



EXPRESSÃO ENZIMÁTICA EM FRUTAS QUE RECEBERAM TRATAMENTOS FÍSICOS NA PÓS-COLHEITA

Mayara Silva **Ponte**¹; Katia de Lima **Nechet**²; Elke Simoni Dias **Vilela**³; Monica Pirola **Vicelli**⁴;
Daniel **Terao**⁵

Nº 15420

RESUMO - O mercado é exigente no que diz respeito à qualidade de frutas, sem resíduos químicos, o que leva a uma demanda por tecnologias alternativas limpas nos tratamentos de pós-colheita. O estudo da atividade enzimática de frutas permite modular a ação da enzima como um marcador bioquímico de estresse, que pode resultar tanto na ativação de mecanismos de defesa contra fitopatógenos, bem como na aceleração do processo de senescência da fruta. Assim, o trabalho teve como objetivo determinar as atividades das enzimas peroxidases (PO), polifenoloxidasas (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) em manga Tommy Atkins submetida a tratamentos físicos na pós-colheita, por aspersão de água aquecida a 65 °C (TT), durante 15 s; pela irradiação de luz ultravioleta-C (UVC) na dose de 2,5 kJ m⁻²; pela combinação dos dois tratamentos TT+UVC e uma testemunha. Após a aplicação dos tratamentos os frutos foram armazenados em câmara fria (10 ± 2°C e 85-90% UR) e as amostras coletadas diariamente até cinco dias de armazenamento. De maneira geral, a expressão da PO e da PPO foi maior em frutas que receberam os tratamentos físicos, com destaque para aquelas tratadas com a combinação de TT+UVC. Quanto a FAL, observou-se uma tendência de elevação na sua expressão, ao longo do período de avaliação, para mangas tratadas com TT isoladamente ou combinado com a luz UVC, que apresentou uma tendência a queda a partir do quarto dia. Conclui-se que os tratamentos físicos avaliados podem interferir no metabolismo da manga, pela alteração na expressão das atividades enzimáticas, podendo induzir mecanismos de resistência a fitopatógenos.

Palavras-chaves: manga, peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase, tratamento alternativo.

¹ Autor, Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências dos Alimentos, ESALQ/USP, Piracicaba-SP; mayara.ponte@usp.br

² Colaborador, Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.br

³ Colaborador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; elke.vilela@embrapa.br

⁴ Colaborador, Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP; moviecelli@hotmail.com

⁵ Orientador, Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; daniel.terao@embrapa.br



ABSTRACT- *The market is demanding for fruit quality, without chemical residues, which leads to a demand for alternative technologies of clean post-harvest treatments. The enzyme activities of fruits allows modulating the action of the enzyme as a biochemical marker of stress, which can result in activation of defense mechanisms against pathogenic agents or accelerating fruit senescence process. Thus, this study aimed to analyze the activities of oxidative enzymes, peroxidase, polifenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase on mango Tommy Atkins subjected to physical treatments on postharvest, by hot water brushing treatment at 65 °C (TT) for 15 s; by irradiating of ultraviolet-C light (UVC) at 2.5 kJ m⁻²; by combining the two treatments TT + UVC and a control. After applying the treatments, mangos were stored in cold chamber (10 ± 2 °C and 85-90% RH) and samples collected daily up to five days of storage. In general, the expression of PO and PPO was higher for mangos that received physical treatments, especially those treated with the combination of TT + UVC. Concerning to FAL, there was an upward trend in its expression, over the evaluation period, for mangos treated with TT alone or in combination with UVC light, which showed a tendency to fall from the fourth day. It was concluded that the evaluated physical treatments can interfere with the metabolism of mango by the changing enzymes activities, inducing resistance mechanisms against pathogens.*

Key-words: mango, peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia lyase, alternative treatment.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor, consumidor e exportador de manga, principalmente para países do hemisfério Norte, ocupando importantes janelas de mercado, que correspondem a entressafra da fruta, quando existe escassez e a valorização no preço do produto. Em 2013, exportou cerca de 122.000 t, com uma receita U\$ 147.481.604 (FOB) (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014, 2014).

No entanto, apesar de ser um importante produto para a balança comercial, ainda ocorrem muitas perdas na cadeia produtiva devido a doenças pós-colheita. Para evitar tais prejuízos utilizam-se fungicidas nos tratamentos pós-colheita, que contaminam as frutas. O exigente mercado internacional de frutas frescas tem demandado frutas de qualidade, sem resíduos de agrotóxicos, portanto existe uma demanda por tecnologias alternativas limpas nos tratamentos de pós-colheita.

