

JULIANE KARSTEN

**AÇÃO E PROPRIEDADES CINÉTICAS DA PEROXIDASE NA OCLUSÃO  
XILEMÁTICA DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae* Ait.)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

K18a  
2012

Karsten, Juliane, 1985-

Ação e propriedades cinéticas da peroxidase na oclusão  
xilemática de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae* Ait.) /  
Juliane Karsten. – Viçosa, MG, 2012.  
xii, 113f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Fernando Luiz Finger.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Strelitzia reginae* - Fisiologia pós-colheita. 2. Flores -  
Conservação. 3. Peroxidase. 4. Cinética enzimática. 5. Flores  
- Armazenamento. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 584.39

JULIANE KARSTEN

**AÇÃO E PROPRIEDADES CINÉTICAS DA PEROXIDASE NA OCLUSÃO  
XILEMÁTICA DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae* Ait.)**

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

APROVADA : 9 de março de 2012.

---

Clarice Aparecida Megguer

---

Paulo José de Moraes

---

Wagner Campos Otoni

---

Raimundo Santos Barros  
(Coorientador)

---

Fernando Luiz Finger  
(Orientador)

Aos meus amados pais, Arnaldo e Vanilda Karsten

Minha irmã Nissandra

Ao meu esposo Diego

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença marcante.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Fernando Luiz Finger pela dedicação, amizade e orientação durante esses anos.

Aos professores Raimundo Santos Barros e José Geraldo Barbosa, pelas sugestões e coorientações.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-Colheita e do Setor de Floricultura – Horta Velha, pela ajuda e disposição durante o desenvolver da pesquisa.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela amizade e companheirismo, em especial a Giselle, Danilo, Carol, Carla, Rose, Gládis e Flávio.

Aos amigos do Laboratório de Pós-Colheita, que não mediram esforços em ajudar na realização deste trabalho, meu muito obrigado. Agradecimento especial às amigas Daniela, Patrícia, Christiane, Janaína, Teresa, Cristina, Rithi, Paula e Jo, pela sincera amizade, da qual levarei para sempre comigo. Obrigada por fazerem parte da minha “família” em Viçosa e por terem proporcionado momentos únicos e especiais.

A todas as pessoas que mesmo longe contribuíram direta ou indiretamente nesse trabalho fica o meu reconhecimento.

## **BIOGRAFIA**

Juliane Karsten, filha de Arnaldo Karsten e Vanilda Cecília Karsten, nasceu no dia 04 de Abril de 1985, em Maripá – Paraná.

Em dezembro de 2006, graduou-se em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense (UNIPAR), em Toledo – PR.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, defendendo tese em 16 de fevereiro de 2009. Em março do mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado, na mesma instituição, submetendo-se a defesa em 09 de março de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
<b>CAPÍTULO 1 - PEROXIDASES DE HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO (<i>Strelitzia reginae</i>): PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES CINÉTICAS E MECANISMOS DE INIBIÇÃO .....</b>	<b>5</b>
Resumo .....	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1 Material Vegetal.....	7
2.2 Extração e Separação da POD solúvel e ligada à parede .....	7
2.3 Purificação da POD.....	8
2.4 Determinação da atividade da POD e concentração de proteína .....	9
2.5 Determinação da massa molecular por cromatografia gélida.....	9
2.6 Determinação do pH ótimo de reação .....	9
2.7 Determinação da temperatura ótima de reação .....	10
2.8 Determinação das constantes cinéticas .....	10
2.9 Determinação da cinética de inibição.....	10
2.10 Delineamento experimental.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
3.1 Purificação .....	11
3.2 Determinação da massa molecular .....	12
3.3 Determinação do pH ótimo de reação .....	14
3.4 Determinação da temperatura ótima de reação.....	16
3.5 Determinação das constantes cinéticas .....	17
3.6 Determinação da cinética de inibição.....	21
4. CONCLUSÕES .....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
<b>CAPÍTULO 2 - EFEITO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS, DA ACIDEZ E DO CORTE PERIÓDICO DA BASE DA HASTE NA VIDA DE VASO DE FLORES DE AVE-DO-PARAÍSO (<i>Strelitzia reginae</i>) .....</b>	<b>33</b>

<b>Resumo .....</b>	<b>33</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 Material Vegetal .....	35
2.2 Tratamentos pós-colheita .....	36
2.3 Massa fresca relativa.....	36
2.4 Número de floretes abertos .....	36
2.5 Longevidade.....	37
2.6 Extração e ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase .....	37
2.7 Análise visual .....	38
2.8 Delineamento experimental.....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
3.1 Massa fresca relativa.....	38
3.2 Número de floretes abertos .....	41
3.3 Longevidade.....	42
3.4 Atividade da POD e PPO.....	44
3.5 Análise visual .....	48
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 3 - EFEITO DO USO DE SUBSTRATOS FENÓLICOS NA SOLUÇÃO DE VASO OU PULSING SOBRE A VIDA DE VASO DE AVE-DO-PARAÍSO (<i>Strelitzia reginae</i>).....</b>	<b>55</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>55</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
2.1 Material Vegetal .....	57
2.2 Experimentos .....	57
2.2.1 Experimento 1 .....	57
2.2.2 Experimento 2 .....	58
2.3 Análises .....	58
2.3.1 Massa fresca relativa .....	58
2.3.2 Número de floretes abertos .....	59
2.3.3 Longevidade.....	59
2.3.4 Coloração e análise visual.....	59

2.3.5 Extração e ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase .....	59
2.4 Delineamento experimental.....	60
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
3.1 Massa fresca relativa.....	60
3.2 Número de floretes abertos .....	63
3.3 Longevidade.....	65
3.4 Coloração e análise visual.....	66
3.5 Atividade enzimática.....	73
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS INFLORESCÊNCIAS DE AVE- DO-PARAÍSO (<i>Strelitzia reginae</i>) COLHIDAS COM DIFERENTES DIÂMETROS DE HASTE .....</b>	<b>81</b>
Resumo .....	81
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
2.1 Material Vegetal.....	83
2.2 Tratamentos.....	83
2.3 Relações hídricas .....	84
2.3.1 Absorção de água .....	84
2.3.2 Transpiração (TR) .....	85
2.3.3 Massa fresca relativa (MFR).....	85
2.4 Conteúdo de carboidratos .....	85
2.4.1 Extração açúcares e amido.....	86
2.4.2 Teores de açúcares solúveis totais (AST) .....	86
2.4.3 Teores de açúcares redutores (AR) e não redutores (ANR).....	87
2.4.4 Teores de amido .....	87
2.5 Características inerentes às hastes e floretes .....	88
2.5.1 Abertura de floretes .....	88
2.5.2 Longevidade.....	88
2.5.3 Comprimento das sépalas e bráctea .....	88
2.5.4 Massa fresca e área de absorção da base .....	88
2.6 Escurecimento e atividade da peroxidase .....	89
2.6.1 Coloração e análise visual.....	89

2.6.2 Extração e ensaio enzimático da peroxidase.....	89
2.7 Delineamento experimental.....	90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
3.1 Relações hídricas .....	90
3.2 Conteúdo de carboidratos .....	96
3.3 Características inerentes às hastes e floretes .....	102
3.4 Escurecimento e atividade da peroxidase .....	105
4. CONCLUSÕES .....	108
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
CONCLUSÕES GERAIS.....	113

## RESUMO

KARSTEN, Juliane, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Ação e propriedades cinéticas da peroxidase na oclusão xilemática de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae* Ait.)**. Orientador: Fernando Luiz Finger. Coorientadores: Raimundo Santos Barros e José Geraldo Barbosa

Com o intuito de melhor compreender os mecanismos pela qual a peroxidase (POD) está envolvida no bloqueio xilemático em hastes de ave-do-paráiso e como estes podem ser reduzidos ou inibidos, este trabalho teve como objetivos: purificar e caracterizar a POD; verificar o efeito da utilização de inibidores enzimáticos combinados ou não com pHs ácidos e a presença do corte periódico da base da haste sobre a vida pós-colheita dessas flores, avaliar o efeito da aplicação de substratos fenólicos na longevidade das flores e estudar as características inerentes à própria haste, que podem estar influenciando a longevidade das flores de ave-do-paráiso. Para a purificação da POD foi utilizada uma amostra composta de bases de várias hastes mantidas por 8 dias na água. Durante a extração, foi utilizado um processo de separação da POD solúvel da de parede, e o extrato bruto obtido foi purificado por meio da precipitação com sulfato de amônia e por cromatografia gélida. O extrato purificado foi utilizado para a caracterização enzimática. A atividade total no extrato bruto, a massa molecular estimada e o pH ótimo foram semelhantes para as duas isoenzimas. O processo de purificação só foi eficiente para a POD solúvel, e a POD de parede mostrou-se mais sensível aos aumentos de temperatura e apresentou maior afinidade com os substratos. Entre os inibidores enzimáticos testados, o mais eficiente foi o  $\beta$ -mercaptoetanol. No experimento de vaso, as hastes foram colhidas com um florete aberto e distribuídos entre os tratamentos que continham os inibidores metabissulfito de sódio ou azida sódica, combinados com pH 6,0 ou 2,5, aplicados na forma de pulsing por 24 h. Metade das hastes sofreram o corte da base, e a outra metade não. Para as hastes que não sofreram o corte da base, o melhor tratamento foi azida sódica, pH 6,0, que proporcionou maiores valores de massa fresca relativa e retardou o desenvolvimento do balanço hídrico negativo. Já o mesmo inibidor com o pH 2,5 causou toxidez, e por isso foi considerado o pior tratamento. O metabissulfito foi eficiente em retardar o escurecimento da base e reduziu a atividade da polifenoloxidase (PPO). Apesar destes resultados, a

longevidade não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados. Em outro experimento de vaso, substâncias fenólicas (catecol, 4-metilcatecol, pirogalol, pirocatequina e guaiacol, 10 mM) foram aplicadas como pulsing por 24 h e em experimento subsequente, o guaiacol foi aplicado como pulsing ou solução de vaso em concentrações de 5, 25 e 50 mM. A massa fresca relativa das hastes tratadas com essas substâncias fenólicas foram superiores as das hastes controles nos dois experimentos e o balanço hídrico negativo foi retardado. No entanto, essas hastes apresentaram escurecimento intenso da base, e a longevidade não foi prolongada. No último experimento, as hastes colhidas com um florete aberto foram separadas em 3 grupos de acordo com o diâmetro da base: I – finas (até 10 mm de diâmetro), II – médias (diâmetro maior que 10 e menor que 12 mm) e III – grossas (diâmetro maior que 12 mm). A presença do corte da base a cada 48 h também foi avaliado. Foram avaliadas as relações hídricas, o conteúdo de carboidratos, abertura de florete, tamanho de florete, longevidade, escurecimento da base e atividade da POD. A taxa da absorção de água só foi influenciada pela presença do corte da base, sendo maior para as hastes grossas que sofreram o corte da base, apresentando estas maiores valores de massa fresca relativa. Essas hastes também apresentaram maior abertura de floretes e longevidade. As taxas de transpiração não foram influenciadas pelo diâmetro da haste, nem pela presença do corte da base. O conteúdo de carboidrato variou com o diâmetro da haste, parte da planta avaliada (haste, bráctea ou florete), tempo e presença do corte. O escurecimento foi semelhante entre os 3 grupos e a atividade da POD foi maior nas hastes grossas. O tamanho da bráctea e da sépala aumentou proporcionalmente com o aumento no diâmetro da base. Conclui-se que a POD está mesmo envolvida no processo de obstrução xilemática em hastes de ave-do-paráíso, desempenhando um papel fundamental neste processo que culmina com o murchamento precoce dos floretes. No entanto, outros fatores, como diâmetro da haste e o conteúdo de reserva presente nessas podem estar influenciando a longevidade das flores.

## ABSTRACT

KARSTEN, Juliane, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2012. **Action and kinetic properties of peroxidase in xylem occlusion of bird-of-paradise.** Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-advisers: Raimundo Santos Barros and José Geraldo Barbosa

In order to better understand the mechanisms by which the peroxidase (POD) is involved in xylem blockage in stems of bird of paradise and how these xylem blockage can be reduced or inhibited, this work aimed to purify and characterize POD; verify the effect of enzyme inhibitors combined or not with acid pH and the periodical cut of the base of the stem on the postharvest life of these flowers, evaluate the effect of phenolic substrates in the longevity of the flowers and study the characteristics inherent to the stem, which may be influencing the bird of paradise flowers longevity. To purify POD was used a sample of several bases maintained for 8 days in water. For the extraction, a procedure to separate the soluble POD from the cell wall POD was used, and the crude extract obtained was purified by precipitation with ammonium sulfate and by gel chromatography. The extract purified was used for enzymatic characterization. The total activity in the crude extract, the estimated molecular weight and pH optima were similar for both isoenzymes. The purification process was only effective for soluble POD. The cell wall POD was more sensitive to increases in temperature and had a higher affinity for the substrates.  $\beta$ -mercaptoethanol was the most efficient, among the enzyme inhibitors tested. In the vase experiment, stems were collected with an open floret and distributed among the treatments containing inhibitors sodium metabisulfite or sodium azide, combined with pH 6.0 or 2.5, applied as pulsing for 24 h. Half of the stems had undergone the cutting of the base, and the other half didn't. For stems that didn't have the cut in the base, the best treatment was sodium azide pH6.0, which led to higher values of relative fresh weight and slowed the development of negative water balance. However the same inhibitor at pH 2.5 caused toxicity, and therefore was considered the worst treatment. The metabisulfite was effective in delaying the darkening of the base and reduced polyphenoloxidase (PPO) activity. Despite these results, longevity showed no statistical differences among treatments. In a different vase experiment, phenolic substances (catechol, 4-methylcatechol, pyrogallol, pirocatequina and

guaiacol 10 mM) were applied as pulsing for 24 h. and in a subsequent experiment, the guaiacol was applied as a vase solution or pulsing at concentrations of 5, 25 and 50 mM. The stems treated with these phenolic compounds showed higher relative fresh weight than those of control stems of the two experiments and the negative liquid balance was delayed. However, these stems had intense base darkening, and the longevity was not increased. In the last experiment, the stems collected with an open floret were separated into three groups according to the base diameter: I - thin (up to 10 mm diameter), II - medium (diameter greater than 10 and smaller than 12 mm) and III - thick (greater than 12 mm diameter). The base cutting at every 48 h was also evaluated. Were also evaluated the water relations, carbohydrate content, floret opening, floret size, longevity, darkening of the base and POD activity. The rate of water absorption was only changed by the presence of the base cutting, being greater for thick stems that have undergone the base cutting that also showed higher relative fresh weight. These stems also had a greater opening of florets and longevity. Transpiration rates were not influenced by the stem diameter or by the presence of the base cutting. The carbohydrate content changed with the stem diameter, the plant part evaluated (stem, bract or floret), cutting time and cutting presence. Darkening was similar among the three groups and POD activity was higher in thick stems. The size of the bract and sepal increases with the increase in base diameter. In conclusion, POD is really involved in xylem blockage of bird of paradise stems, playing a key role in this process that culminates in early wilting of the florets. However, other factors such as stem diameter and reserves content may be influencing the flowers longevity.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas ornamentais tropicais, flores e folhagens, destinadas principalmente para corte são de grande beleza pelo porte e formas exóticas. Dentre as espécies tropicais, a ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Ait.) destaca-se pela beleza, curiosa forma e comprimento da haste (Luz et al., 2005). Pertencente à família Strelitziaceae, a ave-do-paraíso é uma planta herbácea rizomatosa, entouceirada, acaule, apresentando folhas firmes e coriáceas (Lorenzi e Souza, 2001). As flores se abrem sucessivamente de uma bráctea de cor verde-avermelhada, possuindo três sépalas grandes de cor laranja e duas pétalas azuis modificadas em forma de seta, que abrigam os órgãos sexuais (Castro, 1995).

As hastes dessa espécie, logo após a colheita, ao serem colocadas na água, desenvolvem balanço hídrico negativo, devido à perda da condutividade hidráulica de seus vasos condutores. Nessa espécie, a perda da condutividade parece relacionada ao aumento na atividade da peroxidase induzida pelo corte na base da haste floral (Karsten, 2009). Uma vez que os vasos são bloqueados, a absorção de água é limitada devido à alta resistência hidráulica, porém o processo de transpiração continua, o que gera um desequilíbrio hídrico e, conseqüentemente, tem-se o murchamento precoce como resultado da perda prematura do turgor das células (van Meeteren et al., 2001).

As peroxidases (POD) oxidam substratos orgânicos, fenóis, precursores de lignina e vários metabólitos secundários, e tem o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora de elétrons (Passardi et al., 2007). É codificada por uma família multigênica e múltiplas formas de isoperoxidases podem ser encontradas, diferindo com respeito ao peso molecular, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótima, especificidade ao substrato, estabilidade térmica e sensibilidade a inibidores (Veitch, 2004). As PODs estão envolvidas em várias funções metabólicas como regulação do alongamento celular, ligação entre os polissacarídeos da parede celular, lignificação, proteção contra patógenos, cicatrização de ferimentos, suberização, oxidação de fenol (Lagrimini, 1991). No caso das flores de corte, o aumento da atividade da POD em resposta ao dano, primeiramente serve para impedir a entrada de microrganismos no tecido danificado, o que pode resultar na oclusão dos vasos do xilema, devido à deposição de materiais no lúmen dos vasos.

Existem algumas técnicas que vem sendo utilizadas na tentativa de melhorar as relações hídricas de hastes após a colheita. A aplicação de tratamentos com produtos químicos no manejo pós-colheita melhora a longevidade e, por consequência, o período de comercialização (Paiva et al., 2005). No caso do bloqueio vascular causado por enzimas oxidativas, a utilização de inibidores enzimáticos específicos para essas enzimas como constituintes de soluções de pulsing ou de vaso podem ser utilizados. Resultados positivos com a utilização dessa técnica já foram encontrados para flores de crisântemo (van Doorn e Vaslier, 2002), *Bouvardia* (Vaslier e van Doorn, 2003) e *Grevillea* (He et al., 2006). Marques (2008), utilizando diferentes inibidores enzimáticos em ave-do-paráíso, não encontrou diferenças significativas na longevidade dessa espécie, enquanto Karsten (2009) encontrou resultados positivos com a utilização dos inibidores, principalmente quando esses foram combinados com sacarose, apresentando maior longevidade e abertura de floretes e o desenvolvimento do balanço hídrico negativo foi retardado.

A acidificação da solução de pulsing ou vaso também é uma alternativa, uma vez que a atividade das enzimas oxidativas e o crescimento de microrganismos são reduzidos ou inibidos nessas condições. Conforme observado na caracterização da POD de ave-do-paráíso, a utilização de pH 2,5 *in vitro*, causa inibição irreversível na atividade dessa enzima (Karsten, 2009).

O corte periódico da base da haste é outra técnica muito utilizada. Com isso, tem-se a remoção da porção obstruída da haste, e o fluxo de água ao longo dos vasos xilemáticos pode ser restabelecido (van Doorn, 1997). Resultados positivos foram encontrados com o corte da base da haste de ave-do-paráíso a cada 2 dias, sendo a longevidade aumentada de 7,6 dias nas plantas controle para 11,3 nas hastes em que o corte foi realizado periodicamente (Campanha et al., 1997).

A purificação e uma possível produção de anticorpos que agem especificamente sobre a POD, inibindo e/ou reduzindo a atividade dessa enzima, parece ser uma estratégia promissora. No entanto, para isso, há necessidade de purificar e realizar estudos mais detalhados de caracterização de seus mecanismos cinéticos e de inibição enzimática.

O fornecimento de substratos fenólicos pode também fornecer informações importantes sobre os mecanismos de como as enzimas oxidativas estão envolvidas nesse bloqueio. Características inerentes das próprias hastes, como diâmetro, podem

também estar influenciando o desenvolvimento do bloqueio ou a capacidade de restabelecer o fluxo de água após a obstrução, e precisam ser avaliadas.

Dessa forma, o trabalho tem por objetivos:

- purificar e caracterizar a peroxidase (solúvel e de parede);
- avaliar o efeito combinado da utilização de inibidores enzimáticos com pH ácido, em haste que sofreram o corte periódico da base;
- verificar o efeito do fornecimento de diferentes substratos fenólicos ao longo da vida de vaso;
- estudar as características inerentes das hastes, como o diâmetro e o conteúdo de carboidratos, que podem influenciar na longevidade das flores.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Campanha, M. M.; Finger, F. L.; Cecon, P. R.; Barbosa, J. G. 1997. Water relations of cut bird-of-paradise (*Strelitzia reginae* Ait.) inflorescences. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 3, 27-31.

Castro, C. E. F. 1995. Inter-relações das famílias das zingiberales. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1, 2-11.

He, S.; Joyce, D. C.; Irving, D. E.; Faragher, J. D. 2006. Stem end blockage in cut *Grevillea* ‘Crimson Yul-lo’ inflorescences. **Postharvest Biology and Technology**. 41, 78-84.

Karsten, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráíso (*Strelitzia reginae*)**. 117p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Lagrimini, L. M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants over expressing peroxidase. **Plant Physiology**. 96, 577-583.

Lorenzi, H.; Souza, H. M. 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1088 p.

Luz, P. B.; Almeida, E. F. A; Paiva, P. D. O.; Ribeiro, T. R. 2005. Cultivo de flores tropicais. **Informe Agropecuário**. 26, 62-72.

Marques, A. E. 2008. **Estudos sobre o bloqueio do xilema na pós-colheita das inflorescências de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Aiton)**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Paiva, R.; Oliveira, L. M.; Nogueira, R. C.; Santos, B. R.; Martinotto, C.; Paiva, P. D. O.; Menegucci, J. L. P. 2005. Aspectos fisiológicos da produção de flores e plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**. 26, 62-72.

Passardi, F., Bakalovic, N.; Teixeira, F. K.; Margis-Pinheiro, M.; Penel, C.; Dunand, C. 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes, **Genomics**. 89, 567-579.

van Doorn, W. G. 1997. Water relations of cut flowers. **Horticultural Reviews**. 18, 1-85.

van Doorn, W. G.; Vaslier, N. 2002. Wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers: roles of peroxidase and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Technology**. 26, 275-284.

van Meeteren, U.; van Gelder, A.; van Ieperen, W.; Slootweg, C. 2001. Should we reconsider the use of deionised water as control vase solutions? **Acta Horticulturae**. 543, 257-264.

Vaslier, N.; van Doorn W. G. 2003. Xylem occlusion in bouvardia flowers: evidence for a role of peroxidases and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Technology**. 28, 231-237.

Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**. 65, 249-259.

# **CAPÍTULO 1 - PEROXIDASES DE HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*): PURIFICAÇÃO, PROPRIEDADES CINÉTICAS E MECANISMOS DE INIBIÇÃO**

## **Resumo**

A ave-do-paraíso é uma importante espécie de flor tropical utilizada para corte, e que sofre a influência da atividade da peroxidase (POD) após o dano causado pela colheita da haste. O aumento da atividade dessa enzima resulta na obstrução dos vasos do xilema durante sua vida de vaso e, como consequência, tem-se redução nas taxas de absorção de água e na longevidade. A POD pode ser encontrada como diferentes isoformas em um mesmo tecido vegetal, apresentando características bioquímicas e propriedades catalíticas diferentes, que devem ser estudadas. Nessa espécie, a atividade total da POD solúvel e ligada à parede é semelhante no extrato bruto. A utilização da precipitação com sulfato de amônia, seguido por cromatografia gélica é um processo eficiente na purificação da POD solúvel. A massa molecular estimado para essas duas isoenzimas através de cromatografia gélica foi semelhante (132 e 135 kDa), e possivelmente tratam-se de enzimas constituídas por mais que uma subunidade. O pH ótimo da POD solúvel foi de 5,0 e da POD de parede pH 5,5. A temperatura ótima foi de 50 e 20°C da POD solúvel e de parede, respectivamente. Dos substratos testados, o guaiacol foi superior ao o ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), e a afinidade da POD ligada à parede para o peróxido de hidrogênio, guaiacol e ABTS foi superior ao da POD solúvel. Entre os inibidores testados, o  $\beta$ -mercaptoetanol foi o mais eficiente em reduzir a atividade, e o modo de inibição varia com o composto utilizado e com a isoenzima.

## **1. INTRODUÇÃO**

A peroxidase (POD) é uma oxidoreductase que catalisa a oxidação de uma variedade de substratos doadores de elétrons utilizando o peróxido de hidrogênio como agente oxidante (Hamid e Rehman, 2009). Constituinte do grupo das glicoproteínas, essa enzima contém ferro na sua estrutura, e catalisa a oxidação de fenóis (guaiacol, p-cresol), aminas aromáticas (anilina, o-dianisidina), e alguns outros compostos orgânicos (Vamos-Vigyazo, 1981). Essa enzima é amplamente distribuída entre as plantas superiores e diversas isoenzimas estão presentes em

diferentes tecidos e espécies, diferindo nas propriedades moleculares e catalíticas (Veitch, 2004).

A peroxidase nas plantas, pertencente à classe III, pode ser encontrada na forma solúvel, ionicamente e covalentemente ligada à parede (Robinson, 1991). Está envolvida em diversas funções, como consequência de seus ciclos peroxidativo e hidroxilativo, como a regulação e geração de espécies reativas de oxigênio, regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio e oxidação de vários substratos. Utilizando desses três mecanismos, as plantas têm à disposição ações multifuncionais que podem ser usadas em muitos tecidos, a qualquer momento, em todo o ciclo de vida (Passardi et al., 2005). As PODs estão envolvidas em numerosos processos fisiológicos que incluem a regulação do alongamento celular, lignificação, ligação cruzada entre os polissacarídeos da parede celular, resistência a patógenos, cicatrização de ferimentos, suberização, respostas gerais ao estresse e catabolismo de auxinas (Passardi et al., 2004, 2005; Lagrimini, 1991).

A ave-do-paraíso é uma planta nativa da costa subtropical do sul da África, e é amplamente cultivada em regiões quentes (Hensley et al., 1998). Essa espécie apresenta grande potencial para o cultivo comercial, devido à rusticidade e resistência a pragas e doenças e apresenta características favoráveis para a utilização como flor de corte como tamanho longo das hastes e cores fortes das inflorescências (Wood, 1995). Quando utilizada como flor de corte, perdas na vida pós-colheita são encontradas, resultantes de um rápido declínio na absorção de água após a colheita, associado ao bloqueio dos tecidos vasculares e consequente senescência dos floretes (Jaroenkit e Paull, 2003).

O bloqueio vascular em ave-do-paraíso está relacionado ao aumento na atividade da POD em resposta ao dano causado pelo corte (Karsten, 2009). Essas reações de dano, primariamente, servem para impedir a entrada de microrganismos no tecido aberto, e podem resultar na oclusão xilemática, devido à deposição de lignina na região do corte. A POD está envolvida na oxidação de vários fenóis, entre eles os monolignóis (monômeros constituintes da molécula de lignina), dando origem a radicais que espontaneamente formam a lignina, que obstruem os vasos xilemáticos abertos.

Em trabalhos já realizados com a POD de ave-do-paraíso, determinou-se que esta apresenta atividade máxima a 60°C em pH 5,0. Trata-se de uma enzima com alta termoestabilidade, sendo que inibição irreversível da sua atividade é observada com

a pré-incubação do extrato em pHs ácidos. Sua atividade pode ser também inibida pela adição de diferentes inibidores ao meio de reação (Karsten, 2009). Outras características como a presença de diferentes isoenzimas, peso molecular, constantes cinéticas e mecanismos de inibição ainda não foram determinados para a POD desta espécie.

Assim, este trabalho teve como objetivo separar a POD solúvel e ligada à parede, purificar essas isoformas, determinar suas constantes cinéticas e estudar os mecanismos de inibição de diferentes compostos.

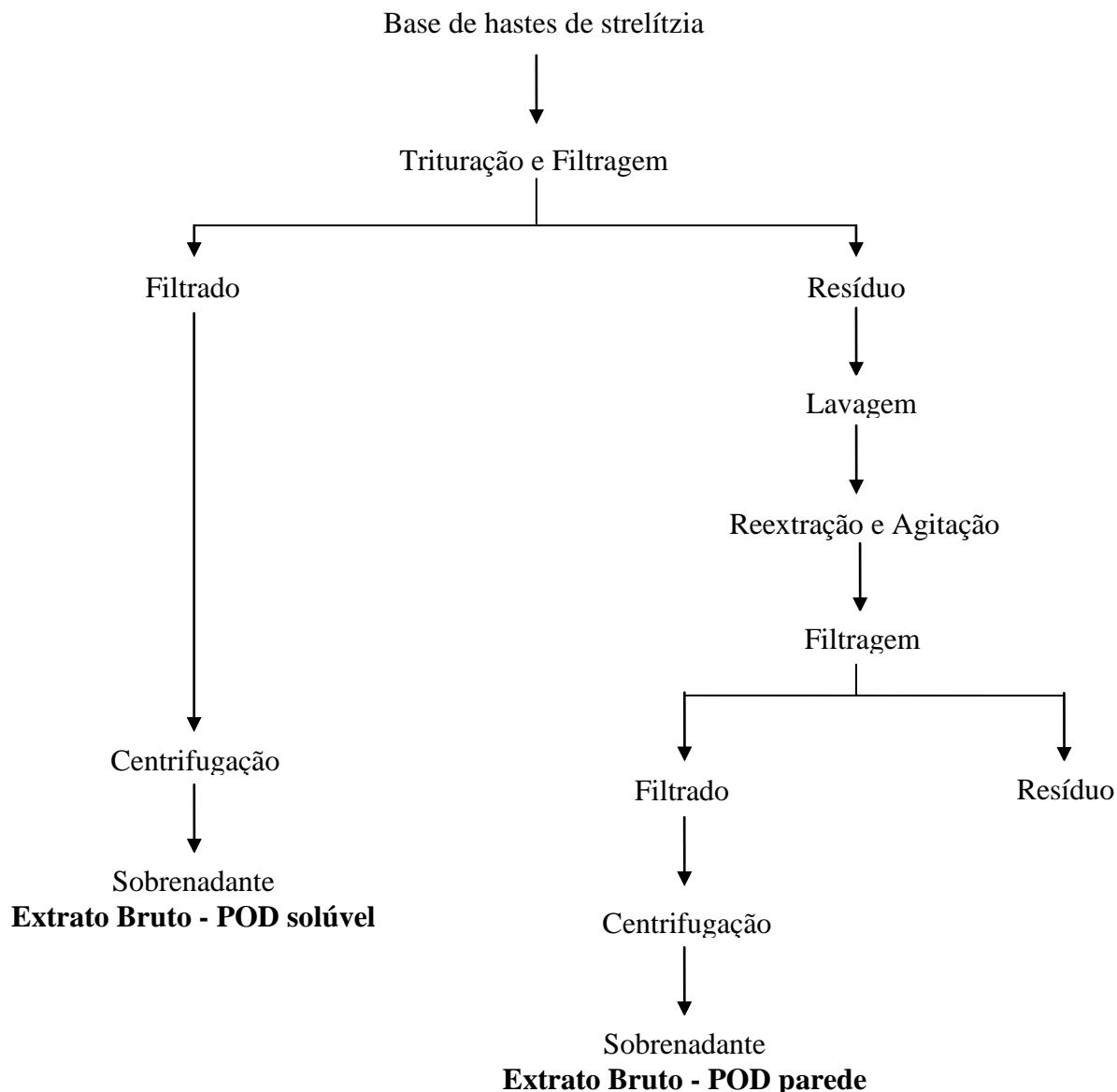
## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Hastes florais de ave-do-paraíso foram colhidas no campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (20°45' S, 42°51' W e altitude de 651 m), no período de março de 2010 a março de 2011. Em seguida, foram levadas ao laboratório onde passaram por processo de seleção e padronização. As hastes foram colocadas em vasos contendo água destilada, sendo essa trocada a cada 48 horas para evitar o desenvolvimento de microrganismos. No final do oitavo dia, secções de aproximadamente 2 cm da base da haste foram cortadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para posterior purificação da POD.

### **2.2 Extração e Separação da POD solúvel e ligada à parede**

Cerca de 200 g de material vegetal foram triturados com 500 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1M pH 6,5, acrescido de 0,1% de bissulfito de sódio). Após a homogeneização, o homogeneizado foi filtrado em uma camada de organza e o líquido filtrado centrifugado a 17000 g, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante obtido desta centrifugação foi utilizado para a determinação da atividade do extrato bruto da peroxidase solúvel. O resíduo retido na organza foi lavado com água desionizada gelada, e ressuspenso em 500 mL do tampão fosfato 0,1 M pH 6,5, acrescido de 1 M de cloreto de sódio. Esse foi reextraído no triturador, e mantido sob agitação por 4 h a 4°C e após filtrado e centrifugado como descrito anteriormente. O sobrenadante dessa centrifugação foi utilizado para o ensaio da peroxidase ionicamente ligada à parede celular do extrato bruto (Esquema 1).



**Esquema 1.** Esquema de separação da POD solúvel e ligada à parede em hastes de *Strelitzia reginae*

### 2.3 Purificação da POD

Todo o processo de purificação foi realizado a 4°C. O extrato bruto obtido da extração foi saturado pela adição de sulfato de amônia 60–80%, e foi mantido sob homogeneização por 30 min e posteriormente centrifugado a 17000 g, por 20 min. O precipitado obtido da centrifugação foi resuspenso em 2 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,5. Esse extrato parcialmente purificado foi aplicado em coluna de

cromatografia gélida (40 cm x 2,5 cm) preenchida com Sephacryl S-200 e equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,5. A eluição foi feita com o mesmo tampão de equilíbrio e frações de 4 mL foram coletadas por um coletor de fração, sendo elas utilizadas para quantificação de proteínas e atividade da POD. As frações que apresentaram maiores atividades da POD foram misturadas e concentradas por ultracentrifugação (Millipore Amicon 10 kDa). O processo de purificação foi realizado separadamente para a POD solúvel e ligada à parede. O extrato agora purificado foi utilizado nos estudos de caracterização descritos abaixo.

#### **2.4 Determinação da atividade da POD e concentração de proteína**

Para a determinação da atividade enzimática da peroxidase, uma alíquota de extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 5,0) e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%), completando-se os 3 mL da reação. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância a 470 nm, a 25°C, e expressa em UA/min/mg de proteína (Neves, 2003).

O extrato utilizado para a determinação da atividade enzimática também foi utilizado para a quantificação da proteína pelo método de Bradford (1976), adotando-se albumina soro bovina como padrão.

#### **2.5 Determinação da massa molecular por cromatografia gélida**

A massa molecular da POD foi estimado por filtração gélida utilizando-se uma coluna Sephacryl S-200, equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,5. A coluna foi calibrada com os seguintes padrões: catalase (250 kDa), amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (141 kDa), soro albumina bovina (132 e 66 kDa), peroxidase (44 kDa), albumina de ovo (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa), eluídos com o tampão de equilíbrio. A partir desses padrões, uma curva derivada da relação volume de eluição x log massa molecular das proteínas foi construída e a massa molecular da POD da haste de ave-do-paraíso estimado.

#### **2.6 Determinação do pH ótimo de reação**

Para determinar-se o efeito do pH na atividade da peroxidase solúvel e de parede, foram utilizadas diferentes soluções-tampão de reação à concentração de 0,1 M: ácido cítrico (pH 2,5 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 7,5) e ácido bórico (pH 8,0 a

9,0). Os ajustes dos pHs foram realizados com NaOH e HCl 1 M (Neves, 2003). Sob pH ótimo, a atividade relativa foi considerada 100%, e a atividade nos demais pHs foi estimada com relação a ela.

