

## 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, KS<sup>1</sup>; Almeida, SL<sup>1</sup>; Morais, MAS<sup>1</sup>; Alves RM<sup>1</sup>; Simões, AN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, CEP 56900-000, Serra Talhada-PE. Brasil. [kelemsilva@yahoo.com.br](mailto:kelemsilva@yahoo.com.br); [samara\\_lopes\\_almeida@gmail.com](mailto:samara_lopes_almeida@gmail.com); [aparecida8sm@gmail.com](mailto:aparecida8sm@gmail.com); [rafaelalvesmateus@gmail.com](mailto:rafaelalvesmateus@gmail.com); [adrianosimoesuast@gmail.com](mailto:adrianosimoesuast@gmail.com)

#### Resumo

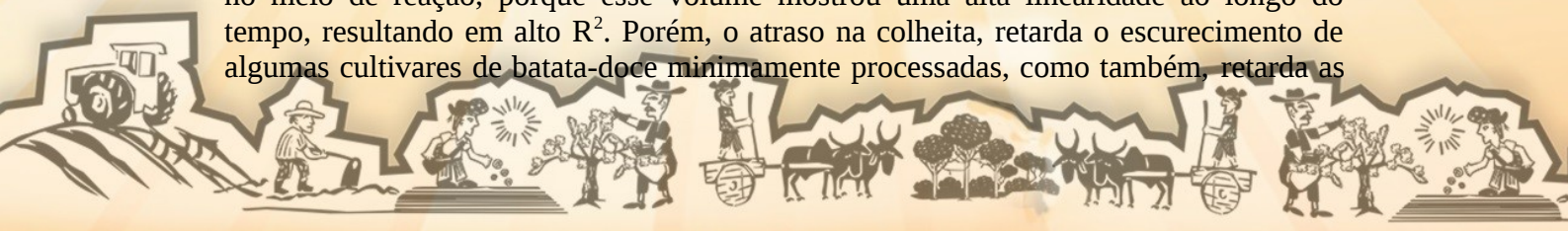
As enzimas polifenoloxidasas e peroxidases são enzimas envolvidas no escurecimento dos tecidos de batatas-doces cortadas. A intensidade desse escurecimento pode-se diferenciar tanto em função da cultivar, quanto épocas de colheita. Raízes de batata-doce das cultivares ESAM1 e Mãe de Família foram cultivadas 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  $\mu$ L), 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  $\mu$ L 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 está 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  $\mu$ L do extrato enzimático no meio de reação, porquê esse volume mostrou uma alta linearidade ao longo do tempo, resultando em alto R<sup>2</sup>. 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<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para catecol, e expressa em mmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF<sup>-1</sup>. Para o controle, o catecol foi substituído pelo tampão de reação, tampão fosfato.

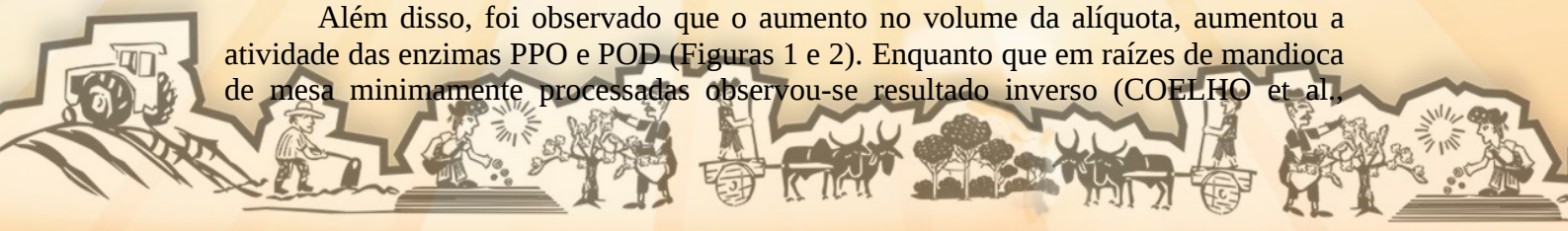
O ensaio da POD foi determinado de acordo com Simões et al., 2015, pela adição de 10, 20, 30, 40 e 50 µL do sobrenadante ao meio de reação contendo contendo 1790, 1780, 1770, 1760 e 1750 µL, respectivamente, de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0), 100 µL de guaiacol (0,5%) e 100 µL de peróxido de hidrogênio (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<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para guaiacol, e expressa em nmol min<sup>-1</sup> g MF<sup>-1</sup>. 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).

