LUCIANA NUNES MENOLLI

ATUAÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS EM RAÍZES DE BATATA-BAROA *(Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) SUBMETIDAS À INJÚRIA POR FRIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae.*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
M547a
2006

Menolli, Luciana Nunes, 1981-
Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas à injuria por frio / Luciana Nunes Menolli. – Viçosa : UFV, 2006.
x, 63f. : il. ; 29cm.

Orientador: Fernando Luiz Finger.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Batata-baroa - Armazenamento. 2. Peroxidase - Efeito da temperatura. 3. Peroxidase - Efeito do pH. 4. Polifenoloxidase - Efeito da temperatura. 5. Polifenoloxidase - Efeito do pH. 6. Stress (Fisiologia).
I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 635.2168

LUCIANA NUNES MENOLLI

ATUAÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS EM RAÍZES DE BATATA-BAROA *(Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) SUBMETIDAS À INJÚRIA POR FRIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2006.

Prof. Mário Puiatti (Co-orientador)	Prof. Raimundo Santos Barros (Co-orientador)
Prof. Vicente Wagner Dias Casali	Maria Aparecida N. Sediyama

Prof. Fernando Luiz Finger
(Orientador)

Aos meus amados pais, João Antonio e Marisa,
Meus irmãos Valéria e João Fernando e
Ao meu namorado Daniel,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante.

À minha família por todo amor e incentivo que me conduziram até aqui.

Ao meu namorado Daniel Carlos Ferreira Lanza, pela compreensão, apoio e carinho.

Ao professor Fernando Luiz Finger, pela orientação, paciência e conhecimento.

Aos conselheiros e membros da banca Raimundo Santos Barros, Mário Puiatti, Vicente Wagner Dias Casali e Maria Aparecida Nogueira Sediyama pelas valiosas sugestões e conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e condições de realização do trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A estagiária Janaína Miranda Barbosa pela disposição e pelos trabalhos prestados.

Aos amigos Eber A. A. Medeiros, Fernanda B. Segatto, Clarice A. Megguer, pela amizade e apoio.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, pelo companheirismo, pelos momentos agradáveis proporcionados e pelas informações compartilhadas.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANA NUNES MENOLLI, filha de João Antonio Menolli e Marisa Alves Nunes Menolli, nasceu em 24 de junho de 1981, em Cambé, PR.

Em 1998, concluiu o ensino médio no Colégio Marista de Londrina, em Londrina, PR.

Em 2000, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas no Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), em Londrina, PR, onde graduou-se em dezembro de 2003.

Em agosto de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos na área de Fisiologia Pós-colheita, defendendo a tese em 30 de junho de 2006.

CONTEÚDO

RESUMO vii
ABSTRACT ix
CAPÍTULO 1
ATUAÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS NO ESCURECIMENTO CAUSADO POR INJÚRIA POR FRIO EM RAÍZES DE BATATA-BAROA 1
RESUMO 1
1. INTRODUÇÃO 3
2. MATERIAL E MÉTODOS 6
2.1- Análise visual 7
2.2- Atividade da polifenoloxidase 7
2.3- Atividade da peroxidase 7
2.4- Compostos fenólicos solúveis 9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 10
4. CONCLUSÕES 22
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23
CAPÍTULO 2
ATIVIDADE DA PEROXIDASE E DA POLIFENOLOXIDASE EM RAÍZES DE BATATA-BAROA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA 28
RESUMO 28
1. INTRODUÇÃO 30
2. MATERIAL E MÉTODOS 33
2.1- Purificação parcial das enzimas peroxidase e polifenoloxidase 33

2.2- Efeito do pH na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase 35
2.3- Efeito da temperatura na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase 35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
3.1- Peroxidase..... 36
3.1.1- Purificação parcial por fracionamento com sulfato de amônio..... 36
3.1.2- Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase 38
3.1.3- Efeito da temperatura sobre a atividade da peroxidase 40
3.2- Polifenoloxidase 47
3.2.1- Purificação parcial por fracionamento com sulfato de amônio..... 47
3.2.2- Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase 47
3.2.3- Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase 52
4. CONCLUSÕES..... 56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

RESUMO

MENOLLI, Luciana Nunes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2006. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa *(Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas à injúria por frio**. Orientador: Fernando Luiz Finger. Co-Orientadores: Mário Puiatti e Raimundo Santos Barros

A batata-baroa é uma hortaliça de origem subtropical, cujas raízes tuberosas são altamente perecíveis em condições de temperatura ambiente, necessitando de armazenamento sob refrigeração para prolongar a durabilidade pós-colheita. Entretanto, baixas temperaturas de armazenamento podem acarretar o surgimento de sintomas de injúria por frio, dentre eles, o escurecimento das raízes. Em muitas espécies, têm-se observado que o escurecimento ocorre devido à atuação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no escurecimento provocado por baixas temperaturas causadoras da injúria por frio e verificar possíveis variações no comportamento dessas enzimas sob condições de pH e temperatura, determinando as condições ótimas da atividade e possíveis formas de inativação. A influência das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no escurecimento enzimático ocasionado pelo armazenamento em temperaturas que causam injúria por frio, foi determinada por meio da análise visual das

raízes, da determinação da atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, e da concentração de compostos fenólicos solúveis em raízes submetidas ao armazenamento a 5ºC e 10ºC. A influência do pH e da temperatura sobre atividade das enzimas foi feita via saturação do extrato bruto com sulfato de amônio (0 a 80%). Tanto a temperatura de 5ºC quanto de 10ºC houve progressivo aumento no grau de escurecimento, na atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, e da concentração de compostos fenólicos durante o armazenamento. A atividade da enzima peroxidase aumentou expressivamente até o 7º dia de armazenamento em ambas as temperaturas, mantendo-se praticamente constante após esse período à temperatura de 5ºC até o 28º dia de armazenamento. A temperatura de 10ºC houve maior atividade, no 14º dia de armazenamento, com posterior declínio. A atividade da polifenoloxidase e a concentração de compostos fenólicos solúveis aumentaram acentuadamente após o 14º dia de exposição às duas temperaturas. Esses resultados indicam a atuação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no escurecimento, porém, essas duas enzimas não seriam os únicos fatores responsáveis pelo mesmo. A peroxidase teve maior atividade quando a reação ocorreu entre pH 5,5 e 6,0, e sob temperatura de 30ºC; houve inativação da enzima a pH 2,5 após 60 min de exposição, e às temperaturas de 60ºC, após 10 minutos, e 70ºC, após 5 minutos. A polifenoloxidase apresentou maior atividade quando a reação ocorreu em pH 7,5 e à temperatura de 30ºC. Essa enzima não foi inativada pela incubação em pH 2,5 ou 9,0, porém foi inativada após 5 minutos a 80 ºC.

ABSTRACT

MENOLLI, Luciana Nunes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June of 2006. **Role of oxidative enzymes on Yellow Peruvian (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) roots submitted to the chilling**. Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-Advisers: Mário Puiatti and Raimundo Santos Barros

The Yellow Peruvian root is a vegetable of subtropical origin, whose tuber roots are highly perishable when stored at room temperature, requiring storage under refrigeration to extend the postharvest life. However, low temperatures of storage can induce the development of chilling symptoms, including the browning of the roots. In many species, it has been observed that the browning occurs due action of peroxidase and polyphenoloxidase. The objective of this work was to evaluate the role of peroxidase and polyphenoloxidase on the development of browning induced by chilling inducing temperatures and to study the behavior of these enzymes under different conditions of pH and temperature, determining optimal conditions for activity and possible ways for inactivation. The influence of the enzymes peroxidase and polyphenoloxidase in the enzymatic browning caused by the temperatures was determined by the visual analysis of the roots, determination of peroxidase and polyphenoloxidase activities, and by the total soluble phenolic concentration in roots stored at 5ºC and 10ºC. The influence of pH and temperature on the activity of enzymes were done in an ammonium sulphate saturated (0 – 80%) crude extract. In both, at 5ºC and 10ºC had an increase in

the root browning, in the activity of peroxidase and polyphenoloxidase, and total phenolics content while being stored. The activity of the enzyme peroxidase increased fast up to the 7º day of storage in both the temperatures, remaining practically constant after this period at 5ºC until the 28º day of storage. The temperature of 10ºC showed higher activity at 14º day of storage, with posterior decline. The activity of polyphenoloxidase and the soluble phenolics concentration increased dramatically after the 14º day of exposition to both temperatures. These results indicate a probable involvement of the enzymes peroxidase and polyphenoloxidase in the browning, however, these two enzymes may not be the only responsible factors acting on the browning. Peroxidase had higher activity when the reaction was performed between the pH 5.5 and pH 6.0 and temperature of 30ºC; its inactivation was accomplished at pH 2.5 for 60 minutes and the temperature of 60ºC for 10 minutes or 70ºC, for 5 minutes. Polyphenoloxidase presented higher activity when the reaction was done at pH 7.5 and temperature of 30ºC. This enzyme was not inactivated by incubation in pH 2.5 or 9.0, but it was inactivated after 5 minutes at 80ºC.

CAPÍTULO 1

ATUAÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS NO ESCURECIMENTO CAUSADO POR INJÚRIA POR FRIO EM RAÍZES DE BATATA-BAROA

RESUMO

A batata-baroa é uma hortaliça de origem subtropical, cujas raízes tuberosas são altamente perecíveis em condições de temperatura ambiente, necessitando de armazenamento sob refrigeração para prolongar a durabilidade pós-colheita. Entretanto, as baixas temperaturas de armazenamento podem acarretar o surgimento de sintomas de injúria por frio, dentre eles, o escurecimento das raízes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no escurecimento provocado por baixas temperaturas causadoras da injúria por frio. Realizou-se, análise visual das raízes, determinação das atividades da peroxidase e da polifenoloxidase e da concentração de compostos fenólicos solúveis em raízes submetidas ao armazenamento a 5ºC e 10ºC. Tanto à temperatura de 5ºC quanto a de 10ºC ocorreu aumento no grau de escurecimento, na atividade da peroxidase, da polifenoloxidase e da concentração de compostos

fenólicos a partir da exposição dos tecidos ao frio. A atividade da peroxidase apresentou aumento expressivo até o 7º dia de armazenamento em ambas as temperaturas, mantendo-se praticamente constante após esse período à 5ºC até o 21º de armazenamento. À temperatura de 10ºC houve maior atividade da enzima, no 14º dia de armazenamento, com posterior declínio. A atividade da enzima polifenoloxidase e a concentração de compostos fenólicos solúveis aumentaram após o 14º dia de exposição às duas temperaturas. Esses resultados indicam atuação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no escurecimento. A peroxidase atuando, inicialmente, como uma resposta direta ao estresse causado pelo frio, e a polifenoloxidase, posteriormente.

Palavras-chave: peroxidase, polifenoloxidase, mandioquinha-salsa, armazenamento

1- INTRODUÇÃO

A batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) pertence à família Apiaceae, sendo cultivada em vários países da América do Sul, especialmente na Venezuela, Colômbia e Brasil (CASALI e SEDIYAMA, 1997). No Brasil, a produção se concentra principalmente nos estados do Paraná e Minas Gerais (SANTOS e CARMO 1998; SANTOS, 2000).

O curto período de conservação pós-colheita da batata-baroa em condições ambientais torna a comercialização viável pelo período máximo de seis dias (THOMPSON, 1980; SCALON et al., 1998). As principais causas da alta perecibilidade da batata-baroa decorrem do aumento da taxa respiratória, da biossíntese e ação do etileno, da ocorrência de danos mecânicos, do alto índice de perda de água e das condições inadequadas de armazenamento (CÂMARA,1984; YUPANQUI, 1998).

Existem algumas técnicas pós-colheita que visam prolongar a vida de prateleira de produtos hortícolas. Dentre essas técnicas, a refrigeração, procedimento pós-colheita relativamente simples, reduz o metabolismo do produto, permitindo menor perda de água do órgão armazenado e dificultando o desenvolvimento de doenças pós-colheita. Porém esta técnica requer certos cuidados quanto à temperatura a ser utilizada, pois temperaturas na faixa de 5ºC a 15ºC podem causar

desordens fisiológicas em espécies tropicais e subtropicais (FERNÁNDEZ-TRUJILLO et al.,1998).

As desordens ou injúrias causadas pela exposição dos tecidos a baixas temperaturas, porém acima do ponto de congelamento, são denominadas de injúria por frio. Plantas sensíveis ao frio sob condições de estresse apresentam, inicialmente, modificação na fase lipídica das membranas, alteração na cinética ou na especificidade das enzimas reguladoras, e modificação na estrutura celular ou aumento do cálcio citosólico (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Posteriormente, ocorre estímulo à síntese de etileno, aumento na respiração, alteração na estrutura celular, redução da fotossíntese, aumento da permeabilidade de membrana e modificação nos mecanismos de produção de energia (CHITARRA e CHITARRA, 2005), acarretando descolorações, depressões superficiais, colapso interno, favorecendo a doenças e promovendo danos.

Em raízes tuberosas, tais como a batata-baroa, os sintomas externos de injúria por frio, a 5ºC, são lesões em toda superfície, seguida de intenso escurecimento ao redor das lesões e sintomas internos de escurecimento que se estendem do anel vascular à periderme (RIBEIRO et al., 2005).

Dentre as respostas dos tecidos à injúria por frio está o escurecimento o qual, segundo trabalhos com várias espécies, pode estar relacionado com a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Admite-se que essas enzimas estejam relacionadas ao escurecimento, visto que baixas temperaturas, que causam injúria por frio, também induzem estresse oxidativo em vegetais (PURVIS e SHEWFELT, 1993). O estresse oxidativo estimula as peroxidases, as quais atuam na remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água (SALISBURY e ROSS, 1991). As polifenoloxidases, por sua vez, promovem a oxidação enzimática de compostos fenólicos produzindo, inicialmente, quinona que rapidamente se condensa, formando pigmentos insolúveis e escuros

denominados melanina, ou reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos (ARAÚJO, 1990).

A sensibilidade da estrutura vegetal a condições de estresse depende de diversas variáveis, dentre elas: espécie e/ou cultivar, maturidade, práticas de colheita e manejo, diâmetro da raiz, condições climáticas e condições de armazenamento (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o escurecimento induzido por temperaturas causadoras de injúria por frio está associado à atividade da peroxidase e da polifenoloxidase.

