

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO PELA POLIFENOLOXIDASE EM PÊSSEGOS DAS CV. GRANADA, JADE, ESMERALDA E MACIEL

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYMATIC BROWNING FOR POLYPHENOLOXIDASES IN PEACHES OF THE CV. GRANADA, JADE, ESMERALDA AND MACIEL

TORALLES, Ricardo. P.¹; VENDRUSCOLO, João L.²; HAAS, Lírio. I. R.³; FERRI, Núbia L.⁴; DEL PINO Francisco A. B.⁵; ANTUNES, Pedro L.⁶

RESUMO

Polifenoloxidasas (PPO) foram extraídas de quatro cultivares de pêssegos utilizando o método “pó-de-acetona”, parcialmente purificada por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de diálise. As cultivares estudadas foram: Granada, Jade, Esmeralda e Maciel. O efeito da concentração do catecol na atividade da PPO foi avaliado pelo incremento da absorbância a 420nm, pH 6,2 e 30°C. Através de um estudo comparativo entre concentração total de fenóis, constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) e o coeficiente de especificidade (V_{max}/K_m), obteve-se uma projeção do potencial de escurecimento enzimático entre as cultivares selecionadas para o estudo. Por eletroforese horizontal em gel de policrilamida foi possível identificar as isoenzimas.

Palavras-chave: Potencial de escurecimento, cinética da PPO, fenóis totais e isoenzimas.

INTRODUÇÃO

A cor é um dos fatores importantes que determina a qualidade em frutos “in natura”, polpas, sucos, néctares e enlatados de pêssegos (SISTRUNK et al., 1976; 1979; LEONARD et al., 1981; ROBERTSON & MEREDITH, 1988; MEDEIROS & RASEIRA, 1998). As alterações de cor podem ocorrer através de reações de origem não enzimática ou enzimática (LUH, 1980; JOHNSON et al., 1998; GARZA et al., 2000). Nesse segundo caso, destacam-se as atividades das enzimas polifenoloxidasas (E.C. 1.14.18.1; PPO) e as peroxidases (E.C. 1.11.1.7; POD) (WHITAKER, 1994; TROIANI et al., 2001).

As polifenoloxidasas são citadas como as principais responsáveis pelo escurecimento enzimático em pêssegos (CHENG & CRISOTO, 1995; GIRNER, 2002). Estas apresentam cobre em sua estrutura molecular, atividade principalmente para o catecol e catalisam reações de oxidorredução em que a própria PPO funciona como receptor de elétrons (WHITAKER, 1994).

Essas enzimas são conhecidas de longa data em pêssegos (FLURKEY & JEN, 1978; ALBA et al., 1996; AGARWALI et al., 2001; GIRNER et al., 2002). Entretanto,

pouco tem sido reportado em relação à atividade das polifenoloxidasas em cultivares brasileiras, principalmente em relação ao conhecimento da constante de Michaelis-Menten (K_m) e o coeficiente de especificidade (V_{max}/K_m). Estas são amplamente utilizadas para o estudo do escurecimento enzimático “in vitro” (REYS & LUH, 1960; LUH & PHITHAKPOL, 1972; OKTAY et al. 1995). Por outro lado, TORALLES et al. (2003) determinaram atividade ótima da PPO de pêssego da cultivar Granada está faixa de 5,5-6,5 a 30°C. Esta é uma cultivar grande expressão comercial, representando aproximadamente 20% da produção da Região Sul do RS.

Objetivou-se isolar as PPOs das cultivares Granada, Jade, Esmeralda e Maciel para fazer um estudo comparativo quanto ao potencial de escurecimento enzimático. As variáveis selecionadas foram K_m aparente, coeficiente de especificidade (V_{max}/K_m) e fenóis totais. Também foram determinadas as características físico-químicas e isoenzimáticas das cultivares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pêssegos de quatro cultivares: Granada, Jade, Esmeralda e Maciel foram colhidos em pomar comercial da região de Pelotas/RS. Selecionaram-se frutos sem defeitos e maduros, os quais foram posteriormente, armazenados em câmara fria entre 1-3°C.

