

ADEQUAÇÃO DE ALÍQUOTA DE EXTRATO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PPO E POD NAS CULTIVARES ESAM1 E MÃE DE FAMÍLIA DE BATATA-DOCE COLHIDAS EM DIFERENTES ÉPOCAS

ADDITION OF EXTRACT ALIQUOTE FOR DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF PPO AND POD IN CULTIVARS ESAM1 AND MÃE DE FAMÍLIA OF SWEET POTATOES COLLIDED IN DIFFERENT AGES

Fonseca, KS¹; Almeida, SL¹; Morais, MAS¹; Alves RM¹; Simões, AN¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, CEP 56900-000, Serra Talhada-PE. Brasil. kelemsilva@yahoo.com.br; samara_lopes_almeida@gmail.com; aparecida8sm@gmail.com; rafaelalvesmateus@gmail.com; adrianosimoesuast@gmail.com

Resumo

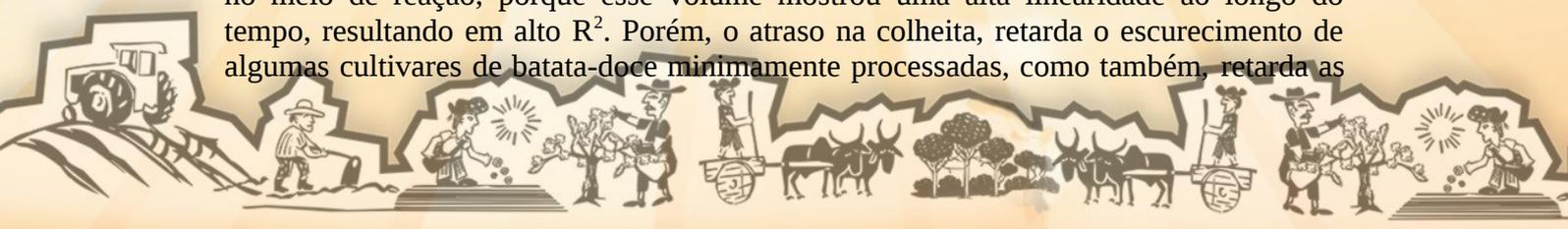
As enzimas polifenoloxidasas e peroxidases são enzimas envolvidas no escurecimento dos tecidos de batatas-doces cortadas. A intensidade desse escurecimento pode-se diferenciar tanto em função da cultivar, quanto épocas de colheita. Raízes de batata-doce das cultivares ESAM1 e Mãe de Família foram cultivadas e colhidas após 120; 150 e 180 dias de cultivo. Após esses tempos, foram transportadas para o Laboratório da Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST). No laboratório, as raízes foram selecionadas e minimamente processadas no formato rodela (2 cm) e retirado amostragens para determinação da atividade da PPO e POD. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x5, sendo duas cultivares de batata-doce (ESAM1 e Mãe de Família), três idades de colheita (120, 150 e 180 dias) e cinco alíquotas de extrato (10, 20, 30, 40 e 50 µL), com 4 repetições. Observou-se que a declividade das curvas das atividades da PPO e POD aumentaram nas duas cultivares, a medida que se aumentou o tempo de reação, em todas as idades de colheita. A partir de uma alíquota de 30 µL com leitura de 2 minutos é capaz de se determinar a atividade da PPO e da POD tanto para cultivar ESAM 1, quanto para a cultivar Mãe de Família, e para todas as idades de colheita estudadas.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas* L. (Lam.), Peroxidase, Polifenoloxidase.

Introdução:

As Polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) são classes de proteínas que catalizam reações de oxidação de compostos fenólicos, produzindo pigmentos escuros pelo corte ou na superfície de frutas e hortaliças (MISHRA, GAUTAM, SHARMA, 2013). As Peroxidases (POD; EC 1.11.1.7) são enzimas que catalizam reações peroxidativas, oxidativas catalítica e de hidroxilação (MINIBAYEVA; BECKETT; KRANNER, 2015). Estão envolvidas no amadurecimento e senescência, na defesa de plantas e reações de escurecimento (MINIBAYEVA; BECKETT; KRANNER, 2015). Ambas, parecem estar envolvidas no escurecimento de batata-doce, *Ipomoea batatas* L. (Lam.) (ALMEIDA, 2018).