Dente os métodos alternativos, o tratamento hidrotérmico por aspersão de água quente e a irradiação de luz ultravioleta-C têm se destacado, com bons resultados de controle de doenças



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

pós-colheita de diversas frutas, atuando tanto, diretamente no controle do agente causal, como indiretamente pela alteração na fisiologia da fruta, retardando o processo de maturação, preservando ou mesmo induzindo mecanismos de resistência (NASCIMENTO et al., 2014; STEVENS et al., 2005).

As enzimas endógenas presentes nos alimentos podem ser responsáveis por reações que afetam sua qualidade. O controle da atividade enzimática endógena em frutas é um desafio, visto que estão presentes na matriz do alimento em intervalos de concentrações em função do metabolismo pós-colheita (DAMODARAN; FENNEMA; PARKIN, 2010).

Por serem compostos que apresentam ação catalisadora e exibem seletividade sobre substratos, o estudo da atividade enzimática de frutas permite modular a ação da enzima como um marcador bioquímico de estresse, que pode resultar tanto na ativação de mecanismos de defesa contra agentes fitopatogênicos, como acelerar o processo de senescência da fruta (NECHET et al., 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações que ocorrem, nas atividades das enzimas peroxidases, polifenoloxidades e fenilalanina amônia-liase, em manga Tommy Atkins submetida a tratamentos físicos na pós-colheita, ao longo de cinco dias de armazenamento em câmara fria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Mangas Tommy Atkins, provenientes de pomar comercial do município de Taquaritinga/SP, colhidas no índice de maturação 3, foram padronizadas e lavadas com detergente neutro. Na chegada dos frutos ao laboratório foram tomadas amostras para representar o tempo zero. Avaliaram-se os seguintes tratamentos: tratamento térmico (TT) por aspersão de água aquecida a 65°C durante 15s seguido de aspersão de água à temperatura ambiente (20°C), durante dois minutos, para deter o efeito da alta temperatura; irradiação com luz ultravioleta C (UVC) na dose de 2,5 kJ m⁻²; a combinação dos dois tratamentos TT+UVC e uma testemunha. Após a aplicação dos tratamentos, os frutos foram armazenados em câmara fria (10 ± 2°C e 85-90% UR) e as amostras coletadas diariamente até cinco dias de armazenamento.

Foram analisados os efeitos dos tratamentos na expressão, na manga, das enzimas: Polifenoloxidases (PPO), Peroxidases (PO) e Fenilalanina amônia-liase (FAL).

O extrato utilizado para as análises foi preparado com a adição de um grama de amostras de casca de manga, sendo analisadas três frutas em cada teste e seis no tempo zero, as quais foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. Após isso, adicionou-se 6 mL de solução tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5 com polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

fenilmetilsulfonila (PMSF). Centrifugou-se a solução a 2000 rpm, 4°C por 20 min e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer (-80°C) até a realização das análises.

A determinação da atividade de proteínas totais seguiu a metodologia de Bradford (1976). Adicionou-se 20 µL de extrato para 200 µL de solução de Bradford. A leitura de absorbância foi realizada no programa Magellan a 595 nm, em 30 min e 1h após adição de Bradford. Os dados foram comparados com a curva-padrão feita previamente e a concentração expressa em mg.mL⁻¹ de proteína.

Na determinação da atividade de FAL centrifugou-se o extrato a 9000 rpm, 4°C por 20 min. Fez-se a mistura de 270 µL de tampão Borato 100 mM (pH 8,8) e 270 µL de L-fenilalanina 12 mM em tampão borato. Adicionou-se 50 µL de extrato. Após 20 min à 35°C, adicionou-se 20 µL de HCl 6N e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro à 290nm. (PASCHOLATI et al, 1986; CAKIR e SULE, 2009). Através da quantidade de ácido trans-cinâmico formado, comparado com a curva-padrão feita previamente, obteve-se a atividade enzimática expressa em µg_{ác trans cin.} mg⁻¹_{proteína} . min⁻¹.