O peso, acidez total (AT) e sólidos solúveis (SS) foram determinado em cinco repetições, com cinco pêssegos cada, segundo metodologia da AOAC (2000). Os fenóis totais foram analisados segundo o método de SINGLETON & ROSSI (1965). A coloração dos frutos foi determinada através de colorímetro Minolta CR-300. A firmeza, expressa em Newtons(N), foi medida na parede do fruto utilizando penetrômetro McCormick com ponta de 8 mm. A técnica de extração da enzima PPO, “pó-de-acetona”, foi adaptada de FLURKEY & JEN (1978) e a pré-purificação foi baseada em OKTAY et al. (1995). O teor de proteínas no extrato enzimático

¹ Engenheiro Químico, MSc. Prof. CAVG/UFPEL, aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação do-DCTA/FAEM/UFPEL. E-mail: torashow@ig.com.br

² Engenheiro de Alimentos, Dr. Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – Pelotas-RS.

³ Graduando em Agronomia da FAEM/UFPEL, bolsista PIBIC-CNPq.

⁴ Química, Auxiliar de operações III da Embrapa Clima Temperado – Pelotas-RS.

⁵ Químico, Dr. Prof. do Departamento Bioquímica/UFPEL.

⁶ Agrônomo, Dr. Prof. do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/UFPEL.

(Recebido para publicação em 28/07/2003, Aprovado em 18/12/2003)

foi determinado pelo método de LOWRY (1951), com padrão de albumina soro bovino (ASB).

O acompanhamento da atividade no meio reativo foi conduzido através do incremento na absorbância a 420nm utilizando um espectrofotômetro Genesys 10 UV/VIS. Essa mistura consistia de 6,0 mL de tampão fosfato-citrato (pH=6,2), 3,0 mL de catecol e 1,0 ml de extrato enzimático, variando a concentração final de catecol no meio reativo de 0 até 50 mM. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causa o incremento na absorbância 0,01/min.

A determinação da constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) foi através do ajuste dos dados ao modelo cinético de Michaelis-Menten utilizando os recursos computacionais do Statistic 98.

As isoenzimas foram visualizadas através de eletroforese horizontal. As placas de gel de poli-acrilamida (5%) e o tampão de corrida (pH=8,3) foram preparadas de acordo com método de SCANDALIOS(1969) para separar as isoenzimas das quatro cultivares. Após completar a corrida, no gel foi revelada a PPO por imersão em tampão citrato(0,1M)-fosfato(0,2M) pH=6,2 contendo 10mM de catecol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físicas e químicas

Na Tabela 1 pode ser vistas as características das cultivares estudadas. Quanto à cor e firmeza, as características foram entre meio maduro e maduro (ROBERTSON & MEREDITH, 1988). As cultivares Granada e Maciel foram as que tiveram a relação SS/AT mais elevada. Esse valor, geralmente, é um bom indicativo de preferência de sabor. A cultivar Maciel foi a que apresentou maior concentração de fenóis totais medido na polpa, estando intimamente relacionado com escurecimento enzimático, pois serve de substrato para PPO.

Efeito da concentração do catecol

Na Figura 1, observa-se a influência da concentração do catecol, como substrato, na velocidade de escurecimento das polifenoloxidases das quatro cultivares em estudo. De modo geral, a velocidade de oxidação do catecol versus sua concentração foi hiperbólica na primeira parte da curva, sugerindo a cinética de Michaelis-Menten para as PPO. Na segunda parte, para PPO-Granada, a velocidade decresce acima de 38mM. Essa inativação pode ser resultado de uma inibição clássica por substrato. As demais enzimas não apresentaram esse tipo de inibição e tiveram um platô bem definido na segunda parte da curva. As PPO-Esmeralda e PPO-Maciel foram as que apresentaram velocidade de

oxidação mais acentuada na primeira parte da curva, ou seja, com pouco substrato apresentam elevado escurecimento.