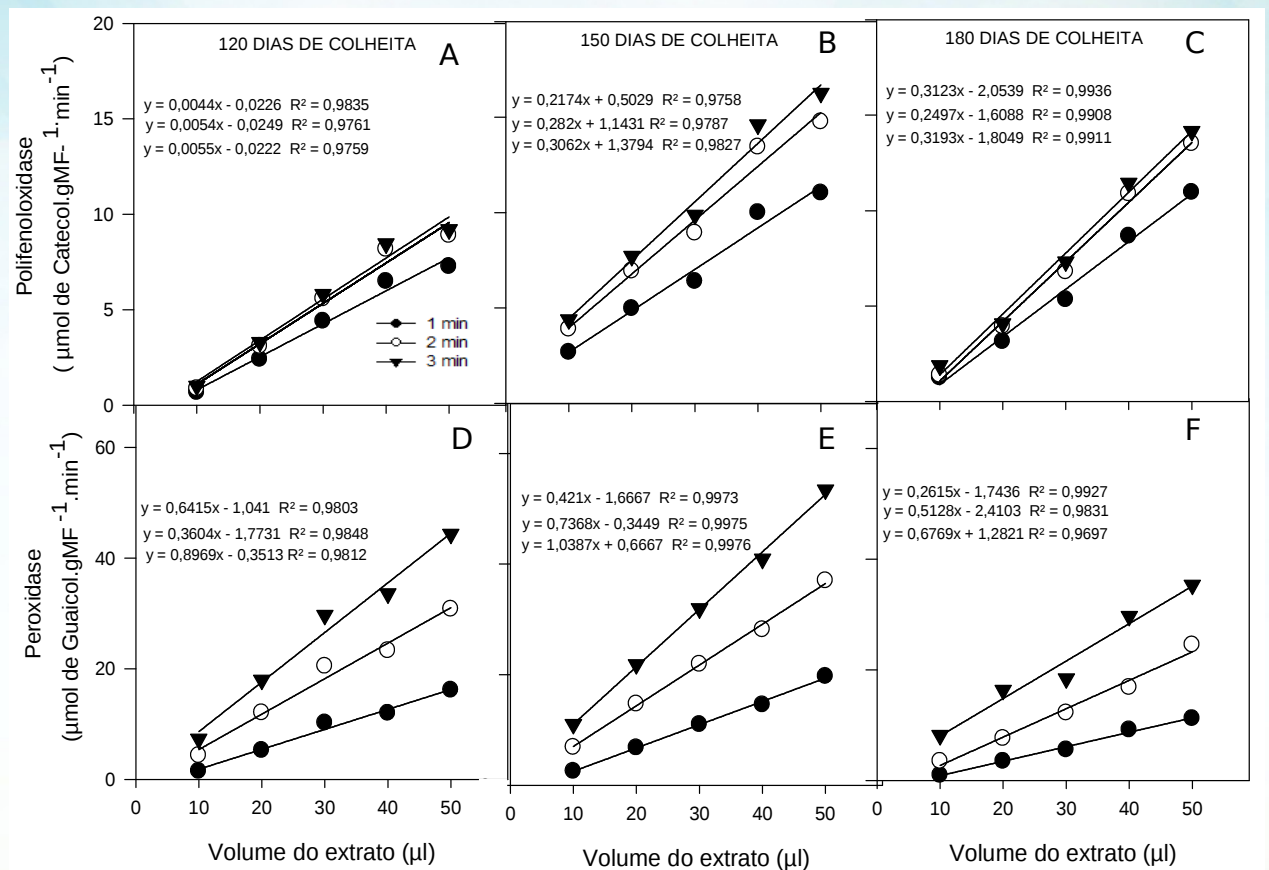


Figura 1: Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em raízes de batata-doce da cultivar ESAM1 minimamente processadas e colhidas aos 120 (A,D), 150 (B, E) e 180 (C, F) dias.



