

ÁCIDO ACETOHIDROXÂMICO COMO INIBIDOR DA POLIFENOLOXIDASE DE BATATA¹

FÁBIO PORTELA²

RESUMO - Investigou-se o uso do ácido acetohidroxâmico como inibidor enzimático da polifenoloxidação (E.C. 1.14.18.1, monofenol monooxigenase) isolada de batata. Os resultados indicam que este ácido atua como inibidor não competitivo desta enzima.

Termos para indexação: enzima, *Solanum tuberosum*.

ACETOHYDROXAMIC ACID AS INHIBITOR OF POTATO POLIPHENOLOXIDASE

ABSTRACT - This research was conducted aiming to determine the inhibitory effect of the acetohydroxamic acid as an enzyme inhibitor on isolated polyphenoloxidase (E.C. 1.14.18.1, monophenol monooxygenase). The results indicate this acid as a noncompetitive inhibitor of this enzyme.

Index terms: enzyme, *Solanum tuberosum*.

INTRODUÇÃO

Visto o efeito inibidor do ácido acetohidroxâmico (AHA) sobre a uréia (Brent et al. 1971) e considerando sua baixa toxidez (Fishbein et al. 1965a) e também suas propriedades quelantes (Neilands 1967), investigou-se sua ação sobre a polifenoloxidação (E.C. 1.14.18.1, monofenol monooxigenase) de batata que está envolvida nas reações de escurecimento dos alimentos que procedem em duas etapas dependendo do substrato usado (Eskin et al. 1971).

Esta enzima possui cobre como grupo prostético (Mathew & Parpia 1971) e daí estudos de inibição enzimática com variadas substâncias, oxalato de sódio, cisteína, bissulfito de sódio, ditiotreitól, e dietilditio carbonato, capazes de complexar o referido grupo prostético (Muneta & Wang 1977, Muneta 1981, Sato 1980).

Assim sendo, visto que o AHA, além de bom complexante, possui baixa toxidez (Baintner Junior 1964, Fishbein et al. 1965a), este trabalho foi realizado visando determinar a ação deste complexante sobre a atividade da polifenoloxidação.

MATERIAL E MÉTODOS

A variedade Mineira cultivada na Estação Experimental de Maria da Fé, Minas Gerais, foi usada como fonte

para extração da polifenoloxidação. Os tubérculos colhidos em outubro de 1980 foram trazidos para o laboratório, lavados, selecionados e mantidos a 4°C até momentos de serem usados.

O ácido acetohidroxâmico foi preparado conforme Fishbein et al. (1965b) e purificado por quatro sucessivas cristalizações em acetato de etila. O ponto de fusão observado para o produto cristalizado foi de 87 a 89°C, que concorda com dados da literatura (Fishbein et al. 1965b, Fishbein et al. 1969).

A polifenoloxidação parcialmente purificada foi preparada seguindo-se descrição de Muneta (1966) e Portela (1982).

O resíduo, recolhido em 25 ml de água destilada deionizada, foi dialisado em tubo de acetato de celulose contra água destilada durante uma noite, a 4°C, trocada periodicamente. Os tubos de diálise foram preparados segundo a técnica descrita por Bailey (1967).

Após diálise, a preparação foi centrifugada a 7.000 g, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 6,00 (Gomori 1955), e analisada para teor protéico pela técnica de biuret (Gornal et al. 1949).

A solução foi dividida em frações de 20 ml, congelada a -10°C e só descongelada antes de ser usada. Esta preparação foi denominada de polifenoloxidação semi-purificada.

Determinação da atividade enzimática da preparação

Determinou-se a atividade enzimática da preparação dialisada conforme descrição anterior (Portela 1982). O substrato, solução de catecol, foi usada em diferentes concentrações (Tabela 1) e mantida sempre pelo período máximo de duas horas após preparo. A referida substância, bem como as demais usadas neste trabalho, tem qualidade de reagente analítico.

Inicialmente, curvas do tipo variação do substrato-variação do tempo com concentração enzimática constante, de acordo com a Tabela 1, foram obtidas usando-se um espectrofotômetro Coleman Jr.

Procedeu-se do seguinte modo: volumes adequados de

¹ Aceito para publicação em 17 de abril de 1984.

