Polifenoloxidase: uma enzima intrigante

Taciana Caroline Alvarenga[1]
Hélio Francisco da Silva Neto[2]
Flávia Okushiro OGASSAVARA[3]
Flávio Cese Arantes[4]
Marcos Omir Marques[5]
Mariana Carina Frigieri[6]

Resumo

As transformações pós-colheita, dos produtos de origem vegetal, são as responsáveis pelos processos bioquímicos decorrentes do estresse ocasionado após a colheita que interferem na integridade do tecido vegetal. Durante o transporte e processamento dos vegetais podem ocorrer rupturas dos tecidos, promovendo transformações metabólicas, dentre as quais se destacam aquelas decorrentes da liberação de enzimas responsáveis pelo o escurecimento dos tecidos, estando, dessa forma, relacionado à redução da qualidade de alguns produtos de origem vegetal, quando chegam ao consumidor final. Uma das enzimas envolvidas com o escurecimento enzimático é a polifenoloxidase, que pertence ao grupo das oxirredutases. Essa enzima oxida difenóis, transformando-os em quinonas na presença do oxigênio molecular. Por outro lado, a ação dessa enzima pode se considerada benéfica na medida em que a mesma é responsável pela maior resistência ao ataque de patógenos, em geral, uma vez que as quinonas são altamente tóxicas, o que lhes permite reduzir a ação de microrganismos invasores. Assim, tendo em vista a existência de aspectos positivos e negativos, a referida enzima tem despertado interesse no meio científico. Sendo assim, esta revisão tem o intuito de abordar a atividade da enzima polifenoloxidase nos vegetais, visando esclarecer a sua ação, com efeitos opostos, constituindo-se num problema complexo do ponto de vista científico e tecnológico.

Palavras-chave: escurecimento enzimático, pós-colheita, quinonas, tirosinase, vegetais.

[1] Graduanda do curso de Tecnologia em Biocombustíveis. FATEC-JB. Bolsista FAPESP. taci-23@hotmail.com
[2] Doutorando em Agronomia (Produção Vegetal), FCAV-UNESP. Bolsista CNPq. heliofsn@hotmail.com
[3] Engenheira Agrônoma, FCAV-UNESP. Auxiliar docente FATEC-JB. flaviaokog@hotmail.com
[4] Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, FCAV-UNESP. Bolsista CNPq. flavionex@hotmail.com
[5] Professor Doutor – Departamento de Tecnologia, FCAV-UNESP. omir@fcav.unesp.br
[6] Doutora em Biotecnologia IQ-UNESP. Professora Assistente FATEC-JB. marifrigieri@gmail.com

Abstract

Postharvest changes of products of plant origin are responsible for the biochemical processes resulting from the stress caused after harvest that interfere with the integrity of the plant tissue. Tissue disruptions may occur during transportation and processing of vegetables, promoting metabolic transformations, among which are those arising out of the release of enzymes responsible for the darkening of the tissues, being, thus, related to the quality reduction of some products of plant origin when they reach the end consumer. The polyphenoloxidase, which belongs to the class of Oxidoreductases, is one of the enzymes involved in enzymatic darkening. This protein catalyses the oxidation of diphenols to quinones in the presence of molecular oxygen. On the other hand, the action of the polyphenoloxidase can be considered beneficial because it is responsible for the higher resistance against attacks performed by pathogens in general once quinones are highly toxic, thereby allowing them to reduce the action of invading microorganisms. Hence, considering the aforementioned positive and negative aspects, this enzyme has being attracting much attention in scientific scenario. Therefore, this review aims at addressing the polyphenoloxidase activity in plants, trying to clarify its opposite effect actions that have become a scientific and technological complex issue.