A atividade de PPO foi determinada utilizando-se 200 µL de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8, e 20 µL de extrato. A leitura de absorbância foi realizada no programa Magellan a 420 nm, em 10 ciclos de 1 minuto, a 30°C. A diferença entre a última e a primeira leitura foi utilizada para o cálculo da atividade, expressa em unidades de PPO. mg⁻¹_{tecido}.min⁻¹, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por mg de tecido. (DUANGMAL e APENTEN, 1999).

A atividade de PO foi determinada pela reação de 10 µL do extrato, 90 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), 90 µL de peróxido de hidrogênio 3 mmol L⁻¹ e 90 µL guaiacol 15 mmol L⁻¹, com leitura de absorbância a 470 nm no programa Magellan, em 10 ciclos de 30s, a 30°C (HAMMERSCHMIDT et al.,1982). Os resultados foram expressos em unidades de PO. mg⁻¹_{tecido}.min⁻¹, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,01 por min de reação por mg de tecido. (HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, considerando-se amostras obtidas de uma fruta como unidade experimental. A análise de dados foi realizada com o software ASSISTAT versão 7.7. beta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à PO, a Figura 1 mostra que o tratamento combinado (TT + UVC) apresentou uma expressão de atividade maior desta enzima em relação aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente da testemunha no terceiro dia de avaliação e não diferindo dos demais

tratamentos. O tratamento com luz UV-C apresentou ligeira elevação de atividade no segundo dia decrescendo em seguida, enquanto que para o tratamento térmico sua expressão decresceu ao longo do período de avaliação.

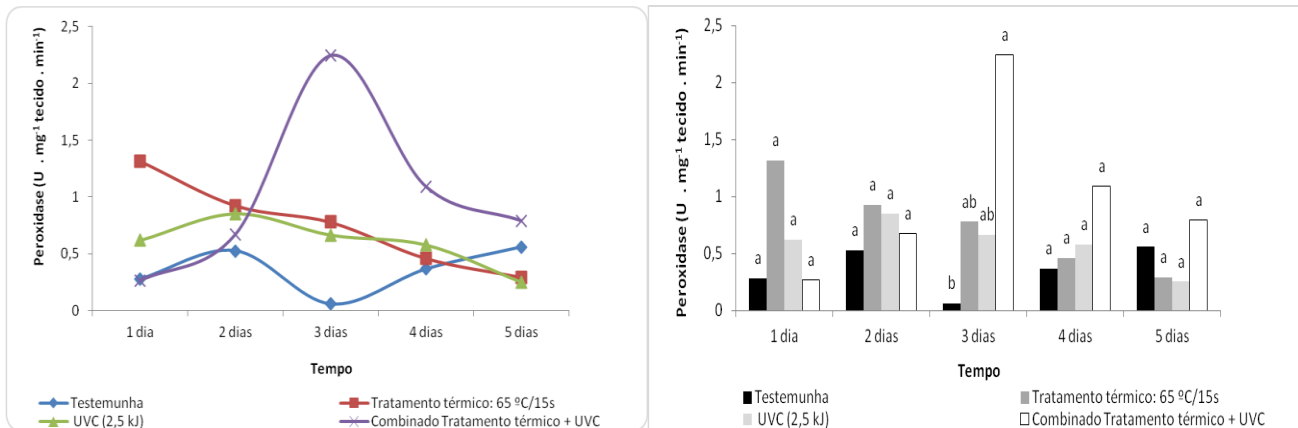


Figura 1. Expressão diária da atividade de peroxidase dos frutos de manga no período de cinco dias de armazenamento em câmara fria.

Dessa maneira, os resultados observados na Figura 1 sugerem que a combinação dos tratamentos hidrotérmico com luz UV-C na dosagem testada, pode induzir mecanismo de resistência à fitopatógenos, uma vez que tendeu a aumentar a expressão de PO.

Quanto à PPO observam-se na Figura 2 resultados similares à PO. Enquanto a testemunha apresentou baixa expressão durante todo o período avaliado, mangas tratadas com luz UV-C isoladamente ou combinada com o tratamento térmico apresentaram elevação desta enzima, com pico no quarto dia. O tratamento térmico isoladamente apresentou aumento na expressão de PPO até o terceiro dia decrescendo em seguida.