2-MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em condições de laboratório, utilizando raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) da cultivar Amarela de Carandaí adquiridas em comércio varejista, localizado na cidade de Viçosa-MG, entre os meses de outubro/2005 a janeiro/2006. As raízes foram colhidas e estavam armazenadas no comércio a 24 ± 12 horas, à temperatura ambiente sem embalagem. Após adquiridas, as raízes tuberosas foram selecionadas de acordo com comprimento, formato, bom aspecto de comercialização e massa média de 164 g.

Os tratamentos foram constituídos de duas temperaturas de armazenamento (5ºC e 10ºC), dispostos no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à estatística descritiva de médias e erro padrão da média. A unidade experimental era constituída de uma bandeja de poliestireno expandido contendo cinco raízes. As bandejas foram mantidas por 28 dias em câmaras frias, com temperaturas de 5ºC ou 10ºC e umidade relativa média de 68 ± 5%. Os dados foram avaliados por analise visual das raízes a cada sete dias de armazenamento, e foram determinadas a concentração de compostos fenólicos solúveis e a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase.

2.1- Análise visual

A análise visual foi realizada aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, sendo utilizadas cinco raízes avaliadas simultaneamente, quanto às lesões externas e internas, sendo para as internas realizado um corte de aproximadamente um cm na extremidade basal.

As lesões de injúria por frio foram avaliadas na superfície das raízes segundo a escala de notas subjetiva adaptada de RIBEIRO (2003), conforme o grau de severidade da ocorrência da injúria, variando de 0 a 4: 0 = sem injúria (sem sinal de injúria); 1 = levemente injuriadas (superfície com até 25% de injúria); 2 = moderadamente injuriadas (superfície entre 26% e 50% de injúria); 3 = extremamente injuriadas (superfície entre 51% e 75% de injúria); 4 = completamente injuriadas (superfície com mais de 76% de injúria) (Figura 1).

2.2- Atividade da polifenoloxidase

Para a determinação da atividade da polifenoloxidase, aproximadamente 2 g de raízes previamente armazenados em câmaras a 5 e a 10ºC, foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 12 mL de tampão de extração [tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5; polyvynil pyrrolidone de peso molecular 40 (PVP40) 1%; Triton X-100 1% e ácido ascórbico 0,15 M]; a suspensão resultante foi centrifugada a 17000 x *g*, a 4ºC, por 30 min. Para a determinação da atividade, uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi adicionada a 0,8 mL de água destilada, 0,5 mL de 4-metil-catecol 0,12 M e 1,5 mL de ácido cítrico 0,1 M pH 4,8 (ajustado com K_2HPO_4 0,2 M) (NEVES, 2003). As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro, pela variação da absorvância no comprimento de onda de 410 nm a 25ºC, imediatamente após a mistura e a atividade expressa em Unidades de Absorvância (UA)/min/mg de proteína.

2.3- Atividade da peroxidase

Para a determinação da atividade da peroxidase, aproximadamente, 2 g de raízes, previamente armazenadas a 5º e a

Figura 1. Sintomas internos e externos de injúria por frio em raízes de batata-baroa: A, sem injúria; B, levemente; C, moderadamente; D, extremamente; E, completamente injuriadas.

10ºC, foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 10 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5; bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M) e a suspensão resultante foi centrifugada a 17.000 x *g*, durante 30 min a 4 ºC. Para a determinação da atividade enzimática, 0,5 mL do sobrenadante foram misturados a 1,5 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5, 0,5 mL de guaiacol 0,19 M e 0,5 mL de H_2O_2 0,01 M (NEVES, 2003). As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 470 nm a 25ºC durante 2,5 minutos. A atividade foi expressa em (UA)/min/mg de proteína.

A concentração de proteína nas preparações enzimáticas foi determinada como descrito por BRADFORD (1976), usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

2.4- Compostos fenólicos solúveis

A determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis nas raízes foi feita de acordo com método de PRINCE e BUTLER (1977). Aproximadamente 2 g de raízes, foram anteriormente macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 10 mL de metanol e colocados sob agitação por 15 min. Após esse período, o homogenato foi centrifugado a 17.000 x g durante 30 min. Para a determinação dos compostos fenólicos solúveis, 0,5 mL do sobrenadante foram misturados a 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:3) e 2 mL de carbonato de sódio anidro 10%, reagindo por uma hora. As leituras da concentração de compostos fenólicos solúveis foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 700 nm e os resultados expressos em g de fenóis solúveis por g de matéria fresca. A curva de calibração foi feita utilizando D-catequina como padrão.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes de batata-baroa armazenadas a 5ºC e a 10ºC, tiveram processo de escurecimento a partir da exposição destas àquelas temperaturas, com escurecimento ao redor das lesões e em torno do anel vascular. O grau de escurecimento aumentou de forma semelhante sob as duas temperaturas, até o 14º dia de armazenamento. Do 14º ao 21º dia de armazenamento ele manteve-se praticamente constante à temperatura de 10ºC. Na temperatura de 5ºC observou-se maior escurecimento a partir do 14º dia de armazenamento, enquanto que a 10ºC o aumento foi menos intenso a partir do 21º dia (Figura 2). Segundo RIBEIRO (2003) o escurecimento em batata-baroa pode ser explicado pela mudança física dos lipídios saturados das membranas, causada por baixas temperaturas. As moléculas lipídicas passam do estado gel para o estado gel cristalino, permitindo oxidações enzimáticas, sendo essa mudança lipídica uma resposta primária dos tecidos sensíveis ao frio. Dentre as espécies de vegetais com esse tipo de tecido, está a batata-baroa. Essa resposta pode resultar em alterações do metabolismo, como, extravasamento de íons, perda da atividade mitocondrial, alterações na produção de etileno, nos sistemas enzimáticos associados à membrana, e acúmulo de metabólitos tóxicos como etanol e acetaldeído (RIBEIRO, 2003).

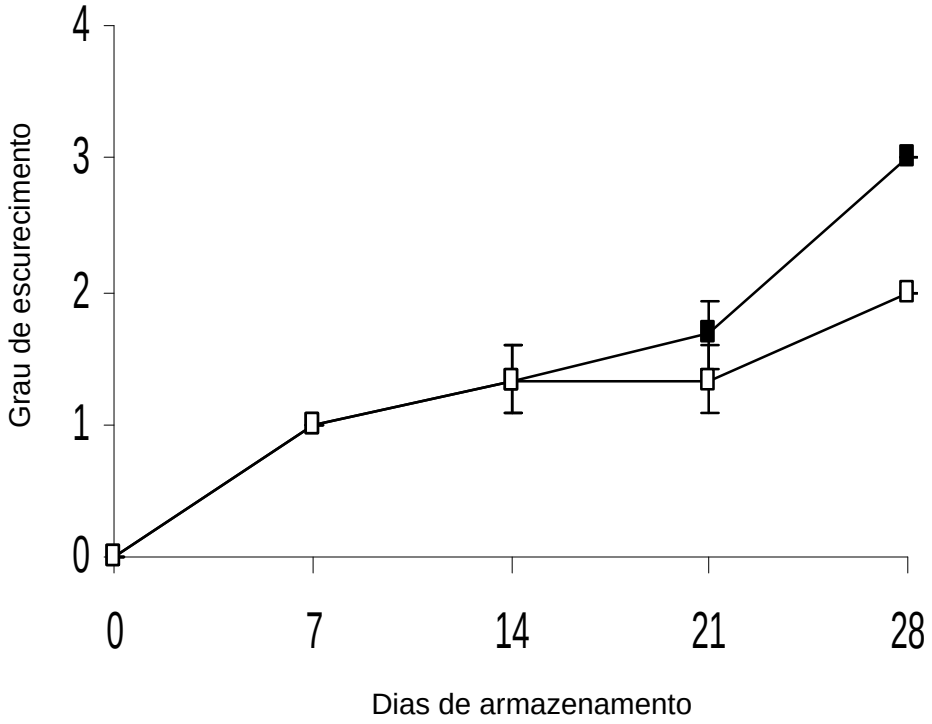

Figura 2. Avaliação do escurecimento em raízes de batata-baroa armazenadas a 5ºC (■) e a 10ºC (□) durante 28 dias. As barras representam erro padrão da média.

RIBEIRO et al. (2005) analisando raízes de batata-baroa da cultivar Amarela de Carandaí armazenadas a 5 e a 10ºC sem embalagem de PVC, durante 28 dias, não observaram escurecimento nos primeiros 7 dias de armazenamento a 10ºC obtendo, ao final do experimento (28º dia), menos de 25% do tecido injuriado àquela temperatura. As raízes armazenadas a 5ºC apresentaram sintomas de injúria por frio após sete dias de armazenamento, atingindo mais de 75% do tecido injuriado, ao 28º dia de armazenamento (Figura 2). Os dados demonstram que os níveis de injúria obtidos por RIBEIRO et al. (2005) foram menores que os observados nesse experimento a 10ºC. As diferenças observadas podem ser explicadas, em parte, pela origem das raízes; RIBEIRO et al. (2005) trabalharam com raízes obtidas de uma horta, com as condições de cultivo, colheita e transporte acompanhadas, ao contrário deste experimento, em que as raízes foram obtidas em condições comerciais de varejo, as quais, muitas vezes já apresentavam injúrias por danos mecânicos, provavelmente devido à colheita e transporte, o que poderia ter proporcionado aumento da síntese de etileno e da respiração. De acordo com TATSUKI e MORI (1999), várias espécies de plantas têm a síntese de etileno induzida quando submetidas a essas condições e a presença do etileno pode ter promovido o agravamento dos sintomas de injúria por frio nas duas temperaturas de armazenamento.

O armazenamento em baixas temperaturas causa indução de várias enzimas, como as peroxidases e as lipoxigenases, as quais podem converter o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno, sabendo-se que em tecidos mecanicamente danificados, a síntese de etileno é resultado final da peroxidação de lipídios (YANG e HOFFMAN, 1984).

A concentração de compostos fenólicos solúveis, do momento de exposição dos tecidos ao frio até o 7º dia de armazenamento, teve aumento de 11 e 10 vezes nas temperaturas de 5 e 10ºC, respectivamente. A maior concentração de compostos fenólicos solúveis foi obtida no 21º dia; do 14º para o 21º dia a concentração passou de

0,369 g g MF para 1,973 a 5ºC e de 0,404 para 2,491 g g MF, a 10ºC

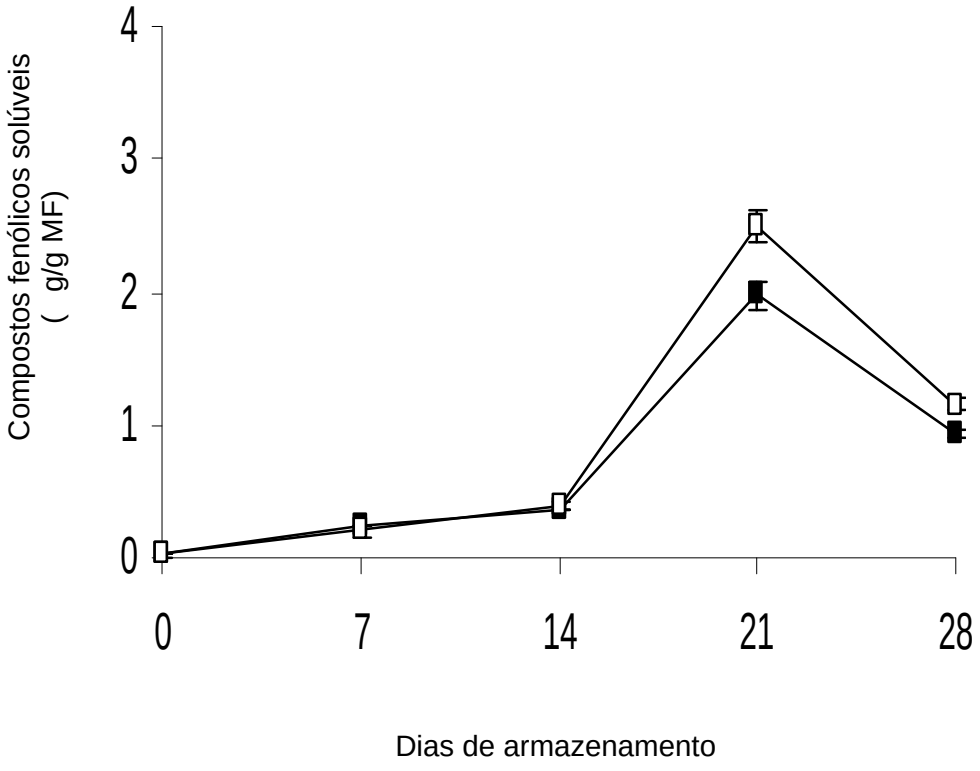

Figura 3. Concentração de compostos fenólicos solúveis em raízes de batata-baroa armazenadas por 28 dias às temperaturas de 5ºC (■) e a 10ºC (□). As barras representam erro padrão da média.

(Figura 3). Esses dados indicam que houve comportamento semelhante nas duas temperaturas de armazenamento. Resultados similares foram encontrados em cascas de duas cultivares de banana armazenadas a 6ºC e a 10ºC, durante 15 dias (NGUYEN et al., 2003). Após o 21º dia de armazenamento, a concentração de compostos fenólicos solúveis reduziu, provavelmente devido à utilização dos substratos pela polifenoloxidase ou outras enzimas do metabolismo dos fenilpropanóides, tais como a peroxidase (GUIMARÃES, 2006).

É possível estabelecer-se relação entre escurecimento e concentração de compostos fenólicos solúveis. Segundo ARAÚJO (1990) o escurecimento ocorre quando compostos fenólicos são oxidados por ação enzimática, produzindo compostos que rapidamente se condensam formando pigmentos escuros, ou quando reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos fenólicos, também formando pigmentos escuros, denominados melanina.