A intensidade de escurecimento depende de diversos fatores genéticos e ambientais, nos quais devem ser estudados com certo rigor. Albuquerque et al. (2017), verificaram que a atividade da PPO de tecidos de batatas-doces cortadas, comporta-se diferente em função da cultivar, mesmo padronizando o protocolo de extração e de ensaio. Nos seus estudos, foi padronizado uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático no meio de reação, porque esse volume mostrou uma alta linearidade ao longo do tempo, resultando em alto R². Porém, o atraso na colheita, retarda o escurecimento de algumas cultivares de batata-doce minimamente processadas, como também, retarda as



atividades da PPO e POD (ALMEIDA, 2018). Isso torna o protocolo de determinação de atividade específico para cada condição estudada.

Assim, verificar a curva resposta relacionada a atividade da PPO e POD, em tecidos de batatas-doces colhidas em diferentes idades é importante para padronização de alíquotas e dados mais confiáveis.

Objetivou-se com este trabalho ajustar alíquotas de extratos para determinação da atividade da PPO e POD, de tecidos de diferentes cultivares de batata-doce, previamente colhidas em diferentes idades.

Metodologia:

Raízes de batata-doce das cultivares ESAM1 e Mãe de Família, foram cultivadas e colhidas após 120; 150 e 180 dias de cultivo. Após a colheita, foram transportadas para o Laboratório da Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST).

No Laboratório, as raízes foram selecionadas e minimamente processadas nos formatos rodela (2 cm) e retirado amostragens para determinação da atividade da PPO e POD.

A determinação da atividade das enzimas PPO e POD foram realizadas de acordo com Simões et al.(2015). Amostras de 0,25 g de batata doce foram maceradas em 6 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 6,0) gelado. O extrato foi centrifugado a 7.960 x g por 23 minutos a 4 °C.

O ensaio da PPO foi determinado de acordo com Simões et al., (2015), pela adição de 10, 20, 30 40 e 50 µL do sobrenadante ao meio de reação contendo 1490, 1480, 1470, 1460 e 1450 µL, respectivamente de tampão de fosfato 0,2 M, (pH 6,0) e 1500 µL de catecol 0,2 M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo libra S8, Biochrom) a 425 nm, a uma temperatura de 25 °C, por 1, 2 e 3 minutos com intervalo entre leituras de 30 segundos. A atividade da PPO foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 3.400 mM⁻¹ cm⁻¹ para catecol, e expressa em mmol min⁻¹ g⁻¹ MF⁻¹. Para o controle, o catecol foi substituído pelo tampão de reação, tampão fosfato.

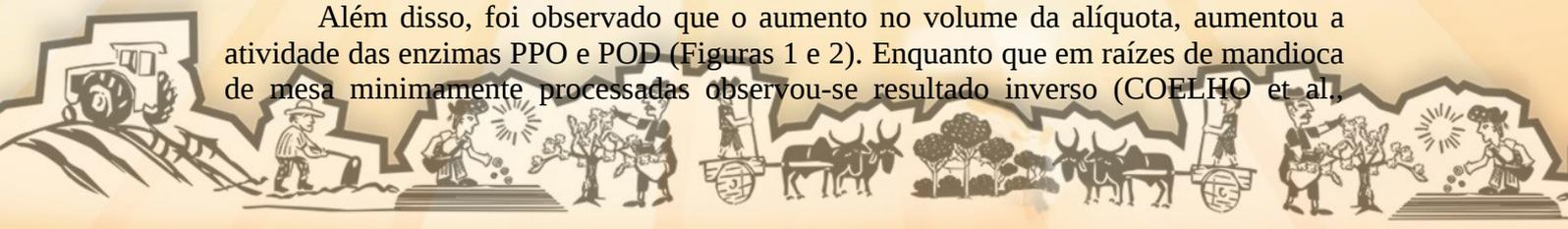
O ensaio da POD foi determinado de acordo com Simões et al., 2015, pela adição de 10, 20, 30, 40 e 50 µL do sobrenadante ao meio de reação contendo contendo 1790, 1780, 1770, 1760 e 1750 µL, respectivamente, de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0), 100 µL de guaiacol (0,5%) e 100 µL de peróxido de hidrogênio (0,08%). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo libra S8, Biochrom) a 470 nm, a uma temperatura de 30 °C, a cada 1, 2 e 3 minutos. A atividade da peroxidase foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ para guaiacol, e expressa em nmol min⁻¹ g MF⁻¹. Para o controle, o guaiacol foi substituído pelo tampão de reação, tampão fosfato.