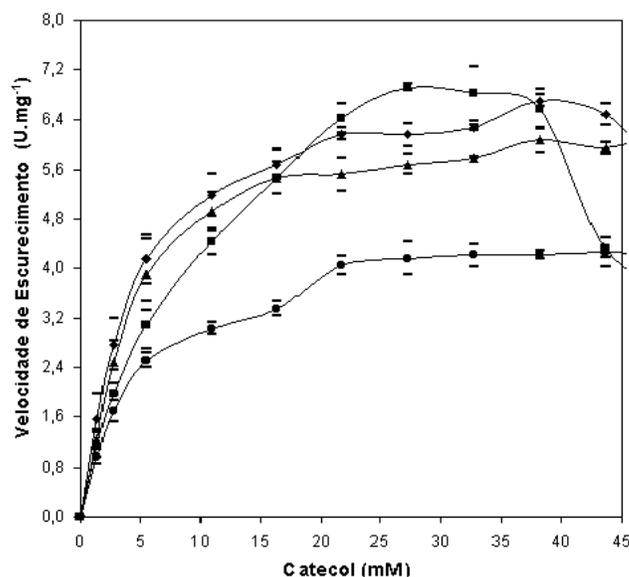


Figura 1 - Efeito da concentração do substrato na reação de escurecimento enzimático catalisada por diferentes polifenoloxidases. Tipo: PPO-Granada (■); PPO-Jade (●); PPO-Esmeralda (▲); PPO-Maciel (◆). Substrato: diferentes concentrações de catecol; Tampão: citrato (0,1M)-fosfato (0,2M) pH= 6,2. Temperatura: 30±0,1°C. Enzima: 1,0 mL em 10 mL de meio reativo.

Constante Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max})

Os dados da Figura 1 foram ajustados por regressão não linear e os valores aparentes de K_m das cultivares Granada, Jade, Esmeralda e Maciel foram, respectivamente, 10,0; 5,3; 4,4 e 4,4mM de catecol (Tabela 2). LUH & PHITHAKPOL (1972) determinaram um K_m de 15 mM para cultivar Halford tipo caroço aderido. As cultivares Esmeralda e Maciel apresentaram menor K_m e, portanto, maior afinidade pelo catecol, ou seja, são mais propensas ao rápido escurecimento enzimático provocado pela PPO. Encontrou-se uma relação crescente do coeficiente de especificidade (V_{max}/K_m), sendo um bom indicador cinético do estudo "in vitro" e, portanto, possível de ser utilizada como indicador de escurecimento em polpa.

Tabela 1 - Características físico-químicas das cultivares.

| Avaliações | Granada | Jade | Esmeralda | Maciel |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Peso(g) | 115,93±10,53 | 109,80±6,03 | 107,10±4,90 | 126,74±10,81 |
| Acidez total (AT), (% ác. cítrico) | 0,74±0,04 | 0,86±0,01 | 0,88±0,05 | 0,70±0,05 |
| Sólidos solúveis (SS) a 25°C | 10,37±0,83 | 9,30±0,55 | 9±0,22 | 11,03±0,40 |
| SS/AT | 14,05±1,12 | 10,87±0,58 | 10,26±0,37 | 15,91±0,94 |
| Fenóis totais (µg de catecol.g ⁻¹) | 191,01±44,52 | 231,17±46,99 | 196,12±27,20 | 580,87±18,15 |
| Cor (ângulo Hue) | 78 | 79 | 77 | 78 |
| Firmeza (N) | 27 | 35 | 38 | 42 |

Tabela 2 - Constante de Michaelis (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) da PPO para as quatro cultivares de pêssego.

| Cultivar | Variância (%) | Parâmetros biocinéticos | | |
|-----------|---------------|-------------------------|------------------------------|---|
| | | K_m (mM) | V_{max} U.mg ⁻¹ | V_{max}/K_m U.mg ⁻¹ .M ⁻¹ |
| Granada | 99,6 | 10,0 | 8,8 | 880 |
| Jade | 99,1 | 5,3 | 4,8 | 906 |
| Esmeralda | 99,4 | 4,4 | 6,7 | 1525 |
| Maciel | 99,7 | 4,4 | 7,3 | 1659 |

Concentração de fenóis versus K_m aparente

Na Figura 2, compara-se fenóis totais avaliado na polpa e K_m das PPO das quatro cultivares. A cultivar Granada teve o menor teor para fenóis totais (1,73 mM), portanto, não alcança a quantidade necessária de catecol, $K_m = 10\text{mM}$, para atingir a metade da velocidade máxima. Uma projeção para potencial de escurecimento enzimático, em ordem crescente, levando em consideração oferta (fenóis totais) e demanda (K_m) seria Granada, Jade, Esmeralda e Maciel. Esta ordem é coincidente com a ordem obtida através da relação do coeficiente de especificidade (V_{max}/K_m).