O aumento da concentração de compostos fenólicos no armazenamento pode ser devido ao fato de baixas temperaturas estimularem a atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (NGUYEN et al., 2003). A PAL elimina uma molécula de amônia da fenilalanina para formar o ácido cinânico acarretando a formação compostos fenólicos, sendo essa enzima regulatória entre o metabolismo primário e secundário (TAIZ e ZEIGER, 2002). Em alface minimamente processada, em que escurecimento é relacionado ao aumento da atividade da PAL induzido por dano, tratamento com inibidores da atividade da enzima, reduziu o escurecimento e preveniu o acúmulo de compostos fenólicos livres, o que indica relação entre a PAL e o escurecimento (PEISER et al.,1998; HISAMINATO et al., 2001). Outra explicação para aumento da concentração de compostos fenólicos, é o fato do etileno, decorrente do dano mecânico ou do “chilling”, induzir a síntese de ácido clorogênico, assim como de outros compostos fenólicos,

como a cumarina em cenoura, pela indução do incremento da atividade da PAL (HYDO et al., 1978).

Nas raízes de batata-baroa, armazenadas à 5ºC e a 10ºC, houve aumento na atividade da enzima polifenoloxidase nos primeiros 7 dias de armazenamento de 1,4 e de 1,6 vezes, respectivamente mantendo-se praticamente constante do 7º até o 14º dia (Figura 4). A partir do 14º dia, verificou-se acréscimo de 14 e 8 vezes na atividade da enzima, a 5 e 10ºC, respectivamente. A maior atividade foi observada ao 28º dia, atingindo 68,38 UA/min/mg de proteína a 5ºC e 58,45 UA/min/mg de proteína, a 10ºC, esses valores foram similares aos observados por NGUYEN et al. (2003) em cascas de duas cultivares de banana armazenadas por 15 dias, a 6ºC e a 10ºC e em raízes de jacatupé armazenadas durante 8 dias, às temperaturas de 10 e 20ºC (AQUINO-BOLAÑOS e MERCADO-SILVA, 2004).

Houve relação positiva entre atividade da polifenoloxidase e concentração de compostos fenólicos solúveis (r = 0,91 e de r = 0,90 nas temperaturas de 5ºC e de 10ºC, respectivamente) (Figura 5). Relação dessa natureza e magnitude foi observada em outras espécies, como em castanhas armazenadas a 4ºC e a -20ºC durante seis meses (XU, 2005). NEVES (2003), ao estudar a influência das enzimas oxidativas no escurecimento promovido por condições de chilling em frutos de quiabo armazenados a 5ºC e a 10ºC, por 16 dias, também observou incremento na atividade da polifenoloxidase e elevação da concentração de compostos fenólicos coincidindo com o aumento do escurecimento dos frutos. Essa relação entre a atividade da polifenoloxidase e a concentração de compostos fenólicos pode ser explicada pelo fato de o “chilling” promover modificação no estado físico das membranas, local onde estas enzimas encontram-se inativas, permitindo que as enzimas tornem-se ativas ao entrar em contato com o oxigênio e os substratos fenólicos (UNDERHILL e CRITCHLY, 1995).

Em 5ºC e 10ºC até o 7º dia de armazenamento, a atividade da enzima peroxidase aumentou 1897% e 2564%, respectivamente (Figura

6), mantendo-se praticamente constante após esse período à 5ºC até o 21º de armazenamento. A temperatura de 10ºC houve maior atividade da enzima, no 14º dia de armazenamento, com posterior declínio. Frutos de

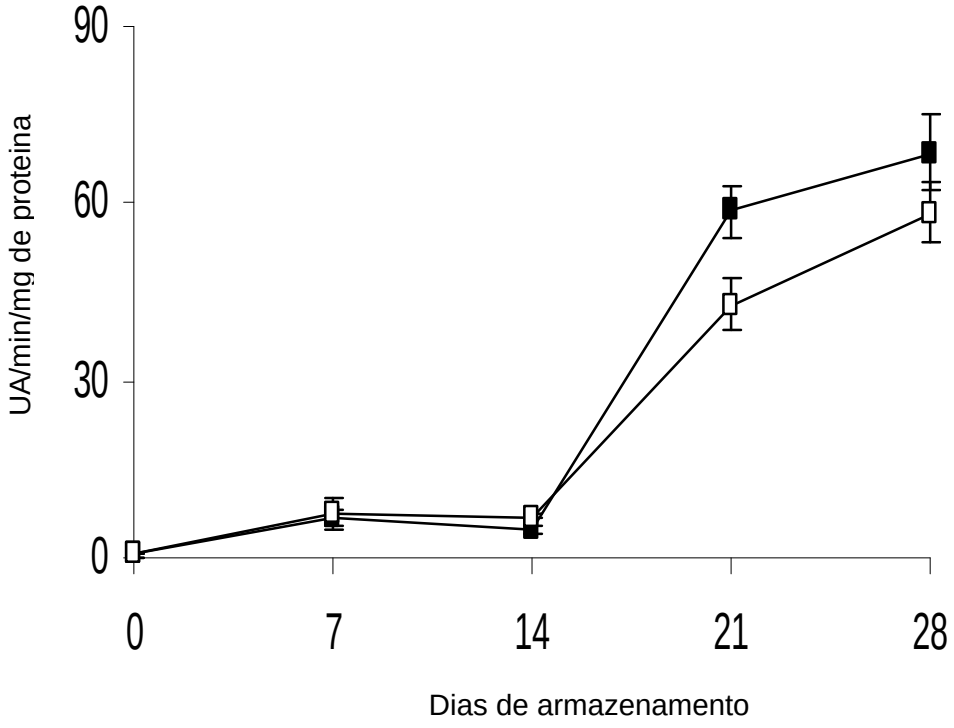

Figura 4. Atividade da enzima polifenoloxidase em raízes de batata-baroa armazenadas por 28 dias às temperaturas de 5ºC (■) e a 10ºC (□). As barras representam erro padrão da média.

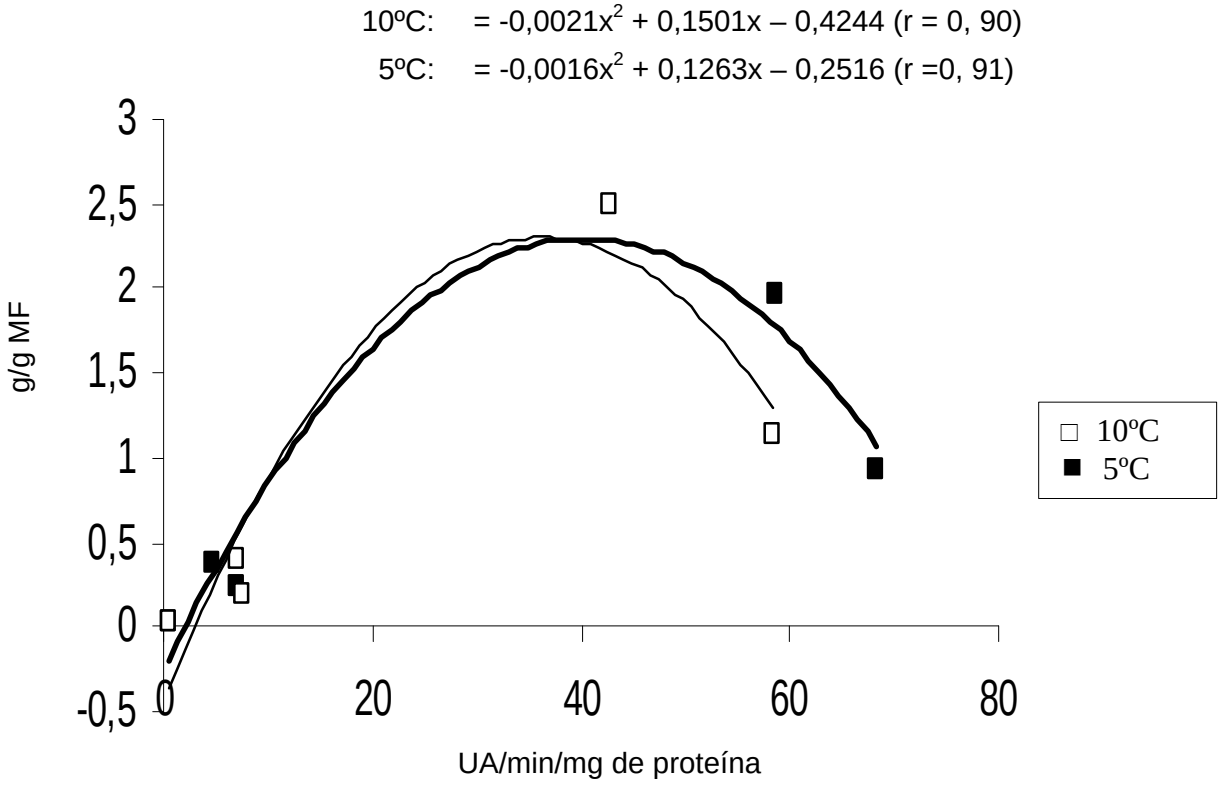

Figura 5- Relação entre atividade da enzima polifenoloxidase e concentração de compostos fenólicos solúveis em raízes de batata-baroa armazenadas por 28 dias nas temperaturas de 5 e 10ºC.

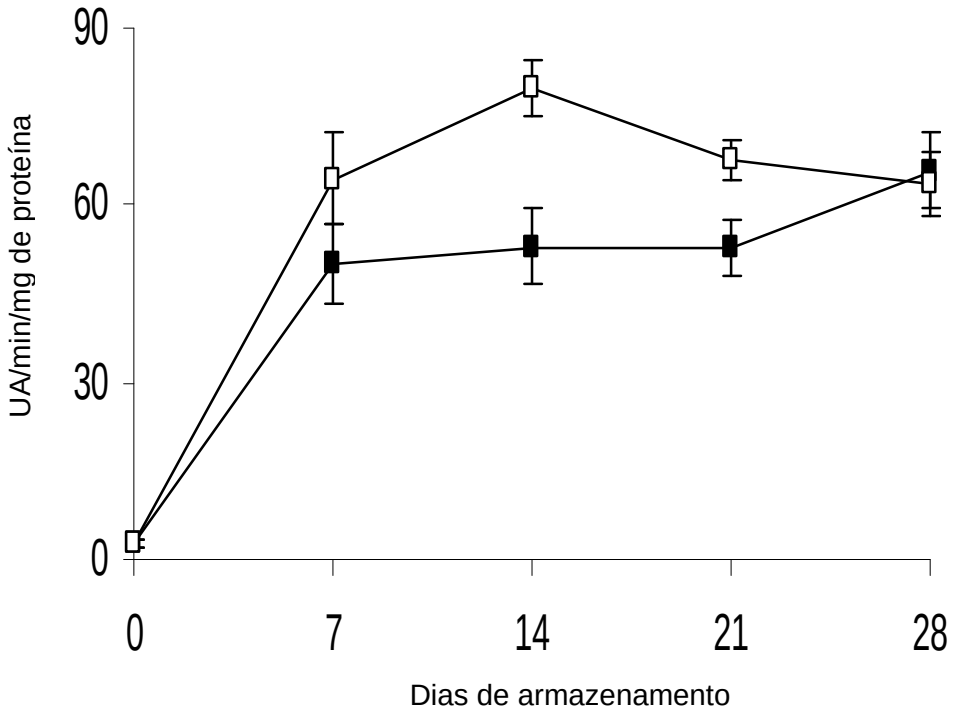

Figura 6. Atividade da enzima peroxidase em raízes de batata-baroa armazenadas por 28 dias a 5ºC (■) e a 10ºC (□). As barras representam o erro padrão da média.

mandarino, que são sensíveis ao frio, armazenados a 4ºC e 8ºC, durante quatro semanas aumentaram continuamente a atividade da enzima peroxidase durante esse período quando armazenados a 4ºC, enquanto que, a 10ºC houve acréscimo na atividade da peroxidase nas duas primeiras semanas com subseqüente declínio (EL-HILARI et al., 2003).

A peroxidase é considerada uma enzima de estresse estimulada por baixas temperaturas, em espécies sensíveis ao frio (EL-HILARI et al., 2003; KUK et al., 2003). Nessas condições, há aumento desordenado na taxa respiratória causando formação de espécies reativas de oxigênio; a enzima aumenta a atividade para reduzir os danos causados por essas espécies reativas de oxigênio, removendo átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água protegendo, assim, os tecidos (SALISBURY e ROSS, 1991).

Estudos com a enzima ascorbato peroxidase em tubérculos de batata, indicam que, em resposta ao armazenamento em baixas temperaturas, a peroxidase apenas reduz o peróxido de hidrogênio à água, devido a sua maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio que a catalase, tendo como função a desintoxicação do meio (KAWAKAMI et al., 2002).

