

CAMILLA MENDES PEDROZA

**PERFIL DE ISOENZIMAS E ATIVIDADE DA PEROXIDASE E
POLIFENOLOXIDASE EM PALMITO DE PUPUNHA MINIMAMENTE
PROCESSADO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P372p
2013
Pedroza, Camilla Mendes, 1988-
 Perfil de isoenzimas e atividade de peroxidase e
 polifenoloxidase em palmito de pupunha minimamente
 processado / Camilla Mendes Pedroza. – Viçosa, MG, 2013.
 xi, 45f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Rolf Puschmann.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Palmito - Processamento. 2. Peroxidase.
3. Polifenoloxidase. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 634.9745

CAMILLA MENDES PEDROZA

**PERFIL DE ISOENZIMAS E ATIVIDADE DA PEROXIDASE E
POLIFENOLOXIDASE EM PALMITO DE PUPUNHA MINIMAMENTE
PROCESSADO**

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

APROVADA: 26 de março de 2013.

Milton Edgar Pereira Flores
(Coorientador)

Anderson Adriano Martins Melo

Rolf Puschmann
(Orientador)

A Deus.
Aos meus pais Gilson e Kika.
Ao meu Tio Marcelo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por TUDO que me tem proporcionado durante toda a minha vida.

Aos meus pais Francisco Gilson Pedroza e Maria do Carmo Mendes Pedroza, pelo amor incondicional, pela compreensão, confiança e pelo incentivo em todos os momentos vividos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de crescimento.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Rolf Puschmann, pela sua disponibilidade e orientação.

Aos meus amigos doutores Milton Pereira-Flores e Anderson Adriano, pelo grandioso auxílio no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Fernando Finger, por todos os ensinamentos e pela compreensão.

A Geraldo Magela, pela doação do palmito; e ao José Maria, pela prontidão e ajuda.

Aos meus irmãos Greicyanne e Henrick, pelo carinho, pela compreensão e torcida em todos os momentos.

Aos meus familiares, em especial ao meu tio Marcelo Mendes, pelo apoio, incentivo e pela confiança; e aos meus primos Marden Neto, Ariadne e Marina, por terem-se feito presentes mesmo distantes.

Ao meu noivo Jalceyr Pessoa, por todo o amor, pelo companheirismo, pela paciência e pelo incentivo.

Aos meus queridos amigos Aline, Ana Carla, Ana Paula, Bruno, Cristiane, Diego, Eduardo Medina, João Henrique, Kelem, Laise, Lorena, Marcela, Marcelo, Moryb, Nancy, Priscila, Paula, Renatinha, Regiane, Rusthon, Stephania e Tania, pelo companheirismo e por todos os momentos de descontração compartilhados.

Aos Professores Elizanilda e Mailson, por toda força e pelo incentivo.

Aos estagiários Emerson Simão e Gilmara Rodrigues, pela ajuda.

Às minhas “irmãs” em Viçosa Naysa, Mayana e Glenda, por estarem sempre presentes.

A todos os professores e funcionários da UFV, em especial aos do Departamento de Biologia Vegetal, por terem contribuído para a minha formação e crescimento; e a todos que contribuíram para a construção deste trabalho – MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

CAMILLA MENDES PEDROZA, filha de Francisco Gilson Pedroza e Maria do Carmo Mendes Pedroza, nasceu em 14 de outubro de 1988, na cidade de Sousa, Estado da Paraíba.

Em dezembro de 2010, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba.

Em fevereiro de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da Dissertação em março de 2013.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 1	7
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ISOENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE, PEROXIDASE E XIQUIMATODESIDROGE- NASE EM PORÇÕES DO PALMITO CAULINAR E FOLIAR DE PUPUNHA (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	7
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	10
<i>Obtenção de palmito e preparo de amostras</i>	10
<i>Extração e atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase</i>	11
<i>Compostos fenólicos solúveis totais</i>	12
<i>Perfil isoenzimático da peroxidase, polifenoloxidase, xiquimatodesidrogenase por eletroforese em amido</i>	12
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
<i>Atividade enzimática</i>	15

	Página
<i>Compostos fenólicos solúveis totais</i>	17
<i>Perfil isoenzimático</i>	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	29
EFEITO DO METABISSULFITO DE SÓDIO NA CONSERVAÇÃO REFRIGERADA DE RODELAS DE PALMITO DE PUPUNHA.....	29
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
<i>Material vegetal</i>	31
<i>Processamento mínimo</i>	31
<i>Cor instrumental</i>	32
<i>Extração e atividade da peroxidase e polifenoloxidase</i>	33
<i>Compostos fenólicos solúveis totais</i>	33
<i>Carotenoides totais</i>	34
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
<i>Cor instrumental</i>	35
<i>Atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase</i>	38
<i>Fenólicos solúveis totais</i>	40
<i>Carotenoides totais</i>	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

RESUMO

PEDROZA, Camilla Mendes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Perfil de isoenzimas e atividade da peroxidase e polifenoloxidase em palmito de pupunha minimamente processado.** Orientador: Rolf Puschmann. Coorientador: Anderson Adriano Martins Melo.

Foi caracterizada a atividade específica das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), bem como o perfil isoenzimático das enzimas POD, PPO e xiquimato desidrogenase (SKDH) e os compostos fenólicos solúveis totais de três regiões do palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) nomeadas: Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar, Região 2 = região meristemática e Região 3 = porção do palmito nobre contíguo à região meristemática. A região meristemática apresentou as maiores médias de atividade enzimática da POD e PPO. O perfil isoenzimático revelou uma isoforma da POD e PPO e duas da SKDH, em todas as regiões, com maiores expressões também na região meristemática, na qual foi encontrada maior concentração de compostos fenólicos. Rodelas de palmito nobre da porção contígua à região meristemática foram minimamente processadas e tratadas com metabissulfito de sódio 0,5% e conservadas a 5 °C por 11 dias. Avaliaram-se a cor instrumental, atividade enzimática da POD e PPO e os compostos fenólicos solúveis totais. A aplicação do metabissulfito de sódio 0,5% reduziu a atividade enzimática da POD e da PPO em 35 e 70%, respectivamente, durante o período de conservação, e aumentou o teor de compostos fenólicos solúveis, implicando não oxidação desses

compostos. Variações na coordenada b^* foram observadas entre o 7º e o 11º dia no palmito não tratado, evidenciando tendência ao amarelecimento da superfície das rodela, sem aumento na sua concentração de carotenoides. Não foi notada variação na coordenada L^* durante todo o período de conservação das rodela não tratada e tratada com metabissulfito de sódio, evidenciando-se a ausência de escurecimento. Conclui-se que a ausência de escurecimento do palmito de pupunha está associada à natural e reduzida atividade enzimática da POD e PPO e à presença de uma única isoenzima da POD e PPO. O amarelecimento do tecido pode implicar evidência visual da oxidação dos substratos fenólicos pelas enzimas POD e PPO, todavia a ser verificada experimentalmente.

ABSTRACT

PEDROZA, Camilla Mendes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Isoenzyme profile and activity of peroxidase and polyphenol oxidase in minimally processed ‘Pupunha’ heart-of-palm.** Adviser: Rolf Puschmann. Co-Adviser: Anderson Adriano Martins Melo.

The specific activities of peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) were characterized and the isoenzyme profile of POD, PPO and shikimate dehydrogenase (SKDH) and total soluble phenolics assessed for three regions of heart of palm (*Bactris gasipaes* Kunth.) named: Region 1 = 2nd internode of palm stem, region 2 = meristematic section, and region 3 = section of the palm contiguous to the meristematic tissues named ‘noble’ portion or ‘heart’. It was observed that the meristematic region had the highest levels of POD and PPO activities. The isoenzyme profiles revealed one isoform of POD and PPO and two of SKDH, in all regions, with the highest expressions also in the meristematic region, where phenolic compounds were found in higher concentration. Slices of the noble portion were minimally processed, treated with 0.5% sodium metabisulfite and stored at 5 °C for 11 days. Instrumental color, enzymatic activity of POD and PPO and total soluble phenolic compounds were evaluated. The addition of 0.5% sodium metabisulfite reduced the activities of POD and PPO by 35% and 70%, respectively, during the cold storage period and increased the content of soluble phenolic compounds not involving oxidation of these compounds. Variations in coordinate b* were observed

from the 7th to the 11th day in the untreated slices, showing tendency to surface yellowing, however no increase in carotenoid levels was observed. Variations in the L^* value were not observed throughout the storage period in either treated or untreated slices, showing no browning. It is concluded that the absence of browning in Pupunha heart-of-palm is associated with the presence of a single isoenzyme of POD and PPO, and the reduced activity of these enzymes. The yellowing of the tissue surface at the later storage period could involve visual evidence of reactions other than oxidation of phenolic substrates by enzymes POD and PPO, however to be verified experimentally.

INTRODUÇÃO GERAL

O palmito é uma iguaria fina de grande aceitação no mercado brasileiro, extraído de diversas espécies de palmeiras. Alguns fatores fazem que uma espécie seja preferida a outra, como a abundância, palatabilidade, cor, formato, rendimento e facilidade de extração e ausência de compostos tóxicos. Devido à alta taxa de exploração de palmeiras do gênero *Euterpe* e ao relativo baixo poder de regeneração presente nesta espécie, há atualmente falta de produto de boa qualidade que tenha completado seu ciclo de desenvolvimento. Logo, palmeiras mais precoces e que produzam palmito adequado às exigências do mercado têm sido buscadas para suprir essa procura, entre as quais tem merecido destaque a pupunheira (BOVI, 1997).

O cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) surge como opção para atender à demanda do mercado, por apresentar características desejáveis quanto ao seu cultivo e qualidade do palmito produzido (RAMOS *et al.*, 2004). Fornece ainda frutos comestíveis de sabor agradável e alto valor nutritivo, destacando-se elevados teores de caroteno, proteína e gordura (VERRUMA-BERNARDI *et al.*, 2003). Devido ao seu alto valor nutritivo, os frutos da pupunheira podem ser utilizados na alimentação humana e animal, tornando-se, assim, cultura de elevado potencial econômico (MORETTI, 2001).