O delineamento experimento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x5, sendo duas cultivares de batata-doce (ESAM1 e Mãe de família), três idades de colheita (120, 150 e 180 dias) e cinco alíquotas de extrato (10, 20, 30, 40 e 50 µL), com 4 repetições.

Resultados e discussão:

Observou-se que a declividade das curvas das atividades da PPO e POD aumentaram nas duas cultivares, a medida que se aumentou o tempo de reação, em todas as idades de colheita (Figuras 1 e 2). Percebeu-se que no tempo de 2 e 3 minutos essas declividades ficaram mais próximas, em relação a declividade de 1 minuto (Figuras 1 e 2).

Além disso, foi observado que o aumento no volume da alíquota, aumentou a atividade das enzimas PPO e POD (Figuras 1 e 2). Enquanto que em raízes de mandioca de mesa minimamente processadas observou-se resultado inverso (COELHO et al.,



2015). Esses aumentos também foram mais intensos, com 2 e 3 minutos de reação (Figuras 1 e 2).

Em todos os casos, a curva resposta nos tempos e nos volumes estudados apresentaram alta linearidade, acima e 90%. Isso possibilita utilização dos volumes e tempos estudados para os estudos de conservação das cultivares de batata-doce ESAM 1 e Mãe de Família. Porém, neste caso foi preferido utilizar tempos intermediários, 2 minutos, e também alíquotas intermediárias, 30 µL, para os estudos nas condições estudadas.

Esse tipo de estudo é importante para se determinar a linearidade da resposta enzimática, pois, caso não haja, é possível que esteja ocorrendo interferência na reação, como falta de substrato, ou algum tipo de inibição, como foi observado por Albuquerque et al. (2017).

