

## **ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGADAS AO ESCURECIMENTO DE POLPA EM GENÓTIPOS BRASILEIROS DE GOIABEIRA SERRANA**

### **ACTIVITY OF ENZYMES ASSOCIATED WITH FLESH BROWNING IN BRAZILIAN GENOTYPES OF FEIJOA FRUIT**

Diana Carolina Lima Freitas<sup>1</sup>, Thalita Dal Toé Benincá<sup>2</sup>, Laís Dieb Lima<sup>3</sup>, Deysi Jhoana Camayo Mosquera<sup>4</sup>, Isadora Dalbem Schuerne<sup>5</sup>, João Claudio Vilvert<sup>6</sup>, Cassandro Vidal Talamini do Amarante<sup>7</sup>

#### **RESUMO**

O escurecimento de polpa é considerado o principal limitante no armazenamento de goiaba serrana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) e fenilalanina amonialiase (PAL) e o escurecimento de polpa em genótipos brasileiros de goiaba serrana. Frutos das cultivares Alcântara, Helena, Mattos e Nonante, e do acesso 2316, foram colhidos na maturação comercial, no município de São Joaquim-SC, e armazenados a  $4\pm 1$  °C ( $90\pm 5\%$  UR), durante sete e 14 dias, seguido por mais 48 h a  $23\pm 1$  °C ( $75\pm 5\%$  UR). Houve incremento significativo na atividade da enzima PPO durante o armazenamento em todos os genótipos. A atividade da PPO aumentou 29% da colheita aos sete dias, e 37% dos sete dias aos 14 dias de armazenamento refrigerado. A atividade da enzima POD foi muito baixa nos frutos de todos os genótipos. A atividade da PAL apresentou pequeno incremento até os 14 dias de armazenamento refrigerado, e foi diferente entre os genótipos. Os resultados obtidos mostram que o aumento na atividade das enzimas PPO e PAL tem forte ligação com a ocorrência de escurecimento de polpa em goiaba serrana.

**Palavras-chave:** *Acca sellowiana* O. Berg.; Polifenoloxidase; Peroxidase.

#### **ABSTRACT**

<sup>1</sup>Mestranda em Produção Vegetal na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>2</sup>Mestre em Produção Vegetal na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>3</sup>Mestranda em Produção Vegetal na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>4</sup>Mestranda em Produção Vegetal na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>5</sup>Graduanda em Agronomia na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>6</sup>Graduanda em Agronomia na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

<sup>7</sup>PhD em Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

*The darkening of pulp is considered the main limit in the storage of pineapple guava. The objective of this work was to evaluate the relationship between polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia (PAL) enzymes and pulp darkening in Brazilian pineapple guava genotypes. Fruits of the cultivars Alcântara, Helena, Mattos and Nonante, and to obtain access 2316, were harvested in commercial maturation, in the municipality of São Joaquim-SC, and stored at  $4 \pm 1$  °C ( $90 \pm 5\%$  RH) for seven and 14 days, followed by 48 h at  $23 \pm 1$  °C ( $75 \pm 5\%$  RH). There was a significant increase in PPO enzyme activity during storage in all genotypes. PPO activity increased 29% of the harvest at seven days, and 37% from seven days to 14 days of refrigerated storage. The activity of the POD enzyme was very low in fruits of all genera. PAL activity showed a small increment up to 14 days of refrigerated storage, and was different among the genotypes. The obtained results show that the increase in the activity of the PPO and PAL enzymes has a strong connection with the occurrence of pulp darkening in pineapple guava.*

**Keywords:** *Acca sellowiana* O. Berg; Polyphenol oxidase; Peroxidase.

## INTRODUÇÃO

O escurecimento de polpa é um grande desafio para a comercialização dos frutos de goiabeira serrana [*Acca sellowiana* (Berg.) Burret., sinônimo *Feijoa sellowiana* Berg.] por longos períodos de tempo (SCHOTSMANS et al., 2011). Esse distúrbio fisiológico ocorre em temperatura ambiente e até mesmo em armazenamento refrigerado, na temperatura indicada, de 4 °C (HOFFMANN et al., 1994; THORP e BIELESKI, 2002; AMARANTE et al., 2008; VELHO et al., 2011).