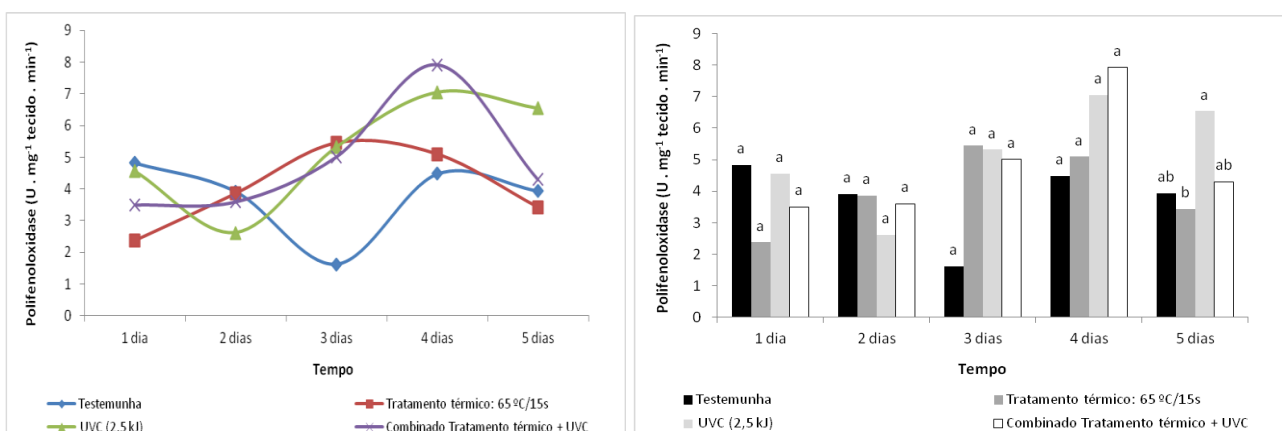


Figura 2. Expressão diária da atividade de polifenoloxidase dos frutos de manga no período de cinco dias de armazenamento em câmara fria.

Com relação a atividade de FAL, o tratamento térmico isoladamente apresentou uma curva crescente durante os cinco dias de avaliação e quando combinado com a luz UVC, decresceu no quarto dia enquanto que a luz UV-C isoladamente manteve a atividade da FAL mais baixa, ao longo do período, com tendência à queda a partir do quarto dia (Figura 3).

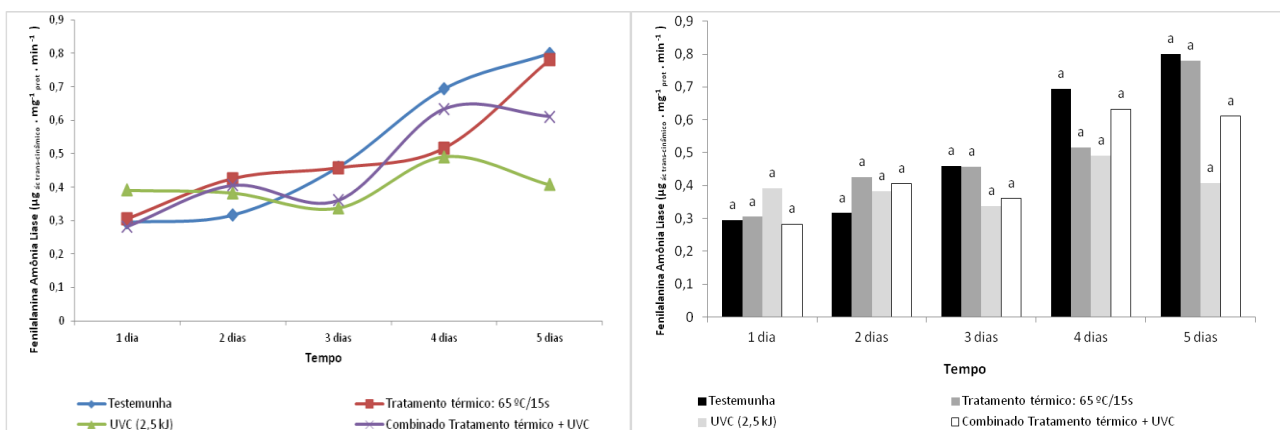


Figura 3. Expressão diária da atividade de fenilalanina amônia-liase dos frutos de manga no período de cinco dias de armazenamento em câmara fria.