### **2.7 Determinação da temperatura ótima de reação**

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade, os extratos enzimáticos e o tampão de reação foram incubados, por 10 min sob temperaturas que variaram de 10 a 80°C, em intervalos de 10°C, e imediatamente, foi efetuada a leitura da atividade em espectrofotômetro, a 470 nm, à mesma temperatura da incubação (Neves, 2003). A temperatura que proporcionou maior atividade foi considerada como 100%, e a atividade relativa nas demais temperaturas foi calculada com base nesta.

### **2.8 Determinação das constantes cinéticas**

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), guaiacol e ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). Os valores de  $K_m$  para o peróxido de hidrogênio foram obtidos por variações na concentração do  $H_2O_2$  (0,05 a 7,5 mM) e com concentração fixa de guaiacol (25 mM). Já para o guaiacol e ABTS, as concentrações variaram de 1 a 40 mM e 0,5 a 15 mM, respectivamente, e concentrações fixas do peróxido de hidrogênio (30 mM) foram utilizadas. Gráficos do duplo recíprocos de Lineweaver-Burk  $1/V$  versus  $1/[S]$  foram construídos e os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram estimados para todos os substratos.

### **2.9 Determinação da cinética de inibição**

A atividade da peroxidase foi determinada com concentração fixa de guaiacol e na presença de inibidores e peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações. Os inibidores utilizados foram: azida sódica (1,5 e 3 mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (0,05 e 0,1 mM), L-cisteína (0,125 e 0,25 mM) e metabissulfito de sódio (0,125 e 0,25 mM). As concentrações do peróxido de hidrogênio variaram de 0,05 a 7,5 mM. O modo de inibição foi determinado a partir do gráfico Lineweaver-Burk de  $1/V$  versus  $1/[S]$ . O valor de  $K_i$  foi determinado a partir da inclinação do gráfico Lineweaver-Burk versus a concentração correspondente do inibidor como descrito por Segel (1979).

## 2.10 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados. Todas as análises foram realizadas com 4 repetições, e cada repetição quantificada em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Purificação

A POD solúvel e a ligada à parede apresentaram no extrato bruto atividade total semelhante, no entanto, o conteúdo de proteína quantificada no extrato bruto da POD ligada à parede foi inferior a 7% da quantidade determinada no extrato da POD solúvel (Tabela 1). Em *Citrus unshiu*, observou-se que a proporção que as atividades da peroxidase solúvel e a ionicamente ligada à parede representam com relação à atividade da peroxidase total, depende da parte da planta avaliada e da estação do ano em que as amostras foram colhidas (Monerri e Guardiola, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados também em *Phoenix dactylifera* L. (Qacif et al., 2007).

**Tabela 1.** Níveis de purificação da POD solúvel e ligada à parede de hastes de *Strelitzia reginae*, após aplicação de diferentes fases de purificação

Fase da Purificação	Atividade Total (UA/min)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (UA/min/mg de ptn)	Purificação
<i>POD solúvel</i>				
Extrato bruto	3333,49	71,78	46,44	1,00
Precipitação com Sulfato de Amônia	90,08	0,89	101,76	2,19
Cromatografia Gélica	46,31	0,01	4951,34	106,6
<i>POD parede</i>				
Extrato bruto	3479,16	4,98	699,28	1,00
Precipitação com Sulfato de Amônia	139,16	0,09	1513,39	2,16
Cromatografia Gélica	17,61	0,01	1774,33	2,54

A utilização de diferentes fases no processo de purificação foi eficiente em aumentar a taxa de purificação da POD solúvel. Após precipitação com 60-80% de sulfato de amônia e aplicação da amostra em coluna de cromatografia gélica, obteve-se uma purificação de 106,6 vezes (Tabela 1). Já no caso da POD ligada à parede, a utilização da mesma seqüência de fases não se mostrou tão eficiente. Isto pode ser explicado pelo baixo conteúdo de proteína encontrado já no extrato bruto dessa isoenzima, o que fez com que, ao longo do processo de purificação o conteúdo de proteína tornasse muito baixo, e muitas vezes até difícil de ser quantificado (Tabela 1).

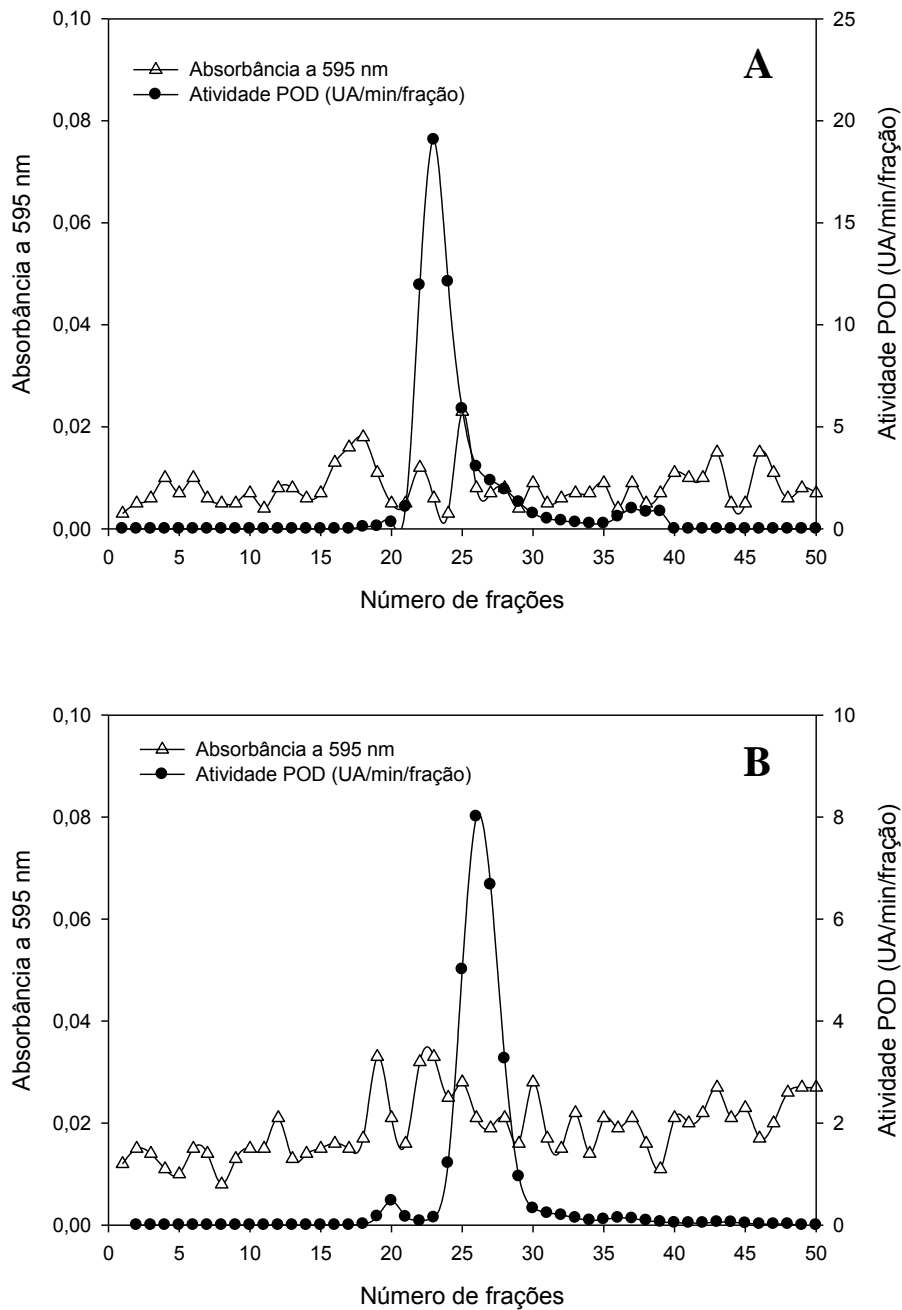
As taxas de purificação encontradas para outras espécies dependem das técnicas utilizadas no processo de purificação. Em *Vigna mungo*, purificação de 44 vezes foi encontrado para a POD, após cromatografia de troca iônica e gélica (Ajila e Rao, 2009), enquanto em *Vanilla*, a taxa de purificação da peroxidase ligada à parede, após passar por processo de ultrafiltração e cromatografia gélica, foi de 21 vezes (Márquez et al., 2008). O processo de purificação emprega sucessivos métodos de fracionamento químicos ou físicos, com o objetivo, em cada etapa, de reter o máximo possível à enzima que se quer purificar e eliminar-se ao máximo outras proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias (Segel, 1979). O objetivo final é a obtenção de um alto rendimento de proteínas puras e ativas em um menor número de etapas (Burgess, 2008).

### 3.2 Determinação da massa molecular

O perfil de eluição da POD solúvel e ligada à parede na coluna de Sephacryl S-200 apresentou um pico único distinto de atividade (Figuras 1A e 1B), localizado entre as frações 23 e 26. O gráfico das proteínas padrões apresenta uma equação de regressão de  $y = -0,0236x + 4,371$  ( $R^2=0,93$ ) (Figura 2) e que foi utilizada na determinação da massa molecular das PODs de interesse. Com base nessa equação, a massa molecular estimada para a POD solúvel foi de aproximadamente 132 kDa e da POD ligada a parede de 135 kDa.

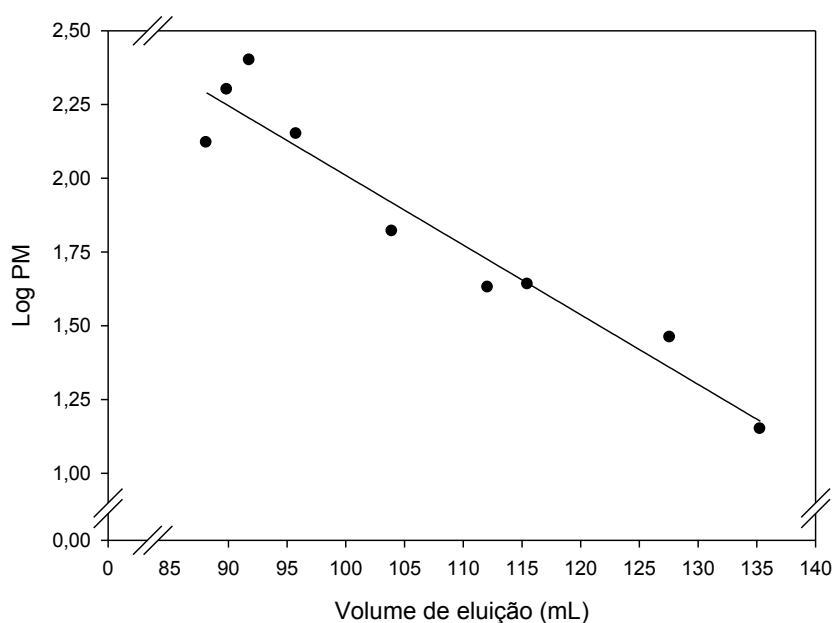
A massa molecular da POD ligada a parede de *Vanilla* estimado por cromatografia em coluna foi de 186 kDa, e em gel SDS-PAGE, obteve-se uma simples banda com 46,5 kDa, o que levou-se a concluir que a peroxidase nativa desta espécie apresenta-se na forma tetramérica (Márquez et al., 2008). Em *Leucaena leucocephala* a massa molecular nativa da peroxidase purificada foi de

aproximadamente 200 kDa e em SDS-PAGE, foram observadas duas subunidades com tamanhos diferentes de 66 e 58 kDa, e com base no tamanho destas subunidades, foi sugerido que a POD nessa espécie apresenta estrutura heterotrimérica (2 subunidades de 66 kDa e 1 de 58 kDa) (Pandey e Dwivedi, 2011).



**Figura 1.** Perfil de eluição da peroxidase solúvel (A) e ligada à parede (B) de *Strelitzia reginae* a partir de Sephacryl S-200

A maioria das PODs são monoméricas, com a massa molecular dos monômeros de diferentes fontes vegetais variando de 30-60 kDa (Vamos-Vigyazo, 1981). As diferenças observadas são atribuídas às modificações pós-transcricional na cadeia polipeptídica, bem como no número e composição da cadeia de glicanos (van Huystee et al., 1992). Uma das prováveis explicações para as PODs de alta massa molecular encontradas é a possível agregação de proteínas sob as condições utilizadas no trabalho (Deepa e Arumughan, 2002). Possivelmente a POD de ave-do-paráíso apresenta-se composta por mais de uma subunidade.



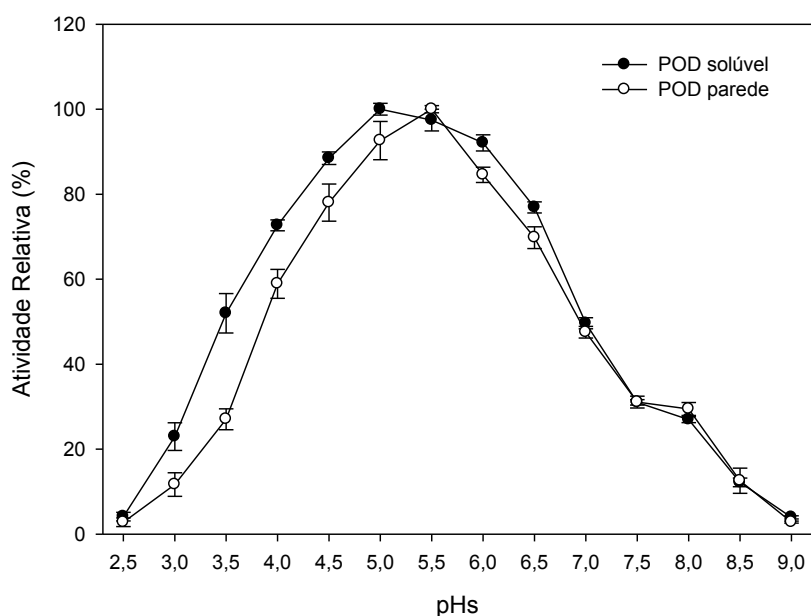
**Figura 2.** Curva de calibração para determinação de peso molecular da peroxidase de *Strelitzia reginae* por cromatografia de filtração gélida

### 3.3 Determinação do pH ótimo de reação

O comportamento da atividade da POD solúvel e ligada à parede sob diferentes pHs do tampão de reação foi semelhante, sendo que maior atividade para a POD solúvel foi encontrada sob pH 5,0, enquanto para a POD ligada à parede esse foi de 5,5 (Figura 3). Máxima atividade da POD utilizando-se o guaiacol como substrato, em folhas de palmeiras foi encontrada sob pH 5,5 (Al-Senaïdy e Ismael, 2011), resultado idêntico aos encontrados em alcachofra (Cardinali et al., 2011) e rabanete cv. Balady (Mohamed et al., 2011). Em *Leucaena leucocephala* o pH ótimo, utilizando-se o guaiacol como substrato foi 5,0 (Pandey e Dwivedi, 2011) e em

*Euphorbia cotinifolia* 6,0 (Kumar et al., 2011). A POD ligada à parede de *Vanilla planifolia* apresentou pH ótimo de pH 3,8 (Márquez et al., 2008).

A POD solúvel exibe mais que 50% de atividade em pHs entre 3,5 e 7,0, enquanto para a POD ligada à parede, essa faixa é mais estreita, sendo encontrada entre os pHs 4,0 e 6,5 (Figura 3). Nos extremos de pHs testados (2,5 e 9,0), as duas isoformas da POD apresentaram baixíssimas atividades, restando menos de 10% da atividade máxima, resultados semelhantes ao encontrado por Pandey e Dwivedi (2011), em POD de *Leucaena leucocephala*. O declínio da atividade nesses pHs pode ser resultado da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima, ou de ambos, pela inativação da enzima ou pela combinação destes efeitos (Segel, 1979).



**Figura 3.** Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade de duas isoenzimas da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média

A maioria das enzimas são ativas em estreitos intervalos de pH, devido à combinação de fatores como a ligação do substrato a enzima, o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica da enzima, a ionização do substrato e à variação na estrutura da proteína (Voet et al., 2002). O pH é fator determinante na expressão da atividade enzimática pois altera o estado de ionização das cadeias de aminoácidos e do substrato (Ajila e Rao, 2009). O pH ótimo

sofre influência também do doador de H utilizado no ensaio enzimático (Fortea et al., 2011). Em *Viscum angulatum*, Das et al. (2011), ao testar a combinação de substratos com diferentes pHs, encontrou o pH ótimo de 3,5 para ácido cafeíco e p-coumárico, pH 4,0 para ABTS e ácido ferúlico e pH 4,5 para o guaiacol.

### 3.4 Determinação da temperatura ótima de reação

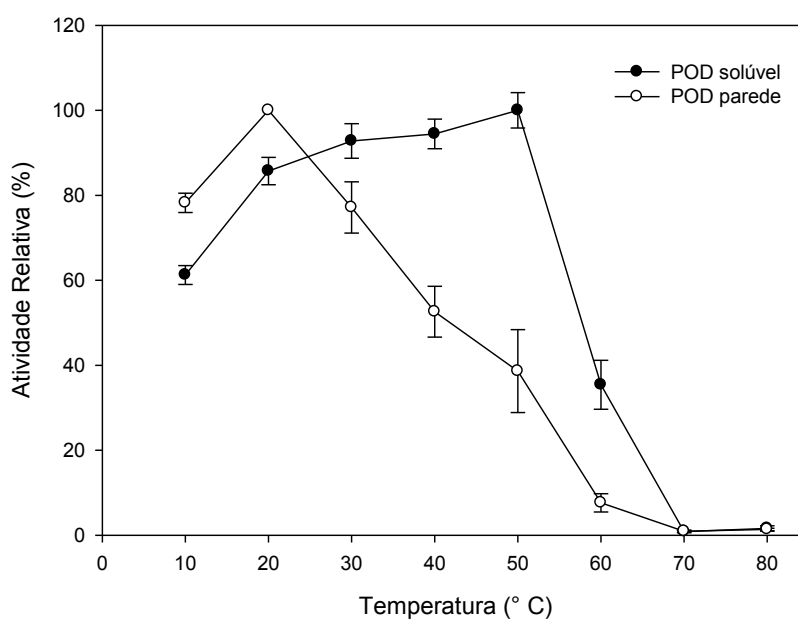
A atividade da POD solúvel e de parede em diferentes temperaturas está presente na figura 4. Nota-se que a POD ligada à parede mostrou-se muito mais sensível aos aumentos de temperaturas que a solúvel. A temperatura ótima para a POD solúvel foi de 50°C, enquanto para a POD ligada à parede, foi de 20°C, apresentando decréscimo gradual na atividade com o aumento na temperatura (Figura 4). POD de *Euphorbia cotinifolia* também apresenta temperatura ótima de 50°C (Kumar et al., 2001), enquanto para rabanete cv. Balady está foi de 40°C, em *Leucaena leucocephala* e em palmeira *Phoenix* foi 55°C (Pandey e Dwivedi 2011; Al-Senaïdy & Ismael, 2011), e em *Vigna mungo* 60°C (Ajila e Rao, 2009). A POD ligada à parede de *Vanilla planifolia* apresentou temperatura ótima de 16°C (Márquez et al., 2008).

Suzuki et al. (2006), estudando a POD de sementes de *Fagopyrum esculentum* Moench encontraram duas isoenzimas (POX1 e POX2). Utilizando o-dianisidina como substrato, eles encontraram temperatura ótima de 30°C e 10°C para POX1 e POX2 respectivamente. No entanto a POX1 retém mais que 50% de atividade entre 0 e 50°C, enquanto a POX2 apresenta altas atividades em baixas temperatura (entre 0 e 20°C), e sua atividade decresce gradualmente em temperaturas maiores que 20°C. A POD solúvel apresenta quedas de 50% da atividade a partir de 60°C, enquanto a POD de parede, apresenta mais que 50% de atividade somente até 40°C (Figura 4). A POX2 descrita por Suzuki et al. (2006) apresenta comportamento semelhante a POD de parede quando exposta a diferentes temperaturas.

Com temperaturas de 70 e 80°C a atividade das duas isoenzimas foi reduzida drasticamente (Figura 4), assim como observado para *Vigna mungo* (Ajila e Rao, 2009) e *Euphorbia cotinifolia* (Kumar et al., 2011). A alta estabilidade térmica apresentada por PODs de diversas fontes vegetais se deve a presença de carboidratos na sua estrutura (Al-Senaïdy e Ismael, 2011).

À medida que a temperatura aumenta, maior é a energia cinética das moléculas de reagentes e, conseqüentemente, há maiores colisões produtivas por

unidade de tempo. As enzimas são moléculas proteicas complexas e suas atividades catalíticas provêm de uma estrutura terciária precisa, mantida por ligações não covalentes fracas, altamente ordenadas, que justapõem os grupamentos R específicos dos aminoácidos para formar sítios estéreo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. Uma grande absorção de energia leva ao rompimento dessas estruturas terciárias e a enzima desnatura-se, perdendo assim a sua capacidade catalítica (Segel, 1979).



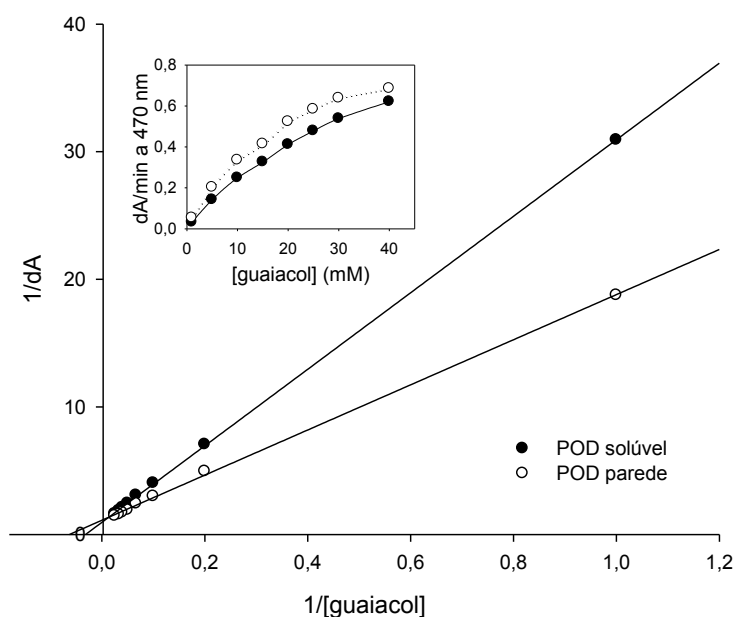
**Figura 4.** Influência da temperatura do meio de reação sobre a atividade de duas isoenzimas da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliadas em pH 5,0. As barras verticais representam o erro padrão da média

### 3.5 Determinação das constantes cinéticas

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade da peroxidase purificada foi estudado pelo ensaio com diferentes concentrações de substratos. Todos os substratos testados apresentaram curva de saturação com comportamento de Michaelis-Menten (Figuras 5, 6 e 7), ou seja, a atividade aumentou com o aumento da concentração do substrato, até alcançar um máximo, onde permaneceu praticamente estável. Apesar de não ter sido observada em POD de ave-do-paráiso, é comum encontrar inibição na atividade da POD sob altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Ajila e Rao, 2009). Isso parece devido à inibição combinada do substrato com a oxidação do ferro no grupo heme formando uma oxiperoxidase. A

extensão da inibição causada pelo  $H_2O_2$  varia grandemente com diferentes substratos e com as condições experimentais (Duarte-Vázquez et al., 2000), o que pode justificar, nesse caso, a não ocorrência desse fenômeno.

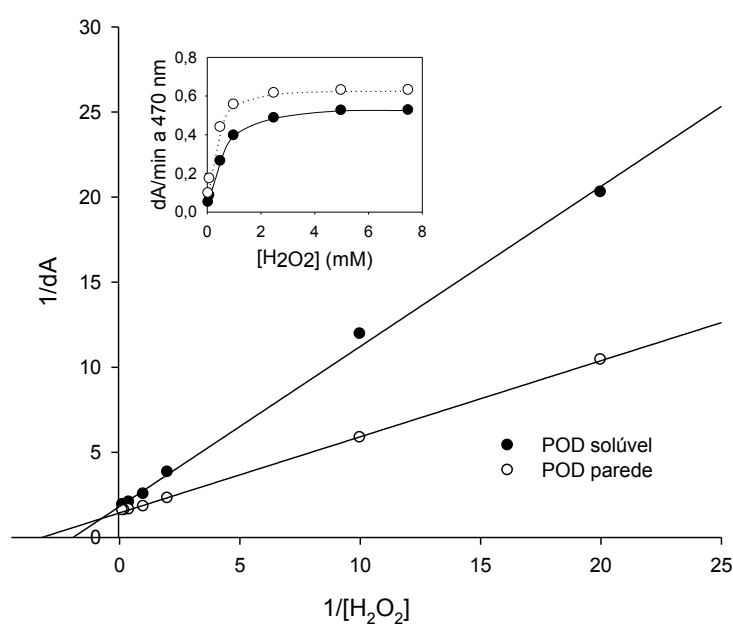
Na tabela 2, encontram-se os valores e  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_m$  e a razão  $V_{m\acute{a}x}/K_m$ , determinados pelo gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Figuras 5, 6 e 7). Variando-se as concentrações de guaiacol, e mantendo-se fixa a concentração do peróxido de hidrogênio, o  $V_{m\acute{a}x}$  estimado para o guaiacol foi de 1,05 e 0,89 e  $K_m$  de 31,53 e 15,84 mM, para a POD solúvel e de parede, respectivamente (Tabela 2).  $K_m$  semelhantes (32,2 e 22,9 mM) foram encontrados para duas isoenzimas de *Metroxylon sagu* (Onsa et al., 2008). A maioria das PODs caracterizadas apresenta valores de  $K_m$  inferiores para o guaiacol, como os encontrados em *Vanilla* 3,8 mM, (Márquez et al., 2008), diferentes espécies de salvia, 2,03, 3,19 e 4,62 mM (Doğan et al., 2007) e *Leucaena leucocephala*, 2,9 mM (Pandey e Dwivedi, 2011). No entanto,  $K_m$  de 98,61 mM já foi encontrado para beterraba (Rudrappa et al., 2007).



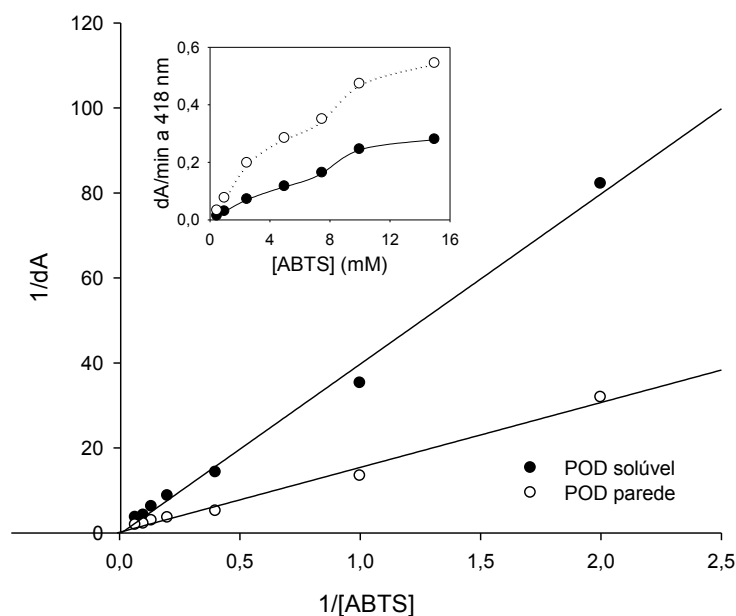
**Figura 5.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito da concentração do guaiacol na velocidade de reação da POD solúvel e ligada à parede de *Strelitzia reginae*. Inserido: Curva de Michaelis-Menten

As constantes cinéticas para o peróxido de hidrogênio foram estimadas sob concentrações constantes de guaiacol (25 mM). Os  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos foram de 0,55 e 0,69 e  $K_m$  de 0,52 e 0,31 mM para a POD solúvel e de parede, respectivamente (Tabela 2).

Em cenoura,  $K_m$  de 1,4 mM foi encontrado para este substrato (Soysal e Sö ylemez, 2005), já em beterraba, o  $K_m$  foi de 0,133 mM (Rudrappa et al., 2007). Para o ABTS, os valores de  $K_m$  encontrados para a POD solúvel e de parede (132,66 e 96,52 mM), foram muito superiores aos citados na literatura. Em diferentes espécies de salvia, Doğan et al. (2007), encontraram  $K_m$  de 0,027, 0,161 e 0,189 mM, enquanto em folhas de *Elaeis guineensis* Jacq. o  $K_m$  foi de 1 mM (Deepa e Arumughan, 2002), em beterraba, 5,05 mM (Rudrappa et al., 2007) e em algas vermelhas, 13 mM (Fortea et al., 2011). Segundo Doğan et al. (2007), os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  para a atividade da POD variam com o tipo de substrato e tampão utilizado.



**Figura 6.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio na velocidade de reação da POD solúvel e ligada à parede de *Strelitzia reginae*. Inseto: Curva de Michaelis-Menten



**Figura 7.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito da concentração de ABTS na velocidade de reação da POD solúvel e ligada a parede de *Strelitzia reginae*. Inserido: Curva de Michaelis-Menten

Em todos os substratos testados, o  $K_m$  encontrado para a POD ligada à parede foi menor do que os estimados para a POD solúvel, sugerindo maior afinidade dessa isoenzima para os diferentes substratos. Entre o guaiacol e ABTS, o guaiacol mostrou-se o melhor substrato (Tabela 2). A razão  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  é chamada poder catalítico, e é um bom parâmetro para encontrar o mais eficiente substrato. Quanto maior a afinidade, menor o  $K_m$  e maior a razão  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  (Doğan et al., 2007).

**Tabela 2.**  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  de diferentes substratos para a peroxidase solúvel e ligada à parede de *Strelitzia reginae*

Substrato	$V_{\text{máx}}$ (UA)	$K_m$ (mM)	$V_{\text{máx}}/K_m$
<i>POD solúvel</i>			
Guaiacol <sup>a</sup>	1,0513	31,53	0,033
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	0,5501	0,5173	1,063
ABTS <sup>c</sup>	3,3134	132,66	0,025
<i>POD parede</i>			
Guaiacol	0,8953	15,8378	0,056
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,6932	0,31	0,5173
ABTS	6,3211	96,52	0,065

<sup>a</sup> Determinado com 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>b</sup> Determinado com 25 mM de guaiacol

<sup>c</sup> Determinado com 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.6 Determinação da cinética de inibição

A azida sódica apresentou um modo de inibição misto para a POD solúvel e incompetitivo para a POD ligada à parede, com o  $K_i$  de 0,19 mM para as duas isoenzimas (Tabela 3 e Figura 8). Segundo Nelson e Cox (2002), o inibidor misto é caracterizado por se ligar a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, podendo-se ligar tanto a enzima quanto ao complexo enzima-substrato, enquanto o inibidor incompetitivo se liga somente ao complexo enzima-substrato. Estes dois tipos de inibição afetam tanto os valores de  $V_{\text{máx}}$  quanto os de  $K_m$ , sendo que na inibição mista os dois parâmetros são reduzidos. A azida sódica foi considerada como tendo um mecanismo de inibição não competitivo sobre a peroxidase de beterraba (Rudrappa et al., 2007), *Vigna mungo* (Ajila e Rao, 2009) e *Viscum angulatum* (Das et al., 2011) e competitivo em *Solanum melongena* (Vernwal et al., 2006). O  $K_i$  da azida sódica encontrado em POD de ave-do-paraíso (0,19 mM) foi menor do que os encontrados em outras espécies como *Hevea brasiliensis* (2,7 mM) (Wititsuwannakul et al., 1997), *Vigna mungo* (2,08 mM) (Ajila e Rao, 2009) e *Viscum angulatum* (1,24 Mm) (Das et al., 2011).

O  $\beta$ -mercaptoetanol, um tipo de inibidor tiol, apresentou-se como um inibidor não competitivo na POD solúvel e incompetitivo na POD ligada à parede (Tabela 3, Figura 9). Sariri et al. (2006) encontrou inibição não competitiva mista para o  $\beta$ -

mercaptoetanol em peroxidase de rabanete. Segundo esses autores, o que caracteriza a inibição não competitiva mista é a redução do  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , o que para Nelson e Cox (2002), são características de inibição incompetitiva. As constantes de inibição na POD solúvel e de parede foram de 0,06 e 0,10 mM, respectivamente, enquanto em horseradish, o  $K_i$  foi de  $83,7 \mu\text{M} \times 10^{-2}$ . Segundo Sariri et al. (2006), a presença do grupo tiol neste inibidor é um importante fator para a sua característica de inibição não competitiva e tem sido sugerido que a presença do grupo OH no  $\beta$ -mercaptoetanol aumenta a sua potência de inibição, podendo este se ligar ao sítio ativo da enzima com um tipo competitivo de cinética.

O mecanismo de inibição encontrado para L-cisteína sobre a POD solúvel e ligada à parede de hastes de ave-do-paraíso foi o misto, com  $K_i$  de 0,12 e 0,17 mM respectivamente (Tabela 3 e Figura 10). A L-cisteína, exibiu inibição incompetitiva em *Metroxylon sagu*, com um  $K_i$  de 0,03 mM (Onsa et al., 2004), enquanto o mecanismo de inibição em rabanete é não competitiva mista (Sariri et al., 2006).