O escurecimento de polpa em goiaba serrana pode estar associado à elevada atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO; EC 1.14.18.1), peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) e fenilalanina amonialiase (PAL; EC 4.3.1.24), o que resulta na oxidação e polimerização de compostos fenólicos, formando precipitados escuros no tecido (THORP e BIELESKI, 2002; SCHOTSMANS et al., 2011). A atividade dessas enzimas, de maneira conjunta ou individual, resulta em escurecimento enzimático de frutos de rambutã (*Nephelium lappaceum* Linn) (YINGSANGA et al., 2008), lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) (BARMAN et al., 2014), diversas cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) (CHON et al., 2012), couve-flor (*Brassica oleracea* L.) (ZHAN et al., 2014) e cogumelo (*Agaricus bisporus*) (GAO et al., 2014), dentre outras.

A enzima PPO atua sobre compostos fenólicos, levando a sua oxidação a quinonas, na presença de oxigênio, desencadeando o escurecimento dos tecidos vegetais pela polimerização das mesmas, ou à sua reação com aminoácidos e proteínas (JIANG et al., 2004; MAYER, 2006). A enzimas POD catalisa reações redox em vegetais, usando peróxido de hidrogênio e oxigênio como agentes oxidantes (GUIMARÃES et al., 2010). O produto da oxidação é colorido, e, em muitos casos, é utilizado para determinação colorimétrica da atividade da POD (LOPES et al., 2014). A PAL atua na desaminação da L-fenilalanina e formação do ácido transcinâmico (MISHARA et al., 2012), precursor de vários compostos fenólicos (como ácido cumárico, caféico e ferrúlico), pigmentos antocianinas e ligninas (DIXON e PAIVA, 1995). Logo, a PAL gera substratos para a atuação das enzimas PPO e POD (NGUYEN et al., 2003; CHEN et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a possível relação entre a atividade das enzimas PPO, POD e PAL e o escurecimento de polpa em genótipos brasileiros de goiaba serrana.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos das cultivares Alcântara, Helena, Mattos e Nonante, e do acesso 2316, foram colhidos em pomar do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), da Estação Experimental da EPAGRI, em São Joaquim-SC (latitude 28° 16' 40,02" S, longitude 49° 56' 09,10" W e altitude de 1.400 m), na safra 2012/2013, no ponto de colheita comercial, identificado pela sua facilidade do desprendimento da planta. No Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita do CAV/UDESC, em Lages-SC, os frutos foram selecionados pela uniformidade de tamanho, cor e ausência de defeitos, como má-formação e danos mecânicos.

Foi avaliada a atividade das enzimas PPO, POD e PAL, e a incidência e severidade de escurecimento da polpa, dos frutos na colheita, e após sete e 14 dias de armazenamento a 4±1 °C/90±5% UR, seguido por mais 48 horas a 23±1 °C/75±5% UR (vida de prateleira).

O extrato enzimático para quantificar a atividade de PPO e POD foi obtido através da pesagem de 5 g de polpa dos frutos, a qual foi adicionando 10 mL de solução tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (solução tampão de extração, com pH 7,0), contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Para PAL, o extrato enzimático foi obtido através da pesagem de 1 g de polpa dos frutos, a qual foi adicionando 5 mL de tampão Tris-HCL 100 mM (pH 8,0), contendo 0,5% de PVP. Após as diferentes preparações, as amostras foram agitadas para homogeneização por um agitador do tipo VORTEX. Em seguida centrifugadas a 10000 rpm por 20 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos (extratos) para as análises enzimáticas.