Diversas palmeiras proporcionam palmito comestível de valor comercial, mas pesquisas com o palmito de pupunha têm-se intensificado devido às vantagens econômicas: ser planta arbórea e perene; ser cultivo de caráter conservacionista e por minimizar os efeitos da erosão, podendo restabelecer a fertilidade do solo, através do

manejo dos resíduos de colheita; apresentar maior rendimento por árvore; primeira colheita mais rápida; perfilhamento da planta-mãe, permitindo cortes nos anos subsequentes; apresenta escurecimento enzimático significativamente menor; sabor adocicado e textura macia, o que contribui para a aceitação no mercado. Quando comparado com outras espécies, é importante alternativa agroecológica para diversificação da produção e fonte de renda (CHAIMSOHN *et al.*, 2002).

O sucesso da pupunheira como produtora de palmito se deve às suas características de precocidade, elevada produtividade e capacidade de adaptação. A produção da planta é contínua durante todo o ano e o crescimento é rápido com o primeiro corte no segundo ano, não necessitando de reposição anual do plantio (VERRUMA-BERNARDI *et al.*, 2003).

O processamento do palmito, mesmo sendo mínimo, promove a destruição de parte dos tecidos superficiais, facilitando a contaminação por microrganismos, além de provocar a liberação de enzimas e de seus substratos, propiciando a ocorrência de reações enzimáticas que podem alterar as características sensoriais dos produtos (CLEMENT *et al.*, 1999). O aumento da atividade de algumas enzimas do metabolismo vegetal como catalase, peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase pode causar o aparecimento de odores estranhos, escurecimento do tecido e lignificação da parede celular, diminuindo a qualidade do produto (HARD, 2000).

Entre as enzimas mais estudadas da deterioração vegetal, podem-se destacar as oxidoredutases peroxidase e polifenoloxidase, cuja principal relação com as alterações pós-colheita diz respeito a mudanças indesejáveis na cor, sabor e aroma dos produtos vegetais.

A peroxidase (POD; peróxido de hidrogênio oxidoredutase E.C.1.11.1.7) é largamente encontrada nos vegetais. Juntamente com a catalase, a peroxidase tem papel na redução da concentração de peróxido de hidrogênio na célula, uma espécie reativa de oxigênio que causa danos às membranas celulares. Sua importância na conservação da qualidade sensorial evidencia-se pelas relações com alterações indesejáveis na qualidade dos vegetais, tornando-se necessária sua supressão parcial ou total na pós-colheita (SCANDALIOS, 1969; KAMIMURA, 2006).

As peroxidases (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), geralmente em resposta a estresses biótico e abiótico (VEITCH, 2004). A enzima pode existir na forma solúvel ou ligada à membrana, e as extracelulares atuam na parede das células, participando da biossíntese de lignina e suberina (van HUYSTEE, 1987).

A polifenoloxidase (PPO; monofenol, di-hidroxifenilalanina: O₂ oxidoreductase EC 1.14.18.1) é uma enzima capaz de oxidar compostos fenólicos com o auxílio do oxigênio molecular, tendo como produtos finais as quinonas (KOBELITZ, 2008), que rapidamente se condensam, formando pigmentos escuros insolúveis, as melaninas, ou reagem não enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, formando também melaninas (ARAÚJO, 2011).

Em vegetais, a PPO parece não estar restrita a um órgão em particular. Sua atividade enzimática em diferentes vegetais varia enormemente com a espécie e cultivar, e sua localização na célula depende da espécie, idade e maturidade (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). A PPO está presente em todos os estágios de desenvolvimento da planta, porém sua atividade é mais elevada nos frutos mais jovens e após uma injúria mecânica ou ataque microbiano (YORUK; MARSHALL, 2003).

Estudos citoquímicos forneceram evidências de que a PPO é uma enzima localizada em uma série de plastídios variados: plastídios de raízes, amiloplastos de tubérculos de batata, plastídios epidérmicos, plastídio de cultura de tecido de cenoura, etioplasto, cromoplastos e cloroplastos (HUTTERMANN *et al.*, 2001); essa enzima tem sido associada à membrana do tilacoide no cloroplasto (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; YORUK; MARSHALL, 2003).

Os substratos da ação dessas enzimas são os compostos fenólicos ou polifenóis. Esses compostos bioativos são largamente distribuídos no reino vegetal e considerados metabólitos secundários, constituindo, portanto, um componente comum da dieta humana. Podem ser definidos como um grupo bastante diversificado de substâncias que possuem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila ou outros grupos funcionais, como ésteres, glicosídeos e outros, em que os mais importantes são os ácidos fenólicos (cafeico, clorogênico, ferúlico, gálico, *p*-cumárico), os flavonoides (antocianinas, flavanas, flavonas, flavononas, flavonóis, isoflavonas) e os taninos (ESCARPA *et al.*, 2001). Para a ciência dos alimentos, é importante o papel dos compostos fenólicos na qualidade sensorial e nutricional dos produtos vegetais, além da sua capacidade de atuação na fisiologia e

bioquímica dos vegetais, como crescimento, escurecimento enzimático, proteção a patógenos, atuação contra raios ultravioleta e outras condições de estresse que podem interferir na pós-colheita (ESCARPA *et al.*, 2001; RICE-EVANS *et al.*, 1997; TUCK *et al.*, 2002).

A biossíntese de fenóis envolve duas vias, a do malonato/acetato ou a do ácido xiquímico (ou xiquimato). A via do xiquimato, que ocorre em plantas superiores, pode ser dividida em três partes: 1) condensação de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato e subsequente ciclização e produção de ácido xiquímico, através da xiquimato desidrogenase (SKDH; Xiquimato: NADP⁺ 3-oxidorreductase EC 1.1.1.25); 2), transformação de xiquimato-3-fosfato em ácido corísmico; e 3) transformação do corismato em outros produtos (SEIGLER, 1998). Entre esses elementos estão os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, os precursores dos fenilpropanoides (TAIZ; ZEIGER 2009). A partir da fenilalanina é formada a maioria das classes de compostos fenólicos secundários nas plantas.

Inibir a atividade da POD e PPO ou suprimir os efeitos da oxidação dos compostos fenólicos é de grande interesse na Ciência de Alimentos, pois as reações promovidas por essas enzimas quando expostas ao oxigênio molecular, juntamente com os seus substratos, alteram a textura, cor, aroma e sabor dos produtos.

Métodos de prevenção da ação dessas enzimas foram desenvolvidos para inibir sua ação ou promover a supressão dos seus substratos. Como exemplos desses métodos, têm a supressão de oxigênio nas embalagens, a acidificação dos produtos, o tratamento térmico (branqueamento) e a aplicação de inibidores químicos (KOBELITZ, 2008), sendo este último o de destaque nesta pesquisa.

Simultaneamente à atividade enzimática, a análise de isoenzimas tem sido empregada em estudos de variabilidade genética entre populações, entre outros. Enzimas que são codificadas por alelos diferentes ou locos gênicos distintos frequentemente possuem mobilidades eletroforéticas diferentes, e essas diferenças são atribuídas a variações na composição de aminoácidos da molécula (ALFENAS, 2006).

Desse modo, o objetivo geral desta pesquisa foi estudar a atividade enzimática e isoenzimática da peroxidase, polifenoloxidase e xiquimato desidrogenase em diferentes partes do palmito de pupunha, bem como durante a conservação refrigerada, sob a ação do metabissulfito de sódio, como inibidor do escurecimento enzimático.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e micro-organismos**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 627 p.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 601 p.

BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 15, p. 183-185, 1997. (Palestra – Suplemento).

CHAIMSOHN, F.P.; MORSBACH, N.; DURIGAN, M.E.; TREITNY, M.R.; GOMES, E.P. **Desenvolvimento de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) Cultivada para Palmito em Diferentes Regiões do Paraná**. Londrina, PR: IAPAR, 2002. 54 p. (IAPAR – Boletim Técnico, 67).

CLEMENT, C.R.; SANTOS, L.A.; ANDRADE, J.S. Conservação de palmito de pupunha em atmosfera modificada. **ACTA Amazônica**, v. 29, n. 3, p. 437-445, 1999.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

HARD, N.F. Características de los tecidos vegetales. In: FENNEMA, O. R. (Dir.). **Química de los alimentos**. [S.l. : s.n.t.], 2000.

HUTTERMANN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 387-394, 2001.

KAMIMURA, G.K.F. **Isolamento, purificação e caracterização da peroxidase de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2006.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, 2008. 242 p.

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

MORETTI, C.L. Processamento mínimo de hortaliças: tendências e desafios. **Horticultura Brasileira**, v. 19, Jul. 2001. (Suplemento – Palestras).

RAMOS, A.; BOVI, M.L.A.; FOLEGATTI, M.V.; DIOTTO, A.V. Efeitos da fertirrigação sobre a produção de palmito da pupunheira. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 734-739, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends plant science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemistry Genetic**, v. 3, p. 37-79, 1969.

SEIGLER, D.S. **Plant secondary metabolism**. Massachussets, EUA: Kluwer Academic Publishers, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Trad. Por Santarém, E.R. et al. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J. Major phenolics compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal Nutricion Biochemistry**, v. 13, p. 636-644, 2002.

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

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

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

VERRUMA-BERNARDI, M.R.; CAVALCANTI, A.C.D.; KAJISHIMA, S. Aceitabilidade do palmito de pupunha. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, 2003.

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

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ISOENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE, PEROXIDASE E XIQUIMATODESIDROGENASE EM PORÇÕES DO PALMITO CAULINAR E FOLIAR DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth)

INTRODUÇÃO

A polifenoloxidase (PPO; EC 1.14.1.7) e a peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) são enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos e pelas alterações na cor e sabor pós-colheita de frutas e hortaliças (VAMOS-VIGYAZO, 1981; MARSHALL *et al.*, 2002; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001).