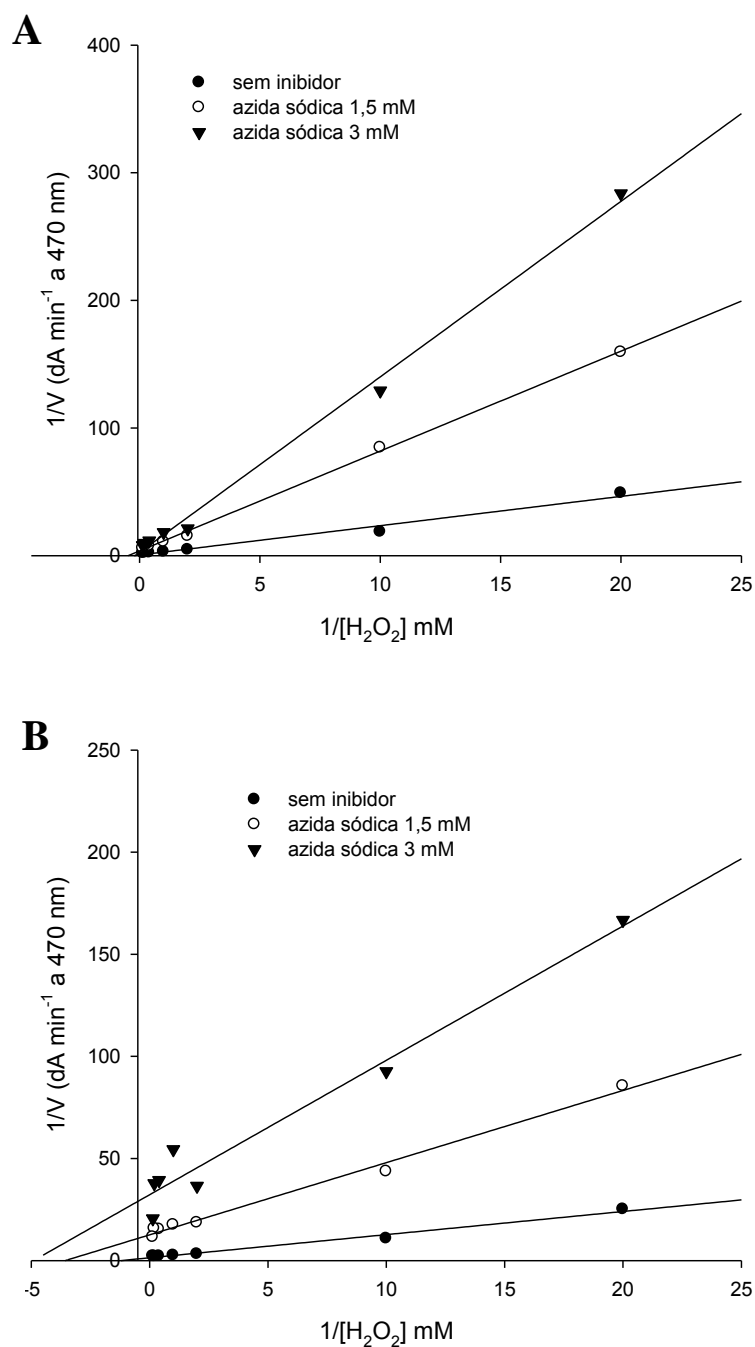
O metabissulfito de sódio apresentou-se como um inibidor competitivo nas duas isoenzimas da peroxidase de ave-do-paraíso, com  $K_i$  de 0,18 e 0,13 mM para a POD solúvel e ligada à parede respectivamente (Tabela 3 e Figura 11). Um inibidor competitivo é uma substância que se combina com a enzima livre de forma a impedir a ligação do substrato, ou seja, o inibidor e o substrato são mutuamente exclusivos, competindo pelo mesmo sítio (Segel, 1979). A competição entre o inibidor e o substrato pela enzima pode se tornar favorável ao substrato, pela adição de mais substrato, sendo que em altas concentrações de substrato, a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar a enzima é mínima, e por isso o que caracteriza esse tipo de inibição é o aumento de  $K_m$  e ausência de efeito no  $V_{m\acute{a}x}$  (Nelson e Cox, 2002). Em *Metroxylon sagu*, Onsa et al. (2004), determinaram que o metabissulfito é um inibidor não competitivo, e apresenta alto poder de inibição com um  $K_i$  de 0,024 mM. Tem-se sugerido que o metabissulfito está envolvido na redução do peróxido de hidrogênio, e assim a atividade da POD é bloqueada e o substrato doador é mantido na sua forma reduzida (Vamos-Vigyazo, 1981).

**Tabela 3.** Constantes cinéticas, modo de inibição e constante de inibição ( $K_i$ ) de diferentes inibidores sobre a POD solúvel e de parede de *Strelitzia reginae*

Inibidor	Concentração (mM)	$V_{\max}^a$	$K_m^a$ (mM)	Tipo de inibição <sup>a</sup>	$K_i^b$ (mM)
<i>POD solúvel</i>					
<b>Azida sódica</b>	0	1,81	4,14	mista	0,19
	1,5	0,27	2,12		
	3,0	0,39	5,37		
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	0	1,35	3,00	Não competitiva	0,06
	0,05	0,82	3,84		
	0,1	0,44	2,78		
<b>L-cisteína</b>	0	1,35	3,00	mista	0,12
	0,125	0,92	4,08		
	0,25	0,37	2,52		
<b>Metabissulfito de sódio</b>	0	0,51	0,67	competitiva	0,18
	0,125	0,52	1,14		
	0,25	0,62	1,92		
<i>POD parede</i>					
<b>Azida sódica</b>	0	0,73	0,82	incompetitiva	0,19
	1,5	0,08	0,28		
	3,0	0,03	0,20		
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	0	1,12	1,29	incompetitiva	0,10
	0,05	0,51	1,04		
	0,1	0,25	0,58		
<b>L-cisteína</b>	0	1,12	1,29	mista	0,17
	0,125	2,04	4,26		
	0,25	4,45	12,99		
<b>Metabissulfito de sódio</b>	0	0,64	0,32	competitiva	0,13
	0,125	0,62	0,42		
	0,25	0,72	0,92		

<sup>a</sup> Determinados a partir do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk de  $1/V$  versus  $1/[H_2O_2]$ .

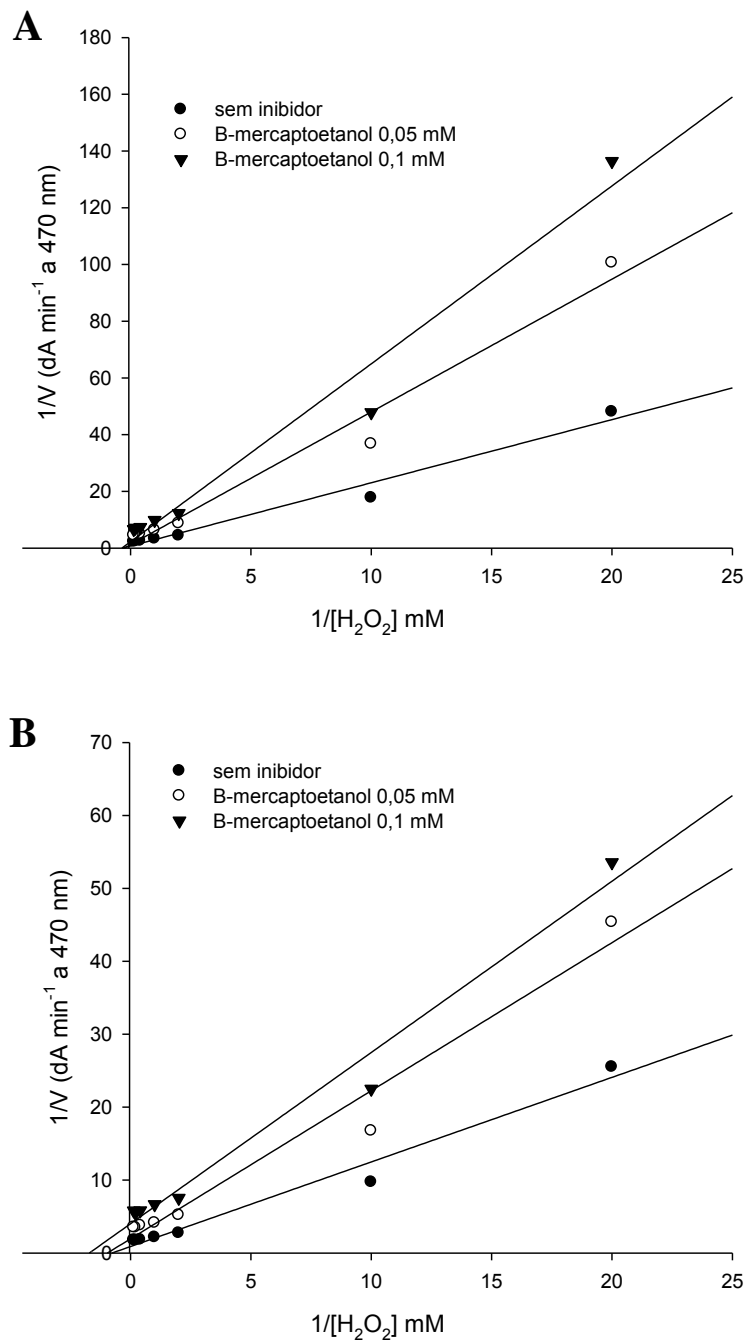
<sup>b</sup> Determinado a partir da inclinação do gráfico do duplo recíproco contra a concentração do inibidor.



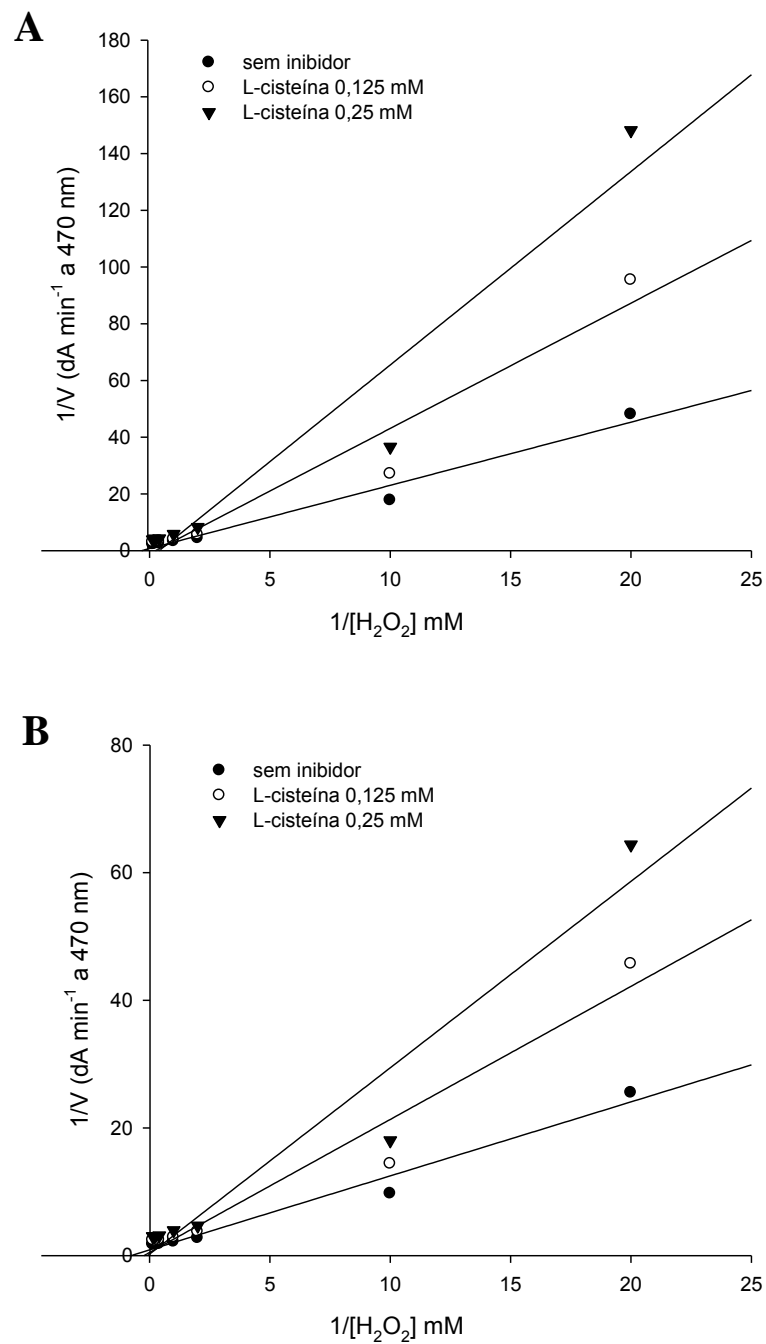
**Figura 8.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em presença de azida sódica sobre a atividade da peroxidase solúvel (A) e de parede (B) de *Strelitzia reginae*

Com base nos resultados encontrados, o inibidor mais potente para a peroxidase solúvel foi o  $\beta$ -mercaptoetanol, seguido pela L-cisteína, metabissulfito de sódio e azida sódica. Com a POD ligada à parede o  $\beta$ -mercaptoetanol também foi o

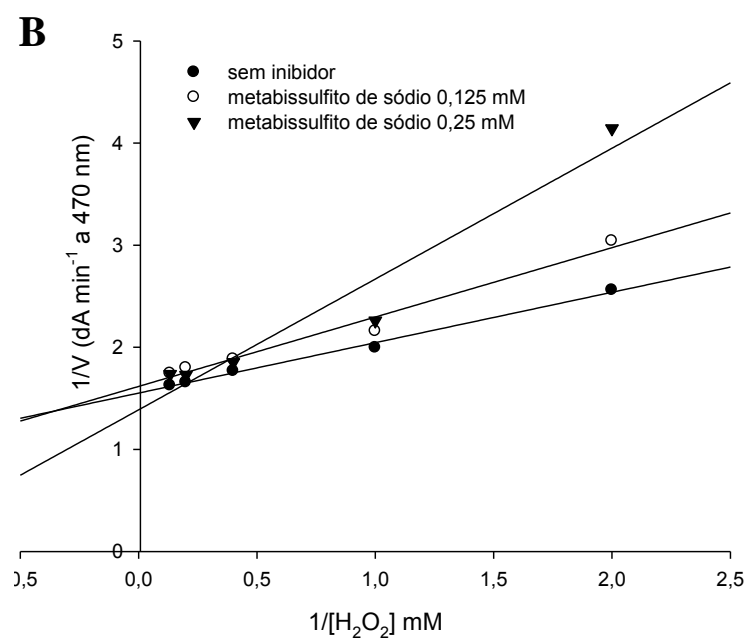
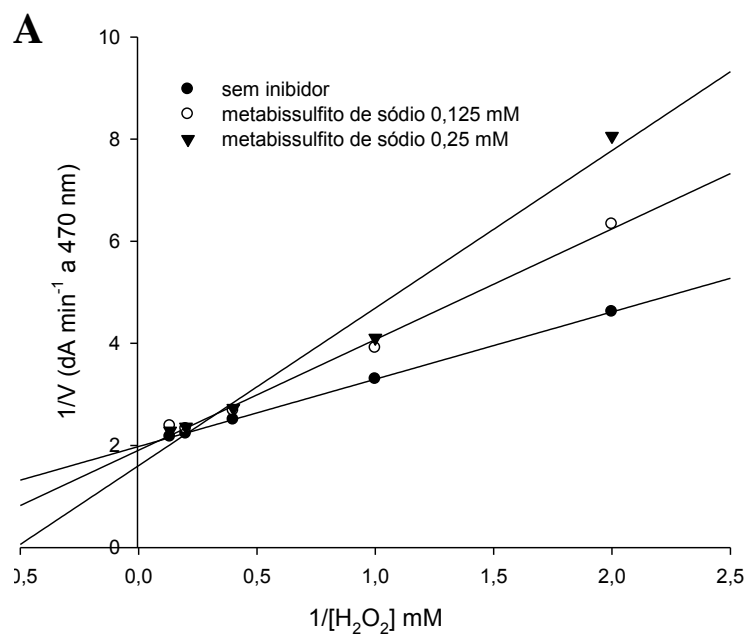
mais potente, seguido pelo metabissulfito de sódio, L-cisteína e azida sódica (Tabela 3).



**Figura 9.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol sobre a atividade da peroxidase solúvel (A) e de parede (B) de *Strelitzia reginae*



**Figura 10.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em presença de L-cisteína sobre a atividade da peroxidase solúvel (A) e de parede (B) de *Strelitzia reginae*



**Figura 11.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em presença de metabissulfito de sódio sobre a atividade da peroxidase solúvel (A) e de parede (B) de *Strelitzia reginae*

#### 4. CONCLUSÕES

A POD solúvel e de parede apresentam atividade total semelhante em extratos brutos de base de hastes de ave-do-paraíso. Após purificação, a massa molecular estimado das isoenzimas foi semelhante e, possivelmente, essas apresentam-se compostas por mais de uma subunidade em sua estrutura nativa. O guaiacol foi o melhor substrato testado, e a POD ligada a parede apresenta maior afinidade com os diferentes substratos. O melhor inibidor enzimático testado foi o  $\beta$ -mercaptoetanol e os mecanismos de inibição variam com os diferentes inibidores e isoenzimas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajila, C. M.; Rao, U. J. S. P. 2009. Purification and characterization of Black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 60, 36-44.

Al-Senaidy, A. M.; Ismael, M. A. 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**. 18, 293-298.

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

Burgess, R. R. Protein Purification. Eds. Nothwang, H. G.; Pfeiffer, S. E. **Proteomics of the nervous system**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008, p. 1-18.

Cardinali, A.; Tursi, N.; Ligorio, A.; Giuffrida, M. G.; Napolitano, L.; Caliandro, R.; Sergio, L.; Di Venere, D.; Lattanzio, V.; Sonnante, G. 2011. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**. 49, 395-403.

Das, M. K.; Sharma, R. S.; Mishra, V. 2011. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 71, 63-70.

Deepa, S. S.; Arumughan, C. 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**. 61, 503-511.

Doğan, S.; Turan, P.; Doğan, M.; Arslan, O.; Alkan, M. 2007. Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. **Journal of Food Engineering**. 79, 375-382.

Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 1574-1579.

Fortea, M. I.; López-Miranda, S.; Serrano-Martínez, A.; Hernnández-Sánchez, P.; Zafrilla, M. P.; Martínez-Cachá, A.; Núñez-Delicado, E. 2011. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. **Food Chemistry**. 127, 1091-1096.

Hamid, M.; Rehman. 2009. Review: Potential applications of peroxidase. **Food Chemistry**. 115, 1177-1186.

Hensley, D.; Deputy, J.; Yogi, J.; Leonhardt, K. 1998. **Ornamental and Flowers – Bird-of-Paradise**. College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR).

Jaroenkit, T.; Paull, R. E. 2003. Postharvest handling of *Heliconia*, red ginger and bird-of-paradise. **HortTechnology**. 13, 259-266.

Karsten, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*)**. 117p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Kumar, R.; Singh, K. A.; Singh, V. K.; Jagannadham, M. V. 2011. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. **Process Biochemistry**. 49, 721-729.

Lagrimini, L. M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiology**. 96, 577-583.

Márquez, O.; Waliszewski, K. N.; Oliart, R. M.; Pardio, V. T. 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **Food Science and Technology**. 41, 1372-1379.

Mohamed, S. A.; Abulnaja, K. O.; Ads, A. S.; Khan, J. A.; Kumosani, T. A. 2011. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. **Food Chemistry**. 128, 725-730.

Monerri, C.; Guardiolla, J. L. 2001. Peroxidase activity and isoenzyme profile in buds and leaves in relation to flowering in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*). **Scientia Horticulturae**. 90, 43-56.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Trad. Simões, A. A.; Lodi, W. R. N. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

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

Onsa, G. H.; Saari, N. Selamat, J.; Bakar, J. 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from *Metroxylon sagu*. **Food Chemistry**. 85, 365-376.

Pandey, V. P.; Dwivedi, U. N. 2011. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 68, 168-173.

Passardi, F.; Penel, C.; Dunand, C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidase modify the cell wall. **TRENDS in Plant Science**. 9, 534-540.

Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. 2005 Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**. 24, 255-265.

Qacif, N.; Baaziz, M.; Bendiab, K. 2007. Biochemical investigations on peroxidase contents of male and female inflorescences of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Scientia Horticulturae**. 114, 298-301.

Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and catalases in food. In: Robinson, D. S & Eskin, N. A. M. (eds.) **Oxidative enzyme in food**. London & New York: Elsevier Applied Science, 1-37.

Rudrappa, T.; Lakshmanan, V.; Kaunain, R.; Singara, N. M.; Neelwarne, B. 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**. 105, 1312-1320.

Sariri, R.; Jafarian, V.; Sajedi, R. H.; Khajeh, K. 2006. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. **Journal of Molecular Liquids**. 128, 175-177.

Sariri, R.; Sajedi, R. H.; Jafarian, V. 2006. Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. **Journal of Molecular Liquids**. 123, 20-23.

Segel, I. H. 1979. **Bioquímica, teorías e problemas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 527 p.

Soysal, C.; Sö ylemez, Z. 2005. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **Journal of Food Engineering**. 68, 349-356.

Suzuki, T.; Honda, Y.; Mukasa, Y.; Kim, S. 2006. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry**, 67, 219-224.

Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 15, 49-127.

Van Huystee, R. B.; Sesto, P. A.; O'Donnell, J. P. 1992. Number and size of oligosaccharides linked to peanut peroxidase. **Plant Physiology and Biochemistry**. 30, 147-152.

Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**. 65, 249-259.

Vernwal, S. K.; Yadav, R. .; Yadav, K. D. 2006. Purification of a peroxidase from *Solanum melongena* fruit juice. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. 43, 239-246.

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. 2002. Enzimas. In: Basso, L. A. (ed.) **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, p. 279 – 349.

Wititsuwannakul, R.; Wititsuwannakul, D.; Sattaysevana, B.; Pasitkul, P. 1997. Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark: purification and properties. **Phytochemistry**. 44, 237-241.

Wood, T. 1995. Ornamental zingiberacea. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1, 12-13.

## **CAPÍTULO 2 - EFEITO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS, DA ACIDEZ E DO CORTE PERIÓDICO DA BASE DA HASTE NA VIDA DE VASO DE FLORES DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*)**

### **Resumo**

A ave-do-paraíso é uma importante espécie de flor tropical utilizada atualmente como flor de corte. No entanto, já nas primeiras horas após a colheita, ao serem mantidas em água, as hastes desenvolvem um balanço hídrico negativo, resultado da obstrução dos vasos xilemáticos, causado por atividade de enzimas oxidativas e crescimento bacteriano. Técnicas como a utilização de soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos, acidificação do meio e o corte periódico da base podem reverter ou retardar este problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dessas técnicas sobre diferentes parâmetros ao longo da vida de vaso de ave-do-paraíso. Os inibidores testados foram metabissulfito de sódio e azida sódica, combinados com pH 6,0 e 2,5, sendo a água destilada utilizada como controle. As hastes foram divididas em 2 grupos, sendo um que não sofreu o corte da base, e outro que sofreu cortes periódicos. Para hastes que não tiveram o corte da base ao longo da vida de vaso, os melhores resultados foram encontrados com o tratamento de pulsing contendo azida sódica pH 6,0, que proporcionou maiores valores de massa fresca relativa, e retardou o desenvolvimento do balanço hídrico negativo. Os diferentes tratamentos não tiveram efeito sobre a massa fresca relativa de hastes que sofreram o corte periódico da base. A azida sódica combinada com pH ácido causou toxidez, e foi o pior tratamento para a perda de massa fresca e longevidade, apesar de ter reduzido a atividade da POD. A utilização do metabissulfito de sódio como constituinte da solução de pulsing diminuiu a atividade da polifenoloxidase (PPO) e, conseqüentemente, o escurecimento da base das hastes tratadas com essa substância também foi reduzido. Apesar desses resultados, a utilização dessas três diferentes técnicas não foi eficiente em prolongar a longevidade das flores de ave-do-paraíso.

### **1. INTRODUÇÃO**

A ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*) pertencente à família Strelitziaceae, é uma planta herbácea rizomatosa, entouceirada, acaule, apresentando folhas firmes e coriáceas (Lorenzi e Souza, 2001). As flores se abrem sucessivamente de uma

bráctea de cor verde-avermelhada, possuindo três sépalas grandes de cor laranja e duas pétalas azuis modificadas em forma de seta, que abrigam os órgãos sexuais (Castro, 1995). Dentre as espécies de flores tropicais, esta destaca-se pela beleza, curiosa forma, e comprimento da haste (Luz et al., 2005).

As flores em geral são classificadas como produtos altamente perecíveis, pela natureza efêmera dos diferentes tecidos que as formam, pela alta atividade respiratória e pelo reduzido conteúdo de carboidratos de reserva (Nowak e Rudnicki, 1990). Após a colheita, ocorrem nas flores alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais que levam ao processo de desorganização e desagregação dos tecidos e órgãos, os quais promovem a senescência, sendo o balanço hídrico considerado um fator determinante no comportamento e na longevidade dos órgãos da planta (Finger et al., 2003).

As flores de corte, quando mantidas em água, desenvolvem um balanço hídrico negativo, onde as taxas de transpiração se tornam superiores as de absorção. Isso ocorre devido ao aumento da resistência hidráulica ao longo do xilema, conseqüência de uma obstrução vascular (van Meeteren, 1992). As principais causas da obstrução dos vasos xilemáticos são: (I) crescimento bacteriano na água de vaso ou base da haste; (II) bloqueio fisiológico resultante da atividade das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), estimuladas pelo dano (van Doorn e Valier, 2002) ou pela deposição de gomas, mucilagens, taninos e resinas sobre a região cortada (van Doorn 1997); e (III) embolismo, em que após o corte da haste o ar flui para dentro dos vasos condutores abertos (van Doorn, 1999).

Uma vez que o vaso está bloqueado, a absorção de água é limitada devido à alta resistência hidráulica. Porém, o processo de transpiração continua, o que leva ao desequilíbrio hídrico, sendo que o murchamento precoce ocorre como resultado da perda prematura do turgor das células (van Meeteren et al., 2001). Em trabalhos anteriores realizados com ave-do-paráíso, constatou-se que a perda da condutividade hidráulica nessa espécie está relacionada ao aumento na atividade da peroxidase induzida pelo corte na base da haste floral (Karsten, 2009) e pelo crescimento bacteriano (Marques, 2008).

Existem alguns tratamentos que podem ser aplicados para melhorar as relações hídricas da haste após o corte, reduzindo ou inibindo a ocorrência do bloqueio xilemático, como a utilização de inibidores enzimáticos em solução de pulsing ou vaso. Esses inibidores agem sobre as enzimas POD e PPO induzidas pelo dano e que

participam da síntese de lignina e suberina, que levam a obstrução dos vasos condutores (van Doorn, 1997). A acidificação da solução de pulsing ou vaso também pode ser utilizada, uma vez que essas enzimas oxidativas tem sua atividade inibida ou reduzida em pHs baixos (Vamos-Vigyázo, 1981), além do crescimento de microrganismos também ser reduzido nestas condições (van Doorn e Perik, 1990). Outra prática comum é o corte periódico da base da haste, removendo-se a porção obstruída e restabelecendo o fluxo de água ao longo dos vasos xilemáticos (van Doorn, 1997).

Em trabalhos anteriores realizados em ave-do-paraíso, resultados positivos foram encontrados, quando o corte da base da haste foi realizado a cada dois dias. A longevidade das flores passou de 7,6 dias nas plantas controle para 11,3 dias nas que sofreram os cortes, assim como essas também apresentaram maior número de floretes abertos, e mantiveram maior teor relativo de água nas sépalas e brácteas ao longo da vida de vaso (Campanha et al., 1997). Hastes de ave-do-paraíso submetidas a tratamentos de pulsing com diferentes inibidores enzimáticos, também apresentaram melhores resultados na longevidade e abertura de floretes, se comparadas ao controle. O desenvolvimento do balanço hídrico negativo foi retardado, destacando-se os inibidores azida sódica e o metabissulfito de sódio (Karsten, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da utilização de soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos e/ou pH ácido sobre a longevidade e atividade de enzimas oxidativas de hastes de ave-do-paraíso, que sofreram cortes periódicos de sua base.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Hastes florais de ave-do-paraíso, contendo um florete aberto (ponto de colheita comercial), foram colhidas no campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (20°45' S, 42°51' W e altitude de 651 m), no período de fevereiro a abril de 2010. Em seguida, essas hastes foram levadas ao laboratório, onde passaram por processo de seleção e padronização (hastes com 80 cm). Após esses procedimentos, as hastes foram distribuídas aleatoriamente entre os diferentes

tratamentos. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 20\%$  e intensidade luminosa de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 2.2 Tratamentos pós-colheita

Os tratamentos aplicados foram: T1 - água pH 6,0 (controle); T2 - água pH 2,5; T3 - azida sódica 2 mM pH 6,0; T4 - azida sódica 2 mM pH 2,5; T5 - metabissulfito de sódio 6 mM pH 6,0 e T6 - metabissulfito de sódio 6 mM pH 2,5. Esses tratamentos foram aplicados na forma de pulsing por 24 horas e após esse período, as hastes foram transferidas para frascos contendo 400 mL de água destilada, sendo que, a cada 48 horas, foi realizada a troca da água dos frascos, para evitar o desenvolvimento de microrganismos e o conseqüente bloqueio xilemático. Esses tratamentos foram aplicados nos dois grupos distintos de hastes: grupo I - hastes que não sofreram o corte da base até o final do experimento e grupo II - hastes que sofreram cortes da base a cada 48 h.

## 2.3 Massa fresca relativa

As hastes florais, após a padronização foram pesadas para a obtenção da massa fresca inicial, peso esse considerado como 100%. Subseqüentes pesagens foram realizadas diariamente, até o término da longevidade das flores, sendo os resultados expressos em porcentagem de massa fresca relativa (MFR) (He et al., 2006):

$$\text{MFR} = (\text{MF}_t / \text{MF}_{t=0}) \times 100$$

Em que:

$\text{MF}_t$  – massa fresca (g) da haste no  $t =$  dia 0, 1, 2, 3, etc

$\text{MF}_{t=0}$  – massa fresca (g) da mesma haste no  $t =$  dia 0

## 2.4 Número de floretes abertos

O número de floretes abertos nas inflorescências de ave-do-paraíso foi avaliado diariamente, sendo os resultados expressos como o número médio de floretes abertos. As avaliações ocorreram até o término da longevidade do último florete aberto.

## 2.5 Longevidade

A longevidade das flores de ave-do-paraíso nos diferentes tratamentos foi determinada como o período (número de dias) compreendido entre o início do experimento e o murchamento do último florete aberto.

## 2.6 Extração e ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase

O material vegetal utilizado na determinação da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase foi coletado em diferentes tempos dependendo do grupo de hastes. Para as hastes que não sofreram corte, a coleta foi realizada nos dias: 0, 1, 2, 5 e 8, enquanto as hastes que sofreram cortes periodicamente, o material foi coletado nos dias: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10. Para isso, secções de 2 cm da base de cada haste foram retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C, para posterior análise.

Para a extração de cada enzima, 10 mL de tampão de extração foram adicionados a 2 g de material vegetal, que foram então, triturados em homogeneizador até a obtenção de massa homogênea, e posteriormente centrifugada 17.000 g, durante 30 min, a 4°C. O sobrenadante obtido da centrifugação foi utilizado para determinação da atividade enzimática e quantificação das proteínas (Bradford, 1976). A composição do tampão de extração utilizado para a peroxidase foi à proposta por Neves, (2003): Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5, acrescido de bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M. Para a polifenoloxidase, o tampão de extração utilizado foi o tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5, acrescido de 1% de polivinilpirrolidona (PVP40) (Concellón *et al.*, 2004 com modificações).

Para a determinação da atividade enzimática da peroxidase, foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 5,0) e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%) completando-se os 3 mL da reação. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, a 25°C, e expressa em UA/min/mg de proteína (Neves, 2003).

Na reação da polifenoloxidase uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0), e 0,5 mL de 4-metil-catecol 10 mM, completando-se o volume final de reação de 1,5 mL. A atividade foi analisada em espectrofotômetro, por meio de variação na

absorbância em comprimento de onda de 420 nm, a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (Kavrayan e Aydemir, 2001).

## **2.7 Análise visual**

Diariamente foram observadas as bases das hastes de todos os tratamentos, avaliando-se o surgimento de injúrias causadas pelas alterações do pH ou pela utilização dos inibidores. O escurecimento da base da haste como resultado da atividade de enzimas oxidativas também foi acompanhado.

## **2.8 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados (DBC), com quatro blocos, sendo cada unidade experimental constituída por duas hastes. Os dados obtidos para longevidade e atividade da POD e PPO foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR. Nas demais análises, utilizou-se a estatística descritiva.

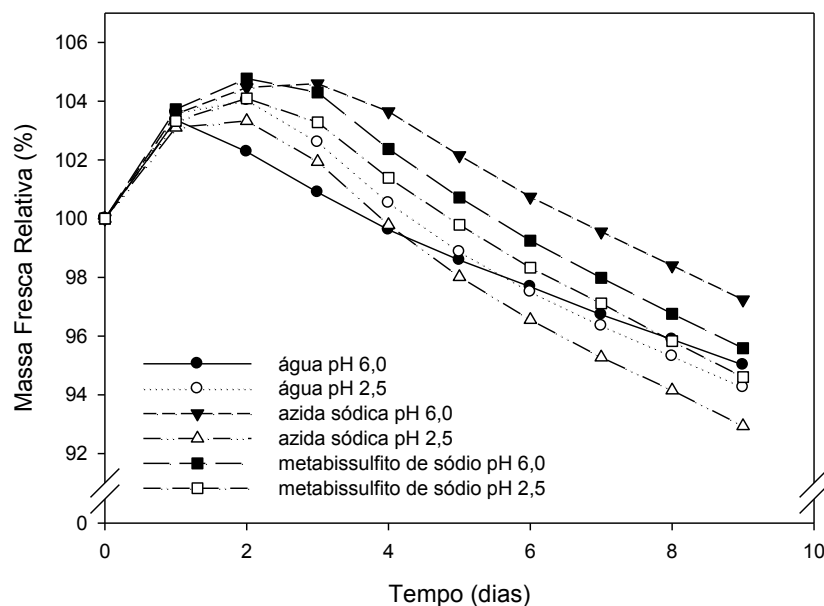
# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Massa fresca relativa**

Maiores valores de massa fresca relativa para hastes que não sofreram os cortes periódicos da base foram encontradas com a aplicação de azida sódica 2 mM pH 6,0 (tratamento 3), sendo que essas hastes tiveram aumentos nos valores de massa fresca relativa até o terceiro dia, e nas hastes dos demais tratamentos, isso ocorreu somente até o primeiro ou segundo dia (Figura 1). Esse tratamento também foi o mais eficiente em retardar o desenvolvimento do balanço hídrico negativo, sendo esse observado somente no sétimo dia de vaso (Figura 1), enquanto nas hastes mantidas em água pH 6,0 e azida sódica pH 2,5, este processo foi observado já no quarto dia (Figura 1). No final da vida de vaso (9º dia), menores valores de massa fresca relativa (92,9%) foram observados em hastes mantidas em pulsing com azida sódica pH 2,5, enquanto os maiores valores (97,2%) foram encontrados em hastes acondicionadas com azida sódica pH 6,0 (Figura 1).

No caso do inibidor enzimático azida sódica, a combinação dessa substância com o pH ácido (pH 2,5), mostrou efeitos negativos na massa fresca relativa. Para a

água e o metabissulfito de sódio, a partir do sexto dia, menores valores de massa fresca relativa também foram encontrados com a acidificação da solução, mais em proporções muito menores se comparadas aos da azida sódica (Figura 1). A acidificação da água ou solução de pulsing e/ou de vaso é uma prática comum em estudos de pós-colheita de flores. Normalmente, ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, são usados na acidificação das soluções (pH de 3,5 a 5,0), o que reduz o crescimento de microrganismos causadores do bloqueio xilemático (Gast, 1997). Segundo Durkin (1980), a acidificação da água também aumenta o fluxo de água em hastes de rosa, uma vez que essa proporciona aumento no movimento lateral de água através das paredes dos vasos, possivelmente por quebra das ligações de pectato de cálcio. A falta de resultados encontrados com a utilização combinada de inibidores e pH ácidos em ave-do-paraíso pode ser devido ao fato de o pH utilizado ser muito ácido, se comparado aos comumente utilizados, o que pode ter causado toxidez e injúria nos tecidos das haste.