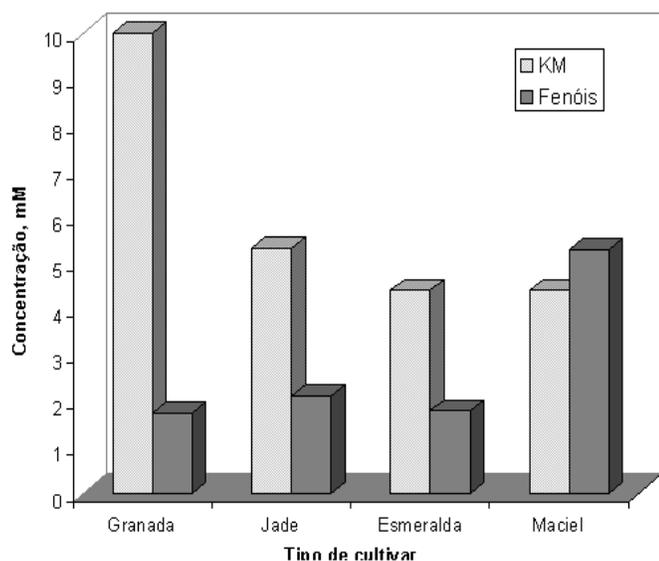


Figura 2 - Comparação entre concentração de fenóis e K_m para quatro cultivares.

Eletroforese

Duas isoenzimas foram identificadas por gel de poliacrilamida e detectadas com catecol (Figura 3). Para as cultivares Maciel, Esmeralda e Jade a banda com menor mobilidade relativa foi a que apresentou maior atividade. Já para a Granada, a banda com maior mobilidade foi a que apresentou maior atividade e, considerando, que a PPO-granada foi a que teve menor coeficiente de especificidade, é, bem provável, que a isoenzima com mobilidade relativa de 0,45 não seja a responsável pela forte atividade apresentada pela PPO-Maciel e PPO-Esmeralda. Estudos mais completos estão sendo executados para validar ou não esta hipótese.

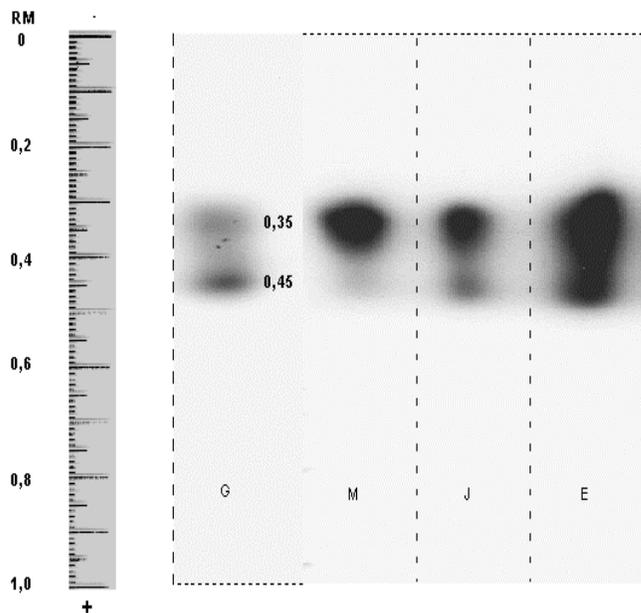


Figura 3 - Mobilidade relativa de polifenoloxidases de quatro cultivares de pêssego em eletroforese de gel de poliacrilamida: Granada (G), Jade (J), Maciel e Esmeralda (E).

CONCLUSÃO

Das quatro cultivares estudadas, a Granada teve o menor escurecimento enzimático, decorrente de seu maior K_m e menor teor fenóis totais na polpa. A ordem crescente de escurecimento enzimático foi Granada, Jade, Esmeralda e Maciel quanto a K_m , coeficiente de especificidade e fenóis totais.

Encontraram-se duas isoenzimas em cada cultivar, podendo a isoenzima com 0,35 de mobilidade relativa ser responsável pelo maior escurecimento enzimático provocado pela PPO-Maciel e PPO-Esmeralda em catecol.