² Bioquímico, M.Sc., Dr., Prof. Adjunto do Departamento de Ciência dos Alimentos, Escola Superior de Agricultura de Lavras-ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

substrato e solução tampão foram transferidos para cubeta, após agitação, a mesma foi transferida para o espectrofotômetro em 410 nm (Weaver et al. 1970), acertado para 0 de absorvância. Adicionou-se 0,2 ml da preparação enzimática, completando-se, assim, o volume para 3 ml com solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,00, e registrou-se a variação da absorvância por três minutos, com anotações feitas de 15 em 15 segundos. Para cada concentração de substrato, o ensaio foi realizado quatro vezes, e valores médios foram registrados.

Cinética enzimática: ação inibitória do AHA

O efeito do AHA foi observado adicionando-se o mesmo em concentrações tais que, por diluição, teríamos 250, 500, 1.000 e 2.000 $\mu\text{g/ml}$ no volume final de três ml. A solução do AHA foi adicionada diminuindo-se em 1 ml o volume da solução tampão fosfato usada (Tabela 2).

A enzima foi incubada com o AHA a 37°C por trinta minutos; após este período, a cubeta foi transferida para o espectrofotômetro em 410 nm, ajustado para zero de absorvância, e, após adição de solução substrato, a reação foi seguida como anteriormente.

Os resultados da cinética, com e sem adição de AHA, são mostrados na Tabela 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das leituras de absorvância com e sem adição do AHA para diferentes con-

centrações do substrato são mostrados na Tabela 3. Destes dados, traçaram-se curvas e as respectivas tangentes pela origem, cujas inclinações, conforme Richardson (1967), definem as respectivas velocidades iniciais (Tabela 4), valores estes que permitem calcular as atividades enzimáticas conforme as definições de Constantinides & Bedford (1967) e Adamson & Abigor (1980). A representação gráfica destes valores (Fig. 1) fornece curvas semelhantes às mostradas por Conn & Stumpf (1972) para inibição não competitiva. À proporção que aumenta a concentração do inibidor, ocorre diminuição da velocidade inicial, e, comparando-se as velocidades iniciais com e sem adição de AHA, observa-se que, na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, temos, aproximadamente, 75% da reação inibida, e, para níveis de 2.000 $\mu\text{g/ml}$, observa-se quase total inibição. Para níveis de 3.000, 6.000 e 12.000 $\mu\text{g/ml}$, absorvâncias aqui não registradas, observou-se total inibição da reação enzimática.

Sharma & Ali (1980) observam que a interação entre a polifenoloxidase e thio compostos ocorre pela complexação do cobre prostético necessário à atividade enzimática. Em face das propriedades complexantes do AHA, espera-se que a inibição

TABELA 1. Esquema para condução do ensaio enzimático em diferentes concentrações do substrato.

Concentração do substrato no volume final do ensaio mM	Solução tampão Fosfato 0,1 M pH 6,00 - ml -	Solução enzimática Adicionada - ml -
2,72	2,70	0,2
5,45	2,60	0,2
10,90	2,40	0,2
16,35	2,30	0,2
21,80	2,00	0,2

TABELA 2. Esquema usado para observar ação do AHA sobre cinética da polifenoloxidase.

Concentração do substrato no volume final do ensaio	Solução tampão - ml -	Inibidor - ml -	Enzima - ml -
2,72	1,70	1	0,2
5,45	1,60	1	0,2
10,90	1,40	1	0,2
16,35	1,30	1	0,2
21,80	1,00	1	0,2

TABELA 3. Absorvâncias registradas para diferentes concentrações de inibidor e do substrato para preparação semipurificada de polifenoloxidase de batatinha.

Tempo (seg)	Concentração do AHA (ug/ml)									
	0					250				
	Concentração do substrato (mM)									
	21,80	16,35	10,90	5,45	2,72	21,80	16,35	10,90	5,45	2,72
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,305	0,290	0,276	0,224	0,163	0,115	0,102	0,083	0,053	0,043
30	0,494	0,458	0,425	0,345	0,247	0,227	0,210	0,165	0,106	0,075
45	0,642	0,588	0,552	0,461	0,321	0,350	0,315	0,251	0,156	0,101
60	0,765	0,728	0,669	0,553	0,389	0,467	0,430	0,342	0,205	0,629
75	0,872	0,832	0,769	0,132	0,465	0,518	0,534	0,423	0,255	0,160
90	0,985	0,921	0,844	0,698	0,525	0,658	0,620	0,503	0,306	0,195
105	1,070	0,984	0,917	0,748	0,564	0,733	0,695	0,573	0,355	0,222
120	1,130	1,035	0,976	0,794	0,594	0,803	0,763	0,639	0,405	0,250
150	1,240	1,108	1,067	0,872	0,654	0,903	0,882	0,752	0,500	0,313
180	1,310	1,175	1,149	0,957	0,733	0,973	0,963	0,850	0,589	0,381

* Média de quatro determinações.