O aumento da atividade da enzima peroxidase foi concomitante com o escurecimento, sob ambas temperaturas; todavia a relação entre a concentração de compostos fenólicos solúveis, que seriam os “responsáveis” pelo escurecimento por serem substrato para a enzima, com a atividade da enzima foi não significativa (Figura 7). Esse comportamento poderia indicar que o aumento da atividade da peroxidase, com posterior manutenção até o 28º dia de armazenamento, estivesse relacionado como a peroxidação de lipídios, uma resposta primária em condições de injúria por frio (KUO e PARKIN, 1989). O aumento na atividade das peroxidases também poderia estar relacionado

com a lignificação de tecidos, uma vez que, de acordo com AQUINO-BOLAÑOS e MERCADO-SILVA (2004) o conteúdo de lignina aumenta três vezes durante o armazenamento, assim como a atividade das

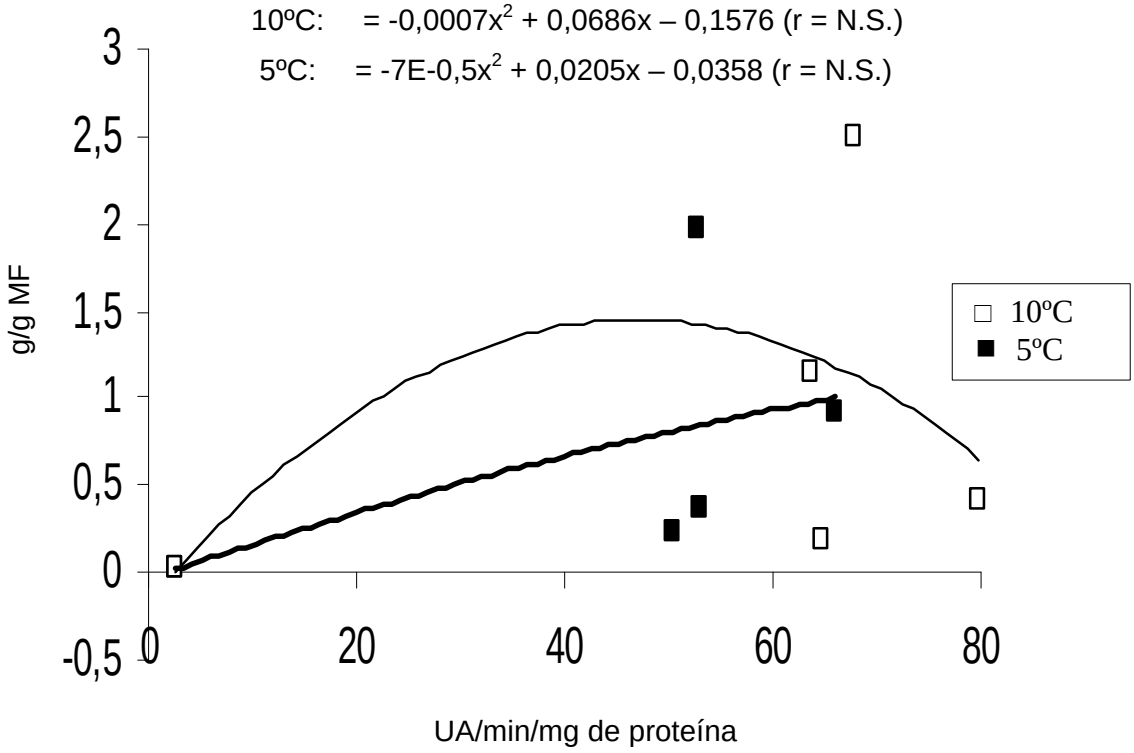

Figura 7- Relação entre atividade da enzima peroxidase e concentração de compostos fenólicos solúveis em raízes de batata-baroa armazenadas por 28 dias nas temperaturas de 5ºC e 10ºC.

peroxidases que participam do processo de lignificação, em raízes de jacatupé, quando estas são submetidas ao armazenamento por uma semana, à temperatura de 20ºC.

MARTINEZ-TÉLLEZ e LAFUENTE (1993) e EL-HILARI et al., (2003) analisando frutos de laranja da cultivar Navelina armazenados a 1ºC, 2,5ºC, 5ºC e 10ºC durante 60 dias e mandarino “Fortune” armazenados a 4ºC e 8ºC por 4 semanas, não verificaram qualquer relação entre escurecimento e a atividade da peroxidase; respostas desta natureza também foram obtidas por NEVES (2003) analisando frutos de quiabo durante 16 dias, às temperaturas de 5 e 10ºC.

Os resultados obtidos sugerem que o escurecimento verificado em condições de injúria por frio, além da possível atuação da polifenoloxidase e da peroxidase, também pode ser causado por reações não-enzimáticas entre a carbonila e grupos amina, produzindo pigmentos escuros de melanoidina, sendo, nesse caso, as principais substâncias envolvidas, açúcares redutores eaminoácidos ou proteínas, como foi observado em batata-doce por PICHA (1986). RIBEIRO (2003) trabalhando com raízes de batata-baroa verificou que, tanto a 5ºC quanto a 10ºC, durante o armazenamento, ocorreu aumento na concentração de açúcares redutores, o que poderia explicar o escurecimento não-enzimático.

4- CONCLUSÕES

O escurecimento em raízes de batata-baroa foi estimulado pelas temperaturas de armazenamento de 5ºC e 10ºC durante 28 dias de armazenamento, sendo que o maior escurecimento foi a 5ºC.

A concentração de compostos fenólicos solúveis, bem como as atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase apresentam incremento durante o armazenamento à 5ºC e 10ºC, concomitantemente com o escurecimento.

A enzima polifenoloxidase teve a atividade aumentada a 5ºC e 10ºC, apresentando relação positiva com o aumento da concentração de compostos fenólicos solúveis.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO-BOLANÕS, E. N.; MERCADO-SILVA, E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin contento in the browning of cut jicama. **Postharvest Biology and Technology**. v. 33, p. 275-283, 2004

ARAÚJO, S. A. Escurecimento enzimático em alimentos. **Boletim Técnico**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. v. 231, 14 p., 1990

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

CÂMARA, F. L. A. Estudo de tecnologias objetivando precocidade de produção de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Viçosa, 54 p. **Tese de Mestrado** - Universidade Federal de Viçosa, 1984

CASALI, V. W. D.; SEDIYAMA, M. A. N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, EPAMIG, v. 19, p.13-14, 1997

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras. ESAL/FAEPE, 783 p, 2005

EL-HILARI, F.; AIL-OUBAHOU, A., REMAH, A.; AKHAYAT, O. Chilling injury and peroxidase activity change in “Fortune” mandarin fruit during low temperature storage. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 29, p. 44-54, 2003

FERNANDEZ-TRUJILLO, J. P.; MARTINEZ, J. A.; ARTES, F. Modified atmosphere packaging affects the incidence of cold storage disorder and keeps “flat” peach quality. **Food Research International**, v. 31, p. 571-579, 1998

GUIMARÃES, D. P. Estudo bioquímico de algumas características da peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora preta (*Rubus* spp.). Campinas, 99 p. **Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006

HISAMINATO, H.; MURATA, M.; HOMMA, S. Relationship between enzymatic browning and phenylalanine ammonia lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosyntesis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 65, p. 1016-1021, 2001

HYDO, H., KURODA, H., YANG, S.F. Introduction of phenylanine ammonia-liase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of Russet Spotting caused by ethylene. **Plant Physiology.** v. 62, p. 31-35, 1978

KAWAKAMI, S.; MATSUMOTO, Y.; MATSUNAGA, A.; MAYAMA, S.; MIZUNO, A. Molecular cloning of ascorbato peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. **Plant Science**. v. 163, p. 829-836, 2002

KUO, S. J.; PARKIN, K. L. Chilling injury in cucumbers (C*ucumis sativa* L.) associated with lipid peroxidation as measured by ethane evolution. **Journal of Food Science.** v. 54, p. 488-1491, 1989

KUK, Y. I.; HIN, J. S.; BURGOS, N. R., HWANG, T. E.; HAN, O.; CHO, B. H.; JUNG, S.; GUH, J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Physiology and Metabolism**. v. 43, p. 2109-2117, 2003

MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; LAFUENTE, M. T. Chilling-induced changes in phenyalanine ammonia- lyase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities in citrus flavedo tissue. **Acta Horticulturae**. v. 343, p. 257-263, 1993

NEVES, L. L. M. Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Viçosa, 72 p. **Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal** – Universidade Federal de Viçosa, 2003

NGUYEN, T. B.; KETSA, S.; VAN DOOR, W. G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 30, p. 187-193, 2003

PEISER, G.; LOPEZ-GALVEZ G.; CANTWELL, M.; SALTVEIT, M. E. Phenyalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology**. v. 14, p. 171-177, 1998

PICHA, D. H. Influence of storage duration and temperature on sweet potato sugar content and chip color. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 239-240, 1986

PRINCE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 25, p. 1268-1273, 1977

PURVIS, A. C.; SHEWFELT, R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in the sensitive plant tissues? **Plant Physiology**. v. 88, p. 712-718, 1993

RIBEIRO, R. A. Conservação pós-colheita e metabolismo de carboidratos em raízes de dois clones de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Viçosa, 81p. **Tese de Doutorado em Fitotecnia** - Universidade Federal de Viçosa, 2003

RIBEIRO, R. A.; FINGER, F. L.; PUIATTI, M.; CASALI, V. W. D. Chilling injury sensitivity in (*Arracacia xanthorrhiza)* roots. **Tropical Science**. v. 45, p. 55-57, 2005

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Wadsworth, Inc, California, 682 p., 1991

SANTOS F. F.; CARMO, C. A. S. Mandioquinha-salsa. **Manejo cultural**. Brasília: EMBRAPA, 76 p.,1998

SANTOS, F. F. Mandioquinha-salsa no agronegócio do estado do Paraná. Curitiba: EMATER/PR, p. 56, 2000

SCALON, S. P.Q.; HEREDIA, Z. N. A.: VIEIRA, M. C. Conservação pós-colheita de mandioquinha-salsa em atmosfera modificada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 33, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 719 p., 2002

TATSUKI, M.; MORI, H. Rapid and transient expression of 1-amino-ciclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. **Plant and Cell Physiology**. v. 40, p. 709-715, 1999

THOMPSON, A. K. Reduction of losses during the marketing of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza).* **Acta Horticulturae**. v. 1, p. 55-60, 1980

UNDERHILL, S. J. R.; CRITCHLEY, C. Cellular localization of polyphenol oxidase and peroxidase activity in litchi chinesis sonn. pericarp. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 627-632, 1995

XU, J. The effect of temperature storage on the activity of polyphenol oxidase in *Castanea henryi* chestnuts. **Postharvest Biology and Technology**. v. 38, p. 91-98, 2005

YANG, S. F; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 35, p.155-189, 1984

YUPANQUI, A. T. Poscosecha de las raices andinas com enfasis en el manejo del producto fresco: arracacha, achira, maca, yacon, chago y aiipa. In: Juan Seminário. (Org), Comp. Produccion de raices andinas. **Manual de capacitación**. Lima: Centro Internacional de la Papa, p. 24.1-24.10, 1998

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE DA PEROXIDASE E DA POLIFENOLOXIDASE EM RAÍZES DE BATATA-BAROA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA

RESUMO

A batata-baroa, assim como outras hortaliças de origem subtropical, pode apresentar injúria por frio quando as raízes são armazenadas sob refrigeração inadequada causando, dentre outros sintomas, o escurecimento. Em muitas espécies, tem-se observado que o escurecimento ocorre pela atividade da peroxidase e da polifenoloxidase. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase em raízes de batata-baroa, sob diferentes condições de pH e temperatura, determinando-se as condições ótimas para suas atividades e possíveis formas de inativá-las. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pós-colheita do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, de janeiro a maio de 2006. Realizou-se a saturação dos extratos brutos com sulfato de amônio (0 a 80%) para ambas as enzimas e, posteriormente, avaliou-se atividade enzimática em

função do pH e da temperatura, e do tempo de exposição a eles, para uma provável inativação. A peroxidase teve maior atividade quando a reação ocorreu entre os pH 5,5 e 6,0, na temperatura de 30ºC. Sua inativação foi observada no pH 2,5 após 60 min de exposição, e a 60ºC, após 10 minutos, e 70ºC, após 5 minutos. Houve maior atividade da polifenoloxidase quando a reação ocorreu em pH 7,5 e à temperatura de 30ºC. Essa enzima não sofreu inativação na faixa de pH 2,5 - 9,0, porém foi inativada, após 5 minutos a 80 ºC.

Palavras-chave: enzimas oxidativas, inativação, injúria por frio, mandioquinha-salsa

1-INTRODUÇÃO

A batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), originária da região andina na América do Sul, é cultivada em regiões de clima ameno, em altitudes entre 1500 e 2000 m (SANTOS et al., 1991), com crescimento ótimo em temperaturas de 15 a 20ºC (SANTOS e CARMO, 1998). No Brasil, é cultivada, principalmente, nos estados do Paraná e Minas Gerais (SANTOS, 1993), cuja produtividade média é 8,8 t ha^{-1} (SANTOS e CARMO, 1998; SANTOS, 2000).

A raiz tuberosa da batata-baroa apresenta alto valor nutritivo, sendo um alimento de função essencialmente energética; a raiz é recomendada em dietas de crianças, pessoas idosas e convalescentes, principalmente por conter cálcio, fósforo e niacina, além de características de fácil digestibilidade apresentadas pelo seu amido (CÂMARA, 1984).

A capacidade de conservação pós-colheita da batata-baroa é comprometida por diversos fatores, dentre eles, a suscetibilidade desta espécie a injúria por frio, também denominada de “chilling” (RIBEIRO, 2003). A injúria por frio é um distúrbio fisiológico causado nos tecidos vegetais quando estes são expostos a baixas temperaturas, mas acima do ponto de congelamento (NEVES, 2003). Este distúrbio ocorre devido ao armazenamento incorreto em câmaras frias pela utilização de temperatura inadequada do produto armazenado.

Em frutos, os sintomas mais comuns de injúria por frio são a ausência de amadurecimento e o escurecimento, geralmente a temperaturas próximas a 5ºC. Em raízes tuberosas de batata-baroa, os sintomas observados externamente são o aparecimento lesões em toda superfície seguida por intenso escurecimento ao redor das lesões e, internamente, escurecimento que se estende do anel vascular à periderme; a temperatura de 10ºC esses sintomas são amenizados em comparação aos causados pela temperatura de 5ºC (RIBEIRO et al., 2005).

Em trabalhos realizados com abacaxi, mandarino e plantas de arroz (GONÇALVES et al., 2000; EL HILARI et al.,2003; KUK et al., 2003), foi observado aumento na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidases quando ocorre o “chilling”. As peroxidases atuam na remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água (SALISBURY e ROSS, 1991). No caso da biossíntese de lignina, a peroxidase catalisa a polimerização oxidativa dos álcoois hidroxicinâmicos sintetizada a partir de fenilalanina (GASPAR et al., 1982). As polifenoloxidases promovem a oxidação enzimática de compostos fenólicos produzindo, inicialmente, quinona a qual rapidamente se condensa formando pigmentos insolúveis e escuros, denominados melanina, ou reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos fenólicos, também formando melanina (ARAÚJO, 1990). MILLER et al. (1989) observou que o escurecimento enzimático em frutos de pepino poderia ser ocasionado pela atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, fato este comprovado em quiabo, por NEVES (2003).

As peroxidases são glicoproteínas que apresentam átomos de ferro como grupo prostético e diferentes quantidades de resíduos de carboidratos (VAN HUYSTEE, 1987; LUSSO, 1989). Localizam-se, principalmente, na parede celular e nos vacúolos das células de plantas superiores, podendo, sua localização variar de acordo com a idade, espécie e grau de diferenciação (GASPAR et al., 1982). O pH ótimo da atividade da enzima *in vitro,* varia de 5,5 a 7,5, de acordo com o substrato

e o tecido vegetal utilizado, sendo que a acidificação acarreta a perda da atividade enzimática, devido à desnaturação protéica. A temperatura mais adequada à avaliação da atividade da peroxidase *in vitro* é variável, uma vez que a atividade dessa enzima pode se regenerar necessitando, assim, de tratamentos térmicos severos visando evitar a regeneração da atividade catalítica (GASPAR et al., 1982).