Para avaliar a atividade da PPO, 0,3 mL do extrato foi misturado com 1,85 mL de solução tampão de fosfato de potássio monobásico 0,1 M (pH 6,0), contendo 0,1 M de solução de pirocatecol, em tubos de ensaio, incubando-os a 30 °C por 30 min. Interrompeu-se a reação com 0,8 mL de ácido perclórico 0,2 M. A variação da absorbância a 395 nm foi medida por espectrofotometria, zerando o equipamento com a mesma reação anterior, substituindo apenas o extrato, por solução tampão de extração. Uma unidade de atividade enzimática (UEA) foi definida como a quantidade de atividade enzimática que produziu uma mudança de 0,001 unidade de absorbância por mL de amostra, por minuto. Os resultados foram expressos em UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína.

A atividade da POD foi obtida numa mistura reacional constituída de 0,9 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 mM (pH 7,0; aquecido a 30 °C), adicionado sequencialmente 0,5 mL de guaiacol (0,02 M), 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (0,06 M) e 0,05 mL de extrato enzimático, em tubos de ensaio. A variação da absorbância a 470 nm foi medida por espectrofotometria, zerando o equipamento com água destilada. Os resultados foram expressos em  $\text{UAE}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), considerando-se que são necessários 4 moles de guaiacol para reduzir 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MATSUNO e URITANI, 1972).

A atividade da PAL foi analisada de acordo com Mori et al. (2001) e El-Shora (2002), com modificações. Foi adicionado, sequencialmente, 1,0 mL de extrato, 5,8 mL de tampão Tris-HCL 100 mM (pH 8,4) contendo 0,5% de PVP, e 0,2 mL de solução de L-fenilalanina 40 mM, em tubos de ensaio, os quais foram incubados por uma hora a 60 °C. Interrompeu-se a reação com 0,1 mL de ácido clorídrico 6 M. Utilizou-se a mesma reação para o controle (branco), porém a interrupção da reação ocorreu antes de adicionar a solução de L-fenilalanina. A variação da absorbância a 290 nm foi medida por espectrofotometria, zerando o equipamento com água deionizada. Os resultados foram expressos em  $\text{UAE}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  proteína.

As atividades das enzimas PPO, POD e PAL foram expressas em função das quantidades de proteínas totais. Os teores proteicos obtidos seguiram o método desenvolvido por Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

As análises de severidade de escurecimento da polpa foram efetuadas em frutos cortados na região equatorial, através de análise visual da polpa, atribuindo-se notas de 1 a 4 (1-ausente; 2-inicial; 3-moderado, e 4-severo, correspondendo a 0%, 1-30%, 31-60% e 61-100% da polpa do fruto com escurecimento, respectivamente).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada repetição composta de 10 frutos. As médias de tratamentos (genótipos) foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Houve incremento na atividade enzimática de PPO em todos os genótipos, da colheita até os 14 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 1). Considerando a atividade média dos cinco genótipos, houve incremento de 29% na atividade enzimática da PPO, passando de 4,68 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína, na colheita, para 6,09 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína após sete dias de armazenamento. Do período de sete aos 14 dias de armazenamento ocorreu incremento de 37% na atividade da enzima, chegando a 8,39 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína (Tabela 1).

**TABELA 1** - Atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) e fenilalanina amonialiase (PAL), e severidade de escurecimento de polpa em diferentes genótipos de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*), na colheita e após sete e 14 dias em armazenamento refrigerado ( $4\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $90\pm 5\%$  UR), seguido 48 h de vida de prateleira ( $23\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $75\pm 5\%$  UR).