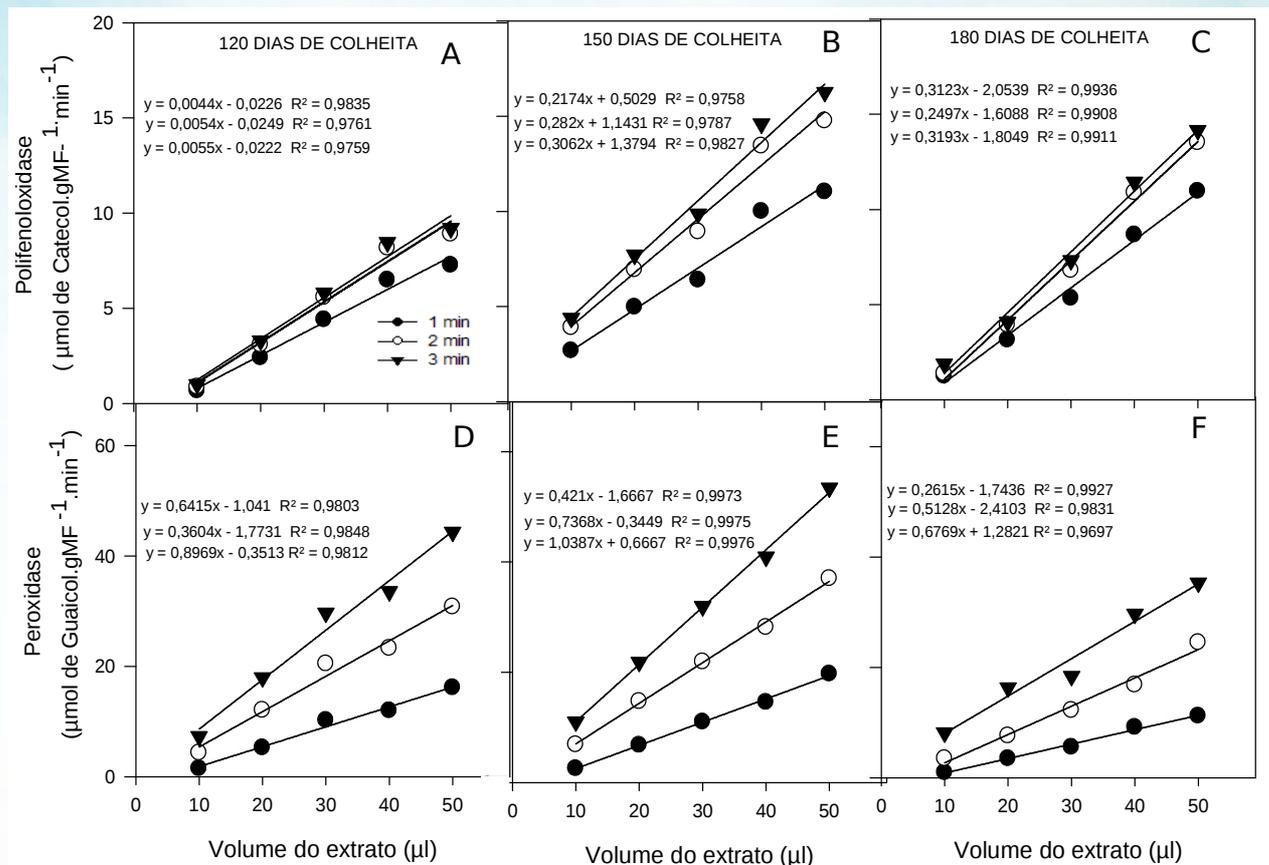


Figura 1: Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em raízes de batata-doce da cultivar ESAM1 minimamente processadas e colhidas aos 120 (A,D), 150 (B, E) e 180 (C, F) dias.