O escurecimento enzimático é decorrente da oxidação de *o*-difenois e orto-hidroxilação de monofenois e catecois para *o*-quinonas pela atividade PPO. As peroxidases, por sua vez, promovem a oxidação de compostos aromáticos fenólicos na dependência de peróxido de hidrogênio, resultando na formação de pigmentos (SCANDALIOS, 1969; DICKO *et al.*, 2002; KOBLITZ, 2008).

Existe evidência de que o corte de tecidos vegetais promove uma série de eventos bioquímicos que levam ao escurecimento das superfícies cortadas, devido à descompartimentalização celular que permite a reação entre enzimas e substratos. Um evento paralelo às alterações fisiológicas após o corte é a promoção do aumento da atividade da xiquimatodesidrogenase (SKDH) e da fenilalanina amônia-liase (PAL) (DIAZ; MERINO, 1997; SALTVEIT, 2000), ativando a rota dos

fenilpropanoides para a síntese de substratos fenólicos, que poderão reagir com as enzimas oxidativas quando a integridade das membranas for comprometida durante a conservação pós-colheita. Em alguns casos, observou-se também aumento transiente do teor e atividade da PPO e POD (DEGL'INNOCENTI *et al.*, 2007), e o aumento contínuo da atividade dos compostos fenólicos (PICOLI *et al.*, 2010).

A produção de compostos fenólicos em vegetais ocorre a partir da rota do ácido xiquímico, e nessa rota a SKDH catalisa a redução do ácido 3-desidroxiquímico para ácido xiquímico, que após várias reações resulta na síntese de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano (HERMANN, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009). A ação das enzimas oxidativas sobre esses elementos pode resultar na formação de pigmentos, que promovem o escurecimento enzimático dos tecidos.

A atividade das enzimas, dependendo da espécie, pode ser influenciada pela especificidade das suas isoformas para os substratos fenólicos durante a reação catalítica (SCANDALIOS, 1969; HO *et al.*, 1999). Desse modo, a avaliação da atividade enzimática deve, sempre que possível, envolver a análise da expressão das isoformas para melhor caracterização do perfil enzimático e das respostas fisiológicas a estímulos diversos.

A caracterização isoenzimática em *Euterpe edulis* permitiu a diferenciação de indivíduos, as suas estruturas gênicas e o fluxo gênico entre as populações (CONTE, 2004), com base na estrutura polimórfica e variabilidade das isoenzimas. Esse autor encontrou cinco lócus de POD e um da SKDH nas folhas de plântulas, plantas jovens e adultas.

A análise isoenzimática da peroxidase em sementes de três espécies de palmito de *Euterpe espiritossantenses*, *E. oleracea* e *E. edulis* mostraram variabilidade genética interespecífica, assim como a expressão estádio-específico de genes da POD com elevado polimorfismo nos zimogramas (MARTINS *et al.*, 2007).

O palmito utilizado para o processamento mínimo é constituído do palmito caulinar e foliar, sendo este último composto por diferentes tecidos, conforme caracterizado por Fonseca (2012). O caulinar, ou basal, corresponde aos entrenós mais jovens do caule e situa-se na região mais baixa do palmito. O palmito foliar, com diâmetro menor que o basal, abrange os tecidos meristemáticos, da bainha, do pecíolo e dos folíolos em diferentes estádios de desenvolvimento. O palmito nobre, ou coração, fica localizado entre o meristema e o ponto de inflexão do palmito foliar,

sendo tradicionalmente o palmito utilizado pela indústria. A região após o ponto de inflexão é normalmente desconsiderada no processamento industrial, por possuir tecidos em estádios de desenvolvimento mais avançados do que a região anterior (BELLEGARD *et al.*, 2005; FONSECA, 2012).

Na caracterização das diferentes partes do palmito realizada por Fonseca (2012), foram constatadas diferenças fisiológicas, físico-químicas e anatômicas entre as regiões basal (palmito caulinar), mediana (palmito nobre) e apical. Essas diferenças foram atribuídas à composição diversa dos tecidos e seus graus de diferenciação, que condicionaram também diferentes taxas respiratórias e da produção de etileno.

A variabilidade de isoformas da PPO e POD tem sido também encontrada em alface associada a tipos de tecidos e estágio-específicos (CANTOS *et al.*, 2001; FUKUMOTO *et al.*, 2002; PEREIRA, 2010). Nesses estudos foi constatada a falta de correlação entre a atividade enzimática e o escurecimento enzimático e correlação positiva entre determinadas isoenzimas, estágio e tecido-específico e o escurecimento.

A importância da caracterização isoenzimática e sua relação com a atividade enzimática da PPO e POD em palmito minimamente processado se baseiam na possibilidade de relacionar a expressão de determinadas isoformas com o escurecimento dos tecidos em resposta ao corte. Cabe enfatizar que qualquer produto oriundo da região do palmito foliar é composto por vários tipos de tecidos, diferente do palmito caulinar (FONSECA, 2012), e essa composição diversa pode apresentar também variabilidade da atividade enzimática e dos padrões isoenzimáticos da PPO e POD.

Diante disso, objetivou-se com este estudo caracterizar o padrão isoenzimático da PPO, POD e SKDH em diferentes regiões do palmito de pupunha e sua relação com a atividade enzimática da PPO e POD.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de palmito e preparo de amostras

Hastes de estipes de pupunha foram colhidas de plantio comercial no Município de Teixeiras, Minas Gerais, para a obtenção de palmito de pupunha. As coletas das hastes foram realizadas entre os meses de Agosto/2012 e Janeiro/2013 de plantas com altura entre 1,70 e 1,90 m e ponto ótimo de corte (MORA-URPI, 1983; EMBRAPA, 2013).

Após a colheita, as hastes contendo três entrenós visíveis na extensão total do palmito foliar foram transportadas para o Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, onde foram retiradas todas as bainhas de proteção para obtenção do palmito, composto pelo palmito caulinar e foliar.

Amostras do palmito caulinar e foliar foram coletadas após identificar as regiões de estudo (Figura 1), denominando-as Região 1, que compreende o segundo entrenó do palmito caulinar (3 cm, aproximadamente); Região 2, correspondente a toda a região meristemática (3,5 cm, aproximadamente); e a Região 3, composta por quatro rodela de 1,5 cm, aproximadamente, da porção nobre do palmito foliar próxima da região meristemática. De cada região, tomaram-se amostras de tecido contendo cerca de 20 g de material vegetal, as quais foram fracionadas em segmentos de 0,5 cm, congeladas em nitrogênio líquido (-160 °C), liofilizadas por 72 h e conservadas até serem utilizadas na caracterização isoenzimática e nos ensaios de atividade específica das enzimas.

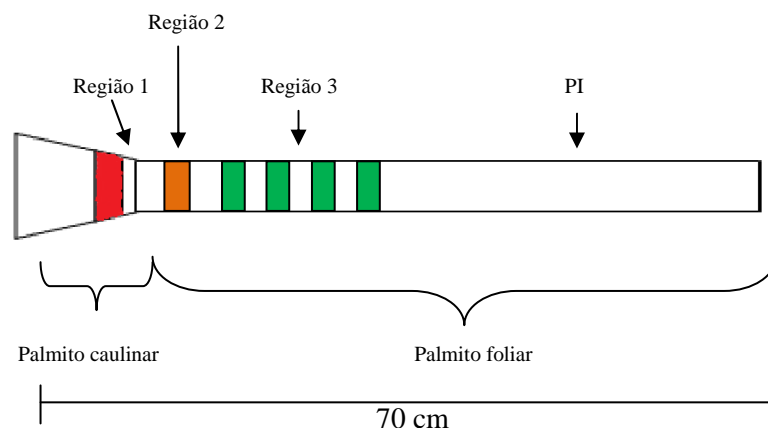


Figura 1 – Localização das regiões amostradas, no palmito de pupunha, para a caracterização da atividade enzimática específica e perfil isoenzimático. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximos da região meristemática. PI = ponto de inflexão.

Extração e atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase

O tampão de extração para a peroxidase (POD) foi composto por tampão-fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M. Para a extração da POD, foram utilizados 4 mL de tampão de extração para 0,1 g de material vegetal liofilizado de cada região. Os tecidos vegetais foram macerados em almofariz até a obtenção de massa homogênea e, então, centrifugada em Eppendorf a 14.000 g por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. O meio de reação foi composto por 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão-fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 0,5 mL de H₂O₂ (1,8%). O volume total do meio de reação foi de 3 mL, considerando os volumes do tampão, do substrato e do extrato enzimático.

O tampão de McIlvaine's 0,1 M, pH 6,8 (Citrato/Fosfato) acrescido de ácido ascórbico 80 mM, 1,5% de Triton X-100 e 1% polivinilpirrolidona (PVP) foi utilizado para extração da polifenoloxidase (PPO). A extração da PPO foi realizada homogeneizando 0,5 g de material vegetal liofilizado adicionado a 5 mL de tampão de extração, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik) por 30 seg. Em seguida, o extrato foi mantido em banho de gelo por 30 min até a filtração e centrifugação a 14.000 g por 30 min, a 4 °C. Para o ensaio

enzimático da PPO, adicionou-se o extrato enzimático ao meio de reação que continha uma mistura contendo 4-metilcatecol (20 mM) em tampão de McIlvaine's, pH 4,8. O volume final de reação foi de 1,5 mL.

A reação enzimática foi avaliada por 2 min, por meio da variação da absorbância no comprimento de onda de 420 nm para a peroxidase a 25 °C e a 395 nm para a polifenoloxidase a 30 °C. A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada por Bradford (1976). A atividade específica foi expressa em UA/min/mg de proteína (NEVES, 2003).

Compostos fenólicos solúveis totais

Compostos fenólicos solúveis totais foram extraídos homogeneizando-se 0,1 g de tecido liofilizado de palmito de pupunha em 10 mL de etanol, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik). O extrato foi centrifugado a 14.000 g, por 30 min, a 22 °C. Foi retirada do sobrenadante uma alíquota de 0,25 mL adicionada de 1,75 mL de Folin-Ciocalteu (diluído 5x em água) e de 1 mL de carbonato de sódio 10% em água (m/v) para reação. Após 30 min de reação, foram obtidas leituras de absorvâncias a 765 nm em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A concentração de fenólicos solúveis totais foi expressa como miligrama de equivalentes de catequina por grama de matéria seca.