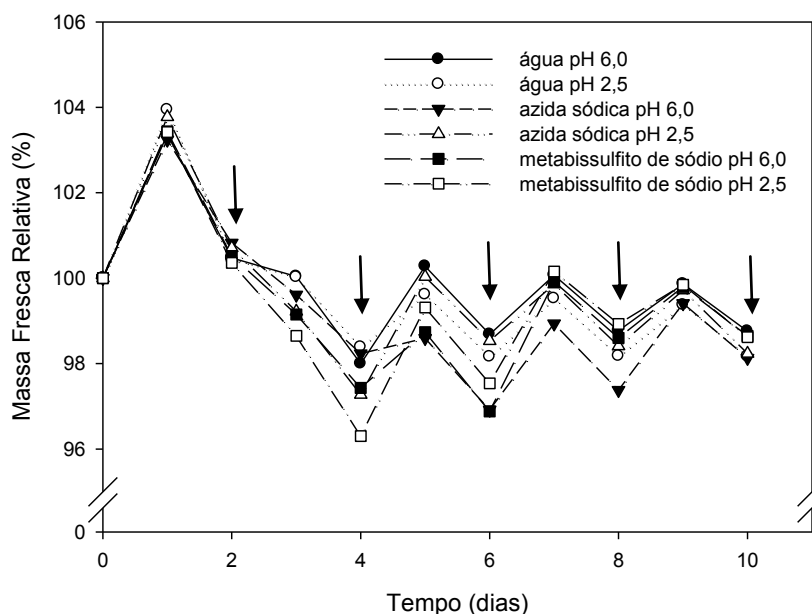
**Figura 1.** Massa fresca relativa ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing, sem o corte da base

Em hastes de *Acacia holosericea* e *Chamelaucium uncinatum*, a utilização de inibidores enzimáticos em solução de pulsing melhorou as relações hídricas das hastes, sugerindo o envolvimento das enzimas oxidativas nas respostas ao dano

nestas espécies (Çelikel et al., 2011). Resultados semelhantes também foram encontrados em *Grevillea* (He et al., 2006).

Nas hastes que sofreram os cortes da base, um novo corte foi feito nos dias 1, 2, 4, 6 e 8. Neste caso, como os tratamentos foram aplicados somente por 24 horas, e logo após a saída do pulsing as hastes sofreram novo corte, induzindo novo dano, e em seguida estas foram mantidas somente em água, os diferentes tratamentos deixaram de ter efeito sobre a massa fresca relativa, sendo observado o mesmo comportamento nas hastes de todos os tratamentos (Figura 2). Nessa circunstância em que um novo corte da base da haste é realizado, talvez a utilização de soluções de manutenção contendo inibidores enzimáticos, em vez da solução de pulsing, traria resultados mais satisfatórios no que diz respeito ao parâmetro variação de massa fresca relativa.

A partir do corte realizado no quarto dia, observa-se um comportamento em zig-zag nos valores de massa fresca relativa, com aumentos nesses valores no dia que segue o corte, seguida por uma queda no dia em que o novo corte era realizado (Figura 2). A técnica dos cortes periódicos da base da haste parece eficiente por si só em reverter parcialmente o bloqueio xilemático causado nas hastes, restabelecendo, em parte, a absorção de água pela haste após o corte.

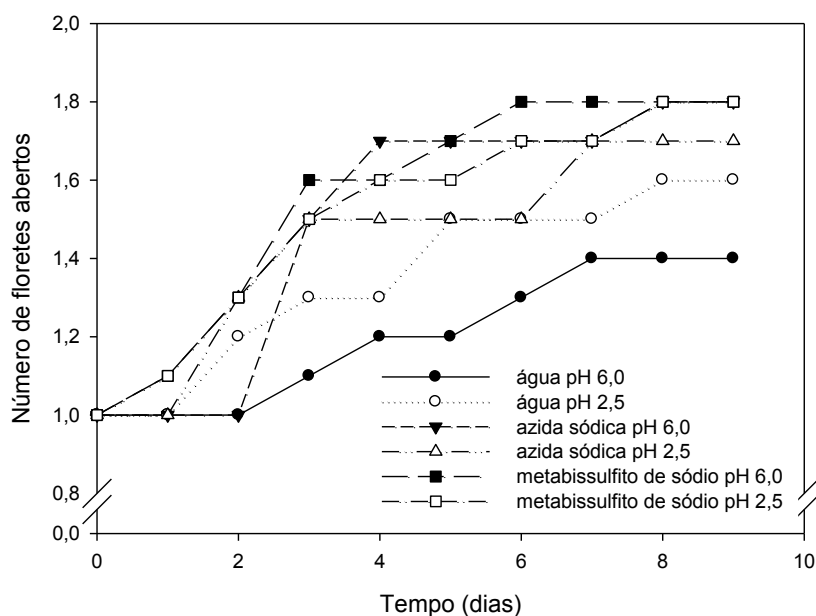


**Figura 2.** Massa fresca relativa ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing, com o corte periódico da base. ↓ Indica o novo corte da base

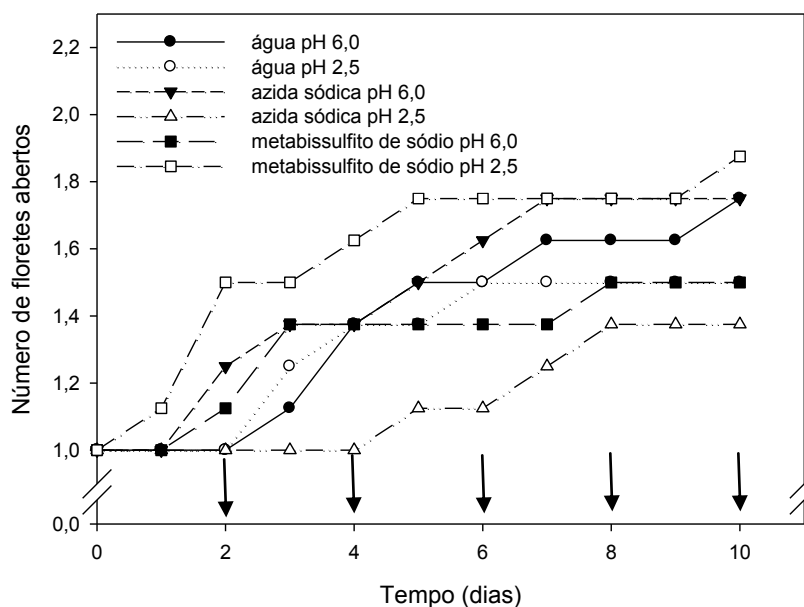
### 3.2 Número de floretes abertos

Nas hastes que não sofreram cortes da base, todos os tratamentos proporcionaram maior abertura de floretes se comparado ao controle (água pH 6,0). Melhores resultados (1,8 floretes abertos) foram encontrados com a azida sódica pH 6,0 e metabissulfito de sódio pH 6,0 ou 2,5, enquanto as hastes controle tiveram abertura de 1,4 floretes (Figura 3). A abertura de floretes em hastes que sofreram o corte periódico da base foi maior em hastes mantidas em solução de pulsing contendo metabissulfito de sódio pH 2,5 (1,9 floretes), enquanto resultados inferiores foram encontrados com a azida sódica pH 2,5 (1,4 floretes) (Figura 4).

Marques (2008) não encontrou diferenças significativas no número de floretes abertos em *Strelitzia*, após a aplicação de diferentes soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos. Campanha et al. (1997), observaram para esta mesma espécie, que o corte da base, a cada 2 dias para hastes mantidas em água, aumentou o número médio de floretes abertos de 1,6 (hastes controle sem corte) para 2,7.



**Figura 3.** Número de floretes abertos ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing, sem o corte da base



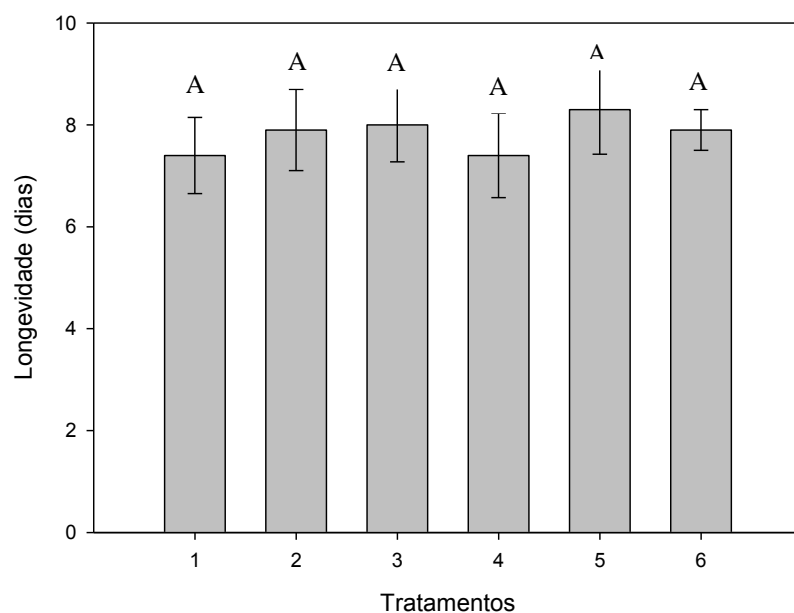
**Figura 4.** Número de floretes abertos ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing, com o corte periódico da base.

↓ Indica o novo corte da base

### 3.3 Longevidade

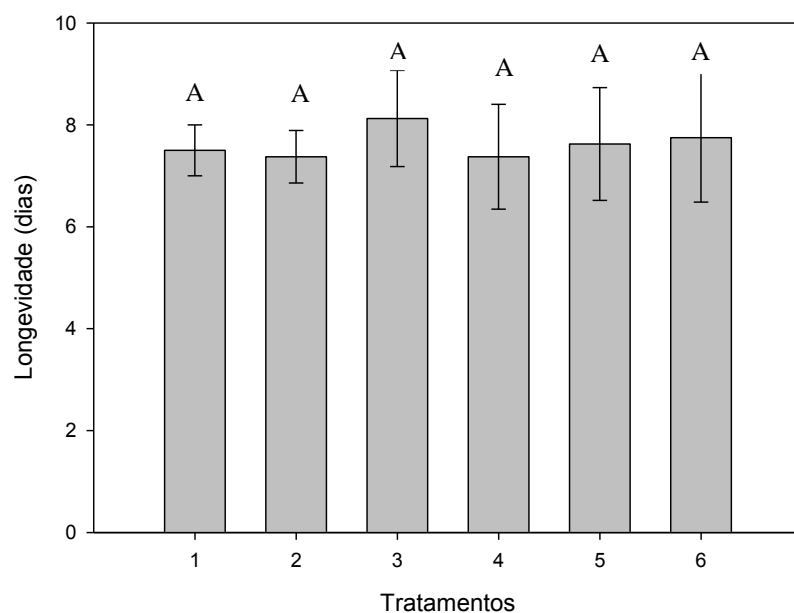
A longevidade em hastes que não sofreram cortes da base foi semelhante entre os tratamentos, não diferindo estatisticamente. A longevidade variou de 8,3 dias, nas hastes mantidas em pulsing com metabissulfito de sódio pH 6,0 a 7,4 dias em hastes mantidas com água pH 6,0 e azida sódica pH 2,5 (Figura 5).

Em flores de bouvardia e crisântemo, a utilização de inibidores da peroxidase e da catecol oxidase retardou o tempo até o total murchamento das flores, proporcionando maior longevidade (Vaslier e van Doorn, 2003; van Doorn e Vaslier, 2002).



**Figura 5.** Longevidade de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing ((1) água destilada pH 6,0; (2) água destilada pH 2,5; (3) azida sódica 2 mM pH 6,0; (4) azida sódica 2 mM pH 2,5; (5) metabissulfito de sódio 6 mM pH 6,0 e (6) metabissulfito de sódio 6 mM pH 2,5) sem cortes da base. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade

Hastes que sofreram o corte da base periodicamente também não apresentaram diferenças da longevidade entre os diferentes tratamentos. Maior longevidade foi observada com a utilização de azida sódica pH 6,0 (8,1 dias), e as menores com água e azida sódica pH 2,5 (7,4 dias) (Figura 6). Neste trabalho, a técnica do corte da base da haste não aumentou a longevidade, se comparado com hastes que não sofreram corte. Em outro trabalho realizado com ave-do-paraíso, Campanha et al. (1997) encontraram aumento de 49% na longevidade das flores ao realizar o corte de 2 cm da base da haste a cada 2 dias.



**Figura 6.** Longevidade de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de pulsing ((1) água destilada pH 6,0; (2) água destilada pH 2,5; (3) azida sódica 2 mM pH 6,0; (4) azida sódica 2 mM pH 2,5; (5) metabissulfito de sódio 6 mM pH 6,0 e (6) metabissulfito de sódio 6 mM pH 2,5) com cortes da base. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade

A vida pós-colheita de ave-do-paraíso varia entre 6 e 16 dias. Essa diferença reflete, em parte, as condições de crescimento, maturidade na colheita, diferentes condições de armazenamento, transporte e diferentes critérios utilizados para avaliar a longevidade das inflorescências (Bayogan et al., 2008). Segundo esses autores, o comprimento da haste também tem influência na longevidade de strelítzia, sendo que hastes mais compridas (70 cm) proporcionam maior vida de vaso que hastes mais curtas (35 cm). Como a absorção de água é limitada após a colheita, hastes mais longas apresentam maior reserva de água (Jaroenkit e Paull, 2003).

### 3.4 Atividade da POD e PPO

A atividade da POD em hastes de ave-do-paraíso que não sofreram o corte da base durante a sua vida de vaso é mostrada na tabela 1. Pode-se observar que as menores atividades dessa enzima foram encontradas em base de hastes que foram mantidas em solução de pulsing contendo azida sódica pH 2,5 (tratamento 4) (Tabela

1). Apesar de essas hastes terem exibido as menores atividades da peroxidase, o que se esperaria como um bom resultado, para os demais parâmetros avaliados, este foi o pior tratamento, possivelmente devido à toxidez causada pela combinação desta substância com o pH ácido. No primeiro e segundo dias de vaso, a atividade da POD nas hastes mantidas em água pH 6,0 e 2,5 e metabissulfito de sódio pH 6,0 e 2,5 foram semelhantes, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1). O metabissulfito de sódio 10 mM, aplicado na forma de pulsing por 5 h, reduziu a atividade da POD em 65% se comparado à água destilada, no segundo dia de colheita, para esta mesma espécie (Marques, 2008). No oitavo dia de vaso, observa-se menor atividade em todos os tratamentos com pH 2,5 se comparados aos seus correspondentes sob pH 6,0 (Tabela 1). Nesse mesmo dia, as hastes do tratamento 1 (água pH 6,0), foi o que apresentou maior atividade da POD, diferindo estatisticamente de todos os demais tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade da enzima peroxidase (UA/min/mg de proteína), em hastes de *Strelitzia reginae* não submetidas ao corte da base, ao longo da vida de vaso

Tratamento	Tempo (dias)				
	0	1	2	5	8
Água destilada pH 6,0	50,19 A*	29,2 A	28,6 B	64,6 B	130,3 A
Água destilada pH 2,5	50,19 A	36,2 A	25,5 B	90,0 A	80,3 B
Azida sódica pH 6,0	50,19 A	12,2 B	53,3 A	48,3 B	24,6 C
Azida sódica pH 2,5	50,19 A	3,2 B	15,7 B	6,8 D	14,3 C
Metabissulfito de sódio pH 6,0	50,19 A	26,4 A	36,2 B	30,1 C	102,2 B
Metabissulfito de sódio pH 2,5	50,19 A	39,9 A	33,9 B	50,8 B	46,1 C

\* Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

Em trabalhos realizados com inibição da peroxidase em ave-do-paráiso *in vitro*, observou-se inibição total e irreversível da atividade dessa enzima, após a incubação do extrato enzimático em pH 2,5 (Karsten, 2009). A capacidade catalítica das enzimas para exercer suas funções em solução aquosa, depende das condições de temperatura e pH. Alterações de pH causam mudanças de ionização do sítio ativo da enzima, o que causa variações na sua atividade (Nelson e Cox, 2006).

Nas hastes em que o corte da base da haste foi realizado periodicamente, o maior efeito dos tratamentos sobre a atividade da POD foi observado no primeiro dia, logo após a saída das hastes da solução de pulsing, sendo a menor atividade encontrada nas hastes tratadas com azida sódica pH 2,5 (tratamento 4) (4,5 UA/min/mg de proteína) e a maior para as hastes mantidas em água pH 2,5 (tratamento 2) (40,9 UA/min/mg de proteína) (Tabela 2). No quarto, sexto e oitavo dias de vaso, maiores atividades da POD foram encontradas nas hastes dos tratamentos 2, 5 e 6 (Tabela 2), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

**Tabela 2.** Atividade da enzima peroxidase (UA/min/mg de proteína), em hastes de *Strelitzia reginae* submetidas ao corte da base, ao longo da vida de vaso

Tratamento	Tempo (dias)						
	0	1	2	4	6	8	10
Água destilada pH 6,0	33,2 A*	16,2 C	18,7 A	39,2 B	44,9 B	57,1 B	35,9 B
Água destilada pH 2,5	33,2 A	40,9 A	28,8 A	64,4 A	74,7 A	96,4 A	93,4 A
Azida sódica pH 6,0	33,2 A	12,5 C	25,4 A	33,7 B	49,3 B	60,1 B	54,9 B
Azida sódica pH 2,5	33,2 A	4,5 D	22,1 A	38,7 B	60,7 B	68,8 B	67,9 B
Met. de sódio pH 6,0	33,2 A	17,7 C	23,2 A	62,9 A	84,1 A	88,3 A	60,6 B
Met. de sódio pH 2,5	33,2 A	32,4 B	33,8 A	63,5 A	94,3 A	91,1 A	50,4 B

\* Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

A técnica do corte da base da haste é utilizada para remover a parte da haste que teve seus vasos xilemáticos obstruídos. No entanto, como um novo corte é feito, tem-se novamente o aumento da atividade de enzimas oxidativas em resposta a esse dano, o que, indiretamente, leva a uma nova obstrução vascular.

A atividade da PPO ao longo da vida de vaso de hastes que foram submetidas aos diferentes tratamentos de pulsing, sem e com os cortes da base, pode ser encontrado nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Em ambos os grupos de hastes, as atividades mais baixas dessa enzima foram encontradas com a utilização do metabissulfito de sódio (Tabela 3 e 4). No primeiro dia de vaso, hastes que não sofreram o corte da base e que foram mantidas na solução de pulsing com metabissulfito de sódio pH 6,0 (tratamento 5), exibiram redução de 78% da atividade da PPO com relação ao controle (tratamento 1), enquanto nas hastes mantidas sob

metabissulfito pH 2,5 (tratamento 6) a redução foi de 75% (Tabela 3). Marques (2008) encontrou redução de 78% da atividade da PPO com a utilização de metabissulfito de sódio 10 mM aplicado na forma de pulsing por 5 h, no segundo dia de vaso de ave-do-paraíso.

**Tabela 3.** Atividade da enzima polifenoloxidase (UA/min/mg de proteína), em hastes de *Strelitzia reginae* não submetidas ao corte da base, ao longo da vida de vaso

Tratamento	Tempo (dias)				
	0	1	2	5	8
Água destilada pH 6,0	11,9 A*	12,2 B	6,0 B	8,5 C	7,2 B
Água destilada pH 2,5	11,9 A	13,4 B	10,0 A	19,4 A	14,4 A
Azida sódica pH 6,0	11,9 A	18,9 A	11,2 A	11,4 B	3,8 C
Azida sódica pH 2,5	11,9 A	6,7 C	9,9 A	2,7 D	3,5 C
Metabissulfito de sódio pH 6,0	11,9 A	2,7 C	4,2 B	2,3 D	2,1 C
Metabissulfito de sódio pH 2,5	11,9 A	3,0 C	4,9 B	1,6 D	1,6 C

\* Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

O metabissulfito é um potente inibidor da PPO, podendo agir diretamente na estrutura da PPO, reagindo com as pontes dissulfídicas, levando à ocorrência de mudanças na estrutura terciária da enzima e, conseqüente, inativação (Golan-Goldhirisch e Whitaker, 1984). A utilização desse agente redutor em inibições *in vitro* da PPO, tem levado a completa inativação desta enzima em uva (Rapeanu *et al.*, 2006) e ave-do-paraíso (Karsten, 2009).

Nas hastes que não sofreram cortes da base, maiores atividades da PPO no quinto e oitavo dias foram encontradas com a utilização de água pH 2,5, que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos nesses períodos. Hastes que sofreram o corte periódico da base não apresentaram diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos com oito e dez dias de vaso (Tabela 4). Neste experimento, a azida sódica não foi eficiente em inibir a atividade da PPO, uma vez que hastes tratadas com esta substância (tratamento 3 e 4), apresentaram atividades enzimáticas semelhantes ou superiores as hastes controle (Tabela 4).

As PPOs são enzimas que catalizam reações de óxido-redução dos compostos fenólicos, transformando-os em suas quinonas correspondentes (Mayer, 2006). Após sua descompartimentalização e formação das quinonas, as reações subseqüentes ocorrem espontaneamente. As quinonas podem polimerizar-se e formar pigmentos insolúveis escuros denominados melanina, ou reagir não enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, também formando melanina. Para controlar a atividade enzimática da PPO, e evitar que reações indesejáveis ocorram, é necessário bloquear a participação da enzima, do substrato ou do oxigênio (Araújo, 2004).

**Tabela 4.** Atividade da enzima polifenoloxidase (UA/min/mg de proteína), em hastes de *Strelitzia reginae* submetidas ao corte da base, ao longo da vida de vaso

Tratamento	Tempo (dias)						
	0	1	2	4	6	8	10
Água destilada pH 6,0	9,0 A*	14,1 A	3,6 B	5,2 B	5,2 B	4,0 A	5,0 A
Água destilada pH 2,5	9,0 A	17,0 A	6,2 A	5,6 B	7,6 A	6,2 A	5,4 A
Azida sódica pH 6,0	9,0 A	16,5 A	5,5 A	6,5 A	6,3 A	5,4 A	6,2 A
Azida sódica pH 2,5	9,0 A	8,8 B	6,4 A	7,5 A	6,6 A	5,3 A	5,4 A
Met. de sódio pH 6,0	9,0 A	4,6 C	4,3 B	4,5 B	3,9 B	4,7 A	4,6 A
Met. de sódio pH 2,5	9,0 A	1,4 C	4,0 B	4,2 B	4,2 B	6,1 A	5,5 A

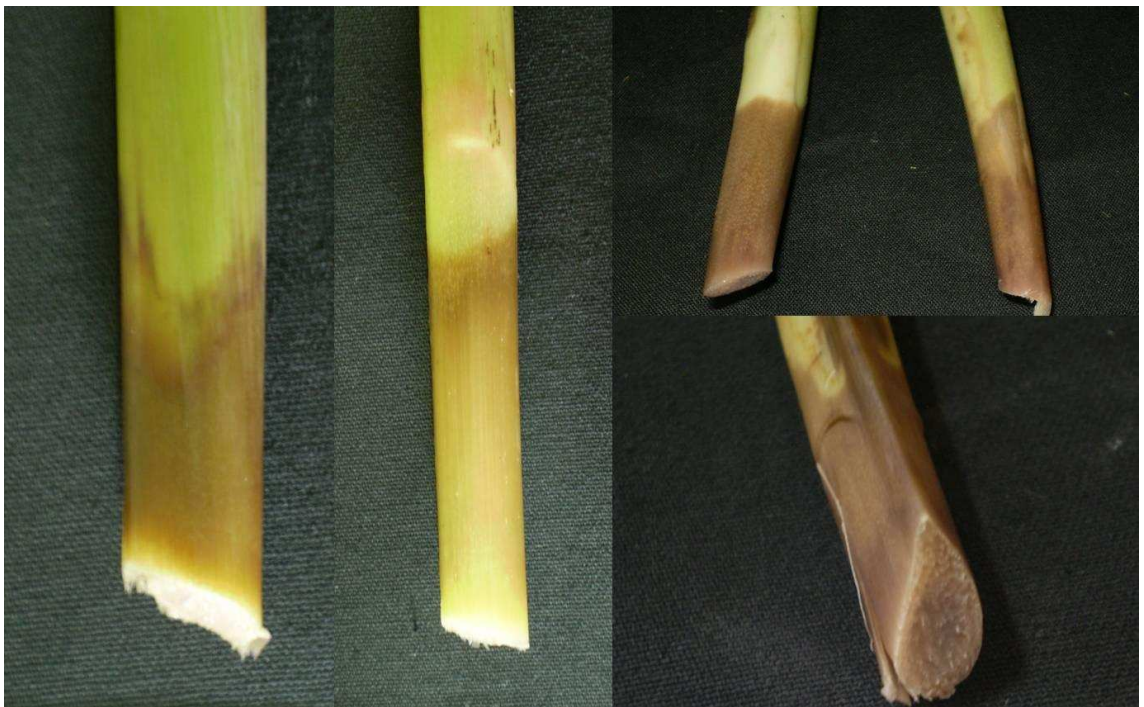
\* Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

### 3.5 Análise visual

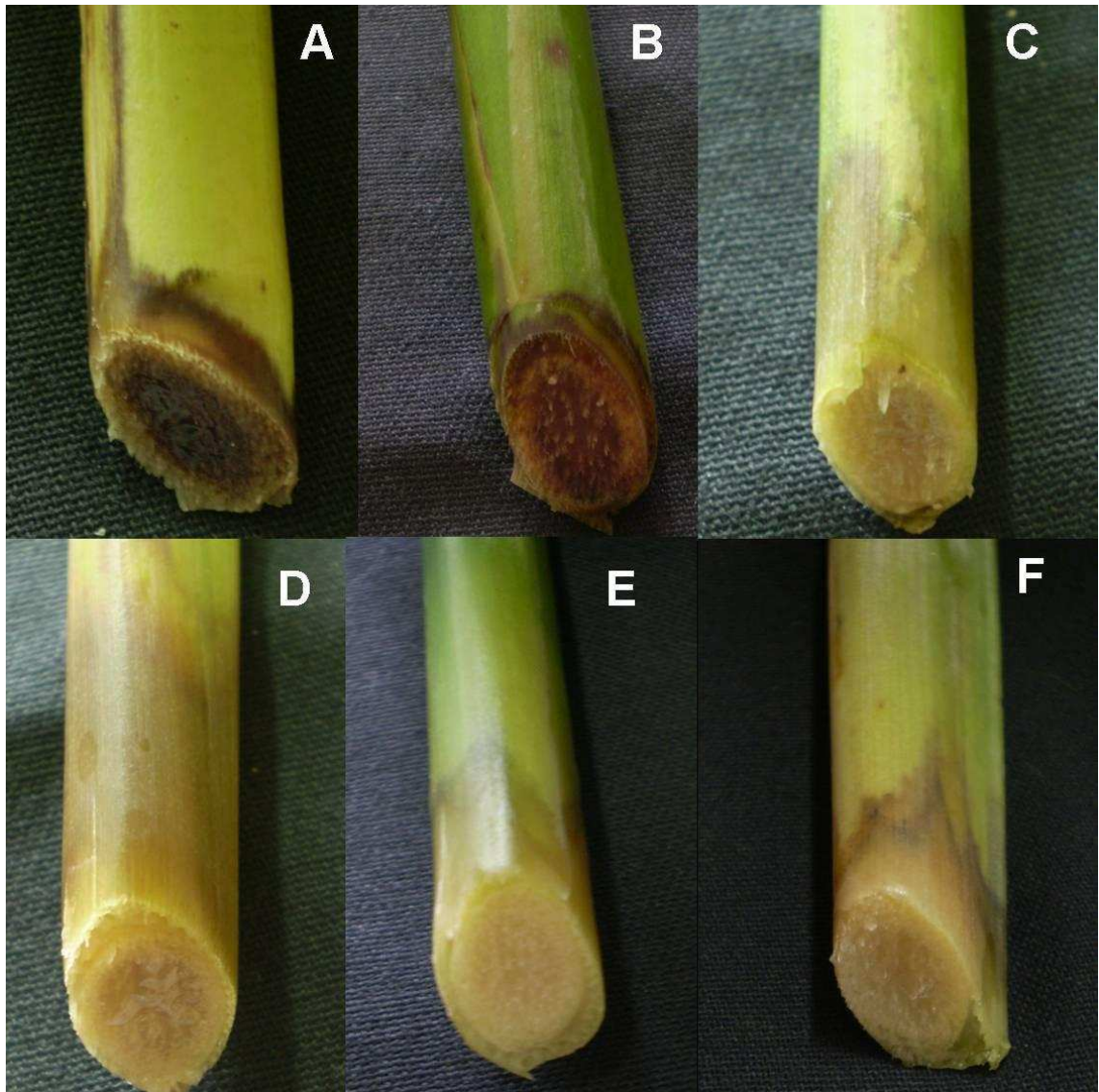
A combinação da azida sódica com o pH ácido causou toxidez, sendo observado já nas primeiras horas um escurecimento da porção da haste em contato com a solução. Na figura 7, pode-se observar a aparência das hastes submetidas a este tratamento no momento da retirada da solução de pulsing, ou seja, 24 h após a aplicação do tratamento. A parte das hastes que esteve em contato com a solução apresentou escurecimento intenso, amolecimento, aparência de podre e odores fortes.

Com oito dias de vaso, hastes que não sofreram o corte da base, apresentaram-se conforme a figura 8. Hastes que foram mantidas em solução de pulsing contendo somente água, tanto sob pH 6,0 como sob pH 2,5 tiveram escurecimento mais intenso que os demais tratamentos, ou seja, somente a

acidificação da água não foi suficiente em reduzir o escurecimento da base da haste. As hastes que mostraram o menor escurecimento foram as submetidas ao tratamento 5 (metabissulfito de sódio pH 6,0). Marques (2008) não observou a formação de pigmentos escuros no tecido cortado até o segundo dia após a colheita com a utilização de metabissulfito de sódio 10 mM em solução de pulsing, por 5 h, em hastes de ave-do-paráiso. O metabissulfito de sódio é muito utilizado para prevenir o escurecimento enzimático, pois além de ter efeito sobre a estrutura da enzima PPO, o composto age sobre as quinonas, formando complexos quinonas-sulfito, prevenindo a sua polimerização e a formação dos pigmentos escuros (Embs e Markakis, 1965).



**Figura 7.** Aspecto das hastes de *Strelitzia reginae* após 24 horas de aplicação da solução de pulsing azida sódica 2 mM pH 2,5 (tratamento 4)



**Figura 8.** Aspecto das bases das hastes de *Strelitzia reginae* 8 dias após a aplicação das soluções de pulsing: água destilada pH 6,0 (A), água destilada pH 2,5 (B), azida sódica 2 mM pH 6,0 (C), azida sódica 2 mM pH 2,5 (D), metabissulfito de sódio 6 mM pH 6,0 (E) e metabissulfito de sódio 6 mM pH 2,5 (F)

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar dos resultados positivos encontrados analisando-se alguns parâmetros, a utilização da solução de pulsing contendo inibidores enzimáticos e pH ácido, combinado ou não com o a realização de cortes da base da haste, não foi eficiente em prolongar a longevidade de flores de ave-do-paraíso.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, J. M. A. 2004. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3 ed. Viçosa: UFV. 478 p.

Bayogan, E. R.; Jaroenkit, T.; Paull, R. E. 2008. Postharvest life of bird-of-paradise inflorescences. **Postharvest Biology and Technology**. 48, 259-263.

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

Campanha, M. M.; Finger, F. L.; Cecon, P. R.; Barbosa, J. G. 1997. Water relations of cut bird-of-paradise (*Strelitzia reginae* Ait.) inflorescences. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 3, 27-31.

Castro, C. E. F. 1995. Inter-relações das famílias das zingiberales. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1, 2-11.

Çelikel, F. G.; Joyce, D. C.; Faragher, J. D. 2011. Inhibitors of oxidative enzymes affect water uptake and vase life of cut *Acacia holosericea* and *Chamelaucium uncinatum* stems. **Postharvest Biology and Technology**. 60, 149-157.

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

Durkin, D. J., 1980. Factors effecting hydration of cut flowers. **Acta Horticulturae**. 113, 109-117.

Embs, R. J.; Markakis, P. 1965. The mechanism of sulphite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. **Journal of Food Science**. 30, 753-758.

Finger, F. L.; Barbosa, J. G.; Grossi, J. A. S.; Moraes, P. J. 2003. Colheita, classificação e armazenamento de inflorescências. In: Barbosa, J. G. (ed.) **Crisântemos**. Viçosa: Aprenda Fácil, 123-140.

Gast, K. L. B. 1997. Commercial specialty cut flowers production – Postharvest handling of fresh cut flowers and plant material. **Cooperative Extension Service**. 12 p. Disponível em: <http://www.ksre.ksu.edu/library/hort2/mf2261.pdf>

Golan-Goldhirsh, A.; Whitaker, J. R. 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 32, 1003-1009.

He, S.; Joyce, D. C.; Irving, D. E.; Faragher, J. D. 2006. Stem end blockage in cut *Grevillea* ‘Crimson Yul-lo’ inflorescences. **Postharvest Biology and Technology**. 41, 78-84.

Jaroenkit, T.; Paull, R. E. 2003. Postharvest handling of *Heliconia*, red ginger and bird-of-paradise. **HortTechnology**. 13, 259-266.

Karsten, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*)**. 117p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Kavrayan, D.; Aydemir, T. 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**. 74, 146-154.

Lorenzi, H.; Souza, H. M. 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1088 p.

Luz, P. B.; Almeida, E. F. A.; Paiva, P. D. O.; Ribeiro, T. R. 2005. Cultivo de flores tropicais. **Informe Agropecuário**. 26, 62-72.

Marques, A. E. 2008. **Estudos sobre o bloqueio do xilema na pós-colheita das inflorescências de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Aiton)**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Mayer, A. M. 2006. Polyphenol oxidases in plants e fungi. Going places? A review. **Phytochemistry**. 67, 2318-2331.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2006. **Lehninger princípios de bioquímica**. Trad. Simões, A. A.; Lodi, W. R. N. 4 ed. São Paulo: SARVIER. 1202p.

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

Nowak, J.; Rudnicki, R. M. 1990. **Postharvest handling and storage of cut flowers, florist greens and potted plants**. Portland: Timber Press. 210 p.

Rapeanu, G.; van Loey, A.; Smout, C.; Hendrickx, M. 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chemistry**. 94, 253-261.

Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 15, 49-127.

van Doorn, W. G. 1997. Water relations of cut flowers. **Horticultural Reviews**. 18, 1-85.

van Doorn, W. G.; Perik, R. R. J. 1990. Hydroxyquinoline citrate and low pH prevent vascular blockage in stems of cut rose flowers by reducing the number of bacteria. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 115, 979-981.

van Doorn, W. G. 1999. Vascular occlusion in cut flowers. I. General principles and recent advances. **Acta Horticulturae**. 482, 59-63.

van Doorn, W. G.; Vaslier, N. 2002. Wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers: roles of peroxidase and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Technology**. 26, 275-284.

van Meeteren, U. 1992. Role of air embolism and low water temperature in water balance of cut chrysanthemum flowers. **Scientia Horticulturae**. 51, 275-284.

van Meeteren, U.; van Gelder, A.; van Ieperen, W.; Slootweg, C. 2001. Should we reconsider the use of deionised water as control vase solutions. **Acta Horticulturae**. 543, 257-264.

Vaslier, N.; van Doorn W. G. 2003. Xylem occlusion in bouvardia flowers: evidence for a role of peroxidases and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Technology**. 28, 231-237.