Genótipo	Colheita	Após armazenamento	
		7 dias	14 dias
Atividade da PPO (UAE.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> proteína )			
(UAEmin <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> proteína)			
Alcântar	2,08 Bc*	5,81BCb	7,17 CDa
Helena	5,36 Ab	5,49 Cb	6,56 Da
Mattos	5,49 Ac	6,71 Ab	11,62 Aa
Nonante	5,70 Ab	6,37ABb	7,78 BCa
2316	4,95 Ac	6,12 ABCb	8,71 Ba
CV (%)	4,68	10,39	6,71
Atividade da POD (UAE.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> proteína)			
Alcântar	0,00038 Ca	0,00011 Cb	0,00007Cc
Helena	0,00124 Ba	0,00013 Cc	0,00023 Bb
Mattos	0,00129 Aa	0,00030 Ab	0,00033 Ab
Nonante	0,00125 Ba	0,00023 Bc	0,00030 Ab
2316	0,00136 Aa	0,00014 Cc	0,00019 Bb
CV (%)	3,75	12,02	9,06
Atividade da PAL (UAE.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> proteína )			
Alcântar	2,63 Eb	2,52 Db	3,50 Ca
Helena	4,40 Db	4,42 Cb	5,20 Ca
Mattos	10,71 Aa	10,56 Aa	10,61 Aa
Nonante	7,21 Ba	7,12 Ba	6,95 Ba
2316	5,47 Cb	5,17 Cb	6,58 Ba
CV (%)	6,51	7,45	11,44
Severidade de escurecimento de polpa (1-4)**			
Alcântar	1,00 Ac	1,76 BCb	2,24 Aa
Helena	1,00 Ab	1,56 BCa	1,56 Ba
Mattos	1,00 Ac	2,25 ABb	2,43 Aa
Nonante	1,00 Ab	1,24 Ca	1,24 Ba
2316	1,00 Ab	2,72 Aa	2,72 Aa
CV (%)	-	21,06	13,6

\*Valores seguidos da mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* Severidade de escurecimento de polpa (1-ausente; 2-inicial; 3-moderado, e 4-severo, correspondente a 0%, 1-30%, 31-60% e 61-100% de polpa escurecida, respectivamente) ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

O aumento da atividade enzimática da PPO em frutos, durante o armazenamento refrigerado, ocorre em diversas frutíferas. Durante o armazenamento refrigerado ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 dias) de lichia (*Litchi chinensis*) também

ocorreu aumento na atividade da PPO de 18% a 48%, dependendo da cultivar (MISHARA et al., 2012).

Diferenças menos expressivas na atividade da PPO entre os genótipos foi observada aos 7 dias do que aos 14 dias de armazenamento refrigerado, após 48 h de vida de prateleira (Tabela 1). No entanto, em ambos os períodos de armazenamento refrigerado, a atividade da PPO foi menor na cultivar Helena e maior na cultivar Mattos.

Diferença de atividade da PPO nos frutos também foi reportada entre genótipos de banana (*Musa* sp.), armazenados por 9 dias a 6 °C (com valores variando de 0,4 a 1,1 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína) (NGUYEN et al. 2003), e entre genótipos de lichia , armazenados por 15 dias a 4 °C (832 a 1743 UAE.min<sup>-1</sup> proteína) (MISHARA et al., 2012).

A atividade da enzima POD na colheita foi maior que após sete e 14 dias de armazenamento refrigerado, na média dos cinco genótipos (Tabela 1). Houve decréscimo aos sete dias de armazenamento, e um significativo aumento aos 14 dias de armazenamento, porém não superando a atividade quantificada na colheita. Em cultivares de rambutão armazenados em condição de alta UR (85-90%), por seis dias a 25 °C, Yingsanga et al. (2008) observaram o mesmo comportamento da enzima POD, com redução na atividade após a colheita.

A cultivar Alcântara apresentou menor atividade da POD na colheita, com sucessivos decréscimos até 14 dias de armazenamento. As cultivares Mattos e Nonante apresentaram as maiores atividades da POD, dentre todos os genótipos avaliados. Após a colheita, na cultivar Mattos a atividade da POD se manteve estável até os 14 dias de armazenamento (Tabela 1).

A atividade da POD nos genótipos de goiaba-serrana foram inferiores quando comparadas à outros frutos. Em frutos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) armazenados a 8 °C por sete dias, seguidos de sete dias a 24 °C, a atividade da POD foi em média de 18 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína (RAIMBULT et al., 2011). Em frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.) armazenados a 10 °C por 21 dias, seguidos de dois dias a 21 °C, a atividade da POD foi mais expressiva, de 1300-2000 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína (MASSOLO et al., 2011).