Keywords: *enzymatic darkening, postharvest, quinones, tyrosinase, vegetables.*

Introdução

Os vegetais, como organismos autotróficos, desenvolveram a capacidade de crescer em busca dos elementos essenciais, tais como a luz solar, a água e nutrientes minerais (TAIZ; ZEIGER, 2009). A atividade fotossintética das plantas promove a conversão e o armazenamento da energia solar em moléculas orgânicas ricas em energia, a partir de moléculas inorgânicas simples. Somente esses organismos são capazes de transformar a energia luminosa em energia química, aumentando assim a energia livre disponível para os demais seres vivos durante seu ciclo de vida (KERBAUY, 2008). A principal diferença entre os vegetais e os animais é a presença de uma parede celular rígida delimitando as células vegetais, a qual é essencial aos processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução das plantas. As paredes celulares vegetais contêm proteínas estruturais, enzimas, polímeros fenólicos e outros

elementos que modificam as características físicas e químicas das mesmas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Kerbauy (2008) as plantas possuem estruturas que podem ser consideradas análogas aos ossos dos seres humanos, isso porque, em tecidos vegetais cada célula é envolta por uma estrutura chamada de parede celular. As células vegetais apresentam dois tipos de parede: primária e secundária. As paredes celulares primárias são constituídas principalmente pela celulose, hemicelulose e pectinas. Apresentam-se tipicamente finas e compreendem as células jovens e em crescimento. As paredes celulares secundárias são mais espessas e resistentes, sendo a lignina a responsável pela sua maior resistência e rigidez. A presença da lignina nas paredes celulares proporcionou uma grande evolução aos vegetais, o reforço necessário para crescerem verticalmente acima do solo, isto é, crescerem em direção à luz e contra a força da gravidade a fim de dominarem o ambiente terrestre (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O cultivo de vegetais para o consumo envolve diversas etapas, dentre elas: preparo do solo, correção da acidez, fertilização, plantio, fertilização de cobertura (com a cultura implantada), realização de tratos culturais durante o cultivo, avaliação do desenvolvimento, crescimento e maturação, realização da colheita e realização de procedimentos na pós-colheita. Porém, dentre todas as etapas a serem consideradas, deve ser dada a atenção especial aos aspectos de pós-colheita.

Segundo Chitarra e Chitarra (2005) os produtos vegetais sofrem estresse de diferentes formas, desencadeadas quando colhidos, devido às transformações no seu meio ambiente, que geram modificações em seu metabolismo, provenientes dos procedimentos de colheita, manuseio, embalagem, transporte e armazenamento, podendo causar danos mecânicos aos tecidos vegetais, resultando no escurecimento dos tecidos. Na Figura 1 pode-se observar um exemplo de escurecimento resultante desses efeitos em uma pêra. Os aspectos de perda pós-colheita são os responsáveis pelas transformações bioquímicas, as quais geram desordens fisiológicas desses vegetais. Os mesmos autores destacam que os vegetais por apresentarem alto teor de água em sua composição e permanecerem em intensa atividade metabólica estão sujeitos as desordens fisiológicas, quando este sofrer transformações pós-colheita, que são advindos de processos bioquímicos os quais dependem da integridade do tecido vegetal.



Figura 1. (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

É durante o seu transporte e processamento que os tecidos vegetais se rompem, obtendo como consequência alterações metabólicas, muitas vezes indesejáveis, provenientes da liberação das enzimas, ocorrendo o escurecimento enzimático (MENDONÇA; GUERRA, 2003), o qual é responsável pelas modificações sensoriais e nutricionais desses produtos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A enzima responsável por esse escurecimento, nos tecidos vegetais, é a polifenoloxidase (PFO). Porém, essa enzima não deve ser considerada apenas como uma vilã, pois, foi verificado que vegetais com elevada ação dessa enzima podem apresentar maior resistência ao ataque de patógenos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A inibição e/ou controle das alterações metabólicas ocasionadas pelas enzimas, é de vital importância para a redução das perdas de pós-colheita e manutenção do padrão de qualidade no produto final.