TABELA 3. Continuação.

	Concentração do AHA (ug/ml)														
	500					1.000					2.000				
	Concentração do substrato (mM)														
	21,80	16,35	10,90	5,45	2,72	21,80	16,35	10,90	5,45	2,72	21,80	16,35	10,90	5,45	2,72
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,078	0,063	0,088	0,037	0,032	0,053	0,045	0,044	0,024	0,022	0,050	0,050	0,052	0,013	0,017	
0,156	0,118	0,096	0,076	0,050	0,097	0,116	0,068	0,038	0,076	0,066	0,066	0,065	0,029	0,024	
0,229	0,183	0,138	0,088	0,070	0,139	0,123	0,091	0,046	0,053	0,104	0,095	0,080	0,029	0,033	
0,307	0,248	0,186	0,112	0,101	0,194	0,163	0,133	0,073	0,056	0,133	0,126	0,099	0,041	0,039	
0,393	0,318	0,240	0,137	0,131	0,250	0,209	0,166	0,089	0,072	0,170	0,143	0,113	0,050	0,047	
0,472	0,381	0,283	0,167	0,156	0,299	0,251	0,211	0,107	0,090	0,206	0,167	0,133	0,057	0,054	
0,548	0,439	0,332	0,201	0,185	0,348	0,295	0,240	0,127	0,103	0,235	0,193	0,149	0,075	0,068	
0,608	0,496	0,371	0,234	0,210	0,393	0,335	0,275	0,147	0,127	0,262	0,214	0,167	0,096	0,076	
0,730	0,588	0,452	0,309	0,267	0,473	0,410	0,340	0,180	0,147	0,296	0,267	0,204	0,127	0,105	
0,827	0,673	0,519	0,397	0,323	0,547	0,480	0,402	0,220	0,176	0,346	0,314	0,231	0,163	0,123	

* Média de quatro determinações.

aqui reportada ocorra também em função de reação semelhante, isto é, o seqüestro do cobre pelo inibidor. Constantinides & Bedford (1967), trabalhando com a cinética da polifenoloxidase da maçã, observaram que EDTA, atuando como inibidor, não apresentou fenômeno de competição; acreditamos que com o AHA temos a ocorrência de um fenômeno semelhante.

Brent et al. (1971) observam que o AHA inibe a urease não competitivamente, e sendo, esta enzi-

ma, possuidora de zinco na molécula (Metzler 1977), acredita-se que este metal foi complexado, resultando a inibição não competitiva observada. Fenômeno semelhante observa-se com a complexação do cobre da polifenoloxidase.

Neilands (1967) observa a potente complexação de ácidos hidroxâmicos com o íon férrico, esta reação sendo conseqüência de um arranjo bastante estável. Quanto à complexação do cobre pelo AHA, observou-se que na concentração de

TABELA 4. Velocidades iniciais da preparação semipurificada.

Níveis de AHA	Concentração do substrato (mM)				
	2,72	5,42	10,90	16,35	21,80
0	0,0120	0,0150	0,0189	0,0200	0,0280
250	0,0025	0,0035	0,0055	0,0066	0,0077
500	0,0018	0,0023	0,0034	0,0041	0,0052
1.000	0,0016	0,0014	0,0024	0,0038	0,0035
2.000	0,0009	0,0008	0,0020	0,0026	0,0027