Segundo Corrêa et al. (2007) o aumento na atividade da PO está relacionado com o processo de amadurecimento e deterioração da polpa, de que esta enzima participa, catalisando reações oxidativas. Hiraga et. al. (2001) afirmam que esta elevação indica um aumento no acúmulo de peróxidos e ácidos fenólicos livres, resultantes de estresses oxidativos devido ao calor, ou bióticos, em função do desenvolvimento de patógenos. De acordo com Vicente et al. (2006) o menor incremento da atividade de PO encontrado em frutos tratados termicamente pode indicar que estes sofreram menos danos fisiológicos do que os não tratados. Segundo Lima et al. (2002) a PPO e PO são enzimas envolvidas na oxidação de fenóis e estão correlacionadas com mecanismos de defesa vegetal.

De acordo com Chitarra e Chitarra (2005), a ativação de enzimas como a PO e PPO resulta em numerosas funções fisiológicas quando a planta ativa sistemas de autodefesa ao ataque de fitopatógenos, em resposta ao estresse sofrido, bem como aumenta a atividade da FAL, que é a enzima chave na síntese de compostos fenólicos.

Danner et al. (2008) estudando o efeito dos elicitores, acibenzolar-S-metil e proteína harpina, aplicados em pós-colheita, na indução de resistência sistêmica à podridão-parda em pêssegos, observaram que a atividade da enzima FAL foi incrementada pela aplicação dos elicitores, em relação à testemunha. Além disso, verificaram que, quando são utilizados os



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

elicitores, a maior atividade da FAL foi correlacionada negativamente à área superficial dos frutos lesionada por *Monilinia fructicola*, o que indica efeito benéfico dos elicitores na ativação desta enzima e, como consequência, redução da área lesionada pelo patógeno.

As expressões enzimáticas observadas neste trabalho corroboram com os resultados obtidos em avaliação de experimento conduzido paralelamente a este, sobre controle alternativo da doença em pós-colheita em mangas causada pelo fungo *Botryotrichum dothidea*, em que os tratamentos térmico por aspersão de água aquecida a 65°C por 15s ou irradiadas com luz UVC (2,5 kJ.m⁻²) e a combinação deles apresentaram severidade menor da doença que a testemunha (Dados não apresentados).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os tratamentos físicos, hidrotérmico por aspersão de água aquecida a 65°C durante 15s, irradiação com luz ultravioleta C na dose de 2,5 kJ.m⁻² e a combinação entre eles, interferem no metabolismo da manga, alterando a expressão das atividades das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase, assim, os tratamentos alternativos utilizados em pós-colheita para os frutos de manga ao alterar a expressão da atividade enzimática podem induzir mecanismos de resistência a fitopatógenos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto (Projeto FAPESP 2011/23432-8).

6 REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2014.136p.(Frutas do Brasil; 11)

BARACAT-PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; SANTORO, M.M. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, n.2, p. 91-98, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** V. 72, p. 248-254, 1976.

CAKIR, O.; SULE, A. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. **J. Environ. Biol.** v. 30 (1), p.51-55, 2009.

CHITARRA, M.I.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

CORRÊA, M.O.; PINTO, D.D.; ONO, E.O. Análise da atividade respiratória em frutos de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4, supl.2, p.831-833, 2007.

DAMODARAN; FENNEMA; PARKIN. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.900p.

DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study for polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n.3, p. 351-359, 1999.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.41, n.8, p.1247-1252, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p. 73-80, 1982.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H. OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v.42, p.462-468, 2001.

LIMA, M.A.C; ALVES, R.E.; ASSIS, J.S. de; FILGUEIRAS, H.A.C.; COSTA, J.T.A. Aparência, compostos fenólicos e enzimas oxidativas em uva "Itália" sob influenciado cálcio e do armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.39-43, 2002.

NECHET, K. de L.; TERAQ, D.; SILVA, A. M.; VIECELLI, M. P.; HALFELD-VIEIRA, B. de A. Efeito de tratamentos alternativos na pós-colheita na expressão de peroxidases em frutos de laranja, manga e melão. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 23. 2014, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2014. 4 p.

PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v. 115, p. 165-172, 1986.

NASCIMENTO, F.V.; SANTOS, M.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BARTINICK, V.A. Hidrotermia e radiação UV-C no controle de patógenos de manga e melão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.4, p. 313-317, 2014.

STEVENS, C.; KHAN, V.A.; WILSON, C.L. The effect of fruit orientation of postharvest commodities following low dose ultraviolet light-C treatment on host induced resistance to decay. **Crop Protection**, Ames, v.24, n.8, p.756-759, 2005.

VICENTE, A.R.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.40, p. 116-122, 2006.