### **CAPÍTULO 3 - EFEITO DO USO DE SUBSTRATOS FENÓLICOS NA SOLUÇÃO DE VASO OU EM PULSING SOBRE A VIDA DE VASO DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*)**

#### **Resumo**

A ave-do-paraíso após a colheita sofre a ação de enzimas oxidativas que têm a atividade aumentada em resposta ao dano causado pelo corte na haste, resultando da oclusão xilemática. As principais enzimas envolvidas neste bloqueio são a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO), enzimas essas que utilizam substâncias fenólicas em suas reações. Assim, o objetivo do trabalho foi aplicar substratos fenólicos em pulsing ou na solução de vaso, e avaliar seus efeitos ao longo da vida de vaso. O experimento foi realizado em duas partes: (I) utilização de diferentes substâncias fenólicas (4-metilcatecol, catecol pirogalol, pirocatequina e guaiacol 10 mM) aplicadas como solução de vaso; e (II) utilização de diferentes concentrações de guaiacol (5, 25 e 50 mM) aplicados na forma de pulsing ou solução de vaso. Nos dois experimentos, a massa fresca relativa das hastes tratadas com as substâncias fenólicas mostrou-se superior as hastes controle, e o desenvolvimento do balanço hídrico negativo nestas hastes foi retardado. A abertura de floretes variou entre os tratamentos indo de 1,5 até 2,4 floretes. Não houve diferença na longevidade dos floretes nos dois experimentos. No experimento 1, o escurecimento mais intenso da base da haste foi observado com a utilização de catecol e pirocatequina, enquanto no experimento 2, o escurecimento variou com a concentração do guaiacol e com sua forma de aplicação. A atividade enzimática da POD e PPO foi maior nas hastes controle, sendo à atividade da POD superior a da PPO. Conclui-se que, apesar do uso desses tratamentos ter melhorado as relações hídricas das hastes, a longevidade não foi prolongada, porém o escurecimento intenso causado nas bases das hastes fez com que estas ficassem com aparência inadequada para seu uso decorativo, diminuindo o valor comercial.

#### **1. INTRODUÇÃO**

A ave-do-paraíso ou flor “crane” (*Strelitzia reginae*), é nativa da África do Sul, e muito comum em parques e jardins no sul da Califórnia, Florida e outras regiões temperadas quentes, além de muito utilizada em arranjos paisagísticos

(Hoffmann et al., 2011). Essa espécie se desenvolve lentamente pela divisão de seus caules subterrâneos, apresentando, quando madura, de 4 a 5 metros de altura. As folhas que surgem na base da touceira são grossas, duras, verde-acinzentadas, lisas e cerosas. As flores são suportadas por uma longa haste, sendo compostas por três sépalas laranjadas e duas pétalas azuis onde estão inseridos os órgãos sexuais (Hensley, et al., 1998). As características exóticas de suas coloridas flores, o comprimento longo das hastes e a alta valorização desta espécie favorece a sua utilização como flor de corte (Wood, 1995).

Por natureza, as flores são órgãos efêmeros e o fornecimento de substâncias orgânicas e inorgânicas é interrompido uma vez que a flor é colhida, alterando processos fisiológicos importantes (Finger e Barbosa, 2006). A aparência, qualidade, e a longevidade das flores de corte dependem das condições de cultivo, do período adequado de colheita, condições de transporte dos produtos e manejo pós-colheita, que são dependentes dos estresses impostos sobre eles como a diminuição da absorção de água, transpiração, condutividade hidráulica, massa fresca, teor de água das flores e potencial hídrico (Silva, 2003).

Plantas ornamentais para corte, especialmente flores, apresentam uma vida de vaso limitada. A longevidade dessas flores pode ser estendida por aplicação de tratamentos que reduzem a taxa de senescência e melhora as relações hídricas das hastes (Finger e Barbosa, 2006). Um eficiente procedimento é o tratamento de pulsing. O termo “pulsing” significa colocar flores recém colhidas, por um período relativamente curto (de poucos segundos até várias horas), em uma solução especialmente formulada para estender o seu armazenamento e sua vida de vaso (Reid, 2009). Entre as substâncias que compõem a solução de pulsing estão os açúcares, ácidos orgânicos, inibidores da ação e síntese de etileno e agentes antibacterianos (Finger e Barbosa, 2006). Outra opção é a solução de vaso ou conservantes, normalmente constituídas pelas mesmas substâncias da solução de pulsing, em menores concentrações (Armitage e Laushman, 2003).

Em muitas espécies de flores, o murchamento e a senescência das pétalas estão relacionados à deficiência hídrica causada principalmente pela continuada redução na capacidade de absorção de água (Finger e Barbosa, 2006). Em trabalhos anteriores realizados com ave-do-paráiso, foi constatada a perda da capacidade de absorção já nas primeiras horas após a colheita, resultado da obstrução dos vasos xilemáticos. Esse bloqueio vascular está relacionado à atividade de enzimas

oxidativas, principalmente a peroxidase (POD), que tem sua atividade aumentada em resposta ao dano causado pelo corte, e por crescimento bacteriano na água e na base da haste (Karsten, 2009; Marques, 2008). Nas espécies que apresentam essa forma de bloqueio fisiológico, uma alternativa que vem sendo trabalhada é a utilização de inibidores enzimáticos específicos para as enzimas oxidativas como constituintes das soluções de vaso ou pulsing. No entanto, na espécie em questão, a utilização de inibidores enzimáticos e a acidificação do meio não foram eficientes em prolongar a longevidade das flores (capítulo 2).

A POD está envolvida nos processos relacionados à cicatrização de danos, como a lignificação. Essa enzima catalisa a oxidação de uma variedade de substratos fenólicos, incluindo-se os monolignóis, que são os monômeros constituintes da molécula de lignina (Passardi et al., 2007). A polifenoloxidase (PPO) também está relacionada a processos de defesa e cicatrização de danos (Mayer, 1987), e catalisa a hidroxilação de monofenóis e a oxidação de difenóis (Aydemir, 2004). Ambas as enzimas utilizam em seus processos os fenóis presentes no meio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do fornecimento de substratos fenólicos na solução de vaso ou pulsing, nos diferentes parâmetros, ao longo da vida de vaso de flores de *Strelitzia reginae*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Hastes florais de ave-do-paraíso, contendo um florete aberto (ponto de colheita comercial), foram colhidas no campo de cultivo da Universidade Federal de Viçosa (20°45' S, 42°51' W e altitude de 651 m), no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2011. Em seguida, essas hastes foram levadas ao laboratório, onde passaram por processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento. Após estes procedimentos, as hastes foram distribuídas aleatoriamente entre os diferentes tratamentos. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 20\%$  e intensidade luminosa de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **2.2 Experimentos**

#### **2.2.1 Experimento 1**

Os tratamentos aplicados foram T1 - água destilada (controle); T2 - 4 metilcatecol (4-MC) 10 mM; T3 - catecol 10 mM; T4 - pirogalol 10 mM; T5 - pirocatequina 10 mM e T6 - guaiacol 10 mM. Estes tratamentos foram aplicados em solução de vaso, sendo a cada 48 h realizada a troca da solução dos frascos, para evitar o desenvolvimento de microrganismos e o conseqüente bloqueio xilemático. Após o preparo das soluções, foram feitas medições do seu pH, para verificar-se a possível influência desse fator no experimento.

### **2.2.2 Experimento 2**

Os tratamentos aplicados foram T1 - água destilada (controle); T2 - pulsing com guaiacol 5 mM; T3 - pulsing com guaiacol 25 mM; T4 - pulsing com guaiacol 50 mM; T5 - solução de vaso com guaiacol 5 mM; T6 - solução de vaso com guaiacol 25 mM e T7 - solução de vaso com guaiacol 50 mM. Para os tratamentos em pulsing, esses foram aplicados por 24 h e, após este período, as hastes foram lavadas e colocadas em frascos contendo 400 mL de água destilada. A cada 48 h foi realizada a troca da solução de vaso e da água, para evitar o desenvolvimento de microrganismos. Após o preparo das soluções, foram feitas medições do seu pH, para verificar a possível influência deste fator no experimento.

## **2.3 Análises**

Todas as análises, com exceção da atividade enzimática, foram realizadas a 0, 6, 12, 18 e 24 h de vaso. Após este período, as análises passaram a ser feitas a cada 24 h até o final da longevidade das flores.

### **2.3.1 Massa fresca relativa**

As hastes florais, após a padronização foram pesadas para a obtenção da massa fresca inicial, massa essa considerada como 100%. Subseqüentes pesagens foram realizadas até o término da longevidade das flores, sendo os resultados expressos em porcentagem de massa fresca relativa (MFR) (He et al., 2006):

$$\text{MFR} = (\text{MF}_t / \text{MF}_{t=0}) \times 100$$

Em que:

$\text{MF}_t$  - massa fresca (g) da haste no  $t =$  dia 0, 1, 2, 3, etc

$MF_{t=0}$  – massa fresca (g) da mesma haste do  $t = \text{dia } 0$

### **2.3.2 Número de floretes abertos**

O número de floretes abertos nas inflorescências foi avaliado diariamente, sendo os resultados expressos como o número médio de floretes abertos. As avaliações foram realizadas até o término da longevidade do último florete aberto.

### **2.3.3 Longevidade**

A longevidade das flores nos diferentes tratamentos foi determinada como o período (número de dias) compreendido entre o início do experimento e o murchamento do último florete aberto.

### **2.3.4 Coloração e análise visual**

Alterações na coloração da base da haste foram avaliadas utilizando-se o colorímetro (Colortec PCM Minolt). Valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , croma ( $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ) e ângulo hue ( $h^\circ = \text{artg } b^*/a^*$ ) foram registrados.

Diariamente, foi observada a base das hastes de todos os tratamentos, avaliando-se o surgimento de injúrias causadas pelos substratos fenólicos. O escurecimento da base da haste como resultado da atividade de enzimas oxidativas também foi acompanhado. No último dia de vaso, o escurecimento interno ao longo da haste também foi avaliado.

### **2.3.5 Extração e ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase**

O material vegetal utilizado para a determinação da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase foi coletado no último dia de vaso. Para isso, secções de 2 cm da base de cada haste foi retirado, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ , para posterior análise. Para extração da POD, 10 mL do tampão de extração (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, acrescido de bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M) foi adicionado a 2 g de material vegetal. Em seguida, esse foi triturado em politron até obtenção de uma massa homogênea, que foi filtrada em 2 camadas de gaze, e centrifugada a 17000 g, por 30 min, a  $4^\circ\text{C}$  (Neves, 2003). O processo de extração utilizado para a PPO foi semelhante ao da POD, sendo alterado somente o tampão de extração (tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 acrescido de 1% de polivilpirrolidona (PVP40))

(Concellón *et al.*, 2004 com modificações). O sobrenadante obtido da centrifugação para cada enzima, foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e quantificação de proteína (Bradford, 1976).

Para a determinação da atividade enzimática da peroxidase, foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 5,0) e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%) completando-se os 3 mL da reação. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorvância em comprimento de onda de 470 nm, a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (Neves, 2003).

Na reação da polifenoloxidase uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0), e 0,5 mL de 4-metil-catecol 10 mM, completando-se o volume final de reação de 1,5 mL. A atividade foi analisada em espectrofotômetro, por meio de variação na absorvância em comprimento de onda de 420 nm, a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (Kavrayan e Aydemir, 2001).

## **2.4 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), com seis blocos, sendo cada unidade experimental constituída por duas hastes. Os dados de longevidade, e atividade enzimática da POD e PPO foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR. Nas demais análises, utilizou-se a estatística descritiva.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

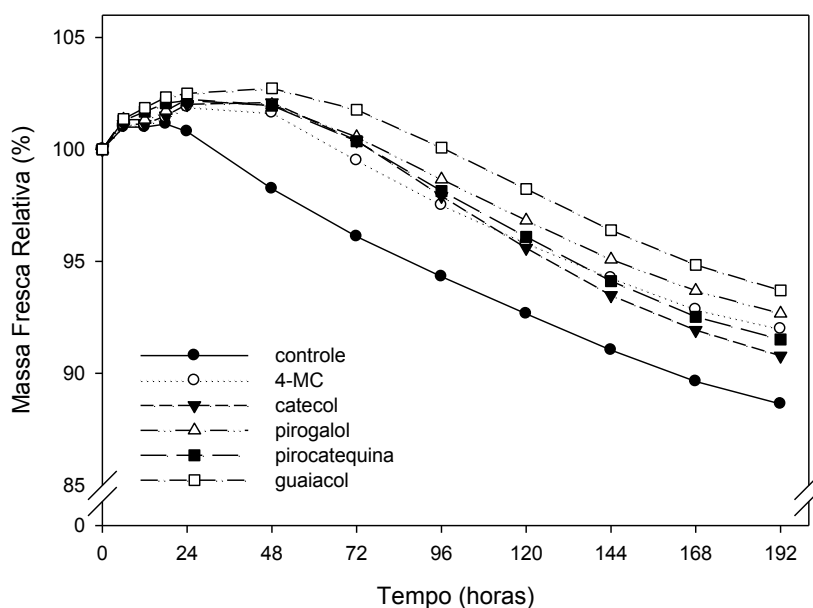
Em ambos os experimentos, a adição das substâncias fenólicas não alterou significativamente o pH da solução, que permaneceu na faixa de 6,5 a 6,8.

### **3.1 Massa fresca relativa**

As alterações da massa fresca das hastes no experimento 1, são apresentadas na Figura 1. Observou-se já nas primeiras horas de experimentos, que todos os tratamentos mostraram valores de massa fresca relativa superior ao do controle. Entre as substâncias fenólicas testadas destaca-se o guaiacol, que promoveu aumento

de massa fresca relativa até 48 h, atingindo o máximo de 102,7%, enquanto no controle esse aumento foi observado somente nas primeiras 18 h, alcançando 101,1% (Figura 1). O balanço hídrico negativo das hastes tratadas com guaiacol foi observado com 120 h de vaso, enquanto nas hastes tratadas com catecol, pirogalol e pirocatequina, isso ocorreu com 96 h, já para 4-MC e o controle o mesmo foi observado com 72 e 48 h respectivamente (Figura 1). Com 8 dias de vaso (192 h), a massa fresca relativa das hastes tratadas com guaiacol foi 5,7% superior as da hastes controle (Figura 1).

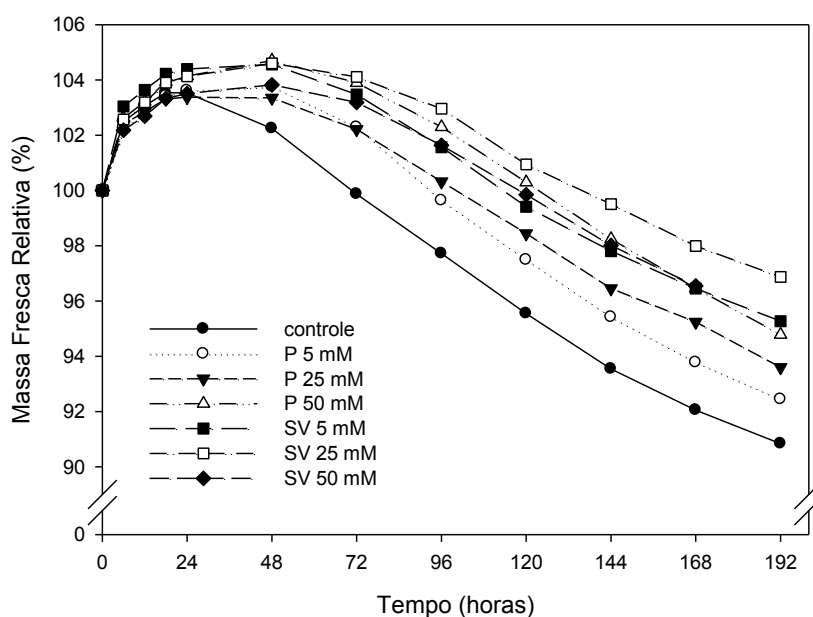
Marques (2008), ao aplicar catecol 5 mM como solução de pulsing, por 5 h em hastes de ave-do-paraíso, encontrou valores de massa fresca relativa máxima semelhantes aos do controle (em torno de 102%). Neste experimento, a utilização de catecol 10 mM como constituinte da solução de vaso, proporcionou valores máximos de massa fresca relativa semelhantes ao encontrado por Marques (2008) (102,1%), mas superior ao controle (101,1%) (Figura 1).



**Figura 1.** Massa fresca relativa ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a soluções de vaso contendo diferentes substratos fenólicos (10 mM)

No segundo experimento, as hastes foram submetidas à solução de pulsing ou vaso com diferentes concentrações de guaiacol. Os valores de massa fresca relativa encontrados para estas hastes estão na figura 2. Neste experimento, novamente todas

as hastes dos tratamentos tiveram massa fresca relativa superior às hastes controle (Figura 2). Comparando-se os tratamentos em que o guaiacol foi fornecido na forma de pulsing ou como constituinte da solução de vaso, maiores valores de massa fresca relativa foram encontrados sob tratamentos com solução de vaso. Para os tratamentos em pulsing, à medida que a concentração de guaiacol foi aumentando, aumentaram-se os valores de massa fresca relativa. Já nos tratamentos com solução de vaso, a utilização de 5 mM e 50 mM de guaiacol proporcionou valores de massa fresca relativa semelhantes, enquanto a utilização de 25 mM mostrou-se superior a esses (Figura 2). Maiores valores de massa fresca relativa foram encontrados após 48 h nos tratamentos de pulsing com 50 mM (104,7%) e com solução de vaso 25 mM (104,6%). O balanço hídrico negativo nas hastes desses dois tratamentos foi encontrado após 144 h, enquanto nas hastes controle, esse já foi observado com 72 h (Figura 2).



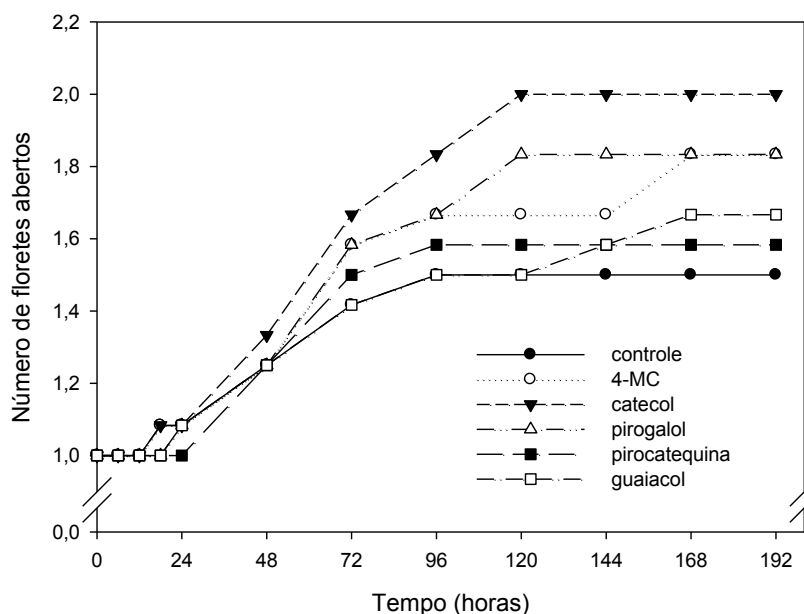
**Figura 2.** Massa fresca relativa ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a soluções de pulsing (P) ou soluções de vaso (SV) com diferentes concentrações de guaiacol

O balanço hídrico negativo se dá quando as taxas de absorção de água se tornam mais baixas que as taxas de transpiração, possivelmente devido à oclusão xilemática, que se desenvolveu na parte basal da haste (van Meeteren et al., 2006). Os diferentes tratamentos utilizados nos dois experimentos foram eficientes em

retardar o tempo até o desenvolvimento de um balanço hídrico negativo. Esta característica é desejável uma vez que para que se tenha a abertura de novas flores é necessário que haja uma boa condutividade hidráulica no xilema, capaz de manter os tecidos das hastes hidratados. Observa-se, em muitos trabalhos realizados com ave-do-paráiso, que o déficit hídrico que se instala nas hastes é tão severo que estas não alcançam o estágio de abertura 2, quando a segunda flor se abre, e as duas apresentam ótimo aspecto (Campanha et al., 1997; Marques, 2008).

### 3.2 Número de floretes abertos

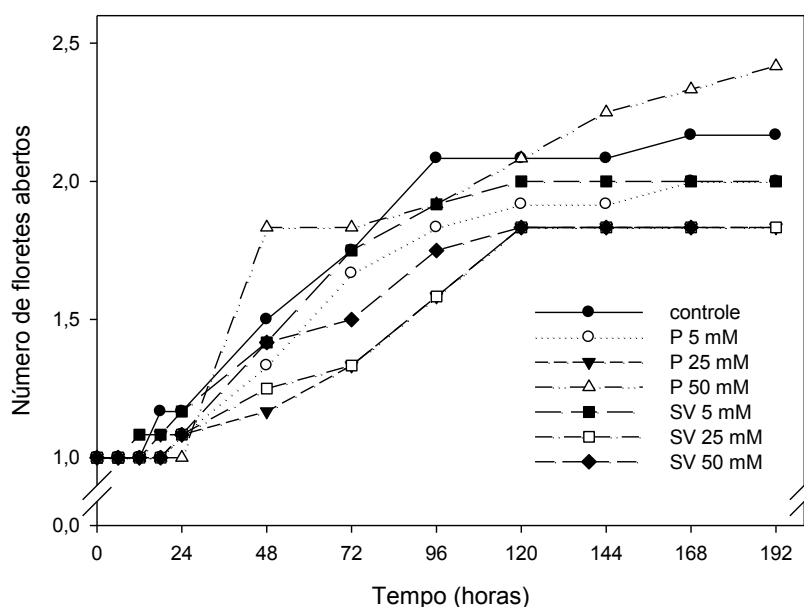
Com a utilização de diferentes substâncias fenólicas como constituintes da solução de vaso (experimento 1), maior abertura de floretes foi encontrada com catecol (2 floretes), seguido do 4-MC e pirogalol (1,8 floretes), enquanto as hastes controle exibiram abertura de 1,5 floretes (Figura 3). Apesar de o tratamento com guaiacol ter proporcionado os maiores valores de massa fresca relativa, e ter retardado o desenvolvimento do balanço hídrico negativo, esse não foi eficiente em aumentar o número de floretes abertos (Figura 1 e 3). No experimento 2, maior abertura de floretes foi encontrada com a utilização de 50 mM de guaiacol aplicado em pulsing (2,4 floretes), seguido pelo controle (2,2 floretes) (Figura 4).



**Figura 3.** Número de floretes abertos ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a soluções de vaso contendo diferentes substratos fenólicos (10 mM)

Em testes preliminares, em que a combinação solução de pulsing contendo 25 mM de guaiacol acrescido de 40% de sacarose foi testado, aplicados por 24 h, encontrou-se uma abertura média de 3 floretes por haste, sendo observada abertura de até 5 floretes (dados não apresentados). Para essa espécie, parece que o fornecimento de uma fonte de carboidrato externo é fundamental para que se tenha maior abertura de floretes e, conseqüentemente, maior longevidade. O açúcar melhora o balanço hídrico pela regulação da transpiração, pela redução do potencial osmótico e aumento na absorção de água (Nowak e Rudnicki, 1990), além de prolongar a vida de vaso de várias flores, aumentar a abertura floral, e intensificar a cor das pétalas (Finger e Barbosa, 2006). Assim, a combinação de uma substância fenólica e o fornecimento de uma fonte de carboidrato talvez seja mais adequado para essa espécie, proporcionando resultados mais satisfatórios.

Em vários experimentos realizados com essa espécie, assim como foi observado nesses dois experimentos, existe grande variação na abertura de floretes entre hastes submetidas aos diferentes tratamentos, e mesmo dentro de cada tratamento. Outras características, inerentes à própria haste, devem ter afetado este parâmetro e devem ser ainda estudadas.

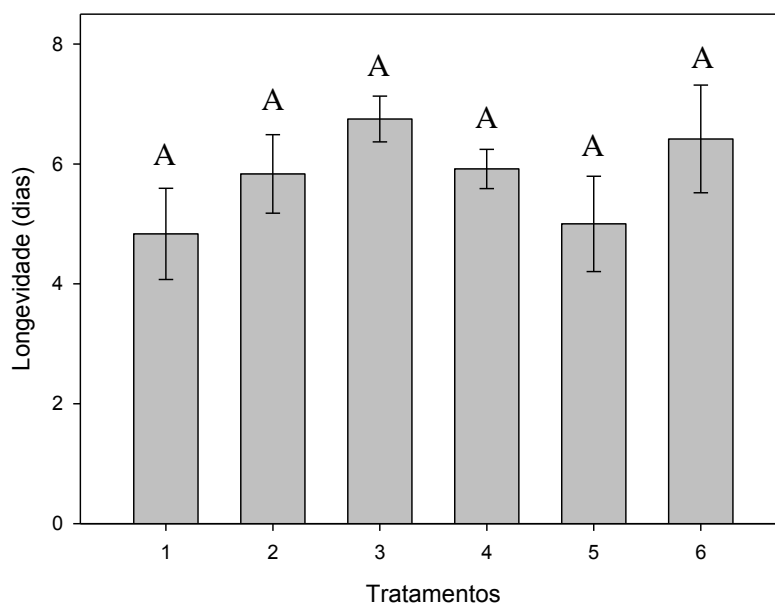


**Figura 4.** Número de floretes abertos ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a soluções de pulsing (P) ou soluções de vaso (SV) com diferentes concentrações de guaiacol

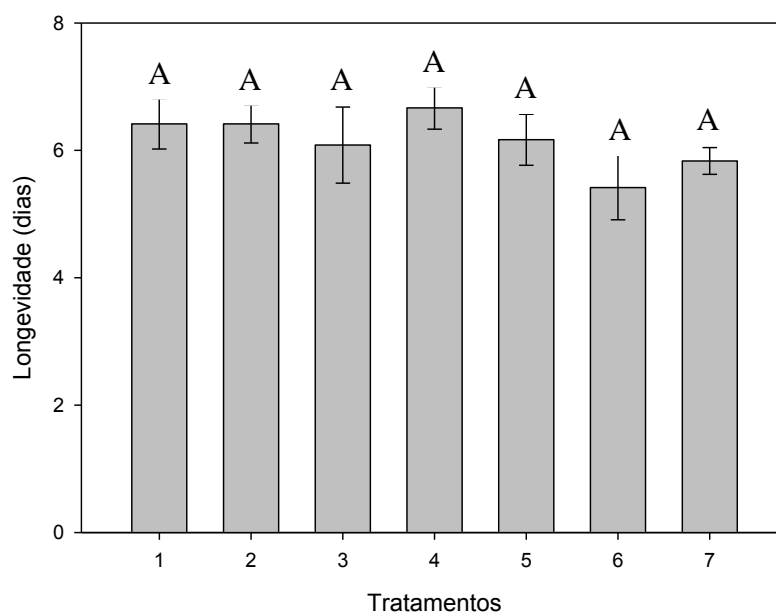
### 3.3 Longevidade

A longevidade no experimento 1 não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, variando de 4,8 dias para as hastes controle até 6,8 dias para hastes tratadas com catecol (Figura 5). No experimento 2, diferenças significativas de longevidade também não foram encontradas, e a longevidade variou de 5,4 dias sob solução de vaso 25 mM a 6,7 dias sob pulsing de 50 mM (Figura 6). Os tratamentos que proporcionaram maior longevidade nos dois experimentos foram os mesmo que produziram maior abertura de floretes (Figura 3 e 4).

Em flores de crisântemo, van Doorn e Vaslier (2002), utilizaram diferentes inibidores enzimáticos como constituintes da solução de pulsing. Entre os compostos utilizados, estava o catecol, classificado por eles como inibidor da peroxidase e que estimula a atividade das fenoloxidasas. Em crisântemo, a aplicação de catecol 2 e 5 mM como pulsing por 5 h, teve efeito relativamente pequeno em retardar o tempo de murchamento das flores.



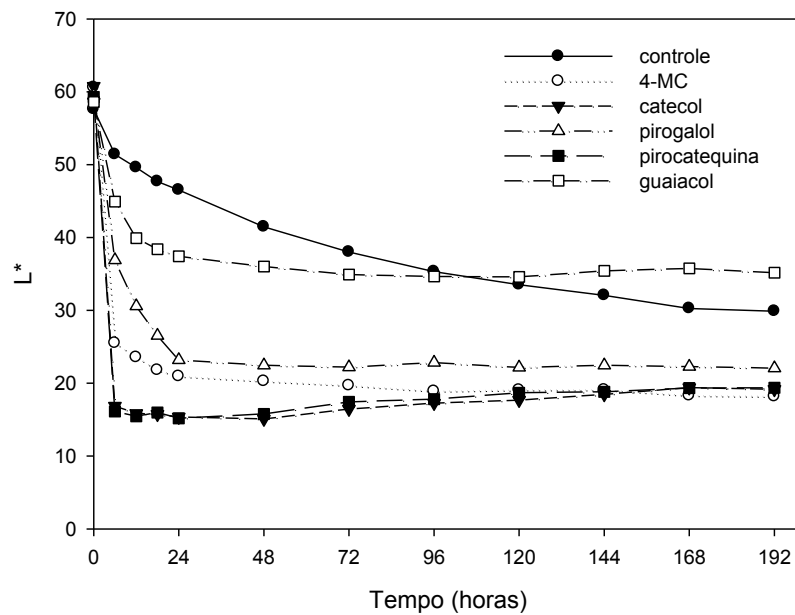
**Figura 5.** Longevidade de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de vaso (1-controle; 2-4-MC; 3-catecol; 4-pirogalo; 5-pirocatequina e 6-guaiacol). As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade



**Figura 6.** Longevidade de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes tratamentos com guaiacol (1- controle; 2- pulsing 5 mM; 3- pulsing 25 mM; 4- pulsing 50 mM; 5- solução de vaso 5 mM; 6- solução de vaso 25 mM e 7- solução de vaso 50 mM). As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

### 3.4 Coloração e análise visual

De todos os parâmetros cromáticos avaliados com o colorímetro, o que melhor parece explicar os resultados é o  $L^*$  (luminosidade). Os valores de  $L^*$  podem variar entre 0, preto, até 100, branco (McGuire, 1992). Observa-se na figura 7, os dados de luminosidade dos diferentes tratamentos no experimento 1. Os tratamentos 3 e 5 (catecol e pirocatequina) tiveram redução brusca nos valores de  $L^*$ , já nas primeiras horas em vaso, permanecendo, após este período, praticamente constante até o final do experimento (Figura 7). Isso indica o aumento no escurecimento dos tecidos da base da haste. Estes resultados podem ser confirmados pela análise visual da base da haste, onde observou-se o escurecimento intenso já nas primeiras 6 h de contato com a solução de vaso, e que se manteve ao longo do todo o experimento (Figura 9). Marques (2008), também observou forte pigmentação da base de hastes de ave-do-paráíso, ao utilizar catecol 5 mM em pulsing por 5 h.

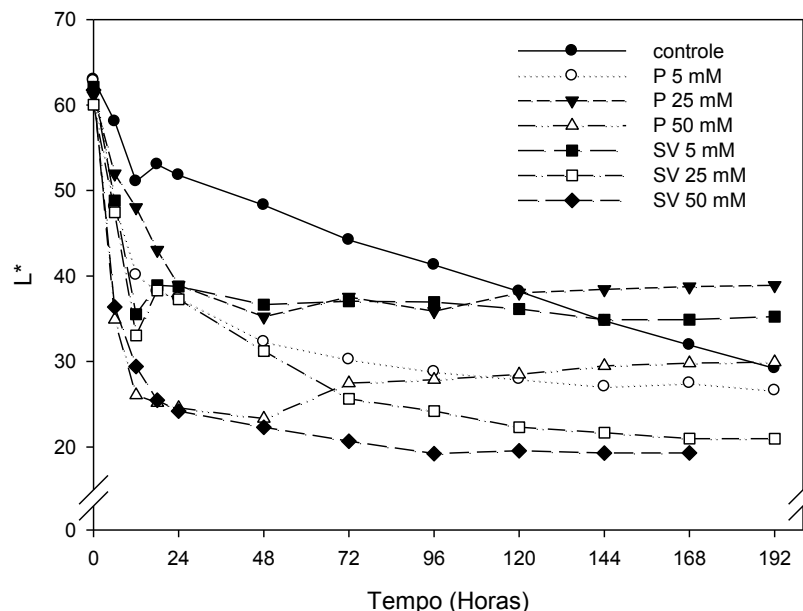


**Figura 7.** Luminosidade ( $L^*$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a soluções de vaso contendo diferentes substratos fenólicos (10 mM)

Hastes controle tiveram redução gradual nos valores de  $L^*$  ao longo de todo o experimento, indo de valores de 57,6 no tempo 0 a 29,9 após 192 h de vaso (Figura 7). De todos os tratamentos aplicados o que se assemelhou mais ao comportamento das hastes controle foi o guaiacol, que promoveu uma pequena queda nos valores de luminosidade nas primeiras horas de experimento e, após, manteve-se constantes ao longo de todo o experimento, sendo que, a partir das 120 h esses valores foram superiores ao controle, ou seja, no final do experimento hastes tratadas com guaiacol foram as que tiveram menor escurecimento da base (Figuras 7 e 9).

No experimento 2, todos os tratamentos também mostraram maiores reduções nos valores de  $L^*$ , se comparado as hastes controle, nas primeiras horas de experimento (Figura 8). Hastes que foram mantidas em pulsing por 24 h em solução de guaiacol 50 mM, exibiram valores de luminosidade semelhantes aos das hastes mantidas em solução de vaso com 50 mM de guaiacol até 48 h. Após esse período, as hastes que sofreram o tratamento de pulsing, mostraram aumentos nos valores de  $L^*$ , enquanto as hastes mantidas em solução de vaso tiveram redução nos valores de  $L^*$ , ou seja, as hastes submetidas ao pulsing, após serem colocadas em água, não aumentam sua taxa de escurecimento (Figura 8). Isso pôde ser confirmado pela

análise visual, em que o escurecimento da base da haste mantida em pulsing por 6 h com 50 mM de guaiacol foi muito mais intenso, do que após 9 dias de vaso (Figura 10).

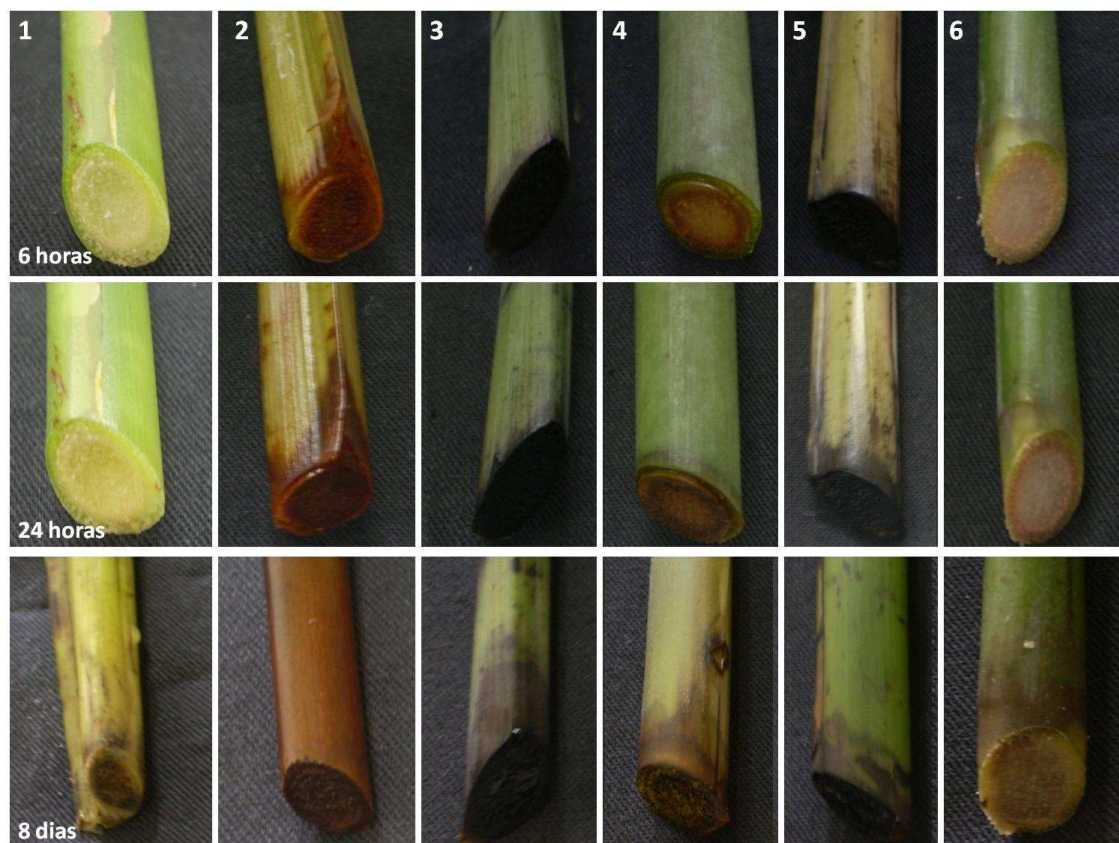


**Figura 8.** Luminosidade ( $L^*$ ) ao longo da vida de vaso de hastas de *Strelitzia reginae* submetidas ao pulsing (P) ou soluções de vaso (SV), com diferentes concentrações de guaiacol

Em cilindros de jicama armazenados a 20°C, Aquino-Bolaños e Mercado-Silva (2004), observaram decréscimo gradual nos valores de luminosidade ao longo dos dias após o dano, variando de 71,5 no início do experimento até 51,1 no décimo dia.