Os reduzidos valores de atividade da POD encontrados nesse experimento podem ser reflexos da inativação da enzima pela baixa temperatura de armazenamento (4 °C) (CHISARI et al., 2007). Chisari et al. (2007) e Bestwick et al.



(1995) relataram que o papel da POD no escurecimento enzimático de frutos tem sido questionado por diversos autores, porque há baixo teor de peróxido de hidrogênio em tecidos de frutos e hortaliças, e também pelo alto poder catalítico da PPO para os compostos fenólicos. Segundo esses mesmos autores, o envolvimento da POD no escurecimento enzimático é por efeito sinérgico com a enzima PPO, porque a POD utiliza o peróxido de hidrogênio gerado pelas reações catalizadas pela PPO, e também as semiquinonas intermediárias das reações de catálises de substratos oxidados pela PPO.

Não houve incremento na atividade da PAL, do período da colheita até sete dias de armazenamento refrigerado, considerando o valor médio de todos os genótipos (Tabela 1). Já no período de sete a 14 dias de armazenamento refrigerado, houve incremento significativo de atividade desta enzima (>8%) (Tabela 1). As cultivares Alcântara e Helena, e o acesso 2316, apresentaram comportamento semelhante, com incremento significativo na atividade da PAL apenas aos 14 dias de armazenamento refrigerado. Já as cultivares Mattos e Nonante não apresentaram incremento significativo na atividade da enzima PAL da colheita até transcorridos os 14 dias de armazenamento refrigerado.

Na média dos valores da colheita e de sete e 14 dias de armazenamento, a cultivar Alcântara apresentou menor atividade enzimática da PAL (2,9 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína), e a cultivar Mattos a maior atividade (10,7 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína). Comportamento semelhante de atividade da PAL para esses mesmos genótipos, foi encontrado para a atividade da PPO (Tabela 1).

Resultados encontrados neste trabalho para a atividade da PAL corroboram os obtidos por Mishara et al. (2012). Estes autores observaram em lichia aumento de 37% na atividade da PAL durante o armazenamento a 4 °C por 10 dias, passando de ~3,45 UAE.min<sup>-1</sup> de proteína, na colheita, para ~4,75 UAE.min<sup>-1</sup> de proteína, após o armazenamento. Ainda neste trabalho, os autores relatam diferenças entre cultivares quanto à atividade da PAL. Nguyen et al. (2003) também observaram diferenças na atividade da PAL entre cultivares de banana armazenadas por 9 dias a 6 °C (85% UR), com valores entre 0,2 e 1,0 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> proteína.

A severidade de escurecimento de polpa foi menor nas cultivares Nonante e Helena, e maior no acesso 2316 e nas cultivares Mattos e Alcântara (Tabela 1).

Velho et al. (2011), trabalhando com genótipos brasileiros de goiaba-serrana, também observaram incremento acentuado no escurecimento de polpa, tanto em

frutos mantidos sob armazenamento refrigerado (4 °C) quanto em frutos mantidos em temperatura ambiente (23 °C). Segundo estes autores, o alto índice de escurecimento de polpa, após 15 dias a 23 °C, pode estar relacionado à senescência dos frutos, enquanto o alto índice de escurecimento de polpa, após 30 dias a 4 °C, pode estar relacionado à senescência dos frutos e/ou a expressão de dano por frio.

O aumento de escurecimento de polpa aos sete e 14 dias de armazenamento refrigerado (Tabela 1), corrobora com o aumento da atividade da enzima PPO, e a alta atividade da enzima PAL, e seu aumento desde o período da colheita até 14 dias de armazenamento refrigerado. A cultivar Mattos apresentou expressivo aumento da atividade da PPO e alta atividade da enzima PAL, desde a colheita ao final das avaliações. A cultivar Alcântara, apesar de apresentar menores valores de atividade das enzimas PPO e PAL, apresentou expressivo aumento na atividade das mesmas, que pode estar associado ao aumento pós-colheita na severidade de escurecimento de polpa.