Revisão da literatura

- Enzimas

As enzimas são proteínas com ação catalítica que aceleram as reações bioquímicas, sendo de extrema importância para o controle dos processos vitais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Fatibello-Filho e Vieira (2002) destacam que a ação enzimática pode ser alterada de acordo com o pH, temperatura, concentração do substrato e pela presença de inibidores.

O local onde os substratos se ligam para que as reações se processem, é chamado de sítio ativo, constituído pela interação de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica, sendo o responsável pela atividade biológica da enzima, ou seja, no sítio ativo ocorre a reação catalítica (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002). Segundo Tortora; Funke e Case (2005) algumas enzimas são totalmente protéicas e outras possuem um grupo não protéico associado

chamado de cofator, essencial para a atividade catalítica. Esse tipo de enzima recebe a denominação de apoenzima quando não está ligada ao cofator (inativa) e quando está ligada é chamada de holoenzima (ativa). Se o cofator for uma molécula orgânica, o mesmo é denominado coenzima. De acordo com Nelson e Cox (2006) quando o cofator (coenzima ou íon metálico) está ligado muito forte ou covalentemente à proteína enzimática é chamado de grupo prostético.

- Polifenoloxidase (PFO)

De acordo com Mendonça e Guerra (2003) a enzima comumente conhecida como "polifenoloxidase" (PFO ou PPO – Polyphenol oxidase) participa do grupo das oxirredutases e contém o cobre como grupo prostético. Essa enzima está relacionada à oxidação de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias advindas de produtos secundários que contêm um grupo fenol, isto é, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, produzidas pelas plantas e que apresentam uma variedade de funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). A PFO compreende duas enzimas distintas, cuja diferença está relacionada à especificidade aos substratos. A primeira, denominada lacase, não atua sobre monofenóis e têm ação restrita à oxidação de orto e para-difenóis. Enquanto que a segunda denominada tirosinase, cresolase, catecol oxidase, fenolase ou orto-difenol oxidase é destacada como a mais importante, pois ela é a responsável pelo escurecimento oxidativo dos tecidos, principalmente, de frutas e hortaliças, catalisando a hidroxilação de monofenóis (atividade cresolase) e a subseqüente oxidação do orto-difenol resultante em orto-quinonas (atividade catecolase).

As PFO's além da ocorrência, de forma geral, em tecidos vegetais (principalmente em frutas e hortaliças), também podem ser encontradas em microrganismos (principalmente em fungos) e em alguns animais (MENDONÇA; GUERRA, 2003). Embora a localização exata dessa enzima, no tecido vegetal, está associada a mecanismos de construção da parede celular dos vegetais, segundo os autores acima, a localização dessa enzima no tecido celular pode se manifestar de forma oculta em algumas espécies, sendo dependente da idade e estágio de maturação dos vegetais.

A ação da PFO está relacionada à formação de ligações cruzadas entre grupos fenólicos em proteínas de parede, pectinas e outros polímeros de parede; unindo-os de maneira complexa

(Figura 2). A lignina, um componente da parede celular secundária, é um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificado (Figura 3), com um padrão de ligações complexo e irregular que une as subunidades aromáticas de três diferentes álcoois fenilpropanóides (coniferil, cumaril e cinapil). Essas subunidades, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede celular dos vegetais onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase (TAIZ; ZEIGER, 2009).