Perfil isoenzimático da peroxidase, polifenoloxidase, xiquimatodesidrogenase por eletroforese em amido

Para a extração das enzimas, 2 mL do tampão-fosfato 0,1 M, pH 6,5 + 1% PVP (polivinilpirrolidona), foram adicionados a 0,1 g de material vegetal liofilizado, macerados em almofariz até a obtenção de massa homogênea e, então, centrifugados a 14.000 g por 30 min, a 4 °C. Tiras de papel cromatográfico foram embebidas no sobrenadante, as quais foram revestidas de papel-alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em Eppendorf a -20 °C até a realização da corrida.

O gel foi preparado com amido 12% (ALFENAS, 2006). As tiras de papel contendo as amostras foram colocadas nos géis e, então, se iniciou a corrida inicial a 4 °C, durante 1 h a 16 ampères (A). Logo após, as tiras de papel foram retiradas, e

continuou-se a corrida eletroforética por mais 5 h a 35 A até que o marcador azul de bromofenol atingisse 9 cm de corrida.

A solução-tampão do gel e do eletrodo foram as descritas por Scandalios (1969), tendo a do gel: Tris ($0,0182 \text{ mol L}^{-1}$) 1,84 g; ácido cítrico ($0,008 \text{ mol L}^{-1}$) 0,69 g; dissolvidos em 1.000 mL de água destilada e pH 7,8; e a do eletrodo: ácido bórico ($0,1855 \text{ mol L}^{-1}$) 18,55 g; NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) 4,00 g; dissolvido em 1.000 mL água destilada e pH 8,6.

Finalizada a corrida, o gel foi dividido em três cópias de 2 mm de espessura e imersas em solução específica para revelação das bandas das isoformas das enzimas.

Na revelação da peroxidase, o gel foi incubado na solução contendo tampão acetato 50 mM, pH 5,0, 3-amino-9-etilcarbazol, dimetilformamida, cloreto de cálcio 0,1 M e peróxido de hidrogênio 3%, a 4 °C, até o aparecimento das bandas. Descartou-se a solução e, após a lavagem dos géis em água corrente, procedeu-se à fixação em solução de glicerina 10% por cerca de 12 h, em refrigerador, a aproximadamente 4 °C (ALFENAS, 2006)

Na revelação da polifenoloxidase, o gel foi incubado no escuro em solução contendo tampão-fosfato 0,2 M, pH 6,0 e catecol 30 mM, a 30 °C, durante 2 h. Após esse tempo, a solução foi descartada e o gel, tratado com uma solução de fenilenodiamina 0,1% por 30 min e posteriormente fixada em solução aquosa de glicerol 10%, por 12 h (ALFENAS, 2006).

Na revelação da xiquimatodesidrogenase, o gel foi incubado em solução contendo tampão tris 0,1 M, pH 7,5, ácido xiquímico, NADP⁺, PMS (metossulfato de fenazina) e MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio-brometo) durante 60 min. Após esse tempo, a solução foi descartada e o gel, fixado em solução aquosa de glicerol 10%, por 12 h. Realizou-se o tratamento de conservação e secagem dos géis pelo método do bastidor descrito por Alfenas (2006).

Na análise dos zimogramas, considerou-se o Quantum Level Ratio (razão do nível quântico). Para a análise quantitativa da intensidade e área das bandas das isoformas das enzimas, foram obtidas as QLRs (Quantum Level Ratio) de cada banda com o software MultiGauge V3.0 (FujiFilm) de imagens digitalizadas em relação a uma área mais clara presente no gel de cada zimograma, como padrão de contraste para a cor das bandas. O QLR é a expressão percentual da relação entre a intensidade-área da banda (isoenzima) de uma região branca no gel, denominada padrão de contraste.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três regiões como tratamentos e quatro repetições. Todas as repetições foram medidas três vezes e suas médias, submetidas à análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Sisvar 4.0 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade enzimática

As atividades enzimáticas específicas da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) foram significativamente diferentes nos tecidos das regiões avaliadas (Tabela 1). A Região 2 (meristemática) apresentou maiores valores de atividade específica para ambas as enzimas, seguido da Região 3 (porção do palmito nobre próximo da região meristemática) e Região 1 (2° entrenó), evidenciando-se maiores atividades das enzimas no palmito foliar do que no caulinar.

Tabela 1 – Atividade específica da peroxidase e polifenoloxidase em três diferentes regiões do palmito de pupunha recém-colhido

Tratamentos	(UA/min/mg de proteína)	
	POD	PPO
Região 1	0,25 c	0,22 c
Região 2	1,75 a	0,74 a
Região 3	0,88 b	0,45 b
Média	0,96	0,47
CV (%)	38,23	16,10

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). POD = peroxidase; PPO = polifenoloxidase. Região 1 = 2° entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximas da região meristemática.

Os valores da atividade específica da POD foram maiores às da PPO em 2,4 e 1,9 vezes nas Regiões 2 e 3; na Região 1, foi 1,1. Observou-se a predominância da atividade da POD no palmito foliar.

Os maiores valores de atividade específica da POD e PPO encontradas na Região 2, correspondente à meristemática, podem ser explicados pelo fato de ser uma região com elevada divisão e diferenciação celular comparada com as outras regiões que possuem tecidos já diferenciados.

A atividade específica da POD e da PPO encontrada em palmito de guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) por Carneiro *et al.* (2003) foi 1,5 e 1,3 vez maior no palmito caulinar que no foliar, respectivamente, diferentemente do encontrado neste estudo. Entretanto, em ambos os estudos constatou-se maior atividade específica da POD que da PPO nos tecidos avaliados.

O corte ou herbivoria dos tecidos vegetais aumenta a expressão de genes relacionados com a defesa das plantas, como das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e xiquimatodesidrogenase (OKEY *et al.*, 1997) envolvidas no processo de lignificação, restauração de tecido e síntese de novos substratos fenólicos (KOMBRINK; HAHLBROCK, 1990; TAIZ; ZEIGER, 2009). O aumento da expressão da POD está envolvido no processo de lignificação dos tecidos vegetais (SOARES, 2006). Entretanto, no palmito de pupunha não foi constatada a síntese de lignina nas superfícies cortadas (FONSECA, 2012), implicando atividade da POD, que pode estar relacionada a outros processos nesses tecidos, como na expansão e desintoxicação celular (McADAM *et al.*, 1992), o que pode explicar a maior atividade da POD na região meristemática e nobre do palmito foliar. Maiores taxas respiratórias dos tecidos em ativo crescimento podem levar a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, encontrar-se maior atividade da POD.

A PPO, além de estar envolvida em processos de oxidação dos compostos fenólicos, atua também na proteção e defesa dos tecidos contra estresses ambientais, ataque de patógenos, controle da concentração de oxigênio nos cloroplastos e cicatrização de danos (MAYER, 1987; HEIMDAL *et al.*, 1994; MARSHALL *et al.*, 2002). É também conhecido o aumento da atividade dessa enzima nos tecidos vegetais como resposta ao corte (BOLIN; HUXSOLL, 1991).

A maior atividade das enzimas na região meristemática pode também estar relacionada com estágio de desenvolvimento, visto que existe variabilidade estágio e tecido específico, como observado em alface (PEREIRA 2010).

Embora tenham sido encontradas atividades enzimáticas da POD e PPO, não se observou escurecimento enzimático do material fresco no período desde o corte no campo até o preparo das amostras para congelamento, que levou cerca de 2 h.

Compostos fenólicos solúveis totais

O teor dos compostos fenólicos solúveis foi diferente entre as regiões (Tabela 2), verificando-se maior concentração na região meristemática.

Tabela 2 – Teor de compostos fenólicos de diferentes regiões do palmito pupunha recém-colhido

Tratamentos	Fenólicos (mg D-catq/g MS)
Região 1	0,33 c
Região 2	0,98 a
Região 3	0,57 b
Média	0,55
CV%	29,75

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximas da região meristemática. D-catq = D-catequina.

A maior concentração de compostos fenólicos encontrada na região meristemática pode relacionar-se com o grau de diferenciação, uma vez que existe variabilidade tecido e estágio específico.

A regulação da síntese de compostos fenólicos é parte integrante do desenvolvimento da folha, e a alocação de carboidratos entre o metabolismo primário e secundário tem importante influência sobre a quantidade e variedade de compostos fenólicos produzidos pelas plantas (MATSUKI, 1996).

Os compostos fenólicos totais podem ter variações de concentração nos tecidos, de acordo com as necessidades metabólicas específicas de cada um. A produção de compostos fenólicos através da indução de enzimas da via do xiquimato e o metabolismo fenilpropanoide e de flavonoides é, em geral, uma resposta ao estresse (WEAVER; HERMANN, 1997). Esses compostos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários compostos celulares, particularmente lipídios das membranas (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Perfil isoenzimático

A QLR apresentou diferença significativa entre as regiões estudadas para a POD e SKDH (Tabela 3). Os valores QLR para a POD revelaram que a Região 2 apresentou valores maiores, seguida pelas Regiões 3 e 1, respectivamente. A QLR da PPO mostrou significância igual nas Regiões 1 e 3, diferindo da Região 2, que apresentou maiores valores. AQLR da SKDH revelou diferenças entre as regiões, verificando-se também maiores valores, na Região 2, seguida das Regiões 3 e 1, respectivamente.

Tabela 3 – Razão do Nível Quântico (QLR) em três diferentes regiões de palmito pupunha recém-colhido

Tratamentos	QLR (%)		
	POD	PPO	SKDH
Região 1	5,75 c	6,10 b	5,75 c
Região 2	12,12 a	10,93 a	11,50 a
Região 3	9,62 b	7,90 b	8,12 b
Média	9,16	7,87	8,46
CV (%)	19,57	43,62	27,99

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. POD = peroxidase; SKDH = xiquimatodesidrogenase; PPO = polifenoloxidase. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximos da região meristemática.