As polifenoloxidases são monooxigenases do grupo das óxido-redutases que contêm cobre em sua estrutura e que se localizam nas membranas celulares, nas quais se encontram inativas, tornando-se ativas quando liberadas (UNDERHILL e CRITCHLY, 1995). O pH ótimo para a atuação da enzima varia de 4,0 a 7,0, dependendo da espécie, podendo ser inativada em pH inferior a 4,0. A temperatura ótima para maior atividade enzimática citada em alguns trabalhos é 20ºC ou 25ºC (SOARES et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005), esta variação é dependente da espécie e do material analisado, do grau de maturação, do substrato doador, da composição de isoenzimas, da pureza da enzima e da solução tampão.

Em razão de CÂMARA (1984) ao armazenar batata-baroa em caixas abertas a 5ºC, ter observado sintomas de injúria por frio: escurecimento e, CZYHRINCIW e JAFFÉ (1951) terem verificado perda de massa a 3ºC por transpiração, respiração e putrefação, formulou-se a hipótese de que esse escurecimento pudesse estar associado à atividade da peroxidase e da polifenoloxidase. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, em diversas condições de pH e temperatura, uma vez que o entendimento da influência estes fatores sobre a atividade da enzima possa permitir propor técnicas de controle do escurecimento enzimático pós-colheita das raízes de batata-baroa, visando diminuir as perdas e aumentar a vida de prateleira.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em condições de laboratório, utilizando raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) da cultivar Amarela de Carandaí adquiridas em comércio varejista, localizado na cidade de Viçosa-MG, entre os meses de janeiro/2006 a maio/2006. As raízes foram colhidas e estavam armazenadas no comercio a 24 ± 12 horas, à temperatura ambiente sem embalagem. Depois de adquiridas, as raízes tuberosas foram selecionadas de acordo bom aspecto visual para comercialização e armazenadas em câmara fria à 5ºC por 21 dias para induzir elevação da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos arranjados em esquema fatorial 14 x 8 (14 pHs e 8 temperaturas) com cinco repetições. Os dados foram submetidos à estatística descritiva de médias e erro padrão.

2.1- Purificação parcial das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

Para extração de cada enzima, individualmente, 40 g de raízes, previamente maceradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em 100 mL de tampão de extração (peroxidase: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5, bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M; polifenoloxidase:

tampão fosfato 0,05 M pH 7 e durante a maceração acrescentou-se ao meio 3 g de PVPP 3%). Posteriormente os extratos foram filtrados em quatro camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado a 17000 x *g*, a 4ºC por 30 min. Uma alíquota do sobrenadante foi guardada (extrato bruto) e o sedimento descartado. O restante do sobrenadante foi saturado com sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$)] a 20%, 40%, 60% e 80%, via homogeneização, por 30 min em banho de gelo e posterior centrifugação em cada etapa, a 17000 x *g*, a 4ºC por 30 min. Os sedimentos resultantes, de cada saturação, foram ressuspensos com 2 mL de tampão de diálise (peroxidase: tampão fosfato 0,01 M pH 6,5 e bissulfito de sódio a 0,1%; polifenoloxidase: tampão fosfato 0,0 1 M pH 7) e dialisado por 15 h em membranas de celulose modelo D-9777 da Sigma, a 4ºC.

Para a determinação da atividade da peroxidase, 17 L de extrato enzimático foram adicionados ao meio de reação constituído 0,15 mL de água destilada, 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,5, 0,17 mL de peróxido de hidrogênio 0,01 M e 0,17 mL de guaiacol 0,19 M. As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro, pela variação da absorvância no comprimento de onda de 470 nm, a 25ºC, imediatamente após a mistura e a atividade expressa em unidades de absorvância (UA)/min/mg de proteína.

Para a determinação da atividade da polifenoloxidase, 20 L de extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação contendo 0,17 mL de 4-metil-catecol 0,12 M, 0,31 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido cítrico 0,1 M, pH 4,8 (ajustado com fosfato de potássio dibásico 0,2 M). As reações foram determinadas em espectrofotômetro, pela variação da absorvância, no comprimento de onda de 410 nm, a 25ºC, imediatamente após a mistura e a atividade da enzima também foi expressa em UA/min/mg de proteína.

As determinações das concentrações de proteína das preparações enzimáticas foram determinadas como descrito por BRADFORD (1976), usando soroalbumina bovina (BSA), como padrão.

Os teores de saturação com sulfato de amônio, nos quais as enzimas apresentaram maior atividade, foram utilizados nas avaliações posteriores de pH e temperatura.

2.2- Efeito do pH na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

Para determinar-se o efeito do pH na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, foram preparadas soluções-tampão de reação de concentração 0,2 M de ácido cítrico (pH 2,5 a 4,0), tampão fosfato (pH 4,5 a 7,5) e ácido bórico (pH 8,0 a 9,0), utilizando-se de NaOH e HCl para ajuste do pH.

O pH, no qual as enzimas exibiram maior atividade foram utilizados em ensaios posteriores. Também foi investigado se os pHs, nos quais as enzimas apresentaram menor atividade poderiam inativá-las. Para isso, os extratos enzimáticos foram misturados às soluções-tampão (1:1) e pré-incubados por 0 a 120 min. Os ensaios foram então conduzidos com o meio de reação contendo a solução tampão que promoveu maior atividade enzimática.

2.3- Efeito da temperatura na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, os extratos enzimáticos e os meios de reação, separadamente, foram pré-incubados sob temperatura de 10 a 80ºC, por 10 min e as reações foram conduzidas à mesma temperatura da pré-incubação.

Para inativação das enzimas, testou-se o efeito da pré-incubação dos extratos às temperaturas de 50, 60 e 70ºC, para a peroxidase e 70 e 80ºC, para a polifenoloxidase, por um intervalo de 0 a 120 min. Após os tratamentos, as amostras foram deixadas em banho de gelo (4ºC) por 30 min e as reações conduzidas sob temperatura de 25ºC.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Peroxidase

3.1.1- Purificação parcial por fracionamento com sulfato de amônio

A fração enzimática que apresentou maior atividade foi àquela submetida à faixa de 60 - 80% de saturação com sulfato de amônio (Figura 1).

Comparando-se o extrato bruto com o obtido após a saturação com 60 - 80% de sulfato de amônio, verifica-se que a atividade enzimática foi três vezes maior no extrato saturado. No extrato saturado naquela faixa, observou-se maior purificação da enzima e consequentemente maior concentração, uma vez que o sulfato de amônio interage com as moléculas de água da camada de solvatação de proteínas, permitindo que estas se agrupem e se precipitem, promovendo a purificação parcial da enzima, sendo esta purificação variável de acordo com a porcentagem de sulfato de amônio utilizada e o peso molecular da enzima (GOURDEAN, 2003).

Em frutos de quiabo (NEVES, 2003) e em cotilédones de pepino (DI PIERO, 2003) também foi observada maior atividade da peroxidase na fração do extrato saturado com 60% de sulfato de amônio, com aumento

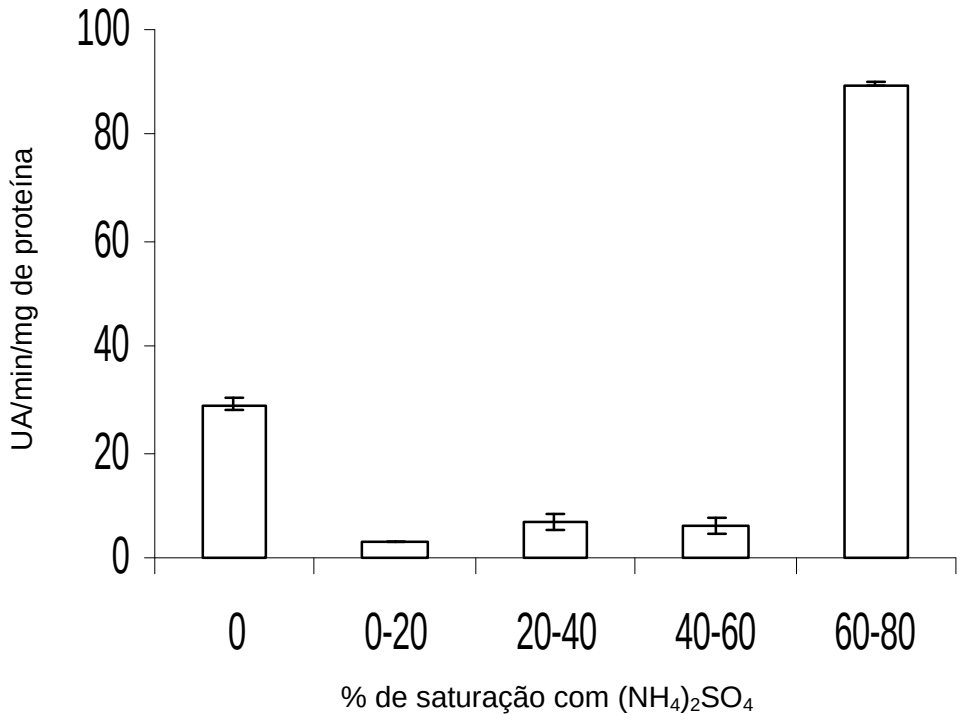

Figura 1- Atividade das enzimas peroxidases após saturação do extrato bruto de raízes de batata-baroa com cinco porcentagens de $(NH_4)_2SO_4$. As barras representam erro padrão da média.

de, aproximadamente, quatro vezes na atividade enzimática dos extratos saturados.

3.1.2- Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi maior quando a reação ocorreu nos tampões fosfato com valores de 5,5 e 6,0 de pH, com atividade total de 2,72 UA/ min/mg de proteína em pH 6,0 (Figura 2); esse valor coincidiu com os encontrados em amora preta por Guimarães (2006) e em rizomas de açafrão por MOTA et al. (2002).

Estes dados diferem dos encontrados em pêssego por NEVES (2002), cujo pH de maior atividade foi 5,0; em lichia (MIZOBUTSI, 2002), pH 6,5 e em tegumento de soja, pH 2,8 (ANDREW et al., 2006). As diferenças de atividade em pH em várias espécies estão diretamente relacionadas à localização da enzima no meio celular (MAYER e HAREL, 1981). Os sítios ativos nas enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar em forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo, liguem-se aos substratos e catalisem a reação. Além disto, os próprios substratos podem conter grupos ionizáveis e somente uma forma iônica desse substrato pode se ligar à enzima ou sofrer catálise (SEGEL, 1979). Quando isso ocorre da forma satisfatória, obtêm-se o pH ótimo para atividade de determinada enzima, porém, algumas enzimas, tais como a peroxidase, possuem várias isoenzimas localizadas em partes da célula, como na parede celular ou nos vacúolos (GASPAR et al., 1982) ou mesmo nos espaços livres da parede (CALDERON et al., 1994), o que poderia explicar as diferenças de pH ótimos encontrados nas espécies.

A peroxidase apresentou baixa atividade nos pHs 2,5 e 9,0, como foi observado na peroxidase extraída de frutos de quiabo por NEVES (2003). Comparando-se os valores da atividade da peroxidase em pH 6,0 e nos pHs 2,5 e 9,0, observa-se que no pH 2,5, a enzima manteve 2,6% de sua atividade máxima e, quando a reação ocorreu a pH 9,0, a enzima manteve 6,2% de sua atividade (Figura 2), demonstrando que essa enzima é mais sensível ao pH ácidos.

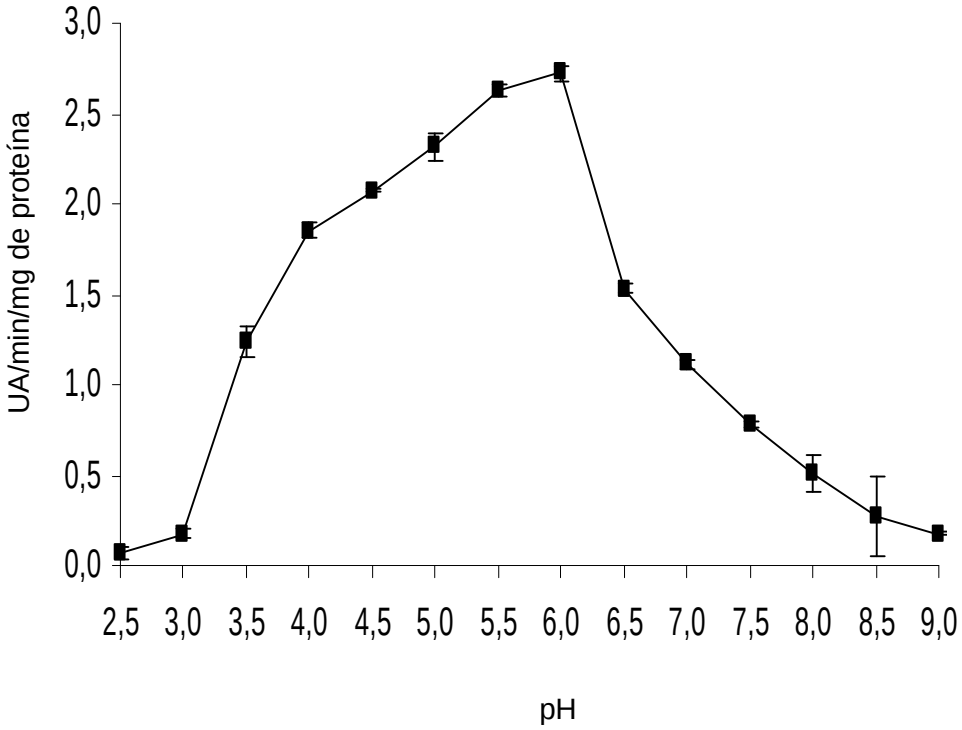

Figura 2- Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade da enzima peroxidase em raízes de batata-baroa, a 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

O declínio na atividade da enzima poderia resultar da constituição de alguma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos) ou da inativação da enzima, ou ainda da combinação desses efeitos.