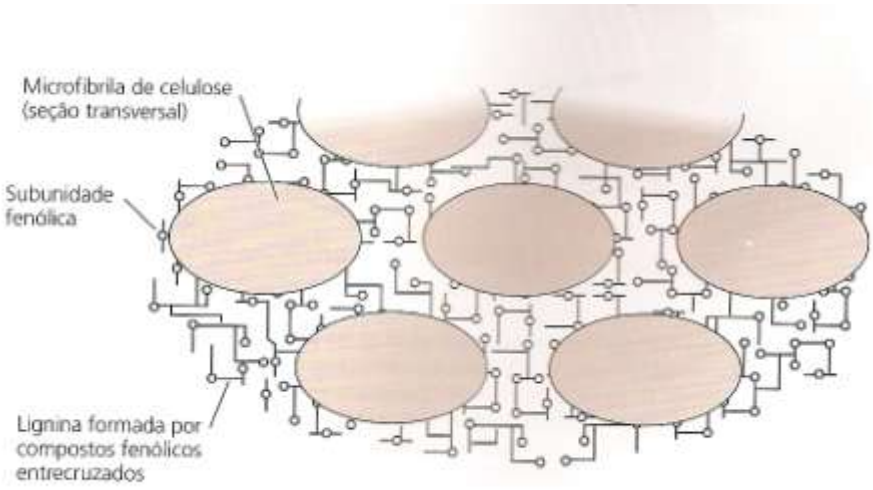

Figura 2. Diagrama ilustrando a formação de lignina por compostos fenólicos entrecruzados (TAIZ; ZEIGER, 2009).

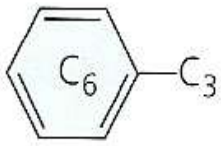

Figura 3. Estrutura da Lignina (TAIZ; ZEIGER, 2009).

- Aspectos Desejáveis da Enzima PFO

Segundo Campos e Silveira (2003) a enzima polifenoloxidase (PFO) é de extrema importância para os vegetais. As quinonas formadas pela ação dessa enzima possuem ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, os quais inibem o ataque de alguns insetos. Ainda, podem formar complexos com proteínas que atuam como uma barreira física

para a entrada de patógenos. Os mesmos autores ressaltam que a importância da polifenoloxidase (PFO) para as plantas é proveniente deste aspecto desejável, em que devido à propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas possibilitam a formação de produtos mais tóxicos para os microrganismos do que o fenol original. Dessa forma, a atividade enzimática torna-se promissora para a resistência à infecção, expressa por meio da redução do ataque de patógenos, proporcionando um aspecto positivo para o reino vegetal. Por essa razão, Agrios (1997) afirma que quanto maior a atividade da enzima polifenoloxidase maiores concentrações de produtos tóxicos da oxidação serão obtidos, os quais conferem a resistência às infecções. Contudo, esta barreira física criada pela enzima PFO é originária da utilização dos seus substratos, no caso os compostos fenólicos. A produção de quinonas, que rapidamente se acumulam após a infecção, é considerada como potentes bactericidas e fungicidas, sendo altamente tóxicos aos microrganismos patogênicos (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). Segundo Cardoso e Garraway (1977), as substâncias provenientes do material castanho da lesão de hipocótilos doentes de feijoeiros inibiam seletivamente isolados não-patogênicos ao feijoeiro.

A atividade da polifenoloxidase é geralmente alta em tecidos vegetais infectados. De acordo com Padmaja et al. (1982 apud CAMPOS; SILVEIRA, 2003), esse aumento da atividade enzimática se dá pelo fato de que os fenóis já estão presentes nos ferimentos e são oxidados para o-quinonas, havendo estímulo para a biossíntese de oxidação destes fenóis. Como ressaltado anteriormente, os compostos fenólicos são normalmente produzidos pelas plantas e apresentam funções diversas nos vegetais. Segundo Taiz e Zeiger (2009) essa grande variedade de aplicabilidades dos compostos fenólicos pode ser destacada nas áreas de defesa contra herbívoros e patógenos, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta, no suporte mecânico ou ainda na redução do crescimento de plantas competidoras adjacentes.

De acordo com Araújo (2001), a polifenoloxidase (PFO) também possui outro papel de extrema importância, em virtude de seu escurecimento oxidativo provocar alterações das propriedades organolépticas, em alguns alimentos como em chá, café, cacau e ameixa seca. Como consequência de sua ação pode haver interferência no estabelecimento do sabor e cor dos alimentos, como ocorre no chá preto ou a redução do amargor e adstringência de produtos como o cacau, e a formação de aldeídos de aminoácidos (MAHANTA et al., 1993; YOSHIYAMA; ITO, 1996).