As tendências da atividade específica da POD foram confirmadas pela análise da QLR das isoenzimas nas diferentes regiões. Em ambos os tipos de análise, valores maiores foram encontrados na Região 2 (meristemática) e menores nas regiões afastadas em direção da região apical do palmito foliar e do palmito caulinar. Pode-se concluir, por meio dessa comparação, que existe diferença de expressão e atividade da POD nas regiões estudadas.

Nos zimogramas, detectou-se atividade das enzimas nas três regiões do palmito (Figuras 2, 3 e 4). Em geral, o zimograma da SKDH apresentou bandas mais nítidas quando comparado aos da PPO e POD.

O zimograma da POD (Figura 2) apresentou apenas uma banda nas três regiões estudadas, com expressões diferentes das isoformas, variando na intensidade das bandas.

Maior variabilidade de isoformas da POD foi encontrada por Azeqour *et al.* (2002) em clones da palmeira *Phoenix dactylifera* L. cultivados *in vitro*. Esses autores indicaram que essa variação diagnosticada pode estar relacionada ao tipo de tecido que deu origem ao clone, que levou a essas variações na expressão de isoformas da POD, uma vez que, em se tratando de clones, a variabilidade entre eles geralmente é muito baixa.

Diferenças no padrão isoenzimático da POD entre *Euterpe* e *Bactris* foram relatados por Sawasaki *et al.* (1998). Esses autores mostraram que o gênero *Euterpe* apresenta um padrão de 6 a 8 bandas, dependendo da espécie, enquanto o gênero *Bactris* revelou apenas duas bandas. Os dados ainda revelam que as espécies do gênero *Euterpe* tiveram expressão das isoformas em locos gênicos distintos, diferente das espécies do gênero *Bactris* que tiveram expressão em apenas um loco. Pelo menor número de isoformas da POD apresentado, é possível afirmar que espécies do gênero *Bactris* têm menor expressão dessa enzima, quando comparada com as espécies do gênero *Euterpe*.

A presença de cinco locos polimórficos da POD em *Euterpe edulis* foi relatada por Conte (2004), diferentemente do relato da presença de apenas um loco monomórfico neste estudo. Essa diferença confere mais uma confirmação quanto à expressão dessa enzima nos diferentes gêneros de palmeiras.

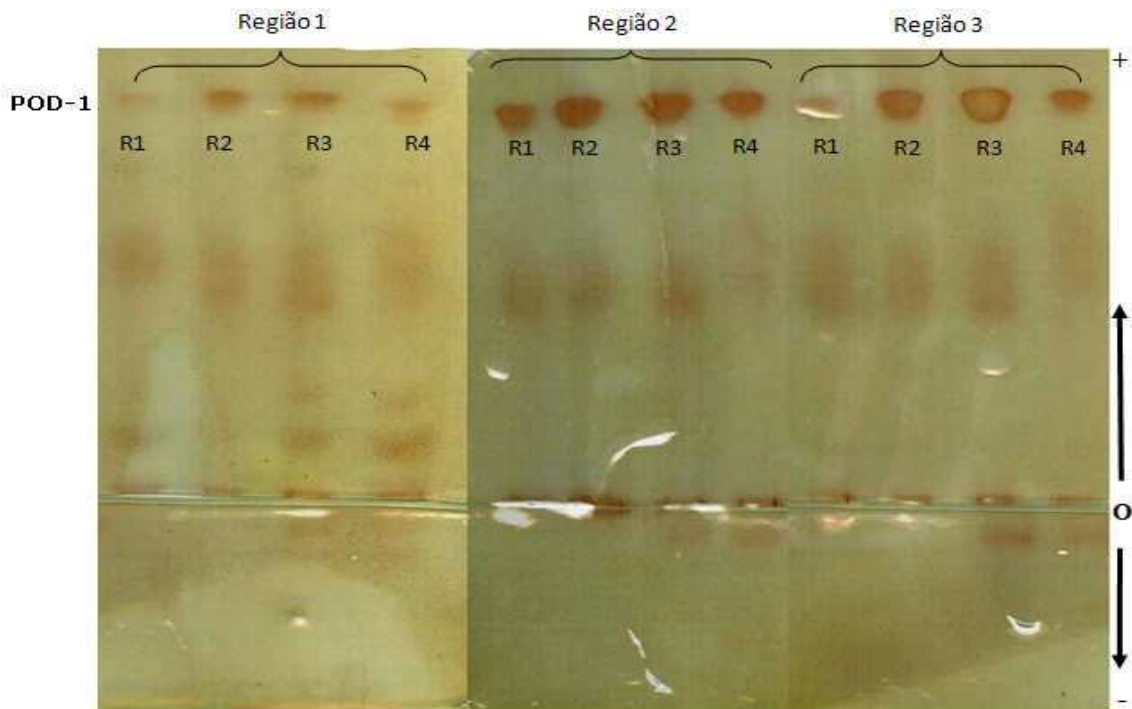


Figura 2 – Zimograma da peroxidase das diferentes regiões do palmito de pupunha. O = origem. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximas da região meristemática.

O zimograma da PPO (Figura 3) apresentou desenvolvimento nítido de uma isoforma com a maior expressão na região meristemática que nas outras, que tiveram semelhante QLR (Tabela 2). A presença de uma ou de várias isoformas de determinada enzima pode ter relação com a atividade específica, pois variações na expressão de isoenzimas podem estar associadas com o nível de atividade enzimática.

A PPO é codificada por uma família multigênica na qual cada gene tem um padrão de expressão espacial e temporal com também diferentes atividades da PPO, dependendo do estágio de desenvolvimento (THYGESEN *et al.*, 1995). A polifenoloxidase do tomate é codificada por sete genes e exibe padrão de expressão complexo e diferencial durante o crescimento e diferenciação (THIPYAPONG; STEFFENS, 1995). Semelhantemente foi confirmada a expressão tecido-específico das isoenzimas da PPO e POD em plântulas de melancia (BILES; MARTIN, 1993).

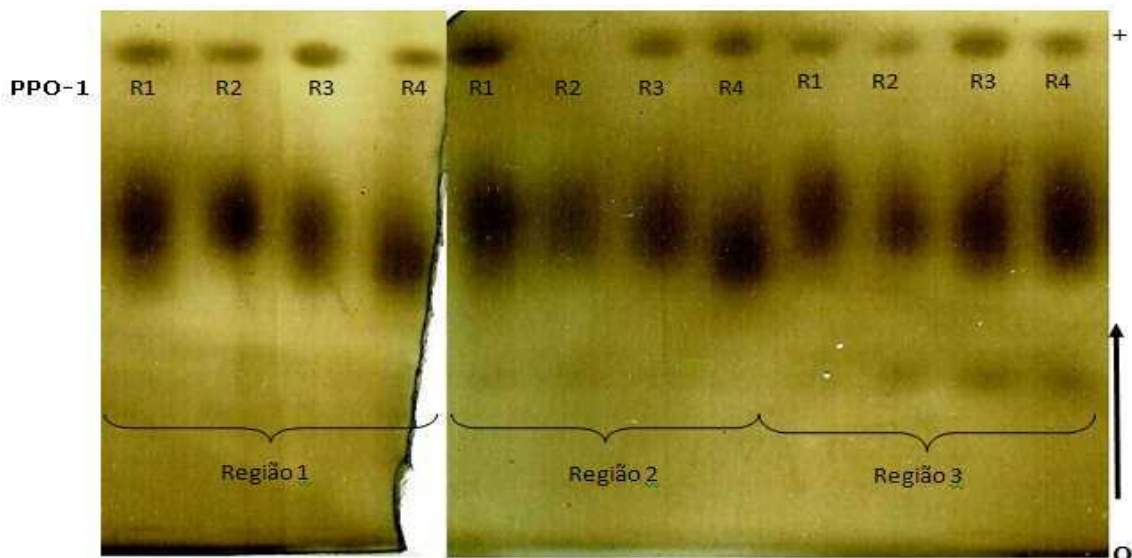


Figura 3 – Zimograma da polifenoloxidase para as diferentes regiões do palmito de pupunha. O = origem. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = Região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximos da região meristemática.

No palmito de pupunha houve expressão de somente uma isoforma. E essa expressão teve associação direta com a quantificação da atividade enzimática via espectrofotômetro.

Desse modo, pode-se concluir que a expressão da PPO em palmito de pupunha varia de acordo com o tecido, caulinar ou foliar, e ainda com o seu estágio de desenvolvimento.

O zimograma da xiquimato desidrogenase (Figura 4) apresentou duas bandas bem definidas SKDH-1 e SKDH-2, com maior expressão da SKDH-1, particularmente quando a SKDH-2 esteve ausente. A presença de duas isoformas da enzima verifica apenas a variabilidade da constituição genética da população de plantas do lote utilizado como fonte de matéria-prima. Na região 2 houve maior intensidade e área de ambas as isoformas com relação às demais regiões, revelando maior atividade enzimática nesta região.

Semelhantemente aos resultados obtidos neste trabalho, Conte (2004) relatou a presença de apenas um loco polimórfico da SKDH em *Euterpe edulis*; no entanto, esse autor não informou quantas isoformas foram encontradas.

