de prevenir e/ou controlar o escurecimento enzimático da PPO em manjerição 'Genovese'. Além disso, apresenta ação nutritiva e não tóxica.

## CONCLUSÕES

A otimização do ensaio enzimático na PPO de folha de manjerição foi conseguida quando o extrato foi saturado entre 60 e 80% com sulfato de amônio e a reação se processou em pH 6,5, a 30 °C, utilizando-se catecol como substrato. pHs ácidos e altas temperaturas inativam a enzima, enquanto ácido ascórbico, DTT, L-cisteína, tropolone inibem a PPO de manjerição 'Genovese'.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela concessão de bolsas.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Aydemir T (2004) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem* 87:59-67.
- Batista KA, Batista GLA, Alves GL, Fernandes, KF (2014) Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J Mol Catal B Enzy* 102:211-217.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bravo K, Osorio E (2016) Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chem* 197:185-190.
- Capecka E, Mareczek A, Leja M (2005) Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem* 93:223-226.
- Carvalho JO, Orlanda JF (2017) Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chem* 233:159-163.
- Chaves IR, Ferreira ES, Da Silva MA, Neves VA (2011) Polyphenoloxidase from atemoya fruit (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.). *J Food Biochem* 35: 1583-1592.
- Cheema S, Sommerhalter M (2015) Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chem* 171:382-387.
- Curutchet A, Dellacassa E, Ringuet JA, Chaves AR, Vinã SZ (2014) Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha x piperita* and *M. spicata*). *Food Chem* 143:231-238.
- Dogan, S, Turan P, Dogan M, Arslan O, Alkan M (2005) Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 53:10224-10230. <https://doi.org/10.1021/jf051646j>
- Ionitã E, Gurgu L, Aprodu I, Stanciuc N, Dalmadi I, Bahrim G, Râpeanu G (2017) Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochem* 56:177-185 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.014>.
- Erat M, Sakiroglu H, Kufrevioglu I (2006) Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chem* 95:503-508.
- Fan, T, Zhang Y, Yang L, Yang X, Jiang G, Yu M, Cong R (2009) Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comp Biochem Physiol* 152:144-149.
- Fратиanni F, Cefola M, Pace B, Cozzolino R, De Giulio B, Cozzolino A, D'Acierno A, Coppola E, Logrieco AF, Nazzaro F (2017) Changes in visual quality, physiological and biochemical parameters assessed during the postharvest storage at chilling or non-chilling temperatures of three sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chem* 229:752-760.
- Friedman M (1996) Food browning and its prevention: An overview. *J Agric Food Chem* 44:631-653.
- Gao HJ, Yang H, Wang JX (2009) Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *Sci Hortic* 119:147-152. <https://doi.org/10.1016/j>

- scienta.2008.07.034
- Gawlik-Dziki U, Szymanowska U, Baraniak B (2007) Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chem* 105:1047-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.012>
- Gawlik-Dziki U, Zlotek U, Swieca M (2008) Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chem* 107:129-135.
- Karsten J (2009) Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de Ave-do-Paraíso (*Strelitzia reginae*). 121p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Kavrayan D, Aydemir T (2001) Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem* 74:146-154.
- Kumar VBA, Mohan TCK, Murugan K (2008) Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) *Food Chem* 110:328-333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.006>
- Lange DL, Cameron AC (1994) Postharvest shelf life of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Hort Science* 29:102-103.
- Lee J, Scagel CF (2009) Chicoric acid found in Basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chem* 115:650-656.
- Liu N-n, Liu W, Wang D-J, Zhou Y-b, Lin X-j, Wang X, Li S-b (2013) Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chem* 138:478-483.
- Marshall RM, Kim J, Wei C-I (2000) Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/enzimatic%20browning.html>. Acesso em: 06 Nov. 2014.
- Mayer AM, Harel E (1978) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.
- Mayer AM, Harel E (1979) Review: polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Mishra, BB, Gautam S, Sharma A (2012) Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem* 134:1855-1861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.098>
- Neves LLM (2003) Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. 72 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Nunez-Delicado E, Megías MS, Pérez-López AJ, López-Nicolás JM (2005) Polyphenol oxidase from Dominga table grape. *J Agric Food Chem* 53:6087-6093. <https://doi.org/10.1021/jf050346z>
- Núñez-Delicado E, Sojo MM, García-Carmona F, Sánchez-Ferrer A (2003) Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 51:2058-2063. <https://doi.org/10.1021/jf0208583>
- Palma-Orozco G, Ortiz-Moreno A, Dorantes-Álvarez L, Sampedro JG, Nájera H (2011) Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry* 72:82-88. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.011>
- Robert C, Richard F, Rouch C, Pabion M, Cadet F (1996) A Kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 28(4): 457-463. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00148-4](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00148-4)
- Serradell M de los A, Rozenfeld PA, Martínez GA, Civello PM, Chaves AR, Añón C (2000) Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch., cv Selva): Characterization and partial purification. *J Sci Food Agric* 80:1421-1427.
- SHAN B, Cai YZ, Sun M, Corke H (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 53:7749-7759. <https://doi.org/10.1021/jf051513y>
- Siddiq M, Dolan KD (2017) Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chem* 218:216-220.
- Sun J, Shi J, Zhao M, Xue SJ, Ren J, Jiang Y (2008) A comparative analysis of property of lychee polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. *Food Chem* 108:818-823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.036>
- Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke HSM (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 102:938-953. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.033>
- Valderrama P, Marangonu F, Clemente E (2001) Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Food Sci Technol* 21(3):321-325. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000300012>
- Vámos-Vigyázó L (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Ver Food Sci Nutr* 15:49-127.
- Wuyts N, Waele DD, Swenner R (2006) Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiol Biochem* 44:308-314. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.005>

Yoruk R, Marshall MR (2003) Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J Food Biochem* 27:361-422.  
Zgórka G, Glowniak K (2001) Variation of free

phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Anal* 26:79–87.