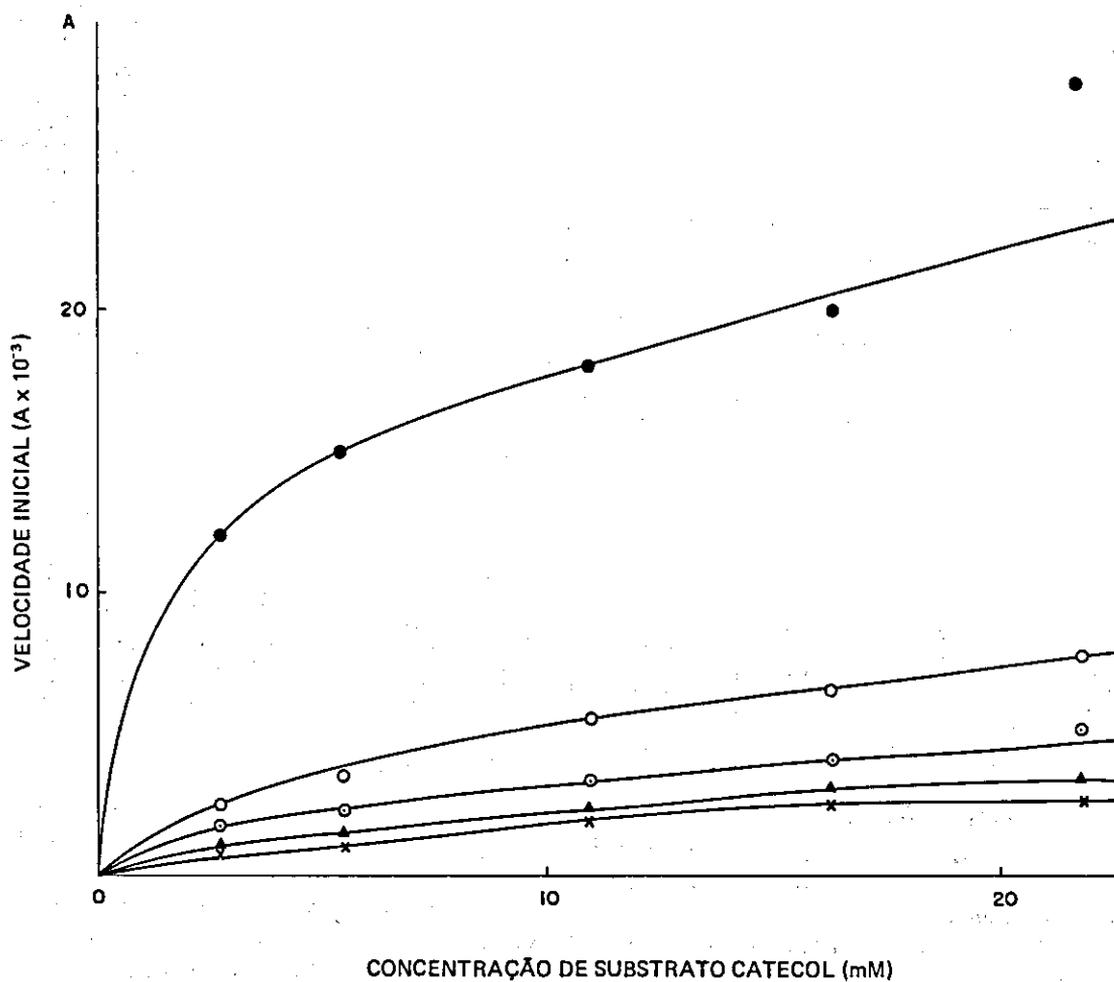


FIG. 1. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação com e sem adição do AHA. Sem adição (●-●-●), com AHA nas concentrações de 250 µg/ml (○-○-○), 500 µg/ml (◐-◐-◐), 1000 µg/ml (▲-▲-▲) e 2000 µg/ml (x-x-x).

TABELA 5. Atividades específicas observadas com e sem adição do AHA para diferentes concentrações de substrato.

Concentração substrato mM	0 AHA	250 AHA	500 AHA	1.000 AHA	2.000 AHA
21,80	121,7	33,5	22,6	14,0	11,8
16,35	86,9	28,6	17,8	12,5	11,1
10,90	83,2	24,0	14,7	10,5	8,6
5,45	65,2	15,2	10,1	5,9	3,6
2,72	52,2	10,9	7,7	5,0	3,9

TABELA 6. Valores duplos-recíprocos de Lineweaver-Burk em diferentes concentrações de AHA.