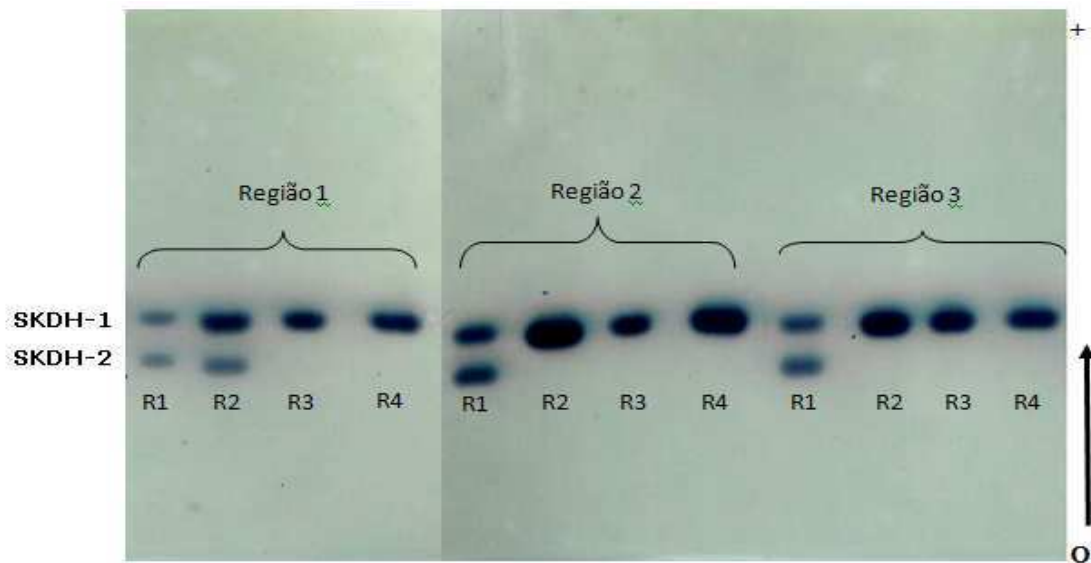


Figura 4 – Zimograma da xiquimato desidrogenase das diferentes regiões do palmito de pupunha. O = origem. Região 1 = 2º entrenó do palmito caulinar. Região 2 = região meristemática. Região 3 = porções do palmito nobre próximos da região meristemática.

Além da variabilidade antes indicada, as diferenças nos padrões isoenzimáticos são função do aparecimento ou desaparecimento de isoenzimas individuais, e isso foi observado em determinados órgãos ou tecidos durante o desenvolvimento (SCANDALIOS, 1969).

Esse comportamento foi coerente com os maiores valores da atividade específica da POD e da PPO, comprovando que a Região 2 possui a maior presença e concentração de enzimas.

Em folhas maduras do palmito de pupunha, a xiquimato desidrogenase apresentou quatro isoformas (TOZETTI *et al.*, 2003) diferentes das duas isoformas encontradas nas três regiões do palmito neste trabalho. O anterior verifica que o número de isoformas em pupunha varia em função do estágio de desenvolvimento, visto que em tecido imaturo como o de palmito registraram-se apenas duas isoformas das quatro encontradas em folha madura por Tozetti *et al.* (2003). Isso pode implicar também diferenças na atividade específica dessa enzima.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As regiões caulinar e foliar do palmito de pupunha apresentaram diferenças significativas quanto à atividade específica das enzimas POD, PPO, expressão das isoenzimas POD, PPO e SKDH e teor de compostos fenólicos.

A atividade específica das enzimas POD e PPO foi maior na região meristemática em relação às regiões correspondentes ao segundo entrenó do palmito caulinar e a porção do palmito nobre, próxima da região meristemática.

A análise dos sistemas isoenzimáticos caracterizou a presença das isoformas POD-1 e PPO-1 nas três regiões estudadas, apesar de serem constituídas por tecidos diversos, como caulinar, bainha, pecíolo, raque e folíolos em estádios de desenvolvimento diferentes.

A análise isoenzimática da xiquimato desidrogenase constatou maior expressão das isoenzimas SKDH-1 e SKDH-2 na região meristemática em relação às outras regiões, confirmando essa região como a que possui maior atividade metabólica, visto ser comportamento semelhante para as enzimas POD e PPO.

A concentração de compostos fenólicos foi também maior na região meristemática e menor nas outras regiões, com comportamento similar à atividade e expressão das enzimas.

Em síntese, a região meristemática caracteriza-se como a de maior potencial oxidativo pelas elevadas concentrações de enzimas oxidativas e de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e micro-organismos**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 627 p.

AZEQOUR, M.; MAJOURHAT KBAAZIZ, M. Morphological variations and isoenzyme polymorphism of date palm clones from *in vitro* culture acclimatized and established on soil in South Morocco. **Euphytica**, v. 123, p. 57-66, 2002.

BELLEARD, C.R.G.; RAUPP, D.S.; CHAIMSOHN, F.P.; BORSATO, A.V. Avaliação de procedimentos de acidificação de conservas de palmito foliar de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Acta Science Agronomic**, v. 27, n. 2, p. 247-254, 2005.
BILES, C.L.; MARTIN, R.D. Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 31, p. 499-506, 1993.

BOLIN, H.R.; HUXSOLL, C.C. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. **Journal Food Science**, v. 56, n. 2, p. 416-418, 1991.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CANTOS, E.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 322-330, 2001.

CARNEIRO, C.E.A.; ROLIM, H.M.V.; FERNANDES, K.F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-193, 2003.

CASTAÑER, M.; GIL, M.I.; ARTÉS, F. Organic acids as browning inhibitors on harvested 'Baby' lettuce and endive. **Z. Lebensmitell Unters Forsch A.**, v. 205, p. 375-379, 1997.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2004.

DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F.; GUIDI, L. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. **Food Chemistry**, v. 104, p. 209-215, 2007.

DIAZ, J.; MERINO, F. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annum*) seedlings. Purification and properties. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 147-152, 1997.

DICKO, M.H.; HILHORST, R.; GRUPPEN, H.; LAANE, C.; BERKEL, W.J.H.; VORAGEN, A.G.J. Zymography of monophenolase and *o*-diphenolase activities of polyphenol oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 306, p. 336-339, 2002.

EMBRAPA. **Processamento do Palmito de Pupunheira em Agroindústria Artesanal** – Uma atividade rentável e ecológica. 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pupunha/PalmitoPupunheira>>. Acesso em: 14 Fev. 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FONSECA, K.S. **Caracterização físico-química, anatômica e fisiológica de palmito pupunha para processamento mínimo.** 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

FUKUMOTO, L.R.; TOIVONEN, M.A.P.; DELAQUIS, J.P. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4503-4511, 2002.

HEIMDAL, H.; LARSEN, L.M.; POLL, L. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1428-1433, 1994.

HERMANN, K.M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 107, p. 7-12, 1995.

HO, K.K. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, Aranda 'Christine 130'. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 841-848, 1999.

ILKER, Y.; KADER, A.A.; ILKER, R.; MORRIS, L.L. Anatomy of lettuce tissue affected by three physiological disorders. **Journal American Soc. Horticulture Science**, v. 102, n. 4, p. 426-428, 1977.

KE, D.; SALTVEIT, M.E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in Iceberg lettuce. **Physiologia Plantarum**, v. 76, p. 412-418, 1989a.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, 2008. 242 p.

KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Rapid, systemic repression of the synthesis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small-subunit mRNA in fungus-infected or elicitor-treated potato leaves. **Planta**, v. 181, p. 216-219, 1990.

MARSHALL, M.R.; KIM, J.; WEI, C.H. **Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods**. [S.l.]: FAO, 2002. 71 p.

MARTINS, C.C.; BOVI, M.L.A.; MORI, E.S.; NAKAGAWA, J. Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero euterpe. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, p. 51-57, 2007.

MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. **Australian Journal of Botany**, v. 44, p. 613-634, 1996.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 193-215, 1979.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plantas – Recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, p. 11-20, 1987

McADAM, J.W.; SHARP, R.E.; NELSON, C.J. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. **Plant Physiology**, v. 99, p. 879-885, 1992.

MORA-URPÍ, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): origen, biología floral y manejo agronómico. In: **Palmeras poco conocidas de América tropical**. Turrialba, Costa Rica: CATIE/FAO, 1983. p. 118-160.

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

OKEY, E.N.; DUNCAN, J.E.; SIRJU CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T.N. *Phytophthora* canker resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p. 295-299, 1997.

PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCAS, G.C.; CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 171-178, 2008.

PEREIRA, E.P.F. **Alocação de matéria fresca, escurecimento enzimático e processamento mínimo de alface**. 2010. 92 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

PICOLI, A.A.; FARIA, D.B.; JOMORI, M.L.L.; KLUGE, R.A. Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 983-988, 2010.

RICHARD-FORGET, F.; GAUILLARD, F.A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p. 2472-2476, 1997.

ROMANI, A.; PINELLI, P.; GALARDI, C.; SANI, G.; CIMATO, A.; HEIMLER, D. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. **Food Chemistry**, v. 79, p. 337-342, 2002.

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 61-69, 2000.

SAWAZAKI, H.E.; BOVI, M.L.A.; SODEK, L.; COLOMBO, C.A. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 681-691, 1998.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular form of enzymes in plants: a review. **Biochemistry Genetic**, v. 3, p. 37-79, 1969.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula dodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 189-196, 2007.

SOARES, A.R. **Lignificação de raízes de soja sob a ação de L-3,4- diidroxifenilalanina (L-Dopa)**. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Trad. por Santarém, E. R. et al. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

THIPYAPONG, P.; STEFFENS, J.C. Tomato polyphenol oxidase differential response of the polyphenol oxidase promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiology**, v. 115, p. 409-418, 1997.

THYGESEN, P.W.; SECO, I.B.; ROBINSON, S.P. Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. **Plant Physiology**, v. 109, p. 525-531, 1995.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

TOZETTI, A.D.; CONTEL, E.P.B. Padronização da isoenzima shikimato desidrogenase em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 2, n. 4, 2003.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

WEAVER, L.M.; HERMANN, K.M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 9, p. 346-351, 1997.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO METABISSULFITO DE SÓDIO NA CONSERVAÇÃO REFRIGERADA DE RODELAS DE PALMITO DE PUPUNHA

INTRODUÇÃO

O processamento mínimo de vegetais promove nos tecidos vivos diversos efeitos indesejáveis ligados à deterioração pela ação de enzimas ou pelo ataque microbiano, reduzindo-se o tempo de conservação, a qualidade, a aceitação e o valor nutritivo (SALTVEIT, 2000).

O palmito de pupunha destaca-se pelo baixo escurecimento visual em relação ao palmito de palmeiras que escurecem intensamente pela atividade de enzimas oxidativas. O escurecimento relevante no processamento mínimo, uma vez que a alteração severa da cor pode levar à sua rejeição pelo consumidor.