A pré-incubação da peroxidase em pH 2,5 promoveu, em 5 min de exposição do extrato, redução de 95,9% da atividade da enzima a qual, após 60 min, exibiu inativação completa (Figura 3), demonstrando que o efeito do pH sobre a atividade da enzima é rápido.

Ao se observar o comportamento da peroxidase no pH 9,0 (Figura 4), verificou-se que, em 5 min de exposição, a atividade da enzima reduziu 77%, mantendo-se praticamente constante esta redução nos extratos incubados por até 120 min, não sendo inativada nessas condições (Figura 4), de forma contrária de quando exposta ao pH 2,5 (Figura 3). Esses resultados indicam que, após a pré-incubação, a enzima em contato com o pH de maior atividade, retome, em parte, sua atividade ao contrário do que ocorre a pH 2,5.

Portanto, pelos resultados obtidos a peroxidase é menos estável em pH ácido, significando que, ao desejar reduzir sua atividade ou inativá-la, deva-se utilizar o pH 2,5.

3.1.3- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase

A peroxidase apresentou atividade máxima à temperatura de 30ºC, apresentando aumento de 58,8% em sua atividade em relação à temperatura de 20ºC (Figura 5). Em açaí, a temperatura ótima para maior atividade da enzima foi 35ºC (SANTOS, 2001), em couve-flor, 40ºC (LEE e SOO, 1998); morango, 30ºC (CIVELLO et al., 1995) e quiabo, 36, 54ºC (NEVES, 2003). A influência da temperatura sobre a atividade enzimática ocorre, uma vez que a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Quando ocorre aumento na temperatura, há maior energia cinética das moléculas de reagente, ocasionando maior número de colisões produzidas por unidade de tempo. Como as enzimas são moléculas protéicas complexas, quando ocorre grande absorção de energia, sua estrutura terciária rompe-se e a

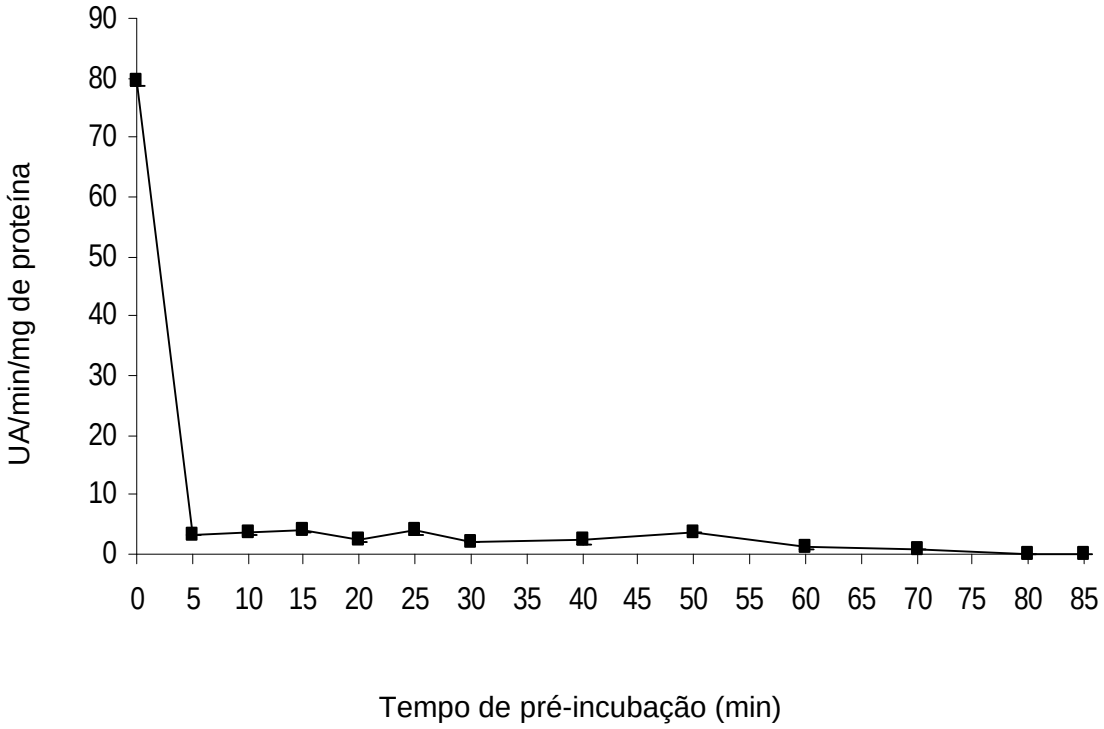

Figura 3- Efeito do tempo de pré-incubação em pH 2,5 sobre a atividade da peroxidase em raízes de batata-baroa, avaliadas a pH 6,0 e a temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

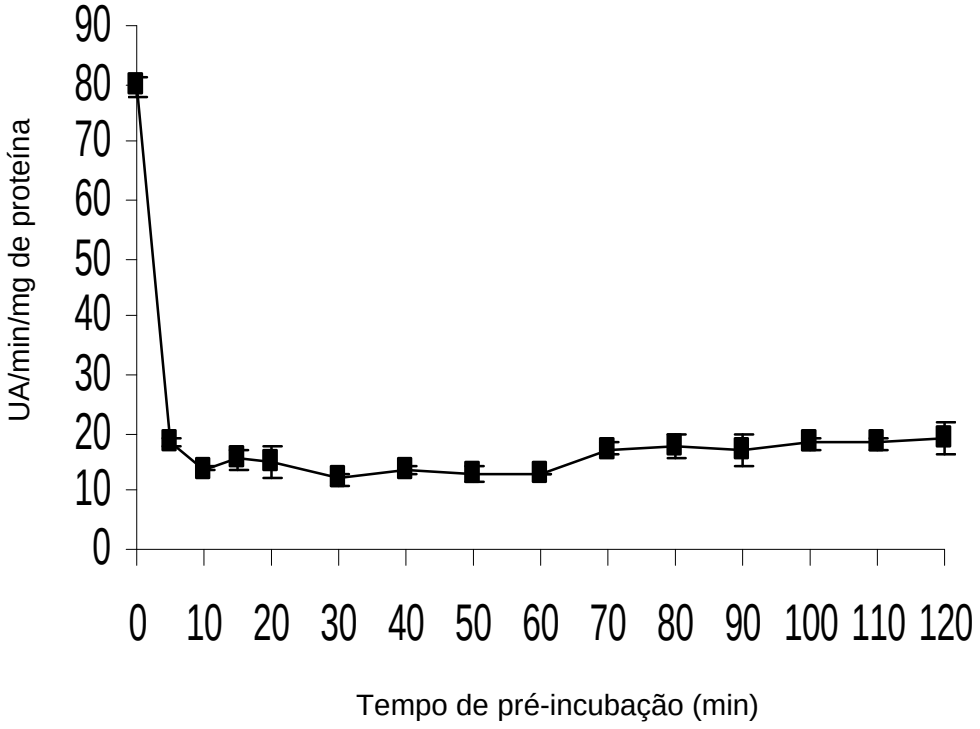

Figura 4- Efeito do tempo de pré-incubação sob pH 9,0 sobre a atividade da peroxidase em raízes de batata-baroa, avaliadas sob pH 6,0 e a temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

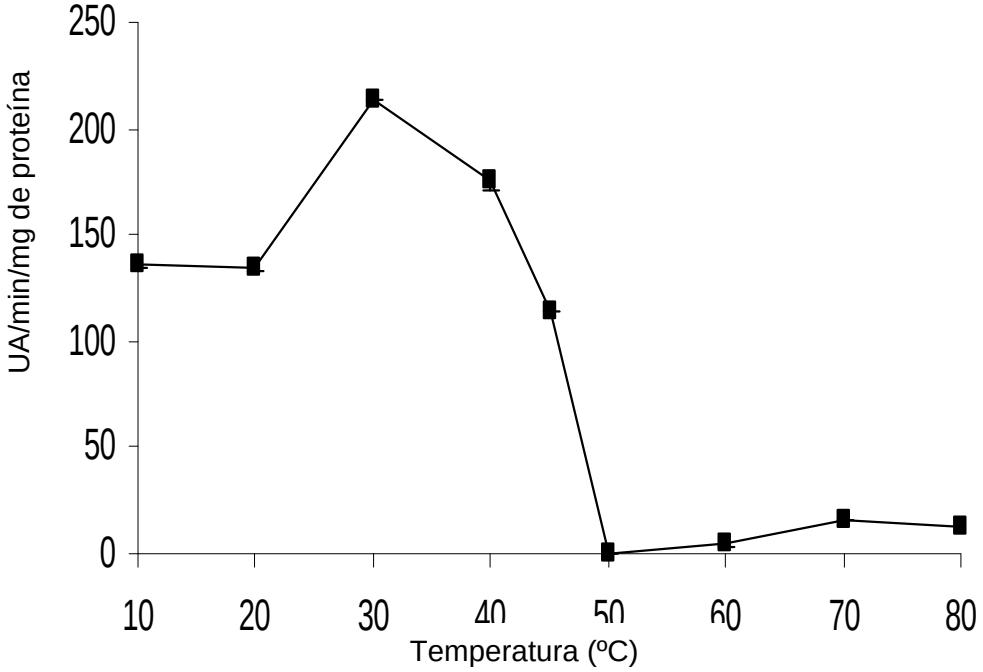

Figura 5- Influência da temperatura do meio de reação sobre a atividade da enzima peroxidase em raízes de batata-baroa, a pH 6,0. As barras representam erro padrão da média.

enzima fica desnaturada, isto é perde sua atividade catalítica (SEGEL, 1979).

Sob temperaturas superiores a 30ºC, houve diminuição da atividade enzimática, ocasionando praticamente, inativação completa da enzima a 50ºC (Figura 5).

O tempo necessário da provável inativação foi determinado via pré-incubação do extrato enzimático nas temperaturas de 50, 60 e 70 ºC por 120 minutos. Nos extratos pré-incubados a 50ºC, observa-se redução de 62% em relação à atividade máxima na atividade da enzima, após 15 min de exposição e de 78% após 30 min de exposição (Figura 6). Essa redução manteve-se praticamente constante durante 120 min de exposição do extrato, não se conseguindo inativar a peroxidase.

Na pré-incubação a 60ºC, observou-se inativação completa da enzima, após 15 min de exposição (Figura 6). Já a temperatura de 70 ºC, essa inativação ocorreu 5 min após a incubação (Figura 7).

No extrato exposto à pré-incubação a 50 e 60ºC, por menos de 15 minutos, a atividade da enzima caiu nos primeiros 5 min de incubação, em duas temperaturas, constatando-se que 60ºC são necessários por 15 min de incubação para inativar completamente a peroxidase.

A inativação enzimática, por meio da exposição do extrato a altas temperaturas, também pode ser observada em trabalhos com polpa e casca de maçã, nas quais VALDERRAMA et al. (2001) verificaram que a enzima peroxidase é muito estável, exposta às temperaturas de 60, 65, 70 e 75ºC durante 10 min, obtendo-se apenas inativação máxima de 85% de sua atividade, após 10 min de tratamento a 75ºC. GUIMARÃES (2006) analisando amoras pretas às temperaturas de 85 e 90ºC, obteve inativação enzimática somente após 30 seg de exposição à temperatura de 90ºC.

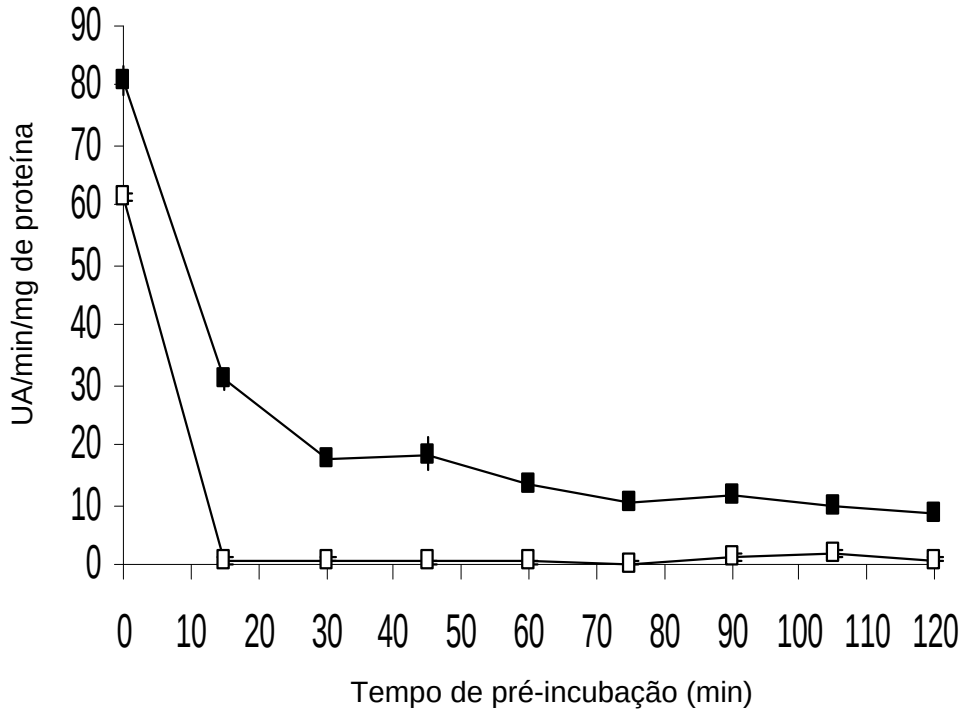

Figura 6- Efeito do tempo de pré-incubação, às temperaturas de 50 (■) e 60ºC (□), sobre a atividade da peroxidase em raízes de batata-baroa, avaliada a pH 6,0 e a temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