O escurecimento no interior da haste também foi avaliado no final da vida de vaso das flores de ave-do-paraíso. Para isso, cerca de 20 cm da base da haste foram retirados, e por meio de um corte longitudinal, a haste foi aberta e o escurecimento avaliado. Nos dois experimentos, o escurecimento das hastas controle mostrou-se bem inferior aos dos demais tratamentos (Figuras 11 e 12). No experimento 1, observou-se escurecimento mais intenso na base da haste, e esse foi reduzindo-se gradualmente à medida que se distanciava da base (Figura 11). No experimento 2, observou-se diferenças tanto com relação à concentração do guaiacol, quanto na forma de aplicação desse composto. Quanto maior a concentração de guaiacol, maior foi o escurecimento. Se comparada à mesma concentração de guaiacol, variando-se a

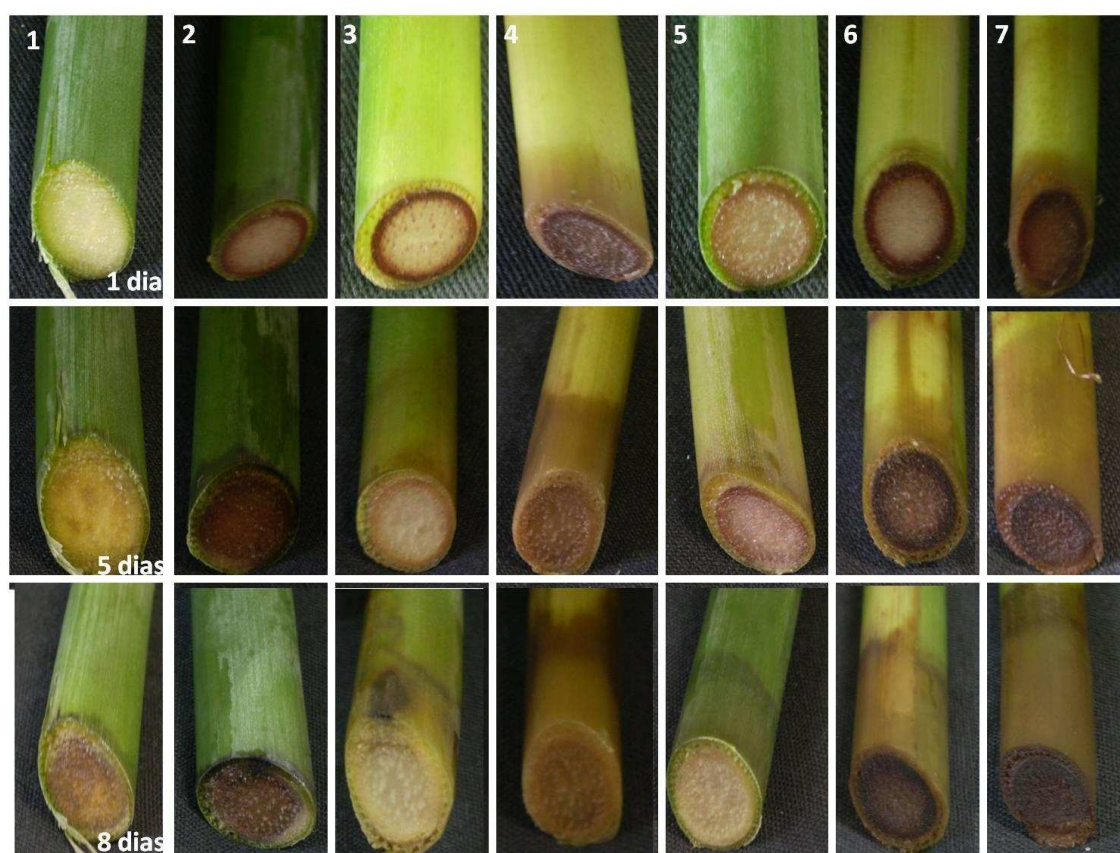
forma de aplicação, observa-se que o escurecimento foi mais intenso nas hastes mantidas em solução de vaso, se comparado as hastes mantidas em pulsing (Figura 12).



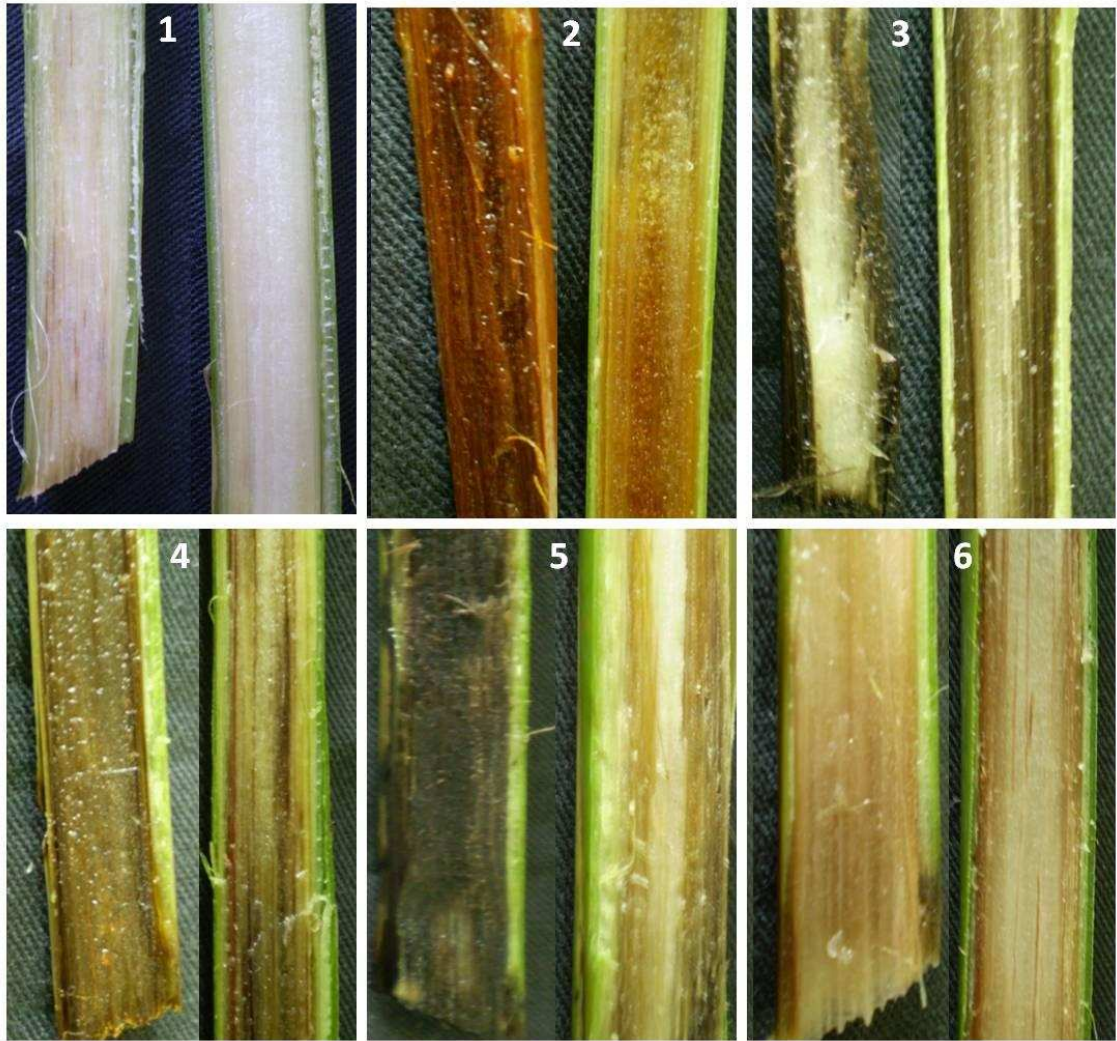
**Figura 9.** Aspecto das bases das hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de vaso (1-controle; 2-4-MC; 3-catecol; 4-pirolgalol; 5-pirocatequina e 6-guaiacol), após 6, 24 e 192 horas (8 dias) de vaso

O escurecimento dos tecidos é resultado de oxidações enzimáticas ou não enzimáticas de compostos fenólicos. A principal enzima que parece estar envolvida no escurecimento de tecidos vegetais é a PPO (Araújo, 2008). O escurecimento pode estar relacionado também à atividade da POD. A POD está envolvida na oxidação dos monolignóis antes da sua polimerização, durante a formação da lignina. A lignina e seus intermediários, formados pela oxidação dos monolignóis, exibem coloração vermelho-marrom, e o escurecimento de alguns produtos frescos cortados parece devido à esses compostos produzidos pelo tecido, em parte como mecanismo de cicatrização (Aquino-Bolaños e Mercado-Silva 2004).

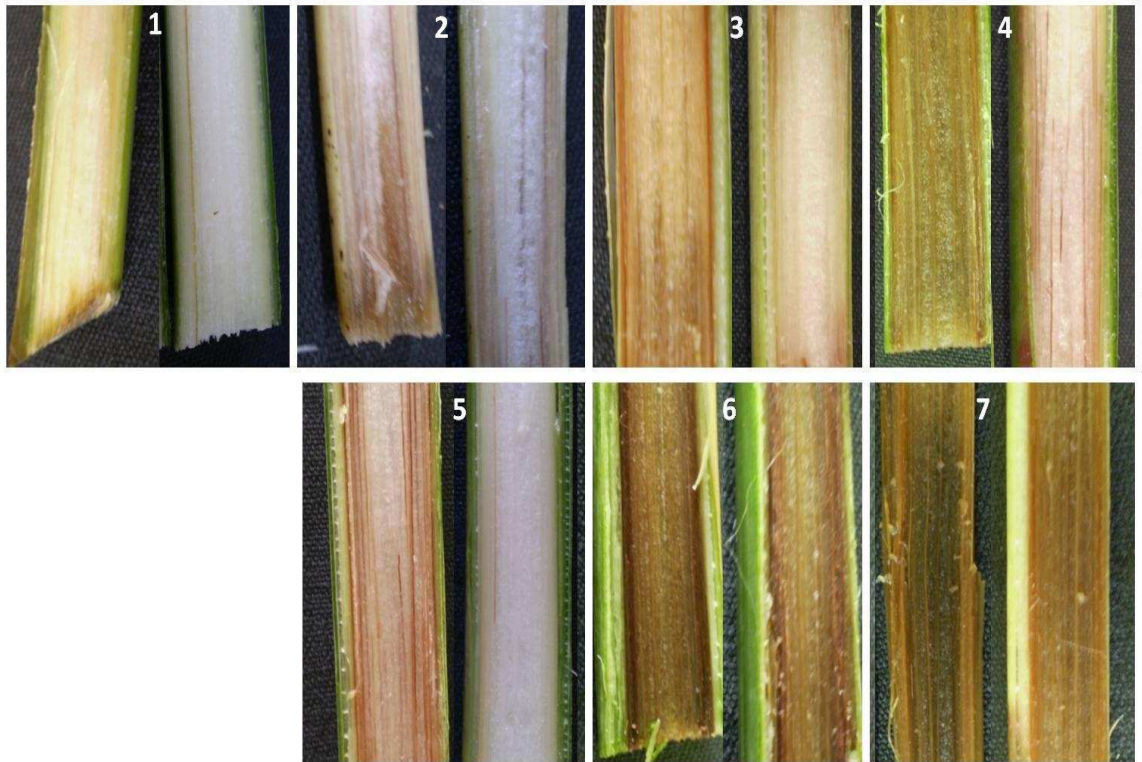
No experimento 1, observou-se também o escurecimento da própria solução de vaso. Algumas substâncias fenólicas, principalmente o 4-MC e o pirogalol, apresentaram-se bastante escuras após 2 dias de preparo, resultados de uma provável auto-oxidação (Figura 13). A auto-oxidação de compostos fenólicos refere-se à formação de estruturas de ligações cruzadas, como resultado da exposição a luz e oxigênio. Devido à natureza aromática dos compostos fenólicos eles podem ser facilmente oxidados, e os radicais formados podem reagir com outros radicais formando dímeros. A oxidação dos compostos fenólicos pode resultar no escurecimento (Vermerris e Nicholson, 2006).



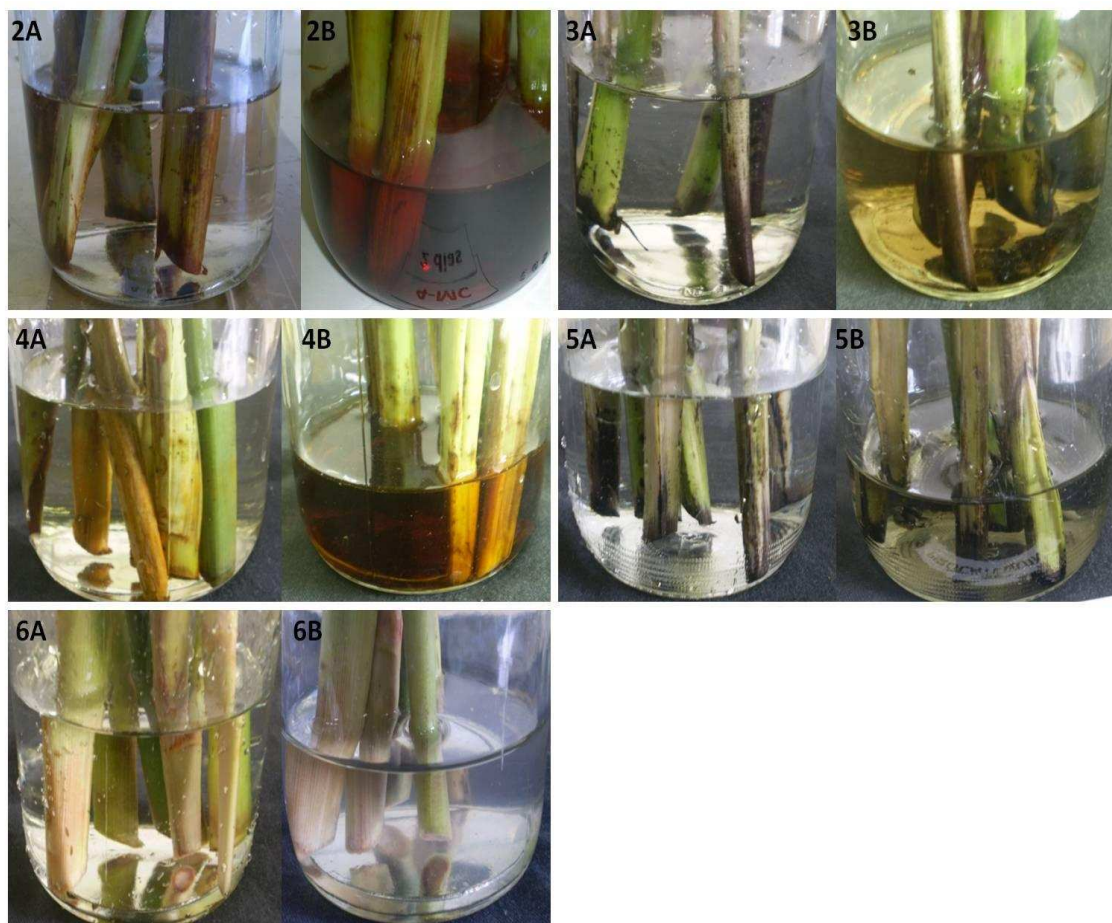
**Figura 10.** Aspecto das bases das hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes tratamentos com guaiacol (1- controle; 2- pulsing 5 mM; 3- pulsing 25 mM; 4- pulsing 50 mM; 5- solução de vaso 5 mM; 6- solução de vaso 25 mM e 7- solução de vaso 50 mM), após 1, 5 e 8 dias de vaso



**Figura 11.** Aspecto do interior das hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de vaso (1-controle; 2-4-MC; 3-catecol; 4-pirogalol; 5-pirocatequina e 6-guaiacol), após 8 dias de vaso. O primeiro corte representa a porção mais próxima a base, e o segundo aproximadamente 20 cm de distância da base



**Figura 12.** Aspecto do interior das hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes tratamentos com guaiacol (1- controle; 2- pulsing 5 mM; 3- pulsing 25 mM; 4- pulsing 50 mM; 5- solução de vaso 5 mM; 6- solução de vaso 25 mM e 7- solução de vaso 50 mM), após 8 dias de vaso. O primeiro corte representa a porção mais próxima à base, e o segundo aproximadamente 20 cm de distância da base



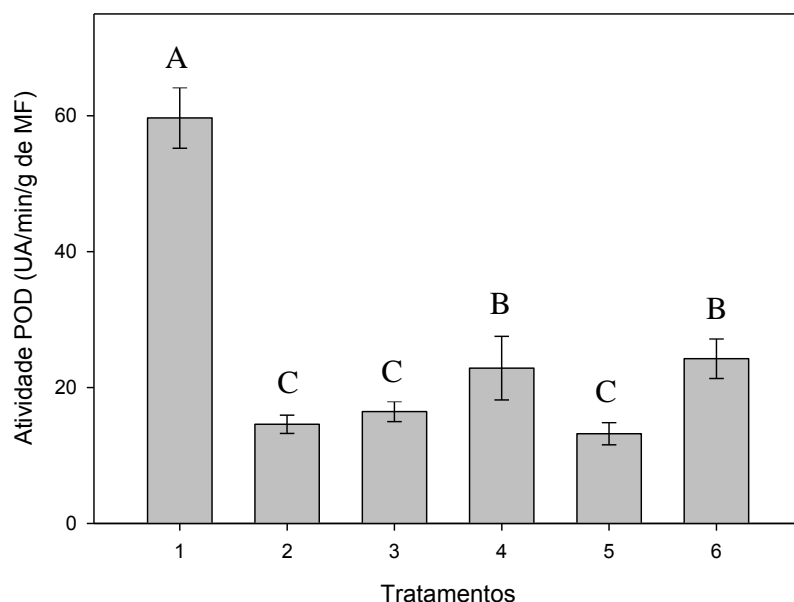
**Figura 13.** Aspecto das soluções de vaso (2-4-MC; 3-catecol; 4-pirogalol; 5-pirocatequina e 6-guaiacol) no momento de seu preparo (A) e após 48 horas (B)

### 3.5 Atividade enzimática

No experimento 1 e 2, os tratamentos que promoveram escurecimento intenso na base, exibiram reduções drásticas na concentração de proteína desses tecidos, tornando-a muitas vezes mais baixa do que a detectável pelo método de Bradford utilizado (dados não apresentados). O motivo para essa redução é desconhecido. Devido a esse fato, para evitar a influência da redução da concentração da proteína na atividade específica das enzimas, optou-se em expressar a atividade enzimática da POD e PPO por UA/min/g de massa fresca.

No experimento 1, maior atividade da POD após 8 dias de vaso foi encontrado nas hastes controle (59,7 UA/min/g de MF), seguido pelas hastes tratadas com guaiacol 10 mM (24,2 UA/min/g de MF) e com pirogalol 10 mM (22,9 UA/min/g de MF). Os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 14). A atividade da PPO foi muito mais baixa se comparada à atividade da POD nas hastes

dos mesmos tratamentos, sendo que em hastes controle a atividade da POD foi 6,15 vezes maior que da PPO. A atividade da PPO neste experimento foi maior para hastes controle, seguido pelas hastes tratadas com guaiacol 10 mM, sendo de 9,7 UA/min/g de MF e 5,1 UA/min/g de MF, respectivamente (Figura 15).

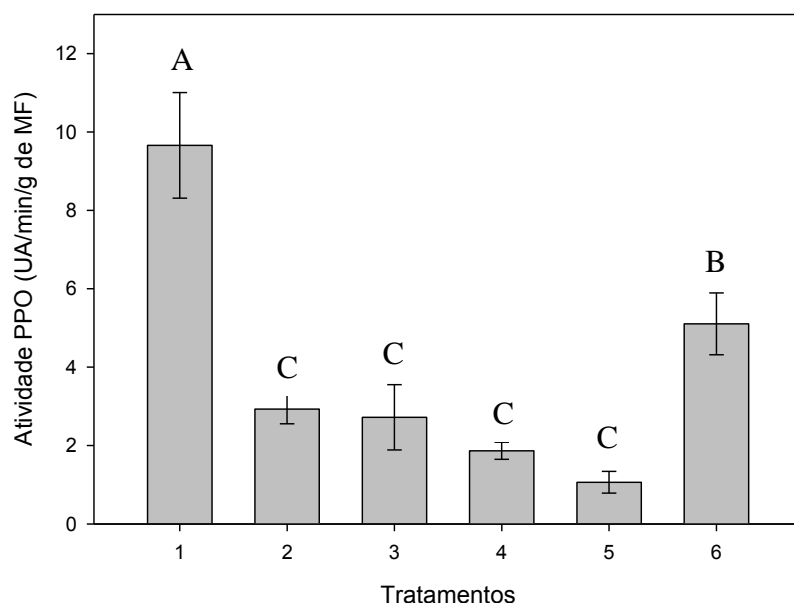


**Figura 14.** Atividade da POD (UA/min/g de massa fresca) de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de vaso (1-controle; 2-4-metil catecolMC; 3-catecol; 4-pirogalol; 5-pirocatequina e 6-guaiacol) após 8 dias de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

No experimento 2, maiores atividades da POD foram encontradas em hastes controle, e tratadas em pulsing de guaiacol 5 e 25 mM, cujos efeitos não diferiram entre si, mas foram superiores aos demais tratamentos (Figura 16). Quanto a PPO, maiores atividade foram encontradas nas hastes dos mesmos tratamentos da POD (Figura 17).

Hastes controle apresentaram em ambos os experimentos maior atividade da POD e PPO, o que pode explicar o desenvolvimento de um balanço hídrico negativo tão precoce causado por esses tratamentos (Figura 1 e 2). O guaiacol é o principal substrato utilizado nas reações enzimáticas *in vitro* da POD. O fornecimento desse composto apesar de ter causado altas atividades da POD e PPO, proporcionou os

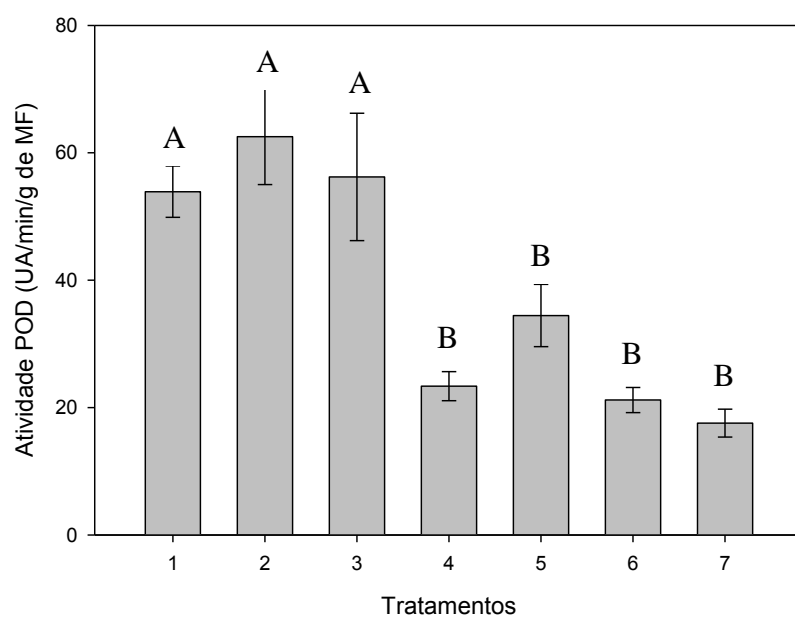
maiores valores de massa fresca relativa e maior retardamento no desenvolvimento do balanço hídrico negativo.



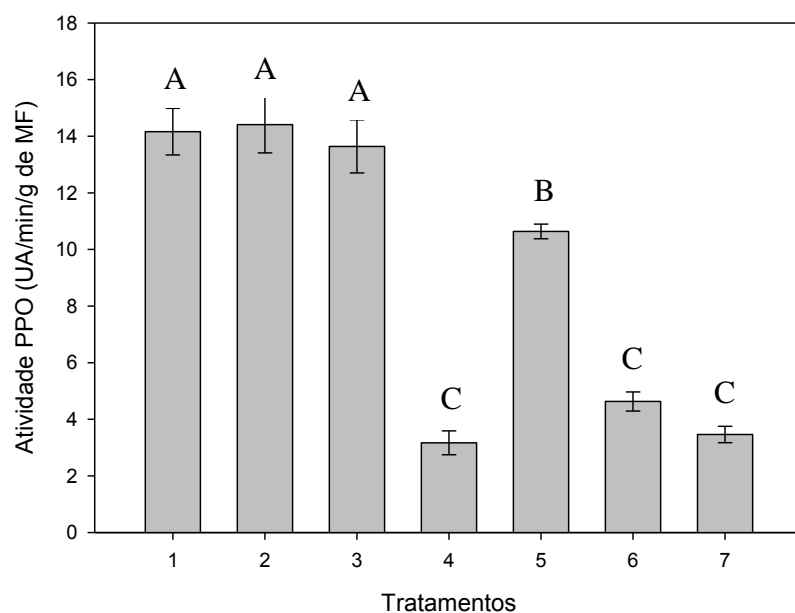
**Figura 15.** Atividade da PPO (UA/min/g de massa fresca) de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes soluções de vaso (1-controle; 2-4-MC; 3-catecol; 4-pirolgalol; 5-pirocatequina e 6-guaiacol) após 8 dias de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

Compostos fenólicos são potenciais substratos para POD e PPO, e os produtos de sua oxidação (benzoquinonas e compostos poliméricos) afetam a qualidade, cor e sabor de alimentos e tecidos vegetais (Martinez e Whitaker, 1995). Nos dois experimentos realizados, o fornecimento das substâncias fenólicas aumentou o escurecimento da base das hastes (Figuras 9 e 10). No entanto, esse escurecimento não foi acompanhado por altas atividades da POD e PPO nas hastes desses tratamentos (Figuras 14, 15, 16 e 17). Uma das prováveis justificativas para a falta de relação entre o escurecimento e a atividade enzimática são os diferentes períodos utilizados para avaliarem-se estes parâmetros. Enquanto o escurecimento foi avaliado diariamente, a atividade enzimática foi avaliada somente no último dia de vaso. Como o escurecimento foi intenso já nas primeiras horas do experimento, e a atividade enzimática não foi avaliada neste período, não se pode inferir se no início

do experimento essas não estiveram altas, o que explicaria um maior escurecimento nas hastes desses tratamentos.



**Figura 16.** Atividade da POD (UA/min/g de massa fresca) de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes tratamentos com guaiacol (1- controle; 2- pulsing 5 mM; 3- pulsing 25 mM; 4- pulsing 50 mM; 5- solução de vaso 5 mM; 6- solução de vaso 25 mM e 7- solução de vaso 50 mM) após 8 dias de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade



**Figura 17.** Atividade da PPO (UA/min/g de massa fresca) de hastes de *Strelitzia reginae* submetidas a diferentes tratamentos com guaiacol (1- controle; 2- pulsing 5 mM; 3- pulsing 25 mM; 4- pulsing 50 mM; 5- solução de vaso 5 mM; 6- solução de vaso 25 mM e 7- solução de vaso 50 mM) após 8 dias de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

#### 4. CONCLUSÕES

O fornecimento de substâncias fenólicas promoveu uma melhoria das relações hídricas das hastes, mas não foi capaz de aumentar a abertura de floretes e a longevidade, e causou escurecimento intenso das bases da haste, o que a torna com características indesejáveis para comercialização.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquino-Bolaños, E. N.; Mercado-Silva, E. 2004. Effects of polyphenol oxidase e peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. **Postharvest Biology and Technology**. 33, 275-283.

Araújo, J. M. A. 2008. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4 ed. Viçosa: UFV. 478 p.

Armitage, A. M.; Laushman, J. M. 2003. **Specialty cut flowers**. 2 ed. Portland.Cambridge: Timber Press. 586p.

Aydemir, T. 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. **Food Chemistry**. 87, 59-67.

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

Campanha, M. M.; Finger, F. L.; Cecon, P. R.; Barbosa, J. G. 1997. Water relations of cut bird-of-paradise (*Strelitzia reginae* Ait.) inflorescences. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 3, 27-31.

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

Finger, F. L., Barbosa, J. G. 2006. Postharvest physiology of cut flowers. In: Noureddine, B. & Shiomi, N. (eds.) **Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops**. 373-393.

He, S.; Joyce, D. C.; Irving, D. E.; Faragher, J. D. 2006. Stem end blockage in cut *Grevillea* 'Crimson Yul-lo' inflorescences. **Postharvests Biology and Technology**. 41, 78-84.

Hensley, D.; Deputy, J.; Yogi, J.; Leonhardt, K. 1998. **Ornamental and Flowers – Bird-of-Paradise**. College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR).

Hoffmann, F.; Daniel, F.; Fortier, A.; Hoffmann-Tsay, S.-S. 2011. Efficient avian pollination of *Strelitzia reginae* outside of South Africa. **South Africa Journal of Botany**. 77, 503-505.

Karsten, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*)**. 117p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Kavrayan, D.; Aydemir, T. 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**. 74, 146-154.

Marques, A. E. 2008. **Estudos sobre o bloqueio do xilema na pós-colheita das inflorescências de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Aiton)**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Martinez, M. V.; Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science & Technology**. 6, 195-200.

Mayer, A. M. 1987. Polyphenol oxidases in plantas – recent progress. **Phytochemistry**. 26, 11-20.

McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. **HortScience**. 27, 1254-1255.

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

Nowak, J.; Rudnicki, R. M. 1990. **Postharvest handling and storage of cut flowers, florist greens and potted plants**. Portland: Timber Press. 210 p.

Passardi, F., Bakalovic, N.; Teixeira, F. K.; Margis-Pinheiro, M.; Penel, C.; Dunand, C. 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes, **Genomics**. 89, 567-579.

Reid, M. S. 2009. **Handling of cut flowers for air transport**. IATA.

Silva, J. A. T. 2003. The cut flower: Postharvest considerations. **OnLine Journal of Biological Sciences**. 3, 406-442.

van Doorn, W. G.; Vaslier, N. 2002. Wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers: roles of peroxidase and catechol oxidase. **Postharvest Biology and Technology**. 26, 275-284.

van Meeteren, U.; Arévalo-Galarza, L.; van Doorn, W. G. 2006. Inhibition of water uptake after dry storage of cut flowers: Role of aspired air and wound-induced processes in Chrysanthemum. **Postharvest Biology and Technology**. 41, 70-77.

Vermeris, W.; Nicholson, R. 2006. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer. 276p.

Wood, T. 1995. Ornamental zingiberacea. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1, 12-13.

## **CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS INFLORESCÊNCIAS DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*) COLHIDAS COM DIFERENTES DIÂMETROS DE HASTE**

### **Resumo**

Em experimentos realizados anteriormente, tem sido observada grande desuniformidade no diâmetro das hastes de ave-do-paraíso colhidas no campo de cultivo da Universidade Federal de Viçosa, o que pode levar a variações nos parâmetros pós-colheita. Com o objetivo de caracterizar as diferenças nestas hastes, após coleta, estas foram separadas em três grupos: hastes finas (diâmetro menor que 10 mm), hastes médias (diâmetro entre 10 e 12 mm) e hastes grossas (diâmetro maior que 12 mm). Metade das hastes não sofreu o corte da base até o final do experimento, e a outra metade sofreu o corte a cada 48 h. Análises de relações hídricas, conteúdo de carboidratos, escurecimento e de características inerentes às hastes e aos respectivos floretes foram avaliadas durante a vida de vaso. A taxa de absorção de água foi semelhante entre os três tipos de hastes, sendo que somente o corte da base teve efeito, aumentando as taxas de absorção, e conseqüentemente aumentando a massa fresca relativa das hastes. A transpiração não foi influenciada nem pelo diâmetro nem pelo corte da base da haste. Os teores de carboidratos foram influenciados pelo diâmetro da haste, parte da planta avaliada, tempo e presença ou ausência do corte. Hastes grossas que tiveram a base cortada a cada 48 h mostraram maior abertura de floretes e maior longevidade. Hastes mais grossas apresentam maior tamanho de sépalas e brácteas. O escurecimento da base da haste, avaliado por meio de colorímetro e por análise visual foi semelhante entre os três grupos de hastes. Maior atividade da POD foi encontrada nas hastes grossas. Conclui-se que existem variações em vários parâmetros avaliados dentro dos diferentes diâmetros das hastes. Maior abertura de floretes, e conseqüentemente, maior longevidade das flores de ave-do-paraíso foram encontradas em hastes mais grossas, que apresentaram maiores teores de carboidratos, combinados com a melhor capacidade de absorver água, causada pelos cortes periódicos da base das hastes.

## 1. INTRODUÇÃO

O sucesso pós-colheita de uma flor se inicia com o fornecimento das melhores condições de crescimento possível e a colheita no estágio adequado (Bachmann, 2006). Plantas cultivadas em ambientes inadequados nunca são tão vigorosas como as cultivadas em ambiente favorável, além de serem raquíticas, desenvolvem menos flores, e por consequência apresentam menor vida de vaso (Armitage e Laushman, 2003). Após a colheita, a qualidade das flores não pode ser melhorada, mas elas podem ser mantidas e a vida de vaso estendida pelo fornecimento de substratos orgânicos água e baixas temperaturas (Bachmann, 2006). A longevidade das flores de corte está associada a fatores fisiológicos inerentes à espécie e a fatores do ambiente, como temperatura, umidade, ação do etileno e a qualidade da água (Dias-Tagliacozzo et al., 2005).

A turgescência das plantas intactas e das flores colhidas é dependente de um balanço entre a utilização ou perda e o fornecimento de água. A murcha e a falha na abertura total das flores são as principais razões para o término da vida útil destas. O balanço hídrico envolve processos fisiológicos de absorção, transporte, perda de água e capacidade dos tecidos de retê-las. Em muitas flores de corte, o murchamento e a senescência das pétalas estão associados à deficiência na absorção de água pelas hastes (Dias-Tagliacozzo et al., 2005).