A cor característica do palmito de pupunha é creme, a qual se intensifica durante a conservação (FONSECA, 2012) e não apresenta níveis elevados de atividade de enzimas oxidativas (BOTELHO, 2010).

Sabe-se que as enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) podem ter aumento de expressão não somente quando relacionadas ao escurecimento enzimático, mas também quando estão envolvidas em outros processos celulares, como no controle da expansão celular, na defesa contra o ataque de patógenos e

também quando os tecidos são submetidos a danos físicos provocados por injúrias mecânicas (MAYER, 1987).

O efeito antioxidante dos sulfitos é parcialmente responsável pela inibição da POD e PPO, baseando-se, principalmente, em sua capacidade de reduzir outros agentes oxidantes, que são formados quando o oxigênio entra em contato com o alimento (MACHADO; TOLEDO, 2006; KOBLITZ, 2008). Os sulfitos agem diretamente nas enzimas pela redução do número de pontes dissulfeto no centro catalítico (WALKER; FERRAR, 1998). Compostos sulfidrilas (-SH) combinam-se quimicamente com *o*-quinonas, formando produto estável e incolor, o que previne a formação de pigmentos escuros (ARAÚJO, 2011). O metabissulfito sódico apresentou maior poder de redução da atividade enzimática da POD em mandioca (RAMOS, 2011) e da PPO em pêssego (BELLUZZO, 2008).

Os agentes sulfitantes – que incluem o dióxido de enxofre (SO₂) e seus sais de sódio, potássio e cálcio – são aditivos alimentares que atuam na inibição da deterioração provocada por bactérias, bolores e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante o processamento, através de reações com as quinonas que as impedem de formar compostos de cor escura (KOBLITZ, 2008).

Resultados do Capítulo 1 evidenciaram maior atividade da POD, PPO, expressão da POD, PPO e da concentração de compostos fenólicos na região meristemática e a porção de palmito nobre próxima do meristema do palmito de pupunha. Diante disso, é relevante determinar as prováveis causas envolvidas na mudança de coloração das superfícies cortadas de palmito, por meio da utilização de um inibidor potente como o metabissulfito de sódio.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal utilizado foi proveniente de plantio comercial no Município de Teixeiras, Minas Gerais, localizado a 20° 39' 03" S 42° 51' 25" O. As coletas foram realizadas entre os meses de Agosto/2012 e Janeiro/2013.

As hastes foram colhidas de plantas com altura entre 1,70 e 1,90 m e ponto ótimo de corte, conforme MORA-URPI (1983) e EMBRAPA (2013).

Após a colheita, o palmito foi transportado ao Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita da Universidade Federal de Viçosa, onde foi imerso em água com gelo (4 °C) por 3 min para remoção parcial do calor de campo e, em seguida, foi armazenado em expositores (5 °C) por 4 h até o momento do processamento.

Processamento mínimo

Na Unidade de Processamento Mínimo da UFV, as hastes de palmito foram lavadas em água corrente; as bainhas protetoras e a parte inferior ao terceiro entrenó foram removidas. Destas, foram obtidas de cada palmito, um segmento de 15 cm da região nobre acima da região meristemática (Figura 1) e sanitizados com solução 0,5% de hipoclorito de sódio embebida em esponja. Desses segmentos foram cortadas rodela de 1,5 cm e imersas em solução clorada (5 ppm) a 4 °C, por 10 min. Metade das rodela, tomadas aleatoriamente, foram imersas em metabissulfito de

sódio (0,5%) por 10 min. As demais rodelas foram imersas em solução clorada (3 ppm de cloro ativo) por 10 min, como controle.

Após a aplicação dos tratamentos, as rodelas foram colocadas em sacos de náilon e centrifugadas manualmente, por 20 seg. As unidades experimentais foram constituídas por quatro rodelas de aproximadamente 40 g, três repetições por tratamento. Essas foram embaladas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) envoltas por uma camada de filme de policloreto de vinila (PVC) de 20 μ m de espessura, e conservados em expositor a 5 ± 1 °C e $89 \pm 3\%$ UR, por 11 dias.

Avaliações de cor instrumental, atividade enzimática e compostos fenólicos solúveis totais foram realizadas 0, 3, 7 e 11 dias após a conservação refrigerada. Carotenoides totais foram quantificados 0 e 15 dias depois da conservação refrigerada.

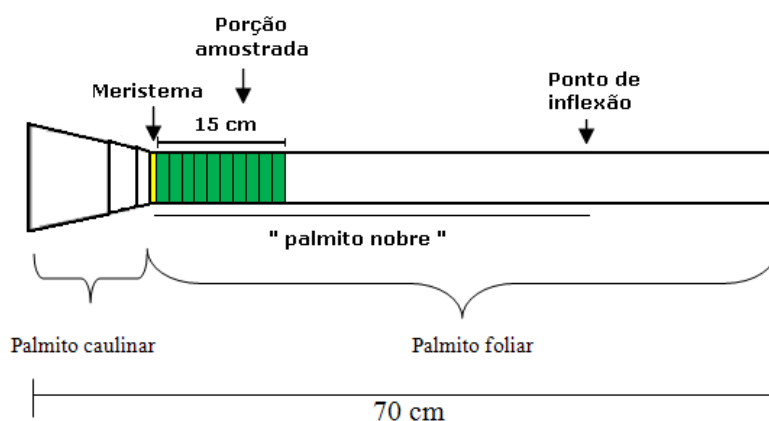


Figura 1 – Localização da porção amostrada do “palmito nobre” para obtenção das rodelas.

Cor instrumental

As coordenadas cromáticas Cielab (sistema L*, a*, b*), da superfície cortada durante o preparo das rodelas, foram medidas com colorímetro portátil digital Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing).

Extração e atividade da peroxidase e polifenoloxidase

Na extração da POD, 4 mL de tampão de extração foram adicionados a 0,1 g de material vegetal liofilizado, macerados em almofariz até a obtenção de massa homogênea, que foi então centrifugada a 14.000 g por 30 min, a 4 °C. O tampão de extração utilizado para a peroxidase (POD) continha fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15 M (NEVES, 2003 – com modificações). Para determinação da atividade enzimática, foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 1,5 mL de tampão-fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 0,5 mL de H₂O₂ (1,8%). O volume final da reação foi de 3 mL.

Para a extração da PPO, utilizou-se 0,5 g de material vegetal liofilizado macerado com 5 mL de tampão de extração, em homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik) por 30 seg. O tampão McIlvaine's pH 6,8 continha ácido ascórbico 80 mM, 1,5% de Triton X-100 e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O extrato enzimático foi mantido em banho de gelo por 30 min até a filtração e centrifugação a 14.000 g por 30 min, a 4 °C. Para o ensaio enzimático, adicionou-se o extrato enzimático ao meio de reação que continha uma mistura contendo 4-metilcatecol (20 mM) em tampão de McIlvaine's pH 4,8. O volume final da reação foi de 1,5 mL.

A reação enzimática foi avaliada por 2 min, por meio da variação da absorbância no comprimento de onda de 420 nm para a peroxidase a 25 °C e a 395 nm para a polifenoloxidase a 30 °C. A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada por Bradford (1976). A atividade específica foi expressa em UA/min/mg de proteína (NEVES, 2003).

Compostos fenólicos solúveis totais

Os compostos fenólicos solúveis totais foram extraídos homogeneizando-se 0,1 g de tecido liofilizado de rodela em 10 mL de etanol, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik). O extrato foi centrifugado a 14.000 g, por 30 min, a 22 °C. Foi retirada do sobrenadante uma alíquota de 0,25 mL e adicionada em 1,75 mL de Folin-Ciocalteu (diluído 5x em água) e de 1 mL de carbonato de sódio 10% em água (m/v). Após 30 min de reação,

foram obtidas leituras de absorvâncias a 765 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A concentração de fenólicos solúveis totais foi expressa como miligrama de equivalentes de catequina por grama de matéria seca.

Carotenoides totais

Carotenoides totais foram extraídos homogeneizando-se 2 g de material vegetal fresco da superfície do tecido, em 10 mL de acetona em homogeneizador Turrax T-18 (IKA Labortechnik). O material foi filtrado em papel-filtro e lavado com acetona até a remoção completa dos resíduos do extrato. O extrato cetônico filtrado foi submetido à partição com éter de petróleo (50 mL), lavando-se cada fração com água destilada para retirar toda a acetona. Foram obtidas leituras de absorvâncias a 449 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A concentração de carotenoides totais foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g/g} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Abs} \times 10^{-4} \times \text{diluição}}{\text{peso da amostra (g)} \times \text{coeficiente de absorvidade molar}}$$

O coeficiente de absorvidade molar considerado foi 2.592, segundo Rodriguez-Amaya (1989).

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (com e sem aplicação de metabissulfito de sódio) e três repetições. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para comparação entre as médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Sisvar 4.0 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cor instrumental

A constância dos valores da coordenada L* nos tratamentos (Figura 2) evidencia ausência de escurecimento da superfície das rodelas durante o período de conservação refrigerada. Botelho *et al.* (2010) encontraram redução nos valores da coordenada L* da ordem de 4%, no 12º dia de conservação refrigerada, confirmando a inexistência de significativas variações na cor do palmito de pupunha.

Os valores médios da coordenada -a* foram semelhantes nas rodelas com e sem tratamento com metabissulfito de sódio (0,5%) durante o período de conservação (Figura 3).

Diferenças nos valores médios da coordenada +b* foram observadas entre os tratamentos durante o período de conservação refrigerada (Figura 4). Entre o 7º e o 11º dia de avaliação houve aumento de 7,3% nos valores de +b*, mostrando que o palmito apresentou ligeira intensificação da cor amarela nos seus tecidos. Para as rodelas de palmito tratadas com metabissulfito de sódio, não foi verificada diferença significativa na coordenada +b*, e seus valores foram, em média, 22,3% menores que o das rodelas não tratadas.

Resultados similares foram relatados por Botelho *et al.* (2010), que verificaram aumento de 21% nos valores da coordenada +b* no 10º dia de conservação refrigerada no palmito não tratado com inibidores de escurecimento. No palmito tratado com esses inibidores, os valores da coordenada +b* se mantiveram constantes até os 12 dias de conservação refrigerada.