- Aspectos Indesejáveis da Enzima PFO

A enzima polifenoloxidase (PFO), pela sua ação indesejável, ocasiona o escurecimento enzimático nos produtos advindos de origem vegetal, após sua fase pós-colheita. De acordo com Araújo (2001), quando a maioria dos vegetais são amassados, cortados ou triturados, rapidamente adquirem coloração escura. Esta coloração é oriunda das reações oxidativas das enzimas PFO's. A ação dessas enzimas, nos vegetais, acarreta grandes perdas econômicas, além da diminuição da qualidade nutritiva e da alteração do sabor. Segundo Éspin et al. (1995), o escurecimento dos tecidos vegetais, provocado pela ação da enzima polifenoloxidase, decorre do produto que é liberado do sítio ativo das tirosinases, a o-quinona, que sofrerá reações não enzimáticas com vários nucleófilos, resultando espontaneamente em pigmentos de coloração castanho escuro, vermelho ou preto, denominados melaninas (Figura 4). Um exemplo do escurecimento enzimático em maçãs após o corte pode ser observado na Figura 5. É interessante salientar que o escurecimento aumenta gradativamente após a exposição da parte interna da fruta ao oxigênio. De acordo com Rani et al. (2001), dentre os vegetais, os grãos utilizados na produção da farinha de trigo contém várias enzimas de importância tecnológica, dentre elas a polifenoloxidase se destaca. Feillet; Autran e Verniére (2000) afirmam que existe uma relação direta entre concentração, cor e a atividade da PFO na farinha de trigo desencadeados pelo processo de escurecimento, ocasionando alterações relevantes para a determinação da aceitação e o consumo da farinha no mercado. A formação de pigmentos escuros relaciona-se às mudanças indesejáveis na aparência e nas propriedades organolépticas (cor, textura e sabor) dos produtos e, como consequência, resulta na decadência da vida útil e do valor de mercado desses produtos.

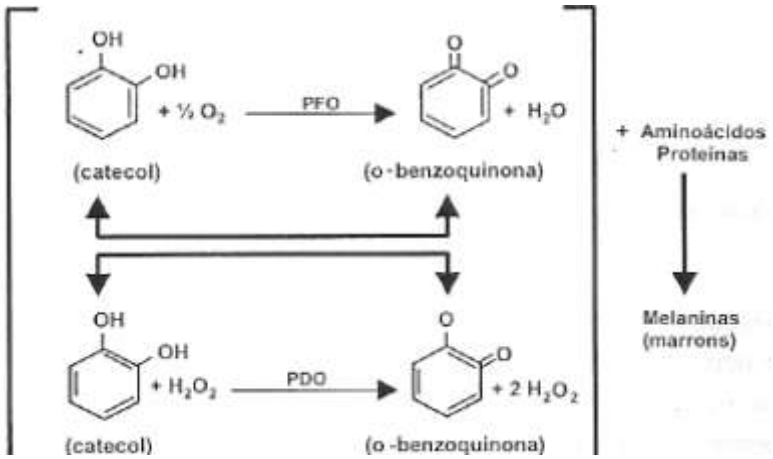

Figura 4. Sequências de reações da ação enzimática da polifenoloxidase (PFO) (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

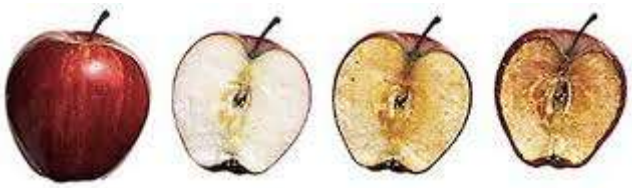

Figura 5. Escurecimento enzimático em frutos de maçã (ALVARENGA, 2011).

A formação da quinona é dependente do oxigênio molecular e da enzima PFO. Uma vez formada, podem ocorrer reações posteriores espontaneamente, não dependendo mais da enzima nem do oxigênio (ARAÚJO, 2011).