Em frutos de goiaba-serrana, é incerto se o escurecimento de polpa é decorrente da senescência natural dos frutos ou de injúrias por frio, devido à temperatura de armazenamento (4-5 °C). Valderrana et al. (2005), trabalhando com tratamento quarentenário em genótipos de goiaba-serrana na Colômbia, não observaram danos visíveis por frio em frutos armazenados a 1,6 °C por 22 dias. Hoffmann et al. (1994), trabalhando com efeito de temperatura em genótipos brasileiros de goiaba-serrana, não relataram ocorrência de escurecimento interno devido a baixas temperatura, em frutos armazenados a 0 °C e 2 °C, durante 21 e 28 dias. Devido aos poucos trabalhos dessa natureza, não se pode descartar o envolvimento da temperatura de armazenamento no alto índice de escurecimento de polpa em goiaba-serrana. Contudo, autores relacionam o escurecimento de polpa com a composição mineral dos frutos. Amarante et al. (2013), trabalhando com cultivares comerciais brasileiras, associaram o alto conteúdo de nitrogênio (1.246 mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca) às maiores taxas respiratórias e de produção de etileno em pós-colheita, resultando em antecipação do amadurecimento e senescência dos frutos, acarretando o escurecimento de polpa.

Em geral, existem indícios da relação entre o escurecimento de polpa e a senescência dos frutos. Trabalhos realizados com genótipos brasileiros de goiaba-serrana atribuem o alto índice de escurecimento da polpa ao processo de

amadurecimento e senescência dos frutos (AMARANTE et al., 2008; VELHO et al., 2011; AMARANTE et al., 2013), tendo em vista que a goiaba-serrana é um fruto altamente perecível, com vida útil em temperatura ambiente de até duas semanas (HOFFMANN et al., 1994; VALDERRAMA et al., 2005; VELHO et al., 2011). Os frutos de goiabeira-serrana são climatérios (VALDERRAMA et al., 2005; AMARANTE et al., 2008; VELHO et al., 2011; AMARANTE et al., 2013), com um coeficiente metabólico (Q10) para a taxa respiratória de ~3,5, na faixa de 0 a 30 °C (AMARANTE et al., 2008). O coeficiente metabólico da respiração para maioria dos frutos é 2,3, na faixa de 0 a 30 °C (CLERICI e SILVA, 2011). O alto Q10 em goiaba-serrana é indicação do elevado metabolismo, ocasionando rápido amadurecimento e perda de qualidade após a colheita.

O escurecimento de tecidos vegetais ocorre principalmente a partir da oxidação de compostos fenólicos, e contribui significativamente para a perda de qualidade. Para este processo ocorrer, as enzimas ligadas ao escurecimento dos frutos têm que estar presentes nos mesmos compartimentos celulares em que estão presentes os substratos ou co-substratos (O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (YORUK e MARSHALL, 2003). Tanto a senescência quanto a injúria por frio levam a desorganização das células ou tecidos (destruição da barreira biológica entre as enzimas e o substrato), favorecendo o escurecimento.

A atividade da PPO parece ser o fator principal na reação de escurecimento de polpa em goiaba-serrana (THORP e BIELESKI, 2002; SCHOTSMANS et al., 2011, VELHO et al., 2011; AMARANTE et al., 2013). Na presença de oxigênio, esta enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis a S-difenóis e a oxidação do S-difenóis aos seus correspondentes de o-quinonas (JIANG et al., 2004; MAYER, 2006). Estes, por sua vez, são polimerizados para formar pigmentos (castanhos, vermelhos ou pretos) indesejáveis (CHISARI et al., 2007; MISHARA et al., 2012). A enzima PPO é encontrada nos cloroplastos das plantas, onde estão associados às membranas internas dos tilacóides (NGUYEN et al., 2003; MAYER, 2006), e os substratos fenólicos destas enzimas estão localizados principalmente nos vacúolos (MAYER, 2006). As membranas celulares e subcelulares podem sofrer danos na senescência natural dos frutos (SOLECKA e KACPERSKA, 2003; JIANG et al., 2004), facilitando o contato da enzima PPO (NGUYEN et al., 2003) com os substratos fenólicos, que conduz a um aumento da atividade das enzimas oxidativas