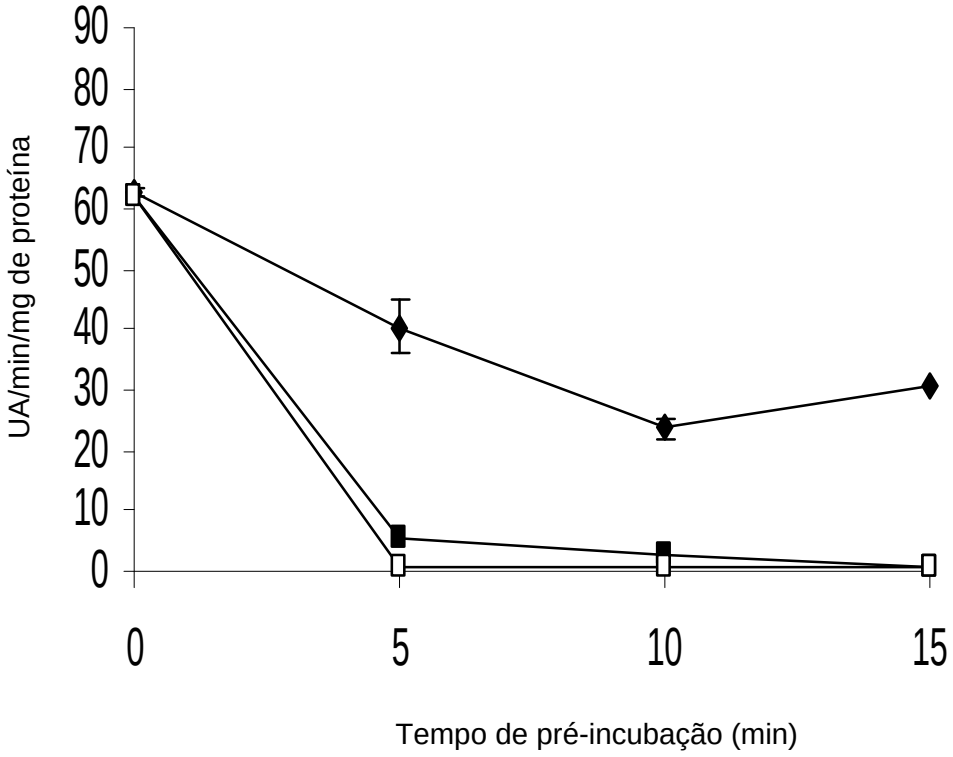

Figura 7- Efeito do tempo de pré-incubação, às temperaturas de 50 (◆) e 60ºC (■) e 70ºC (□), sobre a atividade da peroxidase em raízes de batata-baroa, sob pH 6,0 e temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

3.2 - Polifenoloxidase

3.2.1- Purificação parcial por fracionamento com sulfato de amônio

A fração enzimática na qual a polifenoloxidase apresentou maior atividade foi aquela cuja saturação com sulfato de amônio estava na faixa de 40 - 60% (Figura 8). Essa faixa ótima de saturação coincidiu com os dados observados em polifenoloxidases solúveis em amoras pretas, nas quais se verificou aumento de cinco vezes do extrato saturado com sulfato de amônio a 40 - 60%, em relação ao extrato bruto (GUIMARÃES, 2006), e na polpa de pinha, cuja porcentagem de saturação foi 60% de sulfato de amônio (VASCONCELOS, 1993).

Ao se comparar a atividade enzimática do extrato bruto com a encontrada no extrato saturado com 40 - 60% de sulfato de amônio houve aumento de três vezes no extrato saturado. Este procedimento permitiu maior eficiência na concentração da enzima de interesse no extrato, propiciando maior eficiência na quantificação.

3.2.2 Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase

A maior atividade foi obtida quando a reação se processou em tampão fosfato de pH 7,5, com atividade de 1116,28 UA/min/mg de proteína (Figura 9). Esses dados mostraram-se semelhantes aos encontrados por GOMES et al. (2001), com nove cultivares de feijão, os quais obtiveram maior atividade a pH 7,2, para todas as cultivares. Todavia esses diferem de outras espécies, como rizomas de taro e tubérculos de batata nos quais, DUANGMAL e APENTEN (1998), verificaram que o pH ótimo para a atividade da enzima foi 4,6 no taro e 6,8 na batata, respectivamente, e em guariroba *in natura*, cujo pH ótimo foi 5,7 (CARNEIRO et al., 2003).

Diferença de pH ótimo na atividade da polifenoloxidase deve-se possivelmente à localização da enzima no meio celular (MAYER e HAREL, 1981). As polifenoloxidases localizam-se nas membranas celulares, podendo ser mitocondriais ou plastídicas. MAYER e HAREL

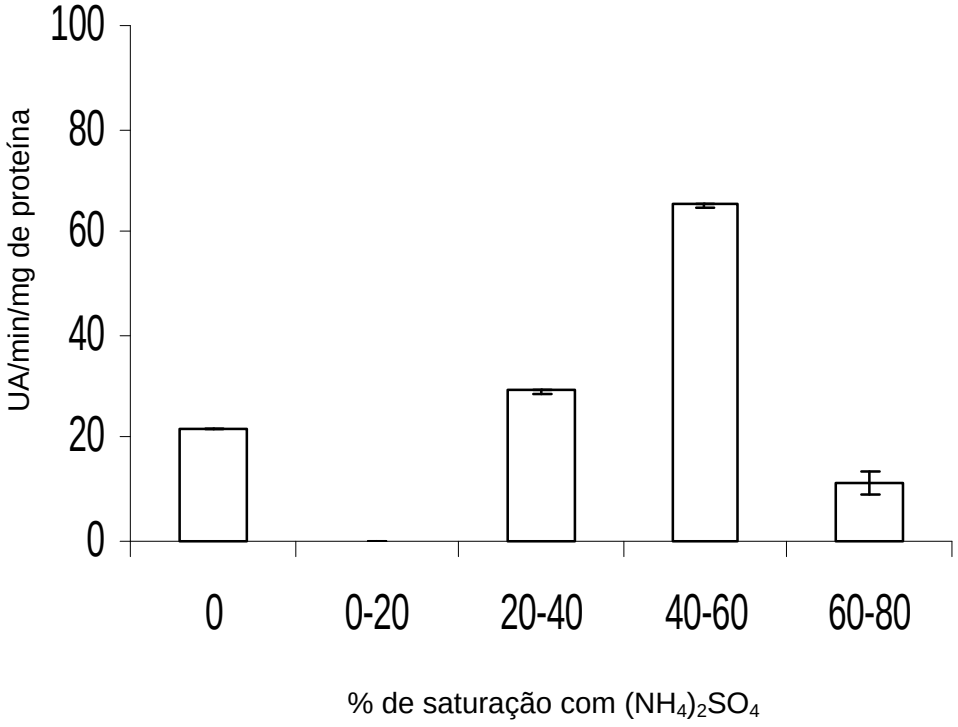

Figura 8- Atividade da enzima polifenoloxidase após saturação do extrato bruto de raízes de batata-baroa com diferentes porcentagens de $(NH_4)_2SO_4$. As barras representam erro padrão da média.

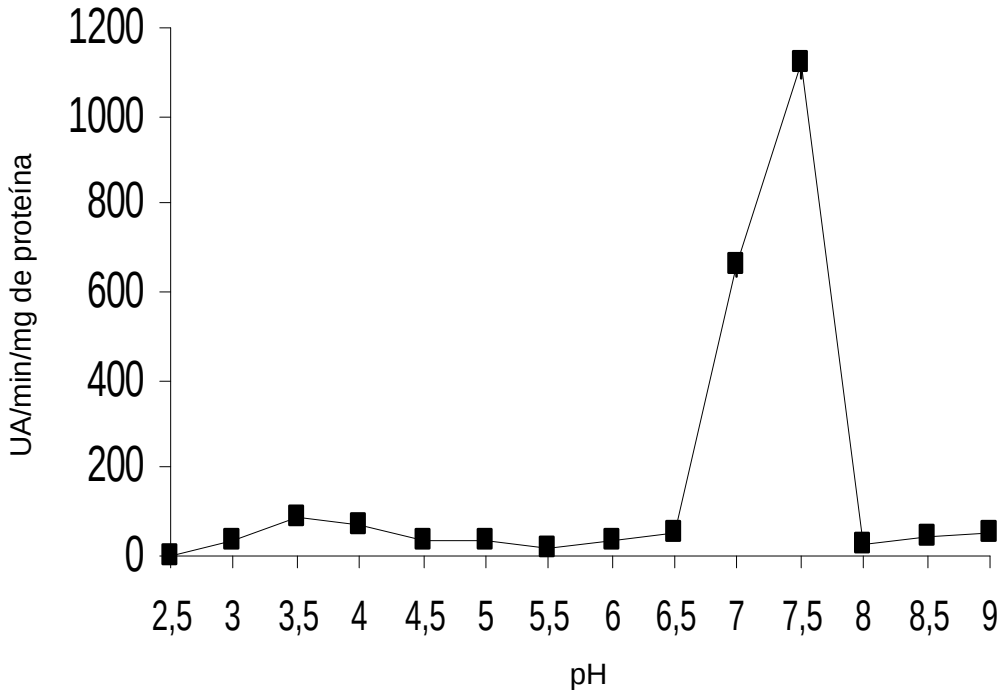

Figura 9- Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade da polifenoloxidase de raízes batata-baroa, a 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

(1981) observaram em extratos de maçã dois picos máximos de atividade, nos pHs 7,3 e 5,1, sendo o pico a pH 7,3 associado à fração extraída de mitocôndrias e do pH 5,1 a fração extraída de cloroplastos.

A estabilidade de uma enzima em relação ao pH depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos (por exemplo, glicerol, compostos sulfidrílicos), concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima (SEGEL, 1979).

As alterações na atividade da enzima, com a modificação do pH, devem-se a modificações dos grupos ionizáveis dos sítios ativos das enzimas e/ ou de seus próprios substratos (SEGEL, 1979).

A menor atividade da polifenoloxidase ocorreu no pH 2,5 (Figura 9), observando-se redução de 1116% na atividade da enzima em comparação com a obtida em pH 7,5. Para saber o tempo necessário para possível inativação, o extrato foi incubado durante 120 min a pH 2,5 e 8,0. Com 15 min de exposição a pH 2,5, a atividade reduziu-se 73%, caindo de 657,92 para 177,08 UA/min/mg de proteína; após este tempo de exposição, a atividade enzimática manteve-se constante durante os 120 min, não se conseguindo inativar a enzima a esse pH (Figura 10). Testando-se a possível inativação em pH 8, um dos pHs de menor atividade, verificou-se redução de 54% nos primeiros 30 min de exposição, com conseqüente manutenção dessa atividade por 120 min (Figura 10), demonstrando que a polifenoloxidase das raízes de batata-baroa não pode ser inativada em função do pH.

Estudos realizados com hastes de guariroba mostraram inativação enzimática quando foram submetidas a pH 4,0 durante 10 min (CARNEIRO et al., 2003), enquanto em amoras pretas, quando houve adição de 50 ppm de ácido ascórbico, a inativação foi observada, na faixa de pH de 4,0 a 5,5 com 5 min de reação; sem a adição de ácido ascórbico, a enzima foi praticamente inativada em pHs menores que 5,5 (GUIMARÃES, 2006). Já em purê de manga houve redução de 95,5% da

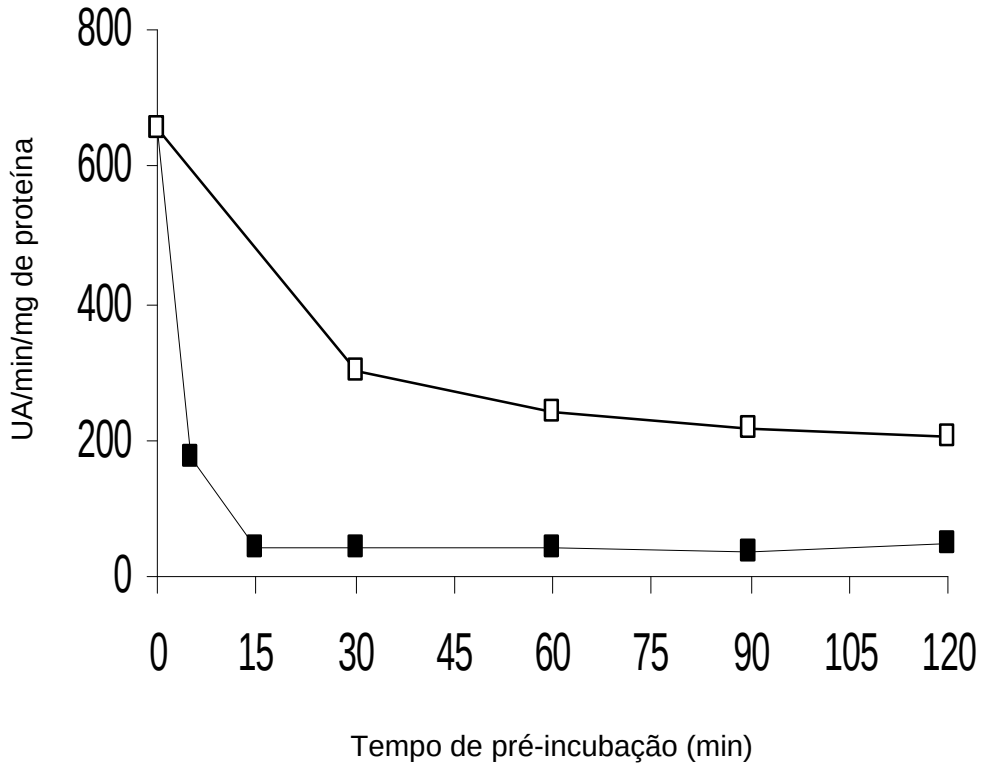

Figura 10- Efeito do tempo de pré-incubação sob pH 2,5 (■) e pH 8 (□) sobre a atividade da polifenoloxidase em raízes de batata-baroa, determinada sob pH 7,5 e à temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

atividade enzimática nos extratos submetidos a pH 3,5 e de 91,1% em pH 4,0 (GUERRERO-BELTRÁN et al., 2004).

3.2.3. Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase

Para a determinação da influência da temperatura na atividade da polifenoloxidase, foi utilizado o tampão-fosfato de pH 7,5, o qual apresentou maior atividade enzimática (Figura 9).