Atualmente, observa-se aumento na procura por culturas exóticas com características tropicais, como espécies da família *Strelitziaceae* (Barbosa et al., 2005). A ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*) é uma das principais espécies de flores tropicais utilizada para corte no Brasil e em muitas outras partes do mundo (Finger et al., 2003). A vida pós-colheita desta espécie varia na maioria dos relatos entre 6 e 16 dias. Essas diferenças parecem refletir as condições de crescimento, a maturidade na colheita, as diferentes condições de conservação, transporte e os diferentes critérios utilizados para avaliar-se a vida pós-colheita (Jaroenkit e Paull, 2003).

A causa para a redução na vida pós-colheita dessa espécie está relacionada a um rápido declínio na absorção de água após a colheita, associada com um possível bloqueio dos tecidos vasculares da haste (Jaroenkit e Paull, 2003). Muitos tratamentos pós-colheita vêm sendo testados com o objetivo de prolongar a vida de vaso dessas flores, assim como vem sendo avaliada a colheita em diferentes estádios e épocas, e com diferentes comprimentos das hastes (Jaroenkit e Paull, 2003;

Bayogan et al., 2007; Marques, 2008; Karsten, 2009), mas em muitos casos, o objetivo de aumentar a longevidade não é alcançado.

As hastes de ave-do-paraíso colhidas nos campos de cultivo da Universidade Federal de Viçosa apresentam uma grande desuniformidade quanto ao diâmetro das bases das hastes, encontrando-se hastes desde muito finas a grossas. Observou-se em experimentos realizados anteriormente, que hastes mais grossas, apresentam maior capacidade de abertura de floretes e, por consequência, maior longevidade. A razão para isso não se sabe, mas fatores como as relações hídricas e o conteúdo de carboidratos dessas hastes podem estar relacionados com esses resultados. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as relações hídricas, o conteúdo de carboidratos, o escurecimento e as características inerentes às hastes e seus respectivos floretes, de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros de base.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

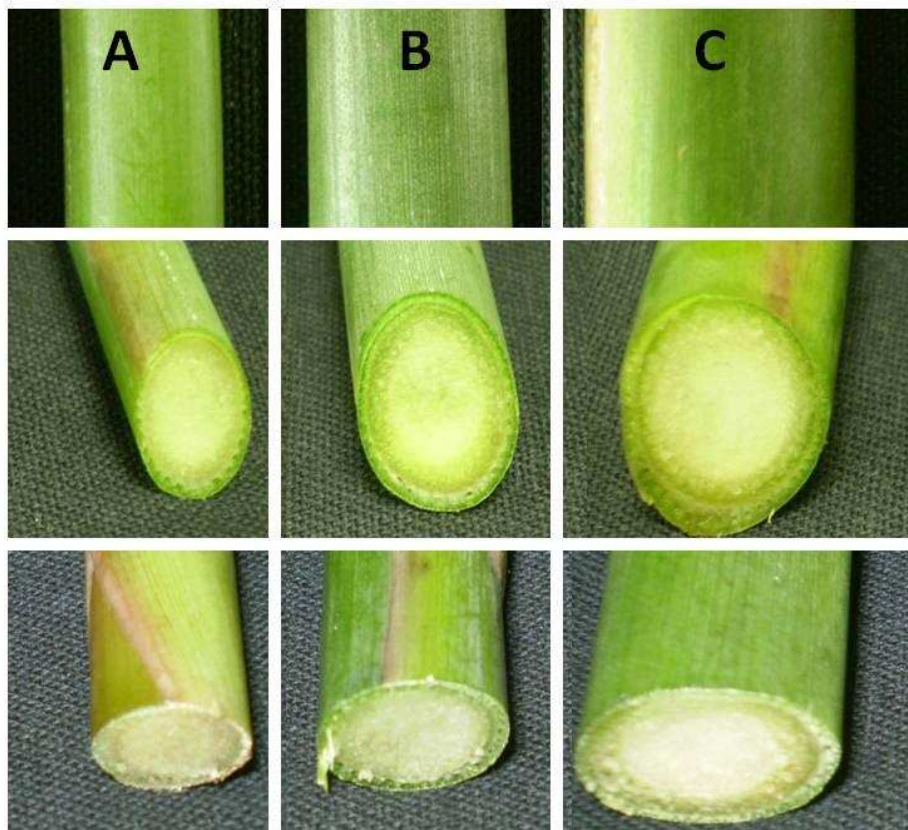
### **2.1 Material Vegetal**

Hastes florais de ave-do-paraíso, contendo um florete aberto (ponto de colheita comercial), foram colhidas no campo de cultivo da Universidade Federal de Viçosa (20°45' S, 42°51' W e altitude de 651 m), em fevereiro de 2011. Em seguida, essas hastes foram levadas ao laboratório, onde passaram por processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento. O experimento foi conduzido à temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 20\%$  e intensidade luminosa de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **2.2 Tratamentos**

As hastes, após a padronização foram separadas em 3 grupos, dependendo do diâmetro da parte mais larga da sua base e foram classificadas em: (I) finas - hastes com até 10 mm de diâmetro; (II) médias – hastes com diâmetro entre 10 e 12 mm; e (III) grossas – hastes com diâmetro maior que 12 mm (Figura 1). Metade das hastes sofreu o corte das bases a cada 48 h (remoção de aproximadamente 2 cm) e as demais permaneceram intactas até o final do experimento. As hastes foram mantidas em frascos individuais, previamente pesados, contendo 50 mL de água destilada, sendo a extremidade superior do frasco fechada com papel alumínio para reduzir a

evaporação da água. A água dos frascos foi trocada a cada 48 h para evitar o desenvolvimento de microrganismos.



**Figura 1.** Hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (A- finas, B - médias e C - grossas)

### 2.3 Relações hídricas

Para as análises de relações hídricas foram utilizadas 6 repetições, sendo o valor de cada repetição proveniente da média de duas diferentes hastes. As análises foram realizadas no tempo 0, e com 6, 12, 18 e 24 h. Após esse período, as avaliações foram feitas diariamente até o final do experimento.

#### 2.3.1 Absorção de água

A pesagem dos frascos contendo a água, sem a haste, foi feito durante toda a vida de vaso da ave-do-paraíso. A média diária de absorção de água foi calculada conforme os dois modelos abaixo:

$$MAA = (MA_{t-1} - MA_t)$$

$$TAA = (MA_{t-1} - MA_t)/MFI$$

Em que:

MAA – massa de água absorvida por haste (g dia<sup>-1</sup>)

TAA – taxa de absorção de água (g g de massa fresca inicial<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)

MA<sub>t</sub> – massa da água (g) no t = dia 1, 2, 3, etc.

MA<sub>t-1</sub> – massa da água (g) no dia anterior

MFI – massa fresca inicial (g)

### 2.3.2 Transpiração (TR)

A taxa de transpiração de cada haste foi estimada segundo as seguintes fórmulas:

$$MAT = [MFI + (MAA) - MFF]$$

$$TR = [MFI + (MAA) - MFF] / MFI$$

Em que:

MAT – massa de água transpirada por haste (g dia<sup>-1</sup>)

TR – transpiração (g g de massa fresca inicial<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)

MAA – massa da água absorvida por haste no dia

MFI – massa fresca inicial (g)

MFF – massa fresca final (g) após 24 h

### 2.3.3 Massa fresca relativa (MFR)

A massa fresca relativa foi calculada usando a seguinte fórmula (He et al., 2006):

$$MFR = (MF_t / MF_{t=0}) \times 100$$

Em que:

MFR - massa fresca relativa (%)

MF<sub>t</sub> – massa fresca (g) da haste no t = dia 0, 1, 2, 3, etc

MF<sub>t=0</sub> – massa fresca (g) da mesma haste do t = dia 0

## 2.4 Conteúdo de carboidratos

A quantificação dos teores de açúcares e amido foi realizada no dia 0 (momento em que o experimento foi montado) e no último dia de vaso (momento em que o experimento foi desmontado). As análises foram feitas em amostras da haste (aproximadamente 20 cm abaixo da inserção da bráctea), bráctea e floretes. Todas as

análises foram feitas com 6 repetições, sendo a amostra de cada repetição composta por material retirado de duas diferentes hastes. No momento da quantificação, as repetições foram analisadas em duplicata.

#### **2.4.1 Extração de açúcares e amido**

Para extração de açúcares, foram pesados aproximadamente 5 g de material vegetal, que foram acondicionados em frascos plásticos. Em seguida, etanol 80% a 70°C foi adicionado sobre a amostra, até cobri-la totalmente. Este material foi triturado em politron até completa homogeneização, transferido para tubos falcon, permanecendo esses em repouso por 10 min e, após, foi centrifugado por 10 min a 2000 g. O sobrenadante da centrifugação foi retirado e colocado em uma proveta. Após isso, 5 mL de etanol 80% foi adicionado ao tubo, que foi agitado, permanecendo em repouso por 10 min e, em seguida, centrifugado novamente. Esse processo de adição de etanol, repouso, seguido por centrifugação foi repetido por 3 vezes. Todos os sobrenadantes obtidos foram misturados na proveta e o volume foi completado para 50 mL com etanol 80%. Esse extrato alcoólico foi armazenado em geladeira, e posteriormente foi utilizado nas quantificações de açúcares solúveis totais e redutores. Os resíduos precipitados nos tubos de centrifugação foram secos em estufa a 65°C, por 72 h, e posteriormente utilizados para determinação dos teores de amido.

#### **2.4.2 Teores de açúcares solúveis totais (AST)**

Para a quantificação dos AST foi empregado o método fenol-sulfúrico (Dubois et al, 1956). Os extratos alcoólicos provenientes das amostras do dia 0 foram diluídos 25 vezes e, para as amostras do último dia de experimento, a diluição foi de 10 vezes. Em tubos de vidro, foram pipetados 250 µL do extrato alcoólico diluído e 250 µL de fenol 5% e, em seguida, agitado em vortex. Após isso, 1250 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados aos tubos, e esses foram agitados novamente e colocados em banho-maria, a 30°C, por 20 min. Após a retirada do banho-maria, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Schimatzu, modelo UV1601) a 490 nm. A concentração dos AST foi estimada com base em curva padrão construída com diferentes concentrações de sacarose.

### **2.4.3 Teores de açúcares redutores (AR) e não redutores (ANR)**

A quantificação dos teores de AR foi feita segundo metodologia Somogy-Nelson (Nelson, 1944). Nesse caso, os extratos alcoólicos provenientes das amostras do dia 0 foram diluídos 10 vezes e, para as amostras do último dia de experimento a diluição foi de 5 vezes. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do extrato diluído foram pipetadas em tubos de Eppendorf. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Nelson 4. Esses foram agitados em vortex e incubados em água fervente, por 15 min. Após a fervura, os tubos foram resfriados até atingir a temperatura ambiente, e foram adicionados a eles 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Nelson 5 e 600  $\mu\text{L}$  de água desionizada, sendo feita uma nova agitação, após cada adição. A mistura obtida foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, e as concentrações de AR foram estimadas com base em curva padrão de glicose.

Os teores de açúcares não-redutores foram estimados por diferença entre a concentração de açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

### **2.4.4 Teores de amido**

A quantificação do amido foi realizada de acordo com a metodologia descrita por McCready et al. (1950). Os resíduos obtidos da extração dos açúcares, após secagem, foram retirados dos tubos falcon, pesados para obtenção da massa seca total, triturados em almofariz para homogeneização, e uma porção de aproximadamente 0,2 g de cada amostra foram pesados e colocados separadamente em novos tubos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 2,5 mL de água desionizada e 3,25 mL de ácido perclórico 52%, e agitado. Essa mistura permaneceu em repouso por 30 min e, após, foi centrifugada por 10 min a 2000 g. Esse processo de adição de água e ácido perclórico, repouso e centrifugação foi repetido por mais 2 vezes. Os sobrenadantes provenientes dos 3 ciclos de centrifugação foram combinados, e o volume foi completado para 20 mL com água desionizada. Para a quantificação do amido, todas as amostras foram diluídas 10 vezes e o processo de determinação da concentração do amido seguiu o mesmo método utilizado para quantificar AST, como descrito no item 2.4.2, sendo a concentração multiplicada pelo fator 0,9.

## **2.5 Características inerentes às hastes e floretes**

Para a abertura dos floretes e longevidade, foram avaliadas 6 repetições, sendo cada uma composta por 2 hastes. Para o tamanho das sépalas e brácteas, massa fresca e área de absorção, foram avaliadas 12 repetições, sendo cada uma composta por 2 hastes.

### **2.5.1 Abertura de floretes**

O número de floretes abertos nas inflorescências de ave-do-paraíso foi avaliado diariamente, sendo os resultados expressos como o número médio de floretes abertos. As avaliações foram realizadas até o término da longevidade do último florete aberto.

### **2.5.2 Longevidade**

A longevidade dos floretes de ave-do-paraíso foi determinada como o período (número de dias) compreendido entre o início do experimento e o murchamento do último florete aberto.

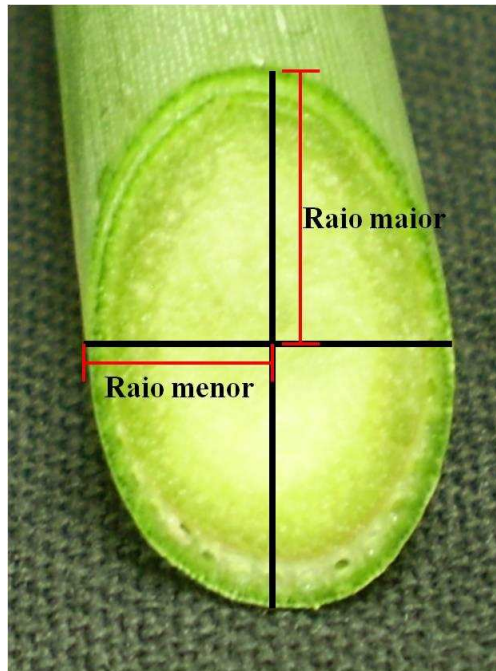
### **2.5.3 Comprimento das sépalas e brácteas**

O comprimento das brácteas e das sépalas do primeiro florete aberto foi avaliado no momento da montagem do experimento, com o auxílio de uma régua.

### **2.5.4 Massa fresca e área de absorção da base**

A massa fresca média (g) das hastes colhidas com os 3 diferentes diâmetros foi determinada com auxílio de balança e a secção de absorção da base dessas hastes, calculada conforme a fórmula abaixo, utilizando paquímetro para medição dos raios da base (Figura 2):

$$\text{Área de uma elipse} = \pi * \text{raio maior} * \text{raio menor}$$



**Figura 2.** Exemplo da medição dos raios da base das hastes de *Strelitzia reginae* para cálculo da área de absorção de água

## 2.6 Escurecimento e atividade da peroxidase

### 2.6.1 Coloração e análise visual

Alterações na coloração da base das hastes que não sofreram o corte da base foram avaliadas utilizando o colorímetro (Colortec PCM Minolt). Valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , croma ( $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ) e ângulo hue ( $h^\circ = \text{artg } b^*/a^*$ ) foram registrados.

Diariamente, foi observada a base dessas hastes, avaliando-se o escurecimento como resultado da atividade de enzimas oxidativas.

### 2.6.2 Extração e ensaio enzimático da peroxidase

O material vegetal utilizado para a determinação da atividade enzimática da peroxidase para as hastes que não sofreram o corte da base foi coletado no dia 0 e no último dia de vaso. Para as hastes que sofreram o corte periódico da base, a coleta do material foi realizada nos dias 0, 2, 4, 6 e 8. Para isso, secções de 2 cm da base de cada haste foram retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , para posterior análise. Para extração da POD, 10 mL do tampão de extração (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, acrescido de bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M) foi adicionado a 2 gramas de material vegetal. Em seguida, o material foi triturado em politron até obtenção de

uma massa homogênea, que foi filtrada em 2 camadas de gazes, e centrifugada a 17000 g, por 30 min, a 4 °C (Neves, 2003). O sobrenadante obtido da centrifugação foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e quantificação de proteína (Bradford, 1976).

Para a determinação da atividade enzimática da peroxidase, foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação, contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 5,0) e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%) completando-se para 3 mL de reação. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 470 nm, a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (Neves, 2003).

## **2.7 Delineamento experimental**

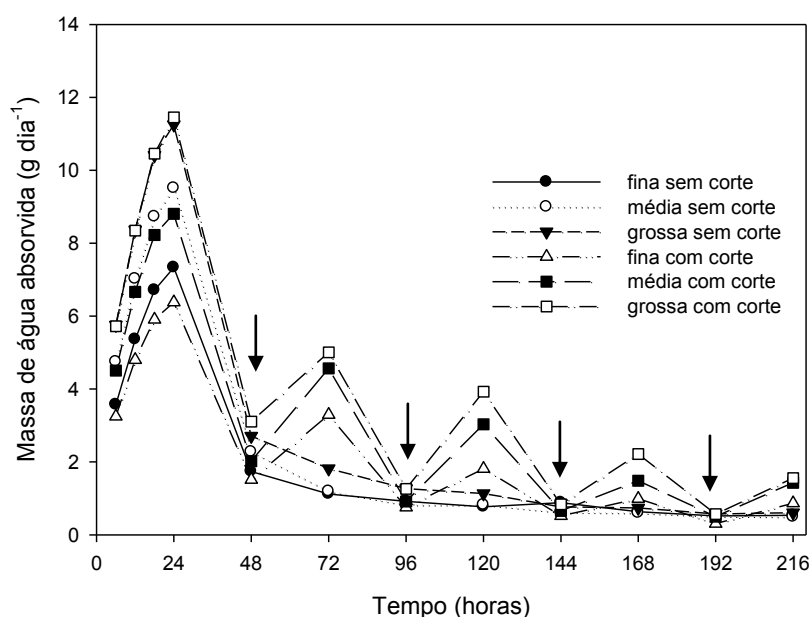
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os teores de açúcares e amido, a longevidade, o tamanho da sépala e da bráctea, a massa fresca média, a área da base da haste e a atividade enzimática da POD, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SISVAR. Para as demais análises, utilizou-se a estatística descritiva.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Relações hídricas**

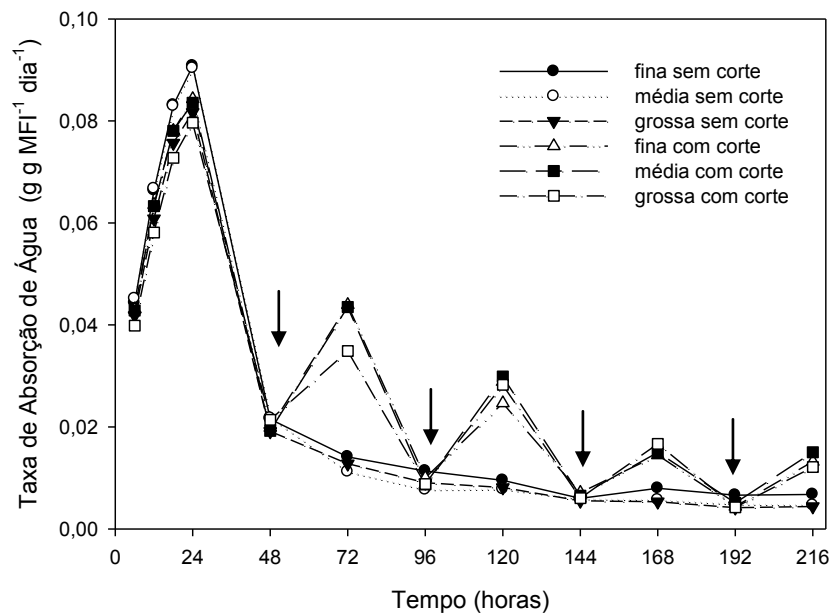
A taxa de absorção de água normalmente é expressa em gramas de água absorvida por haste por dia. Nesse experimento, ao expressarmos dessa forma, as hastes mais grossas absorvem muito mais água do que as hastes finas (Figura 3), uma vez que essas também apresentam uma área de absorção da base (área em contato com a água) muito maior que as demais (Tabela 5). No entanto, como existe uma grande diferença de massa entre os diferentes diâmetros das hastes, optou-se em expressar os resultados em gramas de água por grama de massa fresca inicial por dia. Dessa forma, padronizou-se a taxa de absorção, e a diferença de massa deixou de ter influência. Nesse caso, a taxa de absorção de água para as hastes finas, médias e grossas são semelhantes, e as maiores taxas de absorção ocorreram nas primeiras 24 h (Figura 4). Inflorescências de *Viburnum tinus*, colhidas em três diferentes estádios

de maturidade, apresentam aumentos na taxa de absorção de água até o quarto dia de vaso (Darras et al., 2010).



**Figura 3.** Massa de água absorvida ( $\text{g dia}^{-1}$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base

Hastes que tiveram as bases cortadas periodicamente apresentaram aumentos nas taxas de absorção de água no dia após o corte, ou seja, o corte da base da haste restabeleceu, pelo menos em parte, o fluxo de água entre o vaso e os tecidos vasculares (Figura 4). Em hastes de *Grevillea*, o corte da base diariamente para remoção de 2 cm da parte final aumentou a absorção de água dessas durante toda a vida de vaso se comparado com as hastes não cortadas. Além disso, o corte proporcionou maior potencial hídrico e conteúdo de água nas inflorescências nos primeiros quatro dias de vaso (He et al., 2006).

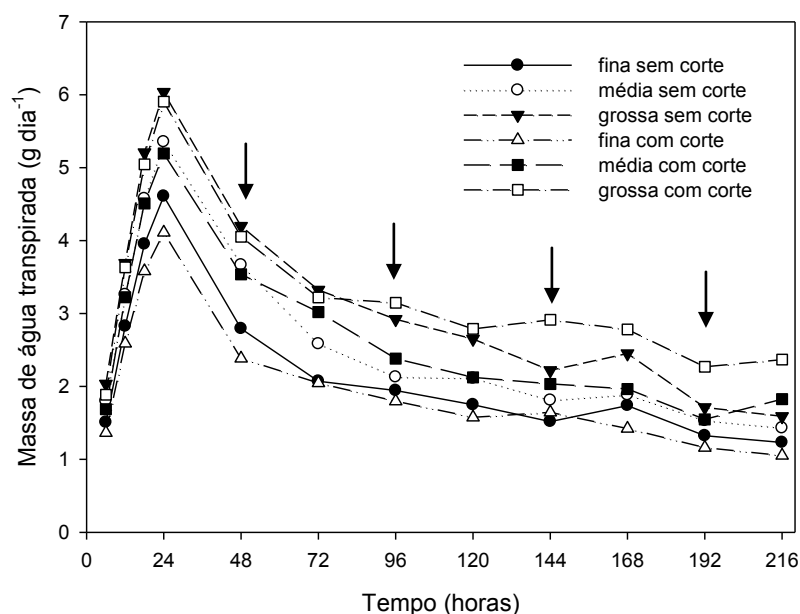


**Figura 4.** Taxa de absorção de água ( $\text{g g de massa fresca inicial}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ou não ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base

A taxa de absorção de água das flores de corte depende da condutância hidráulica nos condutos da haste e na diferença do potencial hídrico entre a água do vaso e os tecidos da flor. O potencial hídrico dos tecidos da flor de corte é por sua vez, afetado pela perda de água devido à transpiração, e também pelos processos que levam ao alongamento celular, especialmente o crescimento das pétalas das flores durante a abertura (van Meeteren e van Gelder, 1999). A condutividade hidráulica do sistema de transporte de água no xilema depende da condutividade hidráulica no lúmen do conduto e da condutividade das conexões entre os condutos. O diâmetro e o comprimento dos condutos e como eles são interconectados determina as propriedades hidráulicas de um sistema vascular (Nijse et al., 2001)

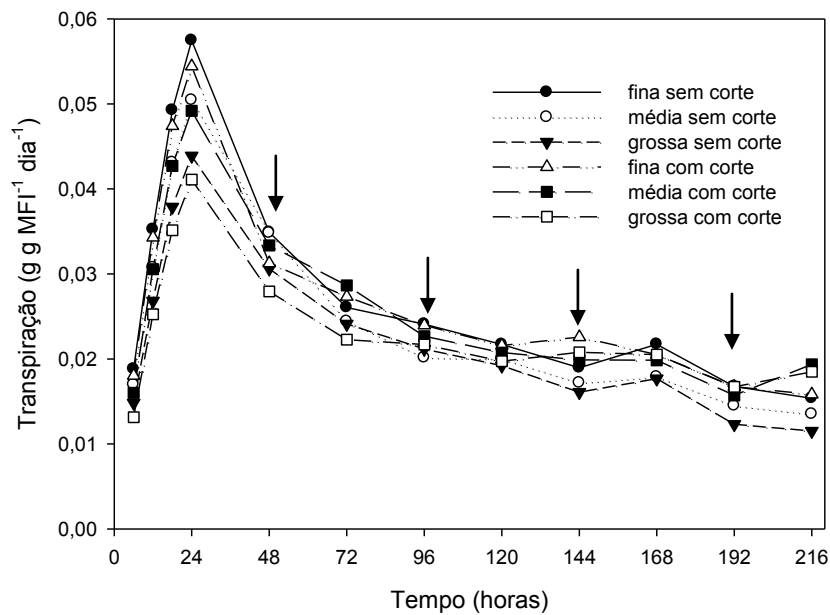
Para as análises de transpiração, quando essas foram expressas em gramas de água por dia, hastes mais grossas apresentaram maior transpiração (Figura 5), resultado esse já esperado, uma vez que a superfície transpiracional das hastes é superior a das demais. Quando a transpiração é expressa por grama de massa fresca inicial, as taxas de transpiração das hastes finas, médias e grossas são idênticas, principalmente a partir de 48 h, independentemente de as hastes terem sofrido o corte

da base (Figura 6). Nas primeiras horas de experimento, existe uma relação inversa entre a transpiração e o diâmetro da haste. Hastes mais finas apresentam maior transpiração, enquanto hastes mais grossas apresentam menor transpiração (Figura 6).



**Figura 5.** Massa de água transpirada ( $\text{g dia}^{-1}$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base

Em flores de *Iris*, van Doorn et al. (1995) encontraram que o decréscimo da absorção de água pelas hastes ocorre antes do murchamento das tépalas, e que as quedas na absorção são maiores que as da transpiração, o que faz com que o balanço hídrico se torne negativo antes do murchamento das pétalas. Resultados semelhantes também foram encontrados em hastes de ave-do-paraíso, em que as quedas na absorção de água entre 24 e 48 h foram muito maiores do que as quedas na transpiração nesse período (Figuras 4 e 6).

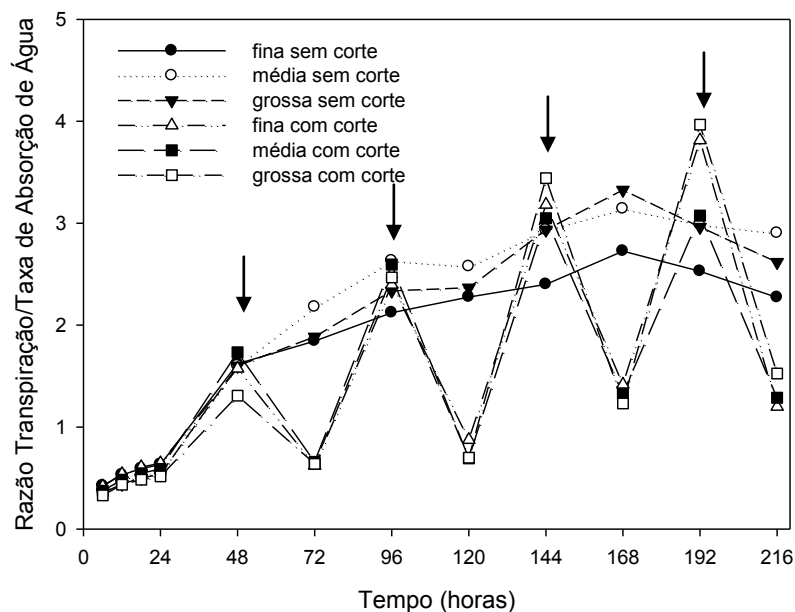


**Figura 6.** Transpiração ( $\text{g g de massa fresca inicial}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base

A razão transpiração/absorção de água (TR/TAA) é um bom indicativo do balanço hídrico. Para as hastes que não sofreram o corte da base, a razão TR/TAA é praticamente constante e semelhante nas primeiras 24 h nas hastes com os 3 diferentes diâmetros (Figura 7). A partir desse período, têm-se aumentos na razão, alcançando-se valores máximos com 168 h, sendo de 2,7, 3,1 e 3,3 para hastes finas, médias e grossas respectivamente (Figura 7). Hastes que sofreram o corte da base periodicamente exibiram oscilações na razão TR/TAA de água. No dia que se segue ao corte, a relação TR/TAA é baixa, seguida de aumento nas próximas 24 h (Figura 7). A queda na razão TR/TAA é explicada pelos aumentos na TAA observados no dia após o corte (Figura 4).

O estresse hídrico é função do conteúdo de água na colheita, e as taxas de absorção de água e perdas de água após a colheita, sendo que em flores de antúrio, os sintomas de estresse hídrico aparecem quando o balanço entre as perdas por transpiração e a absorção de água (razão TR/TAA) excede 1,5 (Elibox e Umaharam, 2010). Em ave-do-paraíso, hastes que não sofreram os cortes da base apresentam valores da razão TR/TAA superiores a 1,5 já com 48 h, sendo em hastes que sofreram o corte da base periodicamente, mesmo apresentando altos valores da razão

no dia em que um novo corte é realizado, no dia seguinte, os valores ficam iguais ou abaixo de 1,5 até o último dia de vaso (Figura 7).

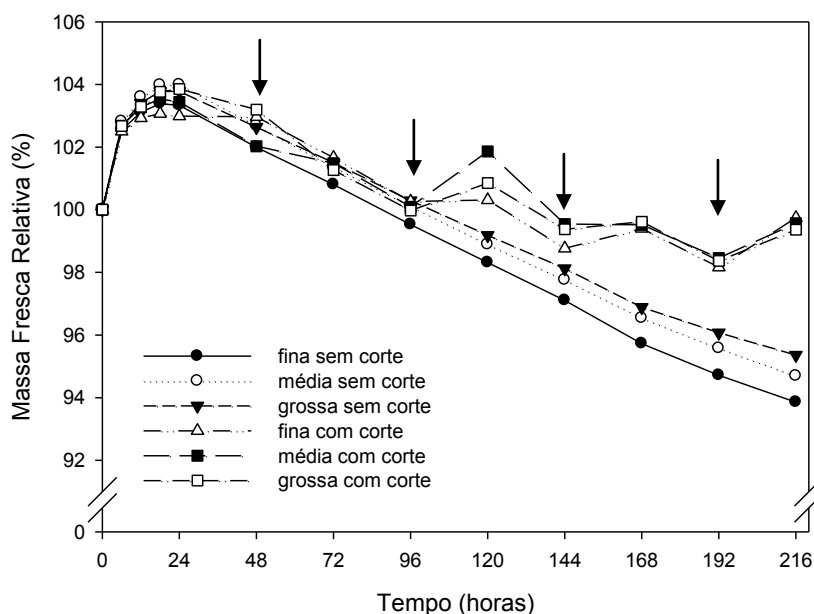


**Figura 7.** Razão taxa de transpiração/taxa de absorção de água ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros distintos (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base.

A massa fresca relativa foi semelhante para as hastes com os diferentes diâmetros, independentemente da realização do corte, nas primeiras 96 h de experimento, apresentando valores máximos com 18 ou 24 h (Figura 8). A partir desse período, hastes que sofreram o corte a cada 48 h apresentaram maiores valores de massa fresca relativa até o final do experimento, desenvolvendo um balanço hídrico negativo, após 144 h de experimento (Figura 8). Hastes finas que não sofreram o corte da base desenvolveram balanço hídrico negativo com 96 h de experimento, enquanto nas hastes médias e grossas este foi observado com 120 h (Figura 8). Os maiores valores de massa fresca relativa nas hastes que sofreram o corte da base a cada 2 dias se deve as maiores taxas de absorção de água apresentadas por essas hastes ao longo de toda a vida de vaso (Figura 4).

Em inflorescências de *Viburnum tinus*, colhidas em três estádios de maturidade, aumentos na massa fresca relativa foram observados somente no primeiro dia de vaso (Darras et al., 2010). Para inflorescências de *Dendrobium*,

reduções nos valores de massa fresca relativa foram observadas a partir do quinto dia de vaso (Rattanawisalanin et al., 2003). Hastes de crisântemo, colocadas em água logo após o corte, desenvolvem balanço hídrico negativo após aproximadamente 3 dias de vaso (van Doorn e Cruz, 2000).



**Figura 8.** Massa fresca relativa (%) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. ↓ Indica o novo corte da base.

Os diferentes diâmetros de hastes parecem não influenciar nos parâmetros de relações hídricas, apresentando esses comportamentos semelhantes, sendo que, somente o corte da base que proporcionou melhoras nas relações hídricas das hastes.

### 3.2 Conteúdo de carboidratos

No momento da colheita, os teores de AST e AR, foram maiores para as hastes grossas e médias diferindo das hastes finas. Em brácteas e floretes, esses foram mais abundantes nas hastes finas (Tabela 1 e 2). No final da vida de vaso, os teores dos AST e AR nas hastes que sofreram cortes periódicos mostraram-se o inverso do observado nas hastes que não tiveram a base cortada, nas três partes da planta avaliada. Enquanto nas hastes em que as bases foram cortadas a cada 48 h os teores de açúcares solúveis totais e redutores foram maiores nas hastes grossas, e nas hastes sem corte, maiores concentrações foram encontrados em hastes finas.

Maiores quedas nos teores de AST e AR foram encontrados nas brácteas, que apresentaram ao final do experimento teores variando entre 15 e 50% das concentrações iniciais, dependendo do diâmetro da haste e da presença ou não do corte da base (Tabela 1). Em sépalas de flores de *Delphinium*, a concentração de todos os carboidratos solúveis decresceu durante o primeiro dia após a colheita, permanecendo baixo após esse período (Ichimura et al., 2000).

**Tabela 1.** Teores de açúcares solúveis totais (AST) na matéria fresca (%) avaliados em haste, bráctea e florete de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas), no momento da colheita e no último dia de vaso (com a presença ou ausência do corte periódico da base da haste)

AST (% MF)	Haste	Bráctea	Florete
	<i>Dia 0</i>		
Fina	1,23 ± 0,06 B*	1,48 ± 0,06 A	1,98 ± 0,08 A
Média	1,55 ± 0,02 A	1,42 ± 0,05 A	1,77 ± 0,06 A
Grossa	1,57 ± 0,03 A	1,25 ± 0,07 B	1,43 ± 0,06 B
CV (%)	6,84	10,70	9,79
	<i>Último dia de vaso - hastes sem corte</i>		
Fina	0,93 ± 0,04 A	0,72 ± 0,05 A	1,71 ± 0,12 A
Média	0,84 ± 0,07 A	0,59 ± 0,05 A	1,31 ± 0,08 B
Grossa	0,70 ± 0,03 B	0,45 ± 0,03 B	1,10 ± 0,04 B
CV (%)	16,64	18,80	15,63
	<i>Último dia de vaso - hastes com corte a cada 48 h</i>		
Fina	0,74 ± 0,05 B	0,39 ± 0,04 A	0,75 ± 0,06 B
Média	0,74 ± 0,04 B	0,52 ± 0,08 A	0,98 ± 0,09 A
Grossa	1,06 ± 0,06 A	0,59 ± 0,04 A	1,14 ± 0,07 A
CV (%)	14,45	26,07	19,00

\* Médias seguidas pelo erro padrão da média. Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, em 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Mapeli et al. (2009) ao estudarem o metabolismo de carboidratos em estruturas florais de *Epidendrum ibaguense* colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, encontraram em flores colhidas totalmente abertas, que o conteúdo de açúcares redutores reduziu-se de 1,41% no dia 0, para 0,65% no último dia de vaso (6° dia). Em ave-do-paraíso, reduções nos teores de AR de floretes também

foram encontradas após 9 dias de vaso, sendo essas mais intensas em hastes que tiveram as bases cortadas periodicamente (Tabela 2). A redução nos níveis de AR durante a vida pós-colheita, segundo Mapeli et al. (2009), indica que estes estão sendo utilizados em processos anabólicos, tais como a respiração, visando o fornecimento de energia para a continuidade do desenvolvimento. Sood et al. (2006) observaram tendência contrária nos teores de AR em pétalas de duas espécies de rosa, sendo a quantidade estimada destes açúcares maiores em flores senescentes em comparação aos demais estádios de desenvolvimento.