De acordo com Mendonça e Guerra (2003), um método físico para o controle desse escurecimento pode ocorrer através do tratamento térmico das enzimas, onde o aumento de temperatura inativa sua atividade enzimática. Entretanto o aquecimento nos tecidos vegetais pode resultar em perdas da qualidade nutricional e sensorial dos produtos resultando em uma desvantagem deste método, pois, a PFO de algumas origens apresenta elevada termoestabilidade. A eliminação do oxigênio por embalagens a vácuo, constitui outra alternativa à oxidação da PFO, contudo, alguns produtos tendem a escurecer rapidamente após a abertura da embalagem ou quando entram em contato com o ar. Dentre os métodos químicos, contra a oxidação enzimática, constam o uso de inibidores potenciais da enzima PFO os quais se destacam o ácido cinâmico, ácido benzóico, ácido ascórbico, ácido cítrico

(uma vez que a redução do pH diminui os valores de escurecimento oxidativo), agentes sulfitantes, dentre outros (MENDONÇA; GUERRA, 2003). Finalmente, essa enzima, que possui aspectos indesejáveis provenientes do escurecimento dos tecidos vegetais, torna seu controle e/ou inibição de vital importância para redução de perdas pós-colheita e da qualidade do produto obtido.

Conclusão

- Dentre os aspectos de perdas pós-colheita, as transformações bioquímicas dos vegetais são de relevante preocupação, decorrendo das atividades enzimáticas que interferem nas qualidades sensoriais e nutricionais dos produtos finais;

- A polifenoloxidase (PFO) pode ser considerada como uma enzima intrigante apresentando pontos positivos e negativos para os vegetais, pois tanto pode prevenir o ataque de patógenos, quanto é responsável pelo escurecimento oxidativo dos tecidos vegetais após a colheita;

- É preciso avaliar as perdas pós-colheita, bem como a ação enzimática preponderante no escurecimento dos tecidos, na tentativa de estabelecer métodos de controle e tecnologias que proporcionem a qualidade dos produtos.

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ALVARENGA, R. **Palavra de médico**. Disponível em: <http://www.palavrademedico.kit.net/tema03.htm>. Acesso em: 09 fev. 2011.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 416p.

CAMPOS, A. D. ; SILVEIRA, E. M da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas.** Pelotas: Embrapa, 2003. Comunicado Técnico, 87.

CARDOSO, C.O.N. ; GARRAWAY, M.O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with Fusarium solani f. phaseoli (Burk.) Snyd & Hans. **Summa Phytopathologica**, v.3, p.103-116, 1977.

CHITARRA, M. I. F. ; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. p. 688.

ÉSPIN, J. C. et al. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. **Analytical Biochemistry**, v.231, p. 237-246, 1995.

FEILLET, P. ; AUTRAN, J. C. ; VERNIÉRE, C. I. Pasta brownness an assessment. **Journal of Cereal Science**, v. 32, p. 215-233, 2000.

FATIBELLO-FILHO, O. ; VIEIRA, I. da C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.455-464, 2002.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2008.
MAHANTA, P. K. et al. Changes of polyphenol oxidase and peroxidase activities and pigment composition of some manufactured black tea (Camellia sinensis L.). **American Chemical Society,** v. 41, p.272-276, 1993.

MENDONÇA, S. C. ; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 113-116, 2003.

NELSON, D. L. ; COX, M. M. Enzimas. In: _____. **Lehninger**: principios de bioquimica. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. cap.6, p. 190-235.

RANI, K. U. et al. Distribution of enzymes in wheat flour Mill streams. **Journal of Cereal Science,** v.34, p. 233-242, 2001.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TORTORA, G.J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. Metabolismo microbiano. In: _____. **Microbiologia.** 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 5, p. 111-121.

YOSHIYAMA, M. ; ITO, Y. Decrease of adstringency of cacao beans by an enzymatic treatment. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**,. v.43, n.2, p. 124-129, 1996.