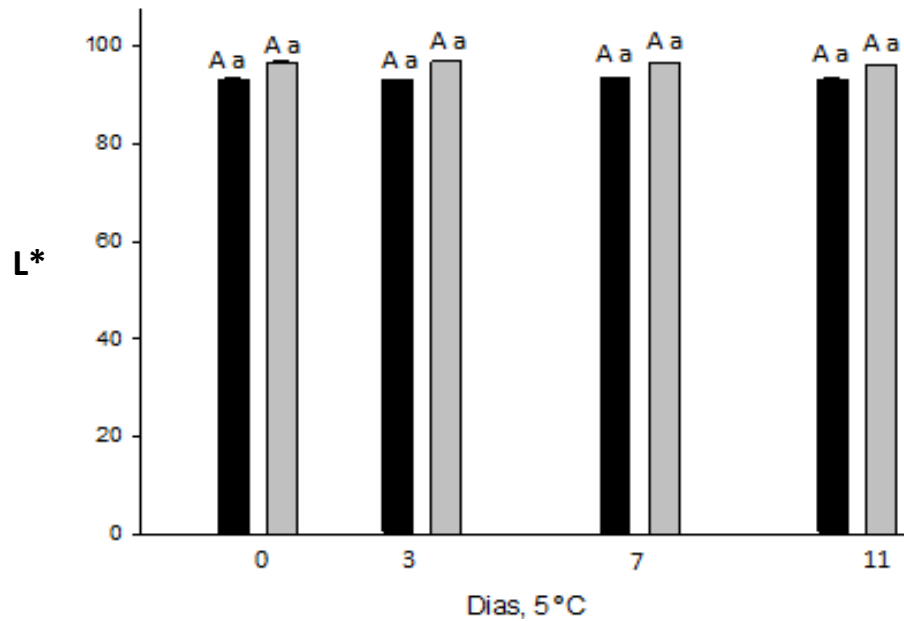


Figura 2 – Médias da coordenada L^* em rodela da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabisulfito de sódio 0,5%, conservado por 11 dias a 5 °C. Letras minúsculas e maiúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

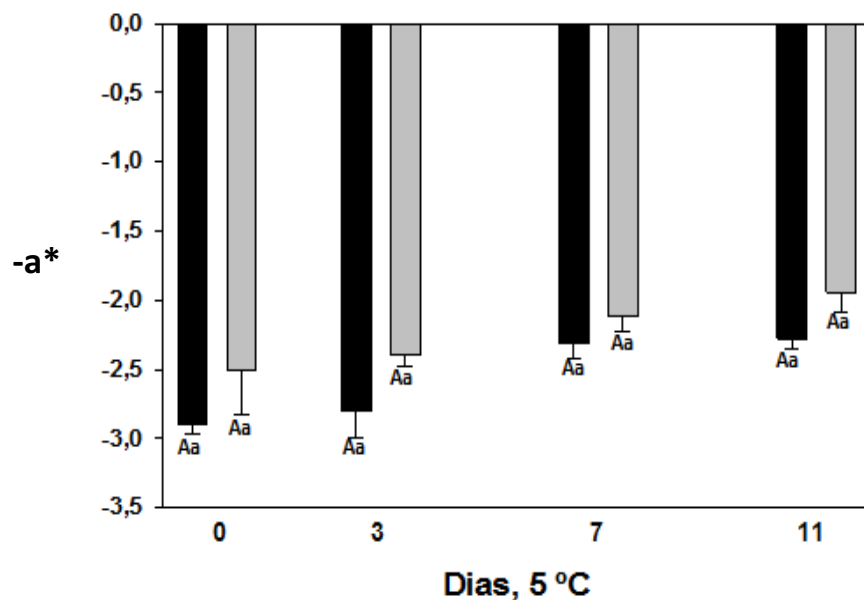


Figura 3 – Médias da coordenada $-a^*$ em rodela da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabisulfito de sódio 0,5%, conservado por 11 dias a 5 °C. Letras minúsculas e maiúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O amarelecimento dos tecidos superficiais do palmito de pupunha também foi observado por Fonseca (2012) no 14º dia de conservação refrigerada, coloração essa relacionada com o desenvolvimento de *Pseudomona* ssp., uma vez que ficou evidenciada, por meio de fotografias sob iluminação ultravioleta, a presença desses microrganismos deterioradores na superfície do palmito.

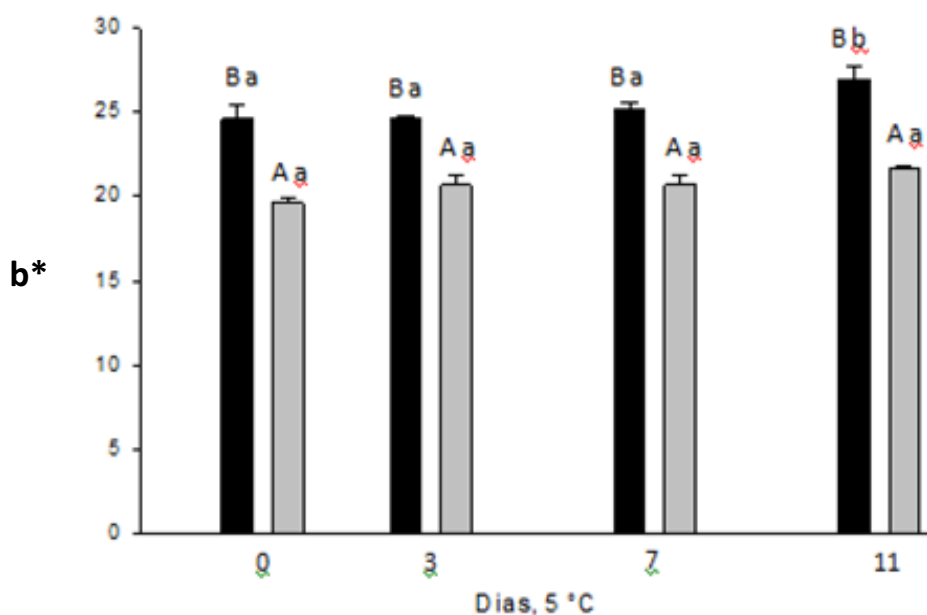


Figura 4 – Médias da coordenada b^* em rodelas da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabissulfito de sódio 0,5%, conservadas por 11 dias a 5 °C. Letras maiúsculas e minúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O amarelecimento da cor superficial das rodelas não tratadas com metabissulfito de sódio (0,5%) foi percebido visualmente no 11º dia de conservação refrigerada (Figura 5). Os registros fotográficos condizem com as alterações nos valores da coordenada $+b^*$, comprovando o amarelecimento da superfície das rodelas.



Figura 5 – Registros fotográficos de rodela da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas e conservadas sob refrigeração a 5 °C. Rodelas sem (A, C) e com imersão em metabissulfito de sódio 0,5% (B, D), no dia zero (A B) e no 11º dia (C, D).

Atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase

A atividade específica da peroxidase aumentou durante o período de conservação (Figura 6) das rodelas tratadas e não tratadas com metabissulfito de sódio (0,5%). O aumento da atividade da POD nas rodelas tratadas foi de 2,2 vezes após 11 dias, enquanto no palmito não tratado o aumento foi de 2,7 vezes, durante o mesmo período. As médias de atividade da POD nas rodelas tratadas ou não diferiram entre si, durante todo o período de conservação, mostrando a eficácia do metabissulfito de sódio na inibição da POD (Figura 6).

A atividade da polifenoloxidase foi reduzida expressivamente nas rodelas imersas em metabissulfito de sódio durante 11 dias de conservação a 5 °C (Figura 7). A diferença entre as atividades do palmito tratado ou não foi de 70%, em média. As médias de atividade da PPO com a aplicação do inibidor mantiveram-se constantes a partir do terceiro dia de conservação, e as não tratadas tiveram aumento de 1,6 vez durante o período de conservação.

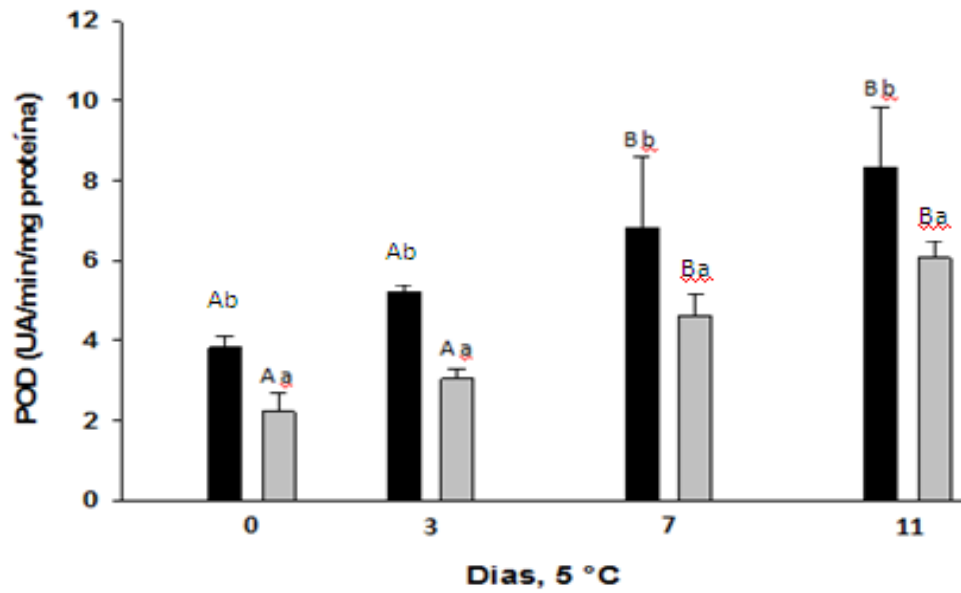


Figura 6 – Médias da atividade específica da peroxidase (POD) em rodelas da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabissulfito de sódio 0,5%, conservadas por 11 dias a 5 °C. Letras minúsculas e maiúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre os tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