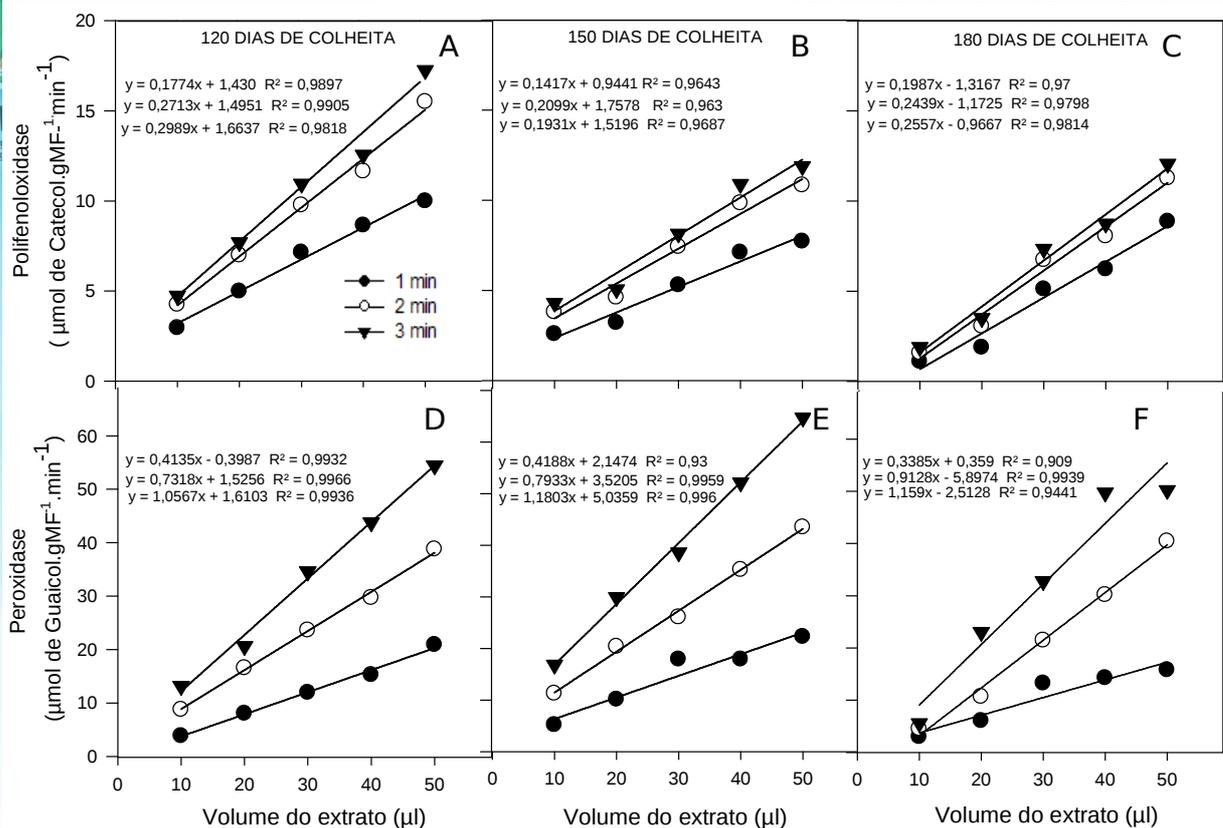


Figura 2: Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em raízes de batata doce da cultivar Mãe de Família minimamente processadas e colhidas aos 120 (A,D), 150 (B, E) e 180 (C, F) dias.

Conclusões:

Conclui-se que uma alíquota de 30 µL com leitura de 2 minutos é capaz de determinar a atividade da PPO e da POD tanto para cultivar ESAM 1, quanto para a cultivar Mãe de Família, e para todas as idades de colheita estudadas.

Estudos como esse contribuem para a obtenção de importantes protocolos laboratoriais.

Agradecimentos: CAPES (Processo: 88881-159183/2017-01), CNPq e FACEPE (Processos: BCT-0191-5.01/17 e APQ-0795-5.01/16).

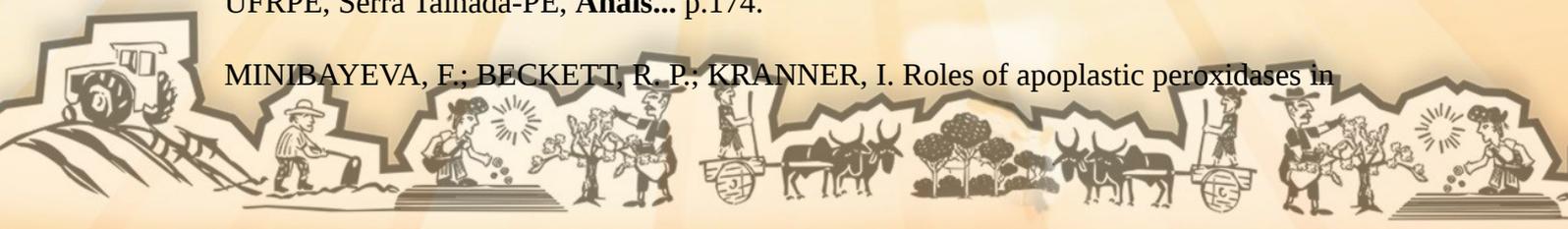
Referências

ALMEIDA, S.L. Cultivares de batata doce colhidas em diferentes épocas para processamento mínimo. 2018.76 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2018.

ALBUQUERQUE, J.R.T.; COELHO JÚNIOR, L.F.C.; MÉLO NETO, D.F.; DE ANDRADE, M.T.; MATIAS, J.R.; SIMÕES, A.N.; BARROS JÚNIOR, A.P. Adequacy of the extract aliquot for determining the activity of polyphenoloxidase in sweet potato varieties. *Amaz. Jour. of Plant Resear*, v. 1, p. 20-23, 2017.

COELHO, D. G.; MELO NETO, D. F.; ANDRADE, M. T.; DINIZ, N. B.; MORAIS, M. A. S.; SIMÕES, A. N. Adequação da alíquota de extrato para quantificar atividade enzimática em mandioca de mesa. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, Serra Talhada-PE, *Anais...* p.174.

MINIBAYEVA, F.; BECKETT, R. P.; KRANNER, I. Roles of apoplastic peroxidases in





contato@sinprovs.com.br
WWW.SINPROVS.COM.BR
(83) 3322-3222

plant response to wounding. **Phytochemistry**, v. 112, n. 1, p. 122–129, 2015.

MISHRA, B. B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). **Food Chemistry**, v. 139, p.105-144, 2013.

SIMÕES, A.N.; MOREIRA, S.I.; MOSQUIM, P.R.; SOARES, N.F.F.; PUSCHMANN, R. The effects of storage temperature on the quality and phenolic metabolism of whole and minimally processed kale leaves. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, p. 101-107, 2015.