ABSTRACT

The polyphenoloxidases (PPO) were extracted from four different clingstone peaches using the acetone powder method, partially purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialysis. Clingstone peaches cultivars investigated were: Granada, Jade, Esmeralda and Maciel. The effect of catechol on the PPO activity was measured by increase in absorbance at 420nm, pH 6,2 and 30°C. Through a comparative study done among total phenolics, apparent constant of Michaelis-Menten (K_m) and specificity coefficients (V_{max}/K_m) was obtained a projection of the potential of enzymatic browning among clingstone peaches selected for the study. By horizontal eletrophoresis in polyacrylamide gel was possible to identify the isoenzymes.

Key words: Browning potential , PPO kinetics, total phenolics and isoenzymes.

REFERÊNCIAS

AGARWAL S., NATH A.K., SHARMA, D. R. Characterization of peach (*Prunus persica*, L.) cultivars using isozymes as

- molecular markers. **Scientia Horticulture**, v. 90, p.227-242, 2001.
- ALBA C.M., de FORCHETTI S.M., TIGIER H.A. Peroxidase and phenoloxidase activities in peach endocarp. In: C. OBINGER, U. BURNER, R. EBERMANN, C. PENELI & H. GREPPIN (Ed.) **Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology**. University of Geneva, 1996. p. 243-246.
- AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. William Horwitz, ed. Maryland: AOAC International, 2000.
- CHENG, W. C.; CRISOTO, C. H. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 120, n. 5, p. 835-838, 1995.
- FLURKEY, W.; JEN, J. Peroxidase and polyphenol oxidase actives in developing peaches. **Journal of Food Science**, v. 43, p.1826-1831, 1978.
- GARZA, S.; IBARAZ, A.; PAGAN, J. et al. Non-enzymatic in peach pure during heating. **Food Research International**, v.32, n. 5, p. 335-343, 2000.
- GIRNER, J.; ORTEGA, M.; MESEGUE, M. et al. Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. **Journal of Food Science**, v. 37, n. 4, p. 264-267, 2002.
- JOHNSON, J. R.; BRADDOCK, R. J.; CHEN, C. S. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. **Journal of Food Engineering**, v. 60, n. 3, p. 502-505, 1998.
- LEONARD, S. J.; LUH, B. S.; CHILCHESTER, C. O. et al. Relationship of fresh cling stone peach color to color and grade after canning. **Food Technology**, v.15, p.492-497, 1981.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAR, A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, p.193-265, 1951.
- LUH, B. S.; PHITAKPOL, B. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. **Journal Food Science**, v. 37, p.264-267, 1972.
- LUH, B. S. Nectars, pulpy juices and fruit juice blends. In: NELSON, P.; TRESSLER, D. (Ed.) **Fruit and vegetable juice processing technology**. Wesport: AVI, 1980. cap.10, p. 436-505.
- MEDEIROS, C. A.; RASEIRA, M. C. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa SPI, 1998. 350 p.
- OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, I.; KOCAÇALISKAN, I. et al. Polyphenoloxidase from Amaya apple. **Journal Food Science**, v. 60, n. 3, p.494-496, 1995.
- REYES, P.; LUH, B. S. Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. **Food Technology**, v.14, p. 570-575, 1960.
- ROBERTSON, J. A.; MEREDITH, F. I. Physical, chemical and sensory evaluation of flordaking peaches stored under different conditions. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 101, p. 272-275, 1988.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, p. 37-79, 1969.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SISTRUNK, W.; ROM, R. C. Quality attributes of peaches for processing. **Arkansas Farm Research**, May-June, 1976.
- SISTRUNK, W.; ROM, R.; MOORE, J. et al. Quality Parameters for Evaluating Clingstone Peach Selections. **Arkansas Farm Research**, December 1979.
- TROIANI; E. P., TROPIANI; C. T.; CLEMENTE, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase em uva. In: Encontro Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 7. **Anais...** Curitiba, SBCTA. 2001. p. ABQ5-09.
- TORALLES, R. T.; VENDRUSCOLO, J. L.; BELARMINO, V. et al. Estudo de parâmetros relacionados ao escurecimento enzimático pela polifenoloxidase em pêssegos da cultivar Granada. In: Simpósio de Tecnologia de Alimentos, 2. **Anais...** Florianópolis: SBCTA. 2003. p. 301-307.
- WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625 p.