1/S (molar)	1/v				
	0	250	500	1.000	2.000
$4,59 \times 10^{+1}$	$1,23 \times 10^{-2}$	$2,98 \times 10^{-1}$	$4,42 \times 10^{-2}$	$7,14 \times 10^{-2}$	$8,47 \times 10^{-2}$
$6,12 \times 10^{+1}$	$1,72 \times 10^{-2}$	$3,50 \times 10^{-2}$	$4,42 \times 10^{-2}$	$8,00 \times 10^{-2}$	$9,01 \times 10^{-2}$
$9,17 \times 10^{+1}$	$1,82 \times 10^{-2}$	$4,17 \times 10^{-2}$	$5,62 \times 10^{-2}$	$9,52 \times 10^{-2}$	$11,63 \times 10^{-2}$
$18,35 \times 10^{+1}$	$2,30 \times 10^{-2}$	$6,58 \times 10^{-2}$	$9,90 \times 10^{-2}$	$16,95 \times 10^{-2}$	$27,78 \times 10^{-2}$
$36,76 \times 10^{+1}$	$2,87 \times 10^{-2}$	$9,17 \times 10^{-2}$	$12,99 \times 10^{-2}$	$20,00 \times 10^{-2}$	$25,64 \times 10^{-2}$

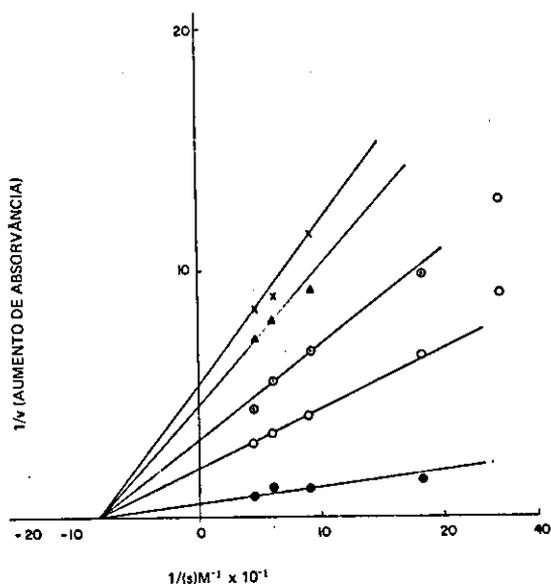


FIG. 2. Gráficos duplos recíprocos (Lineweaver - Burk) de $1/v$ e $1/(s)$ para polifenoloxidase extraída de batatinha variedade mineira. S = concentração de catecol, V = velocidade de reação medida como aumento da absorvância em 410 nm. AHA nas concentrações de 250 $\mu\text{g/ml}$ (O—O—O), 500 $\mu\text{g/ml}$ (●—●—●), 1000 $\mu\text{g/ml}$ (▲—▲—▲) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (x—x—x) sem adição de AHA. (●—●—●).

250 $\mu\text{g/ml}$ tem-se cerca de 75% de inibição da reação; acredita-se ser necessário estudar o tipo e a estabilidade do complexo formado, os possíveis usos, e as transformações que possam vir a ocorrer em processamentos industriais.

Observando, na determinação de proteína (Gornal et al. 1949) do extrato aquoso da enzima, uma concentração de 0,230 mg/ml, calcularam-se conforme Cowgill & Pardee (1963) as respectivas atividades específicas (atividade enzimática/mg de proteína), vistas na Tabela 5 e cujos valores inversos de concentração de substrato e da atividade específica (Tabela 6) também permitem o registro de um gráfico do tipo Lineweaver & Burk (1934) para inibição não competitiva (Fig. 2), cujo valor do km observado foi igual a $1,2 \times 10^{-2}$ M, valor semelhante ao achado por Adamson & Abigor (1980) para a polifenoloxidase de inhame, *Dioscorea alata*, numa preparação semi-purificada como a que usamos apesar de espécies vegetais diferentes.

CONCLUSÕES

1. Em face dos dados obtidos em função da adição do AHA quanto à cinética da polifenoloxidase,

acredita-se que o complexante combinou com o cobre do grupo prostético, resultando daí uma inibição não competitiva.