(SOLECKA e KACPERSKA, 2003), levando a rápida oxidação de fenóis (CHISARI et al., 2007; MISHARA et al., 2012).

A PAL atua na biossíntese de compostos fenólicos nos frutos, e pode estar envolvida no escurecimento de polpa de goiaba-serrana. A PAL é considerada enzima chave entre o metabolismo primário (via chiquimato) e o secundário (fenilpropanóide) (DIXON e PAIVA, 1995), que regula o fluxo de fenilalanina para biossíntese de compostos fenólicos (CHEN et al., 2006). A síntese de compostos fenólicos inicia-se com a desaminação da fenilalanina pela PAL, produzindo transcinamato (monofenol) (CHEN et al., 2008; MASSOLO et al., 2011). Os compostos fenólicos sintetizados pela atividade PAL são utilizados pela PPO. A PPO converte monofenóis a difenóis e, em seguida, catalisa à oxidação de dopacromo à quinonas, que polimerizam espontaneamente, para formar pigmentos castanhos, responsáveis pelo escurecimento dos tecidos (DIXON e PAIVA, 1995).

O escurecimento de polpa em frutos de genótipos brasileiros de goiabeira-serrana está possivelmente ligado à atuação de enzimas ligadas ao escurecimento. A atividade da PAL, na polpa de goiaba serrana, aparentemente está associada ao aumento na atividade da PPO. A POD parece exercer pouco efeito sobre o escurecimento de polpa dos frutos.

## CONCLUSÃO

O aumento na suscetibilidade ao escurecimento de polpa dos frutos durante o armazenamento em genótipos de goiabeira-serrana apresenta relação com a atividade das enzimas PPO e PAL.

A atividade da enzima POD foi baixa nos frutos de todos os genótipos estudados, indicando pouca ou nenhuma influência no desenvolvimento de escurecimento de polpa.

## REFERÊNCIAS

AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; SASSO, A. Qualidade de goiaba serrana em resposta a temperatura de armazenamento e ao tratamento com 1-metilciclopropeno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1683-1689, 2008.

AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; BENINCÁ, T.D.T.; HACKBARTH, C.; SANTOS, K.L. Qualidade e potencial de conservação pós-colheita dos frutos em cultivares brasileiras de goiabeira-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.4, p.990-999, 2013.

BARMAN, K.; SIDDIQUI, M.D.W.; PATEL, V.B.; PRASAD, M. Nitric oxide reduces pericarp browning and preserves bioactive antioxidants in litchi. **Scientia Horticulturae**, Agassiz, v.171, n.1, p.71-77, 2014.

BESTWICK, C.S.; BROWN, I.R.; BENNETT, M.H.R.; MANSFIELD, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **The Plant Cell**, Norwich, v.9, n.1, p.209-221, 1997.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, Maryland, v.76, n.1, p.248-255, 1976.

CHEN, J.; HE, L.; JIANG, Y.; WANG, Y.; JOYCE, D.C.; JI, Z.; LU, W. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. **Physiologia Plantarum**, Umea, v.132, n.3, p.318-328, 2008.

CHEN, J.Y.; WEN, P.F.; KONG, W.F.; PAN, Q.H.; ZHAN, J.C.; LI, J.M.; WAN, S.B.; HUANG, W.D. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.40, n.1, p.64-72, 2006.

CHISARI, M.; BARBAGALLO, R.N.; SPAGNA, G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v.55, n.9, p.3469-3476, 2007.