**Tabela 2.** Teores de açúcares redutores (AR) na matéria fresca (%) avaliados em haste, bráctea e floretes de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas), no momento da colheita e no último dia de vaso (com a presença ou ausência do corte periódico da base da haste)

AR (% MF)	Haste	Bráctea	Florete
<i>Dia 0</i>			
Fina	1,21 ± 0,05 B*	1,35 ± 0,05 A	1,67 ± 0,05 A
Média	1,61 ± 0,02 A	1,05 ± 0,06 B	1,38 ± 0,06 B
Grossa	1,51 ± 0,06 A	0,84 ± 0,06 C	1,27 ± 0,07 B
CV (%)	7,90	12,49	10,32
<i>Último dia de vaso - hastes sem corte</i>			
Fina	0,97 ± 0,04 A	0,54 ± 0,02 A	1,56 ± 0,13 A
Média	0,80 ± 0,09 B	0,43 ± 0,04 B	0,98 ± 0,08 B
Grossa	0,66 ± 0,04 B	0,32 ± 0,04 C	0,72 ± 0,08 B
CV (%)	18,41	18,99	21,74
<i>Último dia de vaso - hastes com corte a cada 48 h</i>			
Fina	0,73 ± 0,03 B	0,19 ± 0,02 B	0,41 ± 0,03 A
Média	0,79 ± 0,04 B	0,33 ± 0,08 A	0,60 ± 0,08 A
Grossa	1,18 ± 0,04 A	0,37 ± 0,03 A	0,57 ± 0,07 A
CV (%)	9,84	40,45	28,13

\* Médias seguidas pelo erro padrão da média. Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, em 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Na maioria das flores de corte, é comum os níveis de açúcares nas pétalas serem relativamente elevados por ocasião do murchamento e senescência das flores, aparentando não haver escassez de carboidratos por parte dos órgãos florais para

manter a respiração das pétalas (Dias-Tagliacozzo et al., 2005). No entanto, deve-se levar em consideração que muitos destes açúcares podem estar compartimentalizados e, portanto não estar disponíveis as mitocôndrias (van Doorn, 2001).

Os teores de ANR nas hastes não foram detectáveis, independentemente do diâmetro da haste e do período de avaliação; nas demais partes da planta, os ANR foram encontrados, em concentrações muito mais baixas que as de açúcares redutores (Tabela 2 e 3). Esses resultados sugerem que a glicose e a frutose podem ser os principais açúcares a serem translocados, como foi sugerido por Adachi et al. (2000), que encontraram baixas concentrações de sacarose em capítulos e hastes de crisântemo 'Seiun'. Botões e flores abertas de *Paeonia lactiflora* também apresentaram baixos níveis de sacarose ao longo da vida de vaso, sendo os principais açúcares detectados nessa espécie a glicose e a frutose (Walton et al., 2010).

No momento em que o experimento foi montado, maiores teores de ANR nas brácteas foram encontrados nas hastes grossas, sendo 1,3 e 2,9 vezes maiores que das hastes médias e finas respectivamente (Tabela 3). Nos floretes, maiores teores de ANR foram encontrados em hastes de diâmetro médio > fino > grosso (Tabela 3). A quantidade de ANR nas brácteas de hastes finas praticamente não foi alterada entre o momento em que o experimento foi montado e o último dia de vaso, independentemente da ocorrência do corte da base, enquanto nas hastes médias e grossas, o ANR diminuiu (Tabela 3). No florete, o teor de ANR nas hastes grossas, no último dia de vaso, aumentou 2,9 e 4,1 vezes em hastes sem corte e com corte da base, respectivamente, com relação ao dia em que o experimento foi montado (Tabela 3). Mapeli et al. (2009) encontraram aumentos de 1,7 vezes nos teores de ANR em estruturas florais de *Epidendrum ibaguense* do dia 0 até o dia 6.

Ranwala e Miller (2009), avaliando o metabolismo de carboidratos de flores de tulipa durante a vida de vaso, encontraram no momento em que o experimento foi montado, que o açúcar mais abundante nas tépalas e segunda folha das hastes de tulipa foram a glicose, seguidos pela sacarose e a frutose. Durante a vida de vaso, a concentração da glicose nas tépalas diminuiu constantemente, alcançando 20% do nível inicial após 6 dias. A concentração de sacarose caiu fortemente nos 3 primeiros dias e depois permaneceu constante, enquanto a concentração de frutose não foi alterada. Na segunda folha das hastes, a concentração de glicose e frutose não mudou durante a vida de vaso, enquanto a de sacarose reduziu 50%.

**Tabela 3.** Teores de açúcares não redutores (ANR) na matéria fresca (%) em haste, bráctea e floretes de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas), no momento da colheita e no último dia de vaso (com a presença ou ausência do corte periódico da base da haste).

ANR (% MF)	Haste	Bráctea	Florete
<i>Dia 0</i>			
Fina	Nd	0,15 ± 0,02 C*	0,32 ± 0,03 B
Média	Nd	0,33 ± 0,02 B	0,42 ± 0,01 A
Grossa	Nd	0,43 ± 0,02 A	0,14 ± 0,03 C
CV (%)		16,89	21,62
<i>Último dia de vaso - hastes sem corte</i>			
Fina	Nd	0,16 ± 0,02 A	0,15 ± 0,07 A
Média	Nd	0,18 ± 0,01 A	0,33 ± 0,12 A
Grossa	Nd	0,10 ± 0,01 B	0,41 ± 0,01 A
CV (%)		24,65	64,36
<i>Último dia de vaso - hastes com corte a cada 48 h</i>			
Fina	Nd	0,21 ± 0,02 A	0,37 ± 0,02 B
Média	Nd	0,17 ± 0,02 A	0,38 ± 0,04 B
Grossa	Nd	0,20 ± 0,02 A	0,58 ± 0,03 A
CV (%)		21,18	18,2

\* Médias seguidas pelo erro padrão da média. Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, em 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. nd - não detectável

Os teores de amido nas hastes e brácteas no dia 0 foram maiores em hastes médias e grossas, que diferiu das hastes finas, enquanto no florete o comportamento foi o inverso, sendo maior nas hastes finas (Tabela 4). A quantidade de amido aumentou no último dia de vaso em todas as partes das plantas Analisadas, para os diferentes diâmetros e para a presença ou não do corte da base, com relação ao dia 0, sendo mais acentuado em brácteas e floretes (Tabela 4). O acúmulo de amido nas flores senescentes também foi observado por Mapeli et al. (2009), em inflorescências de *Epidendrum*. Segundo os autores, o acúmulo de amido indica que não está mais ocorrendo degradação do mesmo nesse órgão, possivelmente porque não ocorre mais expansão celular, tornando-se então órgão fonte.

**Tabela 4.** Teores de amido na matéria seca (%) avaliados na haste, bráctea e floretes de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas), no momento da colheita e no último dia de vaso (com a presença ou ausência do corte periódico da base da haste).

Amido (% MS)	Haste	Bráctea	Florete
<i>Dia 0</i>			
Fina	7,94 ± 0,49 B*	9,39 ± 0,46 B	11,82 ± 0,40 A
Média	11,20 ± 0,28 A	11,42 ± 0,57 A	10,36 ± 0,71 B
Grossa	10,18 ± 0,79 A	10,95 ± 0,53 A	9,35 ± 0,19 B
CV (%)	14,09	12,16	11,30
<i>Último dia de vaso - hastes sem corte</i>			
Fina	9,67 ± 0,15 B	14,36 ± 0,13 A	18,44 ± 0,68 A
Média	11,94 ± 0,39 A	14,81 ± 0,56 A	16,84 ± 0,48 A
Grossa	12,12 ± 0,10 A	14,84 ± 0,45 A	15,18 ± 0,38 B
CV (%)	5,42	7,08	7,67
<i>Último dia de vaso - hastes com corte a cada 48 h</i>			
Fina	10,19 ± 0,31 B	14,58 ± 0,50 A	15,71 ± 0,37 B
Média	12,54 ± 0,50 A	14,10 ± 0,78 A	17,64 ± 0,59 A
Grossa	12,63 ± 0,40 A	15,24 ± 0,18 A	16,86 ± 0,33 A
CV (%)	8,48	9,18	6,52

\* Médias seguidas pelo erro padrão da média. Em cada dia de avaliação, letras iguais na coluna não diferem entre si, em 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

A formação de uma flor depende do suprimento de carboidratos. Antes da colheita, inflorescências são abastecidas com carboidratos provenientes da fotossíntese. Após alcançar a inflorescência, esses assimilados são distribuídos entre os vários botões florais. A intensidade da luz utilizada na pós-colheita é usualmente muito baixa, e a produção de carboidratos pela fotossíntese em flores de corte geralmente é negligenciável. Assim a quantidade de carboidratos em flores de corte é limitada e a competição entre botões em desenvolvimento dentro da inflorescência parece acontecer (van der Meulen-Muisers et al., 2001).

Em algumas espécies de flores de corte, os carboidratos presentes na flor sugerem um aumento na durabilidade pós-colheita desta, entretanto para outras espécies, os carboidratos presentes nas flores não são suficientes para suprir o

metabolismo da haste floral após o corte, podendo os carboidratos ser translocados das folhas para a flor (Marissen, 2001).

Uma flor em desenvolvimento atua como um dreno ativo que requer um fornecimento contínuo de carboidratos, que vão servir como fonte de energia, “blocos de construção” para síntese da parede celular e para manter o potencial osmótico (Ranwala e Miller, 2009). A taxa do fluxo de carboidratos da fonte para o dreno é relacionada com as taxas de atividades de enzimas como a invertase. A hidrólise do amido armazenado está provavelmente associada com a abertura de flores, à medida que o decréscimo do potencial hídrico favorece o influxo de água para os tecidos da flor e promove o alargamento celular (Sood et al., 2006).

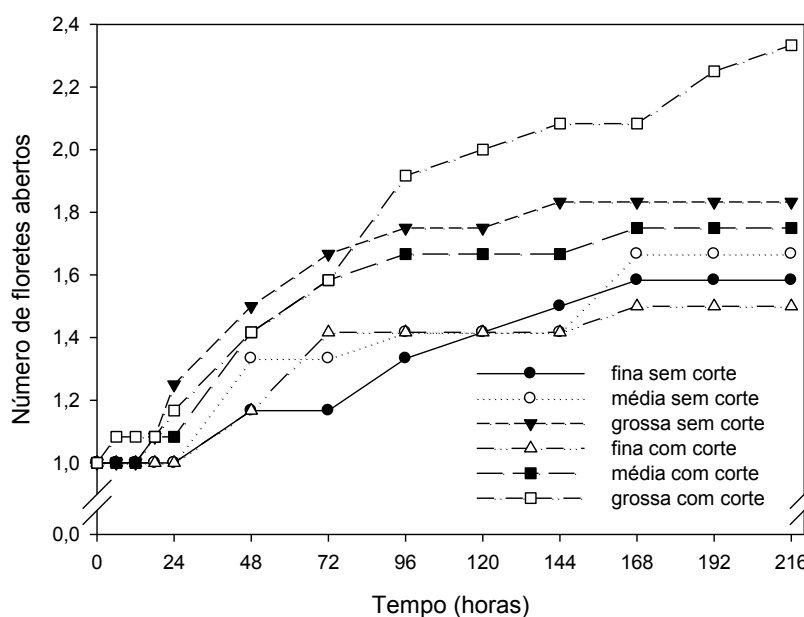
De uma forma geral, as hastes mais grossas apresentam uma maior quantidade de carboidratos, principalmente no último dia de vaso, e nas hastes que sofreram o corte da base. A maior concentração de AST, principalmente de AR, nesse período, em todas as porções avaliadas das hastes grossas, combinado com o corte da base da haste periodicamente, causou um ambiente favorável para o fluxo de água. O acúmulo de carboidratos nessas porções, possivelmente faz com que o potencial hídrico dos tecidos diminua. A diferença de potencial hídrico gerado entre o interior da haste e o meio externo, combinado com o restabelecimento da capacidade da haste de absorver água, causada pelo corte da base, faz com que a água atinja os tecidos das hastes, principalmente na bráctea, onde um novo florete se desenvolve. A pressão hidrostática gerada dentro das células provoca a expansão celular, e a abertura de um novo florete pode ocorrer.

### **3.3 Características inerentes às hastes e floretes**

Existem duas importantes características em flores de corte que são (I) a habilidade de abertura dos botões florais após a haste ter sido colhida e (II) e a manutenção de uma vida de vaso razoável das flores abertas (Walton et al., 2010).

A abertura de floretes nas hastes de ave-do-paraíso que sofreram ou não o corte da base está presente na figura 9. Independentemente do corte da base, observou-se que, quanto mais grossa é a haste, maior é a abertura de floretes, e a abertura do segundo florete nessas hastes parece ocorrer mais rapidamente que nas demais. Hastes que não sofreram o corte da base apresentaram abertura média de 1,6, 1,7 e 1,8 floretes para hastes finas, médias e grossas respectivamente, enquanto que

nas hastes em que os cortes das bases foram realizados a cada 48 h, a média foi 1,5, 1,8 e 2,3 floretes para estes mesmos diâmetros de hastes (Figura 9).

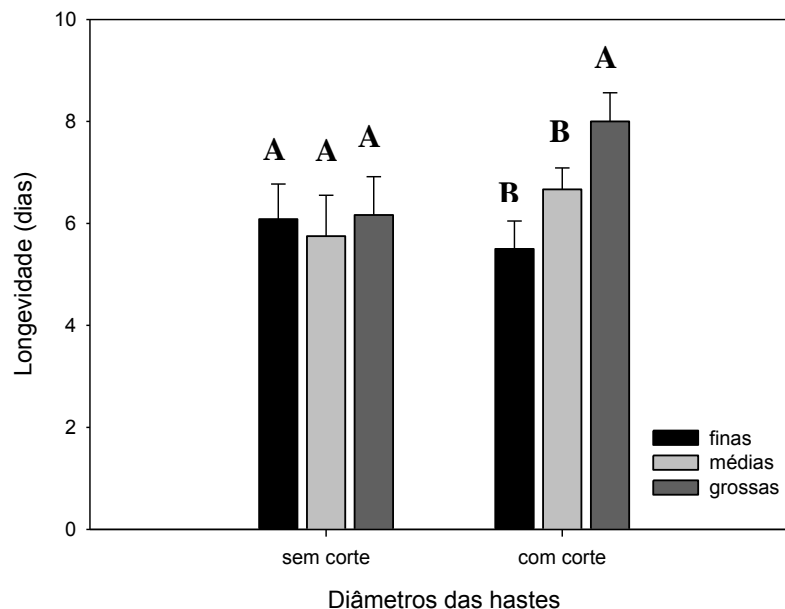


**Figura 9.** Número de floretes abertos ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h

Pelos resultados encontrados para a abertura de floretes combinados com os encontrados em os teores de carboidratos, pode-se sugerir que é necessária uma combinação de fatores para que se tenha a abertura de novos floretes. Hastes finas, que não sofreram o corte da base, apresentaram no final do experimento maiores teores de AST e AR, na haste, bráctea e florete em comparação às hastes médias e grossas (Tabela 1 e 2). No entanto, essas hastes exibiram grandes reduções na capacidade de absorver água já nas primeiras horas de experimento (Figura 4), possivelmente como resultado de um bloqueio xilemático. Ou seja, é irrelevante somente a haste apresentar quantidades significativas de carboidratos nos tecidos, se o fluxo de água ao longo da haste está interrompido.

A longevidade das hastes intactas não apresentou diferenças significativas nas hastes com os 3 diferentes diâmetros, sendo de 6,1, 5,8 e 6,2 para hastes finas, médias e grossas respectivamente (Figura 10). Já nas hastes com a base cortada a cada 2 dias, maior longevidade foi encontrada para as hastes grossas (8 dias), que diferiu estatisticamente das demais (Figura 10). Em *Grevillea*, a vida de vaso das

flores foi prolongada com o corte diário da base da haste, passando de 4,3 em hastes não recortadas para 6,3 dias em hastes com corte da base diariamente (He et al., 2006).



**Figura 10.** Longevidade (dias) de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), submetidas ao corte da base a cada 48 h. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais dentro na presença ou ausência de corte não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

O término da vida de vaso de muitas flores é caracterizado pelo murchamento. O murchamento é geralmente causado por um desbalanço entre a absorção de água pelas hastes e a perda de água via transpiração a partir de suas folhas ou outros órgãos, mesmo que as hastes sejam mantidas na água continuamente (van Doorn, 1997). Os sintomas da senescência de ave-do-paraíso incluem a dessecação do florete e o escurecimento da bráctea, sendo o término da vida pós-colheita dessa espécie considerada quando o último florete seca e quando a base da bráctea escurece e as folhas se enrolam (Jaroenkit e Paull, 2003).

O tamanho das brácteas e das sépalas do primeiro florete aberto, a massa fresca e a área da base das hastes foram avaliadas no momento após a colheita, e estão presentes na tabela 5. Quanto mais grossa a haste, maiores são as brácteas e a sépalas dos floretes, sendo que o tamanho das brácteas das hastes médias e grossas

foi estatisticamente superior a das hastes finas, enquanto os tamanhos das sépalas, nas hastes grossas apresentaram-se maior, diferindo das demais (Tabela 5). A massa fresca e a área da base mostraram-se proporcionais ao diâmetro da haste, sendo as médias superiores às finas, e as grossas superiores às médias (Tabela 5).

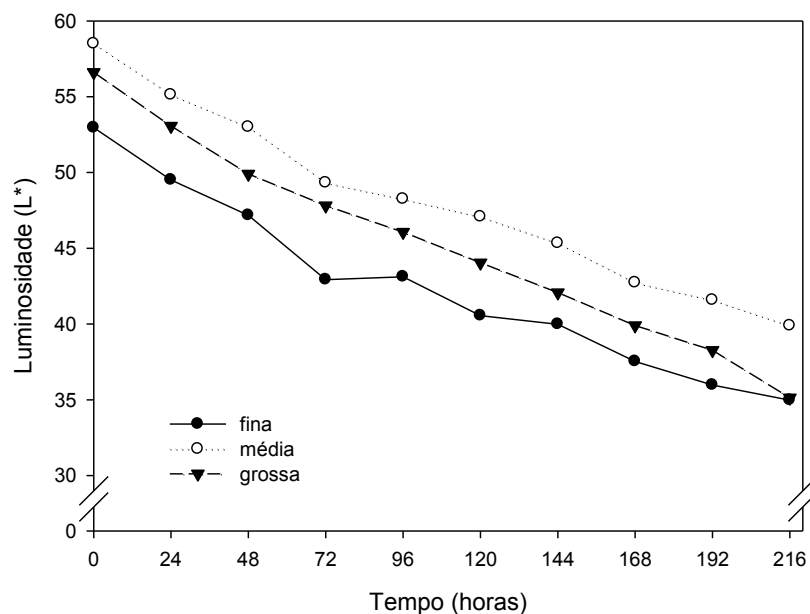
**Tabela 5.** Tamanho médio da bráctea e sépala, massa fresca média e área média da base de hastes de ave-do-paraíso colhidas com três diferentes diâmetros (finas, médias e grossas)

Diâmetro haste	Bráctea (cm)	Sépala (cm)	Massa Fresca (g)	Área da base
Fina	18,2 ± 0,4 B*	11,0 ± 0,3 B	78,3 ± 2,0 C	48,8 ± 2,9 C
Média	19,6 ± 0,4 A	11,4 ± 0,2 B	105,5 ± 1,8 B	68,4 ± 3,1 B
Grossa	20,7 ± 0,3 A	12,1 ± 0,3 A	140,9 ± 4,7 A	106,4 ± 5,3 A
CV (%)	6,96	8,28	9,96	18,33

\* Médias seguidas pelo erro padrão da média. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.4 Escurecimento e atividade da peroxidase

Entre os parâmetros cromáticos avaliados, o que melhor representou o escurecimento da base das hastes foi o L\*, luminosidade. Nas hastes que não sofreram o corte da base, os valores de L\* encontrados ao longo da vida de vaso estão presentes na figura 11. A luminosidade nos três diferentes diâmetros de hastes foram semelhantes, com queda gradual nos valores de L\* com o passar dos dias. A luminosidade vai de valores que variam entre 100 (totalmente branco) até 0 (totalmente preto). Quedas nos valores de L\* indicam o escurecimento ocorrido nos tecidos da base da haste, como foi também observado em análise visual (Figuras 11 e 12). Após 9 dias de vaso, as hastes apresentaram escurecimento similar em suas bases, independentemente do seu diâmetro, sendo que em algumas hastes esse escurecimento manifestou-se mais nas bordas ou em pequenas manchas (Figura 12), o que dificultou a quantificação com o colorímetro.



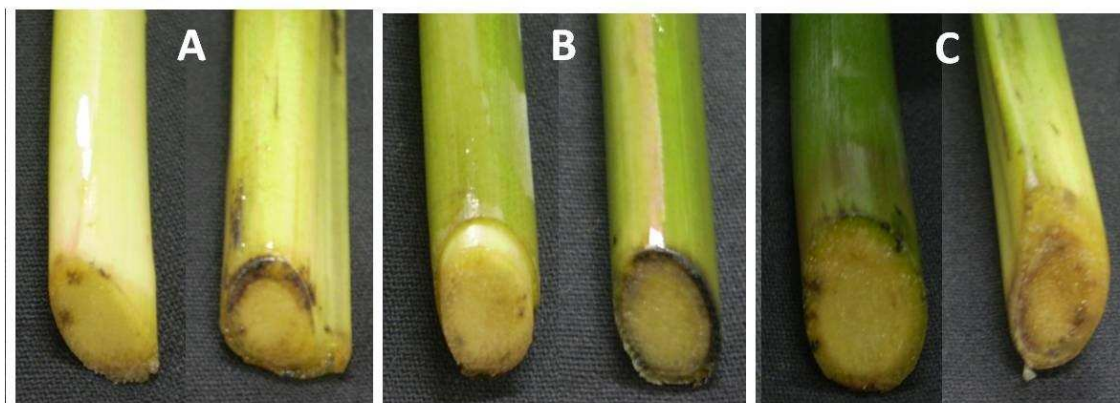
**Figura 11.** Luminosidade ( $L^*$ ) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), que não sofreram o corte da base a cada 48 h

A atividade da POD nas hastes que não sofreram o corte da base foi avaliada no dia 0 e no último dia de vaso. No momento em que o experimento foi montado, maior atividade da POD foi encontrada nas hastes grossas que diferiu dos valores das demais hastes (Figura 13), sendo essa 3,5 vezes maiores que a das hastes finas e 2,6 vezes maior que das hastes médias. No último dia de experimento (9 dias), a atividade dessa enzima não diferiu entre os 3 diâmetros de hastes, sendo de 89,6, 96,9 e 87,5 UA/min/mg de proteína, para hastes finas, médias e grossas respectivamente (Figura 13).

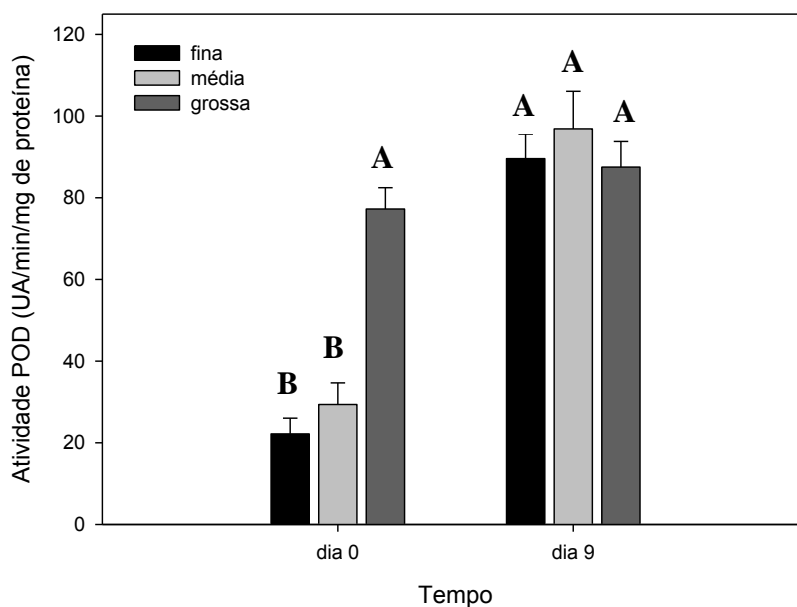
Em hastes em que os cortes foram realizados a cada 48 h, a atividade da POD só diferiu estatisticamente no momento em que o experimento foi montado, sendo maior nas hastes grossas (Figura 14). No demais dias de avaliação observou-se uma grande variação na atividade da POD entre as repetições dentro dos tratamentos, e por isso diferenças estatísticas não foram encontradas, apesar de as hastes finas e médias mostrarem atividades semelhantes e mais baixas que das hastes grossas nos dias 2, 6 e 8 (Figura 14).

O dano mecânico causado em tecidos vegetais aumenta a expressão de numerosos genes e estimula a atividade de várias enzimas, entre elas a peroxidase

(Lagrimini, 1991). A peroxidase ataca um ou mais grupos hidroxil de uma variedade de substâncias químicas, incluindo fenóis extracelulares. Esta enzima está envolvida na fase final de polimerização de monolignóis na biossíntese de lignina e parecem ser também requisito para a síntese de suberina (Passardi et al., 2005).

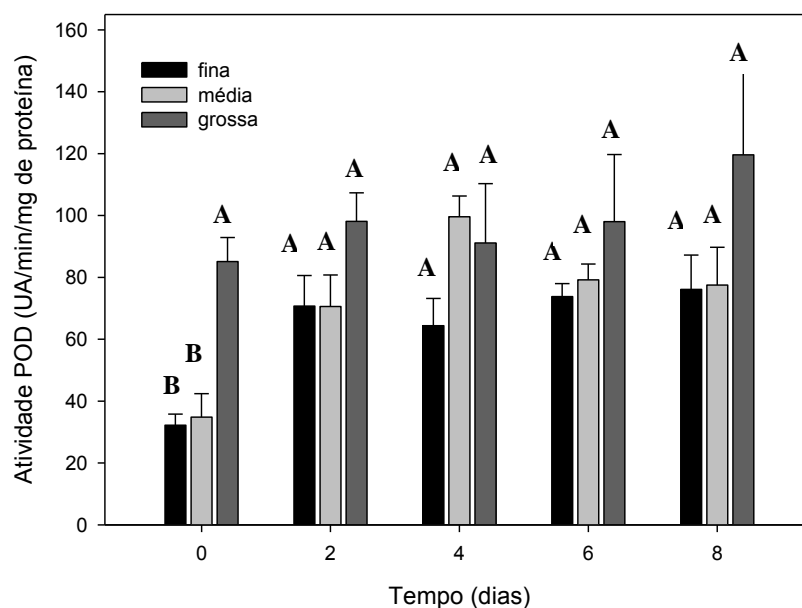


**Figura 12.** Aspecto das bases das hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (A - finas, B - médias e C - grossas), que não sofreram o corte da base durante a vida de vaso, após 9 dias



**Figura 13.** Atividade da POD (UA/min/mg de proteína) nos dias 0 e 9, de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas), que não sofreram o corte periódico da base. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais dentro de cada dia não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

Hastes mais grossas parecem mais lignificadas que as demais. Conhecendo-se o envolvimento da POD na biossíntese de lignina, as maiores atividades dessa enzima encontradas nas hastes grossas podem ser justificadas devido a este fato, ou seja, hastes grossas podem apresentar maior atividade da POD por serem mais lignificadas. Para a confirmação dessa hipótese, análises de teores de lignina precisam ser realizadas.



**Figura 14.** Atividade da POD (UA/min/mg de proteína) ao longo da vida de vaso de hastes de *Strelitzia reginae* colhidas com três diâmetros (finas, médias e grossas) e que sofreram cortes da base a cada 48 h. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais dentro de cada dia não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

#### 4. CONCLUSÕES

As hastes colhidas com diferentes diâmetros apresentam diferenças nos teores de carboidratos, na atividade da POD, na abertura de floretes e no tamanho das flores. Quando os cortes da base foram realizados, diferenças foram encontradas também nas relações hídricas e na longevidade das hastes. Para que se tenha maior abertura de floretes e, conseqüentemente, maior longevidade das flores, é necessária a combinação do uso de hastes mais grossas, que apresentem maiores conteúdos de

açúcares, combinados com a técnica do corte periódico da base, o que proporcionou às hastes a energia e o turgor necessário para a abertura de novos floretes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, M.; Kawabata, S.; Sajiya, R. 2000. Effects of temperature and stem length on changes in carbohydrate content in Summer-grown CUT chrysanthemus during development and senescence. **Postharvest Biology and Technology**. 20, 63-70.

Armitage, A. M.; Laushman, J. M. 2003. **Specialty cut flowers**. 2 ed. Portland.Cambridge: Timber Press. 586p.

Bachmann, J. 2006. **Specialty cut flower production and marketing**. ATTRA – National Sustainable Agriculture Information Service. 36 p.

Barbosa, J. G.; Alvarenga, E. M.; Dias, D. C. F. S.; Vieira, A. N. 2005. Efeito da escarificação ácida e de diferentes temperaturas na qualidade fisiológica de sementes de *Strelitzia reginae*. **Revista Brasileira de Sementes**. 27, 71-77.

Bayogan, E. R.; Jaroenkit, T.; Paull, R. E. 2008. Postharvest life of Bird-of-Paradise inflorescences. **Postharvest Biology and Technology**. 48, 259-263.

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

Darras, A. I.; Akoumianaki-Ioannidou, A.; Pompodakis, N. E. 2010. Evaluation and improvement of post-harvest performance of cut *Viburnum tinus* inflorescence. **Scientia Horticulturae**. 124, 376-380.

Dias-Tagliacozzo, G. M.; Finger, F. L.; Barbosa, J. G. 2005. Fisiologia pós-colheita de flores de corte. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 11, 88-99.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28, 350-356.

Elibox, W.; Umaharan, P. 2010. Cultivar differences in the deterioration of vase-life in cut-flowers of *Anthurium andraeanum* is determined by mechanisms that regulate water uptake. **Scientia Horticulturae**. 124, 102-108.

Finger, F. L.; Moraes, P. J.; Barbosa, J. G.; Grossi, J. A. S. 2003. Vase life of bird-of-paradise flowers influenced by pulsing and term of cold storage. **Acta Horticulturae**. 628, 863-867.

He, S.; Joyce, D. C.; Irving, D. E.; Faragher, J. D. 2006. Stem end blockage in cut *Grevillea* 'Crimson Yul-lo' inflorescences. **Postharvest Biology and Technology**. 41, 78-84.

Ichimura, K.; Kohata, K.; Goto, R. 2000. Soluble carbohydrates in *Delphinium* and their influence on sepal abscission in cut flowers. **Physiologia Plantarum**. 108, 307-313.

Jaroenkit, T.; Paull, R. E. 2003. Postharvest handling of *Heliconia*, red ginger and bird-of-paradise. **HortTechnology**. 13, 259-266.

Karsten, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*)**. 117p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Lagrimini, L. M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiology**. 96, 577-583.

Mapeli, A. M. 2009. **Influência de substâncias preservativas, anti-etilênicas e da refrigeração na conservação pós-colheita de flores de *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae)**. 106 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Marissen, N. 2001. Effects of pre-harvest light intensity and temperature on carbohydrate levels and vase life of cut roses. **Acta Horticulturae**. 543, 331-343.

Marques, A. E. 2008. **Estudos sobre o bloqueio do xilema na pós-colheita das inflorescências de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae* Aiton)**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

McCready, R. M.; Guggolz, J.; Silveira, V.; Owens, H. S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Journal of Analytical Chemistry**. 22, 1156-1158.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry**. 153, 375-380.

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

Nijssen, J.; van der Heijden, G. W. A. M.; van Ieperen, W.; Keijzer, C. J.; van Meeteren, U. 2011. Xylem hydraulic conductivity related to conduit dimensions along chrysanthemum stems. **Journal of Experimental Botany**. 25, 319-327.

Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. 2005 Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**. 24, 255-265.

Ranwala, A. P.; Miller, W. B. 2009. Comparison of the dynamics of non-structural carbohydrate pools in cut tulip stems supplied with sucrose or trehalose. **Postharvest Biology and Technology**. 52, 91-96.

Rattanawisalanon, C.; Ketsa, S.; van Doorn, W. G. 2003. Effect of aminooxyacetic acid and sugars on the vase life of *Dendrobium* flowers. **Postharvest Biology and Technology**. 29, 93-100.

Sood, S.; Vyas, D.; Nagar, P. K. 2006. Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. **Scientia Horticulturae**. 108, 390-396.

van der Meulen-Muisers, J. J. M.; van Oeveren, J. C.; van der Plas, L. H, W.; van Tuyl, J. M. 2001. Postharvest flower development in Asiatic hybrid lilies as related to tepal carbohydrates status. **Postharvest Biology and Technology**. 21, 201-211.

van Doorn, W. G. 1997. Water relations of cut flowers. **Horticultural Reviews**. 18, 1-85.

van Doorn, W. G. 2001. Role of soluble carbohydrates in flowers senescence: a survey. **Acta Horticulturae**. 543, 179-183.

van Doorn, W. G.; Cruz, P. 2000. Evidence for a wounding-induced xylem occlusion in stems of cut chrysanthemum flowers. **Postharvest Biology and Technology**. 19, 73-83.

van Doorn, W. G.; Harkema, H.; Song, J. S. 1995. Water relations and senescence of cut Iris flowers: effects of cycloheximide. **Postharvest Biology and Technology**. 5, 345-351.

van Meeteren, U.; van Gelder, H. 1999. Effect of time since harvest and handling conditions on rehydration ability of cut chrysanthemum flowers. **Postharvest Biology and Technology**. 16, 169-177.

Walton, E. F.; Boldingh, H. L.; McLaren, G. F.; Williams, M, H; Jackman, R. 2010. The dynamics of starch and sugar utilization in cut peony (*Paeonia lactiflora* Pall) stems during storage and vase life. **Postharvest Biology and Technology**. 58, 142-146.

## CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados experimentais obtidos pode-se perceber que:

1. A peroxidase solúvel e de parede apresentam atividade similar no extrato bruto de hastes de ave-do-paraíso, no entanto suas propriedades cinéticas são diferentes.

2. Apesar de existir diferentes tratamentos que podem ser aplicados com o objetivo de prolongar a vida de vaso de ave-do-paraíso, nem todos são eficientes.

3. A utilização de solução de pulsing contendo inibidores enzimáticos e pH ácido, ou substâncias fenólicas não foram eficientes em prolongar a longevidade das flores de ave-do-paraíso.

4. Maior longevidade das flores de ave-do-paraíso foi observada em hastes grossas que sofreram corte periódico de suas bases.