A atividade máxima da polifenoloxidase foi 137,97 UA/min/mg de proteína, obtida na temperatura de 30ºC (Figura 11), coincidindo com a temperatura ótima para atividade da polifenoloxidase verificada em rizoma de taro (DUANGMAL e APENTEN, 1998), polpa de pinha (VASCONCELOS, 1993), quiabo (NEVES, 2003), berinjela (CONCELLÓN et al., 2004) e folhas de menta (KAVRAYAN e AYDEMIR , 2001).

À temperatura igual ou superior a 40ºC observou-se diminuição da atividade enzimática, principalmente a 70 e 80ºC (Figura 11). Buscando-se saber o tempo de incubação necessário para uma possível inativação, naquelas temperaturas, foi realizada a pré-incubação dos extratos por 120 min (Figura 12).

A temperatura de 70ºC, após 5 min de exposição do extrato, reduziu em 92% a atividade da polifenoloxidase; posterior a esse tempo de incubação, a atividade da enzima manteve-se constante por 120 min (Figura 12), não sendo possível sua inativação, enquanto que na 80ºC, 5 min de exposição foram suficientes para completa inativação da enzima (Figura 12).

Em outros trabalhos de inativação térmica da polifenoloxidase, como em casca de pinha, a inativação foi observada a 80ºC e 90ºC, em 49 e 33 seg, respectivamente, contudo na polpa foram necessários 8 min até inativar 90% da polifenoloxidase (VASCONCELOS, 1993). Já em morango, a enzima foi inativada após 30 min de exposição à temperatura de 65ºC (SERRADELL et al., 2000); em polpa e casca de maçãs das cultivares Fuji e Gala, a polifenoloxidase foi inativada após 10 min de exposição, à temperatura de 75ºC (VALDERRAMA et al., 2001); e em

rizomas de taro e tubérculos de batata, foram necessários 10 min à 70ºC (DUANGMAL e APENTEN, 1998).

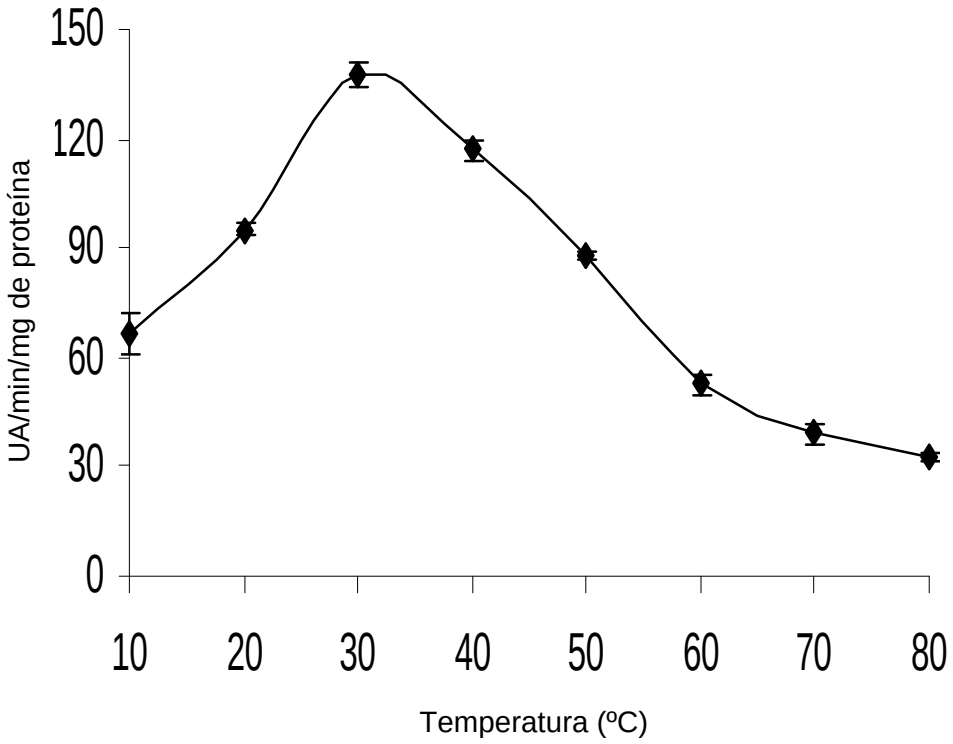

Figura 11- Efeito da temperatura do meio da reação sobre a atividade da enzima polifenoloxidase em raízes de batata-baroa, a pH 7,5. As barras representam erro padrão da média.

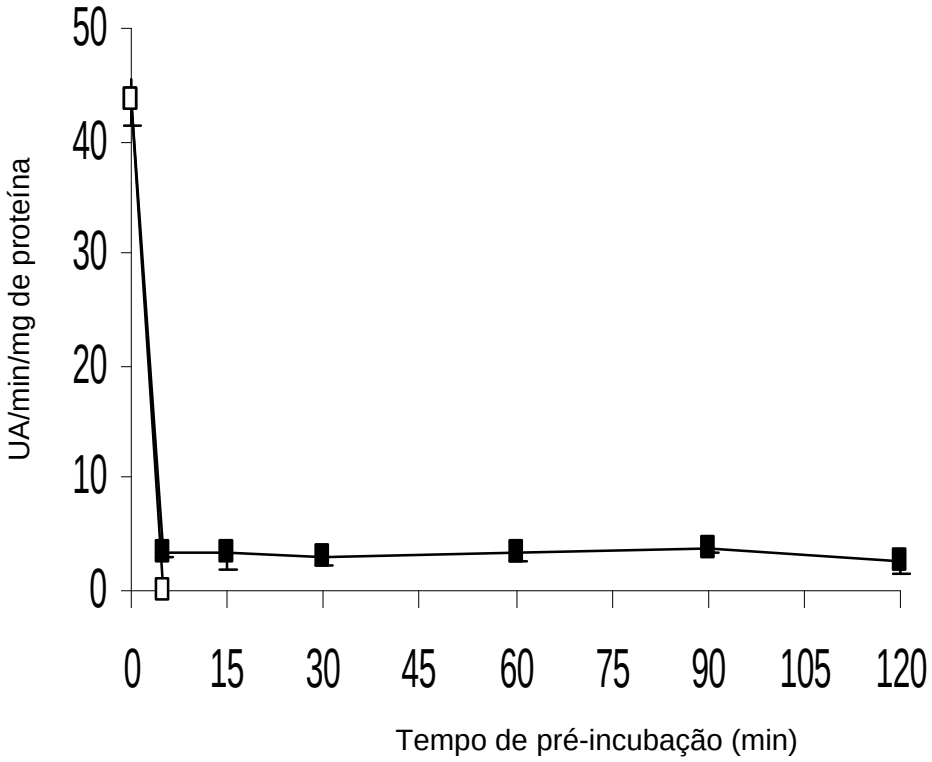

Figura 12- Efeito do tempo de pré-incubação às temperaturas de 70ºC (■) e 80ºC (□) sobre a atividade da polifenoloxidase em raízes de batata-baroa, avaliada a pH 7,5 a temperatura de 25ºC. As barras representam erro padrão da média.

4- CONCLUSÕES

A peroxidase de raízes de batata-baroa teve maior atividade nos pH 5,5 e 6,0 e à temperatura de 30ºC. A inativação ocorreu sob pH 2,5, após 60 min de exposição, e às temperaturas de 60º C, após 10 min e a 70ºC, após 5 minutos.

A polifenoloxidase apresentou maior atividade quando a reação foi realizada em pH 7,5 e à temperatura de 30ºC. Essa enzima foi inativada após 5 min de exposição do extrato à temperatura de 80ºC. A enzima apresenta resistência à inativação ao calor e ao pH.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, C. J. N.; BETTENS, P; A.; RYAN, L. L. P. Determining the optimum pH and charge state of soybean seed coat peroxidase for predictive modeling. **National University of Singapore**, 2006 (in press). Disponível em http://staff.science.nus.edu.sg. Acesso em 24 de abril de 2006

AQUINO-BOLANÕS, E. N.; MERCADO-SILVA, E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. **Postharvest Biology and Technology**. v. 33, p. 275-283, 2004

ARAÚJO, S. A. Escurecimento enzimático em alimentos. **Boletim Técnico.** Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. v. 231, 14 p., 1990

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

CÂMARA, F. L. A. Estudo de tecnologias objetivando precocidade de produção de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Viçosa, 54 p. **Tese de Mestrado** – Universidade Federal de Viçosa, 1984

CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; BARCELÓ, A. R. Diffential expresión of a cell wall-localized preoxidase isoenzyme capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes during the cell culture of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Airen and Monastrell). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** v. 37, p. 212-227, 1994

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudos da atividade de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 25, p. 189-193, 2003

CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; AFIÓN, M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v. 43, p. 2596-2601, 1995

CONCELLÓN, A.; AÑON, M. C.; CHAVES, A. R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. **Food Chemistry.** v. 88, p. 17-24, 2004

CZYHRINCIW, N.; JAFFE, W. Modificaciones químicas durante la conservación de raices y tubérculos. **Arquivos Venezolanos de Nutricion**. v. 2, p. 49-67, 1951

DI PIERO, R. M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (SHITAKE) e *Agaricus blazei* (COGUMELO-DO-SOL) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Piracicaba, 171 p. **Tese de Doutorado em Agronomia**, Área de concentração: Fitopatologia –

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003

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

EL-HILARI, F.; AIL-OUBAHOU, A.,; REMAH, A.; AKHAYAT, O. Chilling injury and peroxidase activity change in “Fortune” mandarin fruit during low temperature storage. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, v. 29, p. 44-54, 2003

GASPAR, T. H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases 1970-1980. Geneva. **Universidade de Geneva, Center de Botanique**, 324 p., 1982

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, p. 69-72, 2001

GOLÇALVES, N.B.; CARVALHO, V.D.; GONÇALVES, J.R.A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 10, p. 2075-2081, 2000.

GOURDEAN, J. Nubes & Partículas. **Environmental science published for everybody round the Earth**. 2003. Disponível em www.atmosphere.mpg.de Acesso em 2 de outubro de 2005

GUIMARÃES, D. P. Estudo bioquímico de algumas características da peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora preta

(*Rubus* spp.). Campinas, 99 p. **Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v. 38, p. 625-630, 2004

KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry.** v. 74, p. 147-154, 2001.

KUK, Y.I.; HIN, J.S.; BURGOS, N. R., HWANG, T. E.; HAN, O.; CHO, B. H.; JUNG, S.; GUH, J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Physiology and Metabolism**. v. 4, p. 2109-2117, 2003

LEE, M. Y.; SOO, K. S. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents. **Phytochemistry.** v. 49, p. 23-27, 1998

LUSSO, M. F. G. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da enzima peroxidase em mesocótilos e folhas de milho (*Zea mays* L.) em resposta à inoculação com *Helminthosporium maydis* Nisik. & Miy., raça 0), *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, raça 1 e à injúria mecânica. Piracicaba, 109 p. **Tese de Mestrado em Agronomia** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1989

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; DA MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Conservação de água de côco por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 72-77, 2005

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in fruits – Changes during ripening. In: Friend, J., Rhodes, M.J.C. (eds). **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables**. London, Academic Press Inc, Ltd. p. 161-1801, 1981

MILLER, A. R.; KELLEY, T. J.; MUJER, C. V. Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenoloxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. **Phytochemistry.** v. 29, p. 705-709, 1989

MIZOBUTSI, G. P. Envolvimento da peroxidase e da polifenoloxidase no escurecimento pós-colheita do pericarpo de lichia (*Lichi chinesis* Sonn) Viçosa, 72 p. **Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal** – Universidade Federal de Viçosa, 2002

MOTA, W. F.; FINGER, F. L. ; BRAZ, R. F. ; SUINAGA, F. A. ; OLIVEIRA, J. E. Z. ; JUNQUEIRA, C. S . Atividade da peroxidase em rizomas de açafrão em função do pH e da temperatura. **Acta Horticulturae**. v. 569, p. 223-227, 2002.

NEVES, V. A. Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit. **Brazilian Archieves of Biology and Technology**. v. 45, p. 7-16, 2002

NEVES, L. L. M. Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Viçosa, 72 p. **Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal** – Universidade Federal de Viçosa, 2003

RIBEIRO, R. A. Conservação pós-colheita e metabolismo de carboidratos em raízes de dois clones de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Viçosa, 81 p. **Tese de Doutorado em Fitotecnia** - Universidade Federal de Viçosa, 2003

RIBEIRO, R. A.; FINGER, F. L.; PUIAT TI, M.; CASALI, V. W. D. Chilling injury sensitivity in (*Arracacia xanthorrhiza)* roots. **Tropical Science.** v. 45, p. 55-57, 2005

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Wadsworth, Inc, California, 682 p. , 1991

SANTOS, F. F. Características sócio-econômicas no processo de produção de mandioquinha-salsa no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 95, 1993.

SANTOS, F. F. dos; VIEIRA, J. V.; PEREIRA, A. S.; LOPES, C. A. CHARCHAR, J. M. **Cultivo da Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**, Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1991. Não paginado. (EMBRAPA-CNPH. Instruções Técnicas, 10)

SANTOS F. F.; CARMO, C. A. S. **Mandioquinha-salsa**. Manejo cultural. Brasília: EMBRAPA, 83 p., 1998

SANTOS, F. F. Mandioquinha-salsa no agronegócio do estado do Paraná. Curitiba: EMATER/PR, 56 p., 2000

SANTOS, H. R. Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*). Campinas, 109 p. **Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001

SEGEL, I. H. Enzimas. In: **Bioquímica teoria e problemas**. Livros técnicos e científicos Editora S.A., p. 257-392, 1979

SERRADELL, M. A.; ROZENFELD, P. A.; MARTINÉZ, G. A.; CIVELLO, P. M.; CHAVES, A. R.; AÑON, M. C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 1421-1427, 2000

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P. Influência de Acibenzola-S-Methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à murcha-de-*Curtobacterium*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 373-377, 2004

UNDERHILL, S. J. R.; CRITCHLEY, C. Cellular localization of polyphenol oxidase and peroxidase activity in litchi chinesis sonn. pericarp. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 22, p. 627-632, 1995

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, p. 321-325, 2001

VAN HUYSTEE, R. B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 38, p. 205-217, 1987

VASCONCELOS, M. A. S. Caracterização da polifenoloxidase da pinha (*Annonna squamosa*, L.) e sua inibição em polpa. Recife, 71 p. **Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** - Universidade Federal de Pernambuco, 1993