CHON, S.; BOO, H.; HEO, B.; GORINSTEIN, S. Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Parma, v.63, n.1, p.45-48, 2012.

CLERICI, M.T.P.S.; SILVA, L.B.C. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, Campinas, v.44, n.1, p.1658-1670, 2011.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.J. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Norwich, v.7, n.6, p.1085-1097, 1995.

EI-SHORA, H.M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from Marrow cotyledons. **Plant Science**, Columbus, v.162, n.1, p.1-7, 2002.

GAO, M.; FENG, L.; JIANG, T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. **Food Chemistry**, Maryland Heights, v.149, n.15, p.107-113, 2014.

GUIMARÃES, A.A.; FINGER, F.L.; SOUZA, P.A.; LINHARES, P.C. Fisiologia pós-colheita de *Heliconia* spp. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.5, p.38-49, 2010.

HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KLUGE, R.A.; BILHALVA, A.B. Influência da temperatura e do polietileno no armazenamento de frutos de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, n.3, p.563-568, 1994.

JIANG, Y.; DUAN, X.; JOYCE, D.; ZHANG, Z.; LI, J. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.88, n.3, p.443-446, 2004.

- LOPES, A.M.; TORALLES, R.P.; ROMBALDI, C.V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v.34, n.1, p.150-156, 2014.
- MASSOLO, J.F.; CONCELLÓN, A.; CHAVES, A.R.; VICENTE, A.R. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 59, n.1, p.10-15, 2011.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Sendai, v.13, n.1, p.1091-1101, 1972.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, Pullman, v.67, n.21, p.2318-2331, 2006.
- MISHARA, B.B.; KUMAR, S.; WADHAWAN, S.; HAJARE, S.N.; SAXENA, S.; MORE, V.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Browning of litchi fruit pericarp: role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and effect of gamma radiation. **Journal of Food Biochemistry**, Orlando, v.36, n.5, p.604-612, 2012.
- MORI, T.; SAKURI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Columbus, v.160, n.1, p.355-360, 2001.
- NGUYEN, T.B.T.; KETSA, S.; DOORN, W.G.V. Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.30, n.2, p.187-193, 2003.
- RAIMBAULT, A.K.; ALPHONSINE, P.A.M.; HORRY, J.P.; HAUGRIN, M.F.; ROMUALD, K.; SOLER, A. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v.59, n.1, p.342-348, 2011.
- SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS, 2002. 200p.
- SCHOTSMANS, W.C.; EAST, A.; THORP, G.; WOOLF, A.B. Feijoa (*Acca sellowiana* [Berg] Burret). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. Volume 3 - Cocona to mango. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited, 2011. p.115-133.
- SOLECKA, D.; KACPERSKA, A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. **Physiologia Plantarum**, Umea, v.119, n.1, p.253-262, 2003.
- THORP, T.G.; BIELESKI, R. **Feijoas: origins, cultivation and uses**. Auckland: David Bateman, 2002. 87p.
- VALDERRAMA, J.K.; FISCHER, G.; SERRANO, M.S. Fisiología poscosecha en frutos de dos cultivares de feijoa (*Acca sellowiana* O. Berg Burret) sometidos a un

tratamiento cuarentenario de frío. **Agronomía Colombiana**, Cundinamarca, v.23, n.2, p.276-282, 2005.

VELHO, A.C.; AMARANTE, C.V.T.; ARGENTA, L.C.; STEFFENS, C.A. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade pós-colheita de goiabas serranas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.1, p.14-20, 2011.

YINGSANGA, P.; SRILAONG, V.; KANLAYANARAT, S.; NOICHINDA, S.; MC GLASSON, W.B. Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.50, n.3, p.164-168, 2008.

YORUK, R.; MARSHALL, M.R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, Flórida, v.27, n.1, p.361-422, 2003.

ZHAN, L.; HU, J.; PANG, L.; LI, Y.; SHAO, J. Light exposure reduced browning enzyme activity and accumulated total phenols in cauliflower heads during cool storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.88, n.1, p.17-20, 2014.