2. Considerando a simplicidade de sintetizar esta molécula acredita-se que a mesma terá numerosos usos nas ciências agropecuárias, ressaltando-se, porém, a necessidade de maiores estudos, principalmente quanto às possíveis transformações que possam ocorrer com a mesma em processos industriais.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, I. & ABIGOR, R. Transformation associated with catecholase in *Dioscorea alata* during storage. *Phytochemistry*, 19(8):1593-5, 1980.
- BAILEY, J.L. *Techniques in Protein Chemistry*. Amsterdam, Elsevier, 1967.
- BAINTNER JUNIOR, K. Prevention of urea poisoning with acetohydroxamic acid. *Allattenyesz*, 13:373, 1964.
- BRENT, B.E.; ADEPOJU, A. & PORTELA, F. In Vitro Inhibition of rumen urease with acetohydroxamic acid. *J. Anim. Sci.*, 32(4):794-98, 1971.
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K. *Outlines of biochemistry*. 3.ed. New York, John Wiley Sons, 1972.
- CONSTANTINIDES, S.M. & BEDFORD, C.L. Multiple forms of phenolase. *J. Food. Sci.*, 32(4):446-50, 1967.
- COWGILL, R.W. & PARDEE, A.B. *Biochemical research techniques*. 3.ed. New York, John Wiley & Sons, 1963.
- ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M. & TOWNSEND, R. *J. Food Biochemistry*. New York, Academic Press, 1971.
- FISHBEIN, W.N., CARBONE, P.P. & HOCHSTEIN, D.H. Acetohydroxamate; bacterial urease inhibitor with therapeutic potential in hyperammonaemic states. *Nature*, 208(5005):46-8, 1965a.
- FISHBEIN, W.N.; WINTER, T.S. & DAVIDSON, J.D. Urease catalysis. I. Stoichiometry, specificity and kinetics of a second substrate: hydroxyurea. *J. Biol. Chem.*, 240(6):2402-6, 1965b.
- FISHBEIN, W.N.; DALY, J. & OSTREETER, C.L. Preparation and some properties of stable and C-14 tritium labeled short-chain aliphatic hydroxamic acid. *Anal. Biochem.*, 28(1):13-24, 1969.
- GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., eds. *Method in enzymology*. New York, Academic Press, 1955. v.1, p.138-46.
- GORNAL, A.G.; BARDAWILL, C.S. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177(2):751-66, 1949.
- LINWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3):658-66, 1934.
- MATHEW, A.G. & PARPIA, H.A.B. Food browning as a polyphenol reaction. In: CHICHESTER, C.O.; MRAK, E.M. & STEWART, G.F., eds. *Advances of Food Research*. New York, Academic Press, 1971. v.19, p.75-145.
- METZLER, D.E. *Biochemistry, the Chemical Reactions of Living Cells*. New York, Academic Press, 1977.
- MUNETI, P. Bisulfite inhibition of enzymatic blackening caused by tyrosine oxidation. *Am. Potato J.*, 43(11):397-404, 1966.
- MUNETI, P. Comparisons of inhibitors of tyrosine oxidation in the enzymatic blackening of potatoes. *Am. Potato J.*, 58(2):85-92, 1981.
- MUNETI, P. & WANG, H. Influence of pH and bisulfite on the enzymatic blackening reaction in potatoes. *Am. Potato J.*, 54(2):73-81, 1977.
- NEILANDS, J.B. Hydroxamic acids in nature. *Science*, 156(3781):1443-47, 1967.
- PORTELA, F. Determinação de qualidades culinárias de variedades de batatinha pela análise sensorial e atividade da polifenoloxidase. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 17(8):1221-25, 1982.
- RICHARDSON, T. Enzymes. In: FENNEMA, O.R., ed. *Principles of Food Science Part. I: Food Chemistry*. New York, Marcel Dekker, 1967, p.285-346.
- SATO, M. Inhibition by oxalates of spinach chloroplast phenolase in unfrozen and frozen states. *Phytochemistry*, 19(8):1613-17, 1980.
- SHARMA, R.C. & ALI, R. Isolation and characterization of catechol oxidase from *Solanum melongena*. *Phytochemistry*, 19(8):1597-600, 1980.
- WEAVER, M.L.; HAUTADA, E. & REEVE, R.M. Distribution of oxidase enzymes in potato tubers relatively to blackspot susceptibility. I. Phenolase. *Am. Potato J.*, 47(12):479-88, 1970.