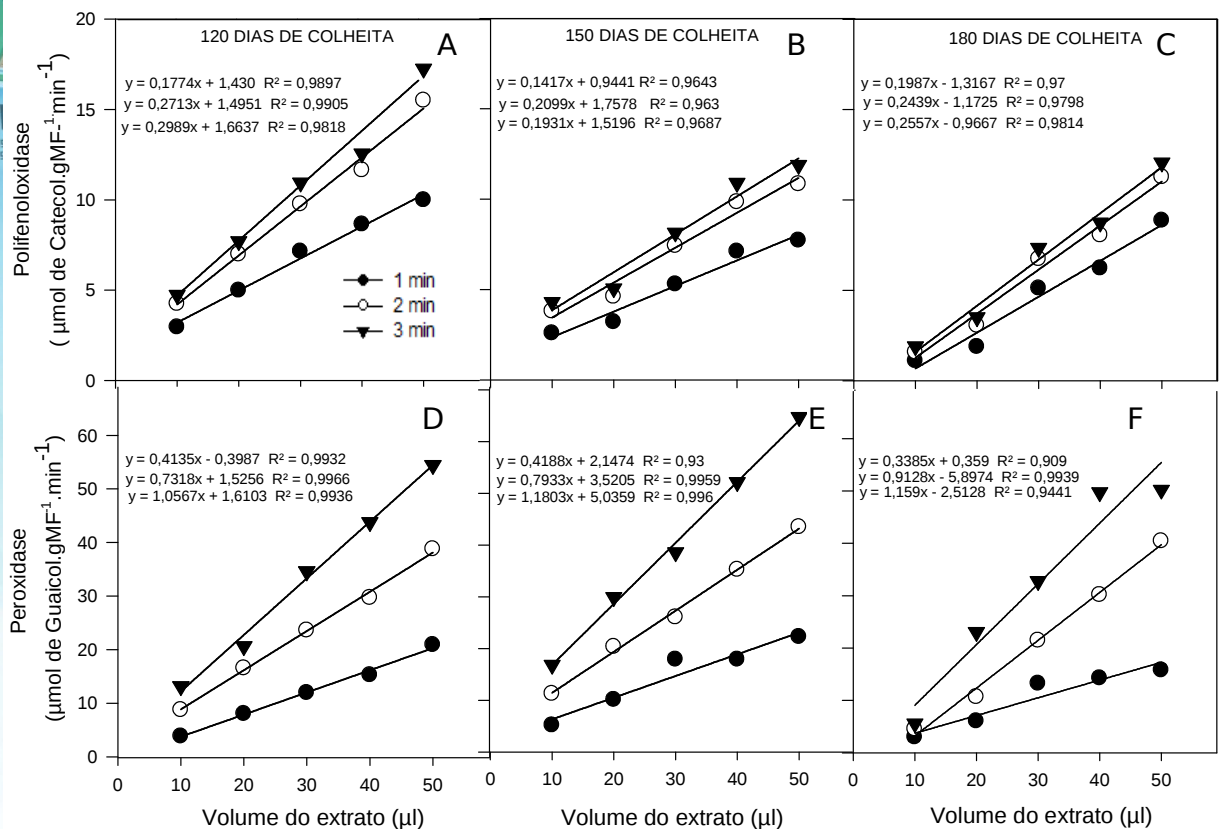


Figura 2: Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em raízes de batata doce da cultivar Mãe de Família minimamente processadas e colhidas aos 120 (A,D), 150 (B, E) e 180 (C, F) dias.

### 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).

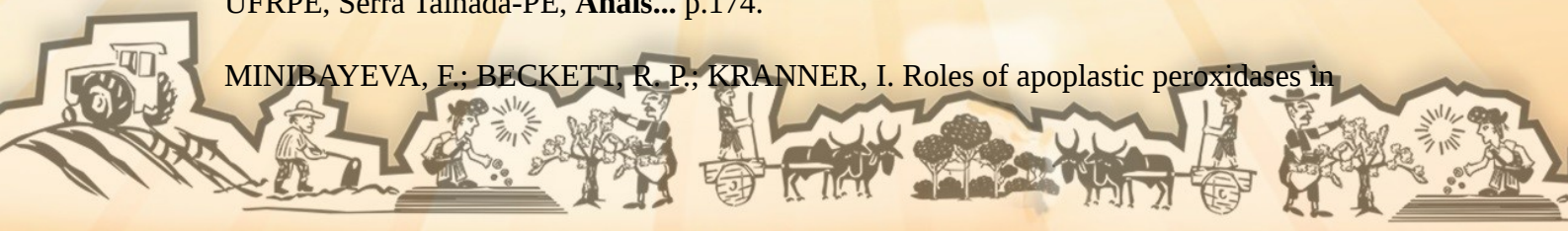
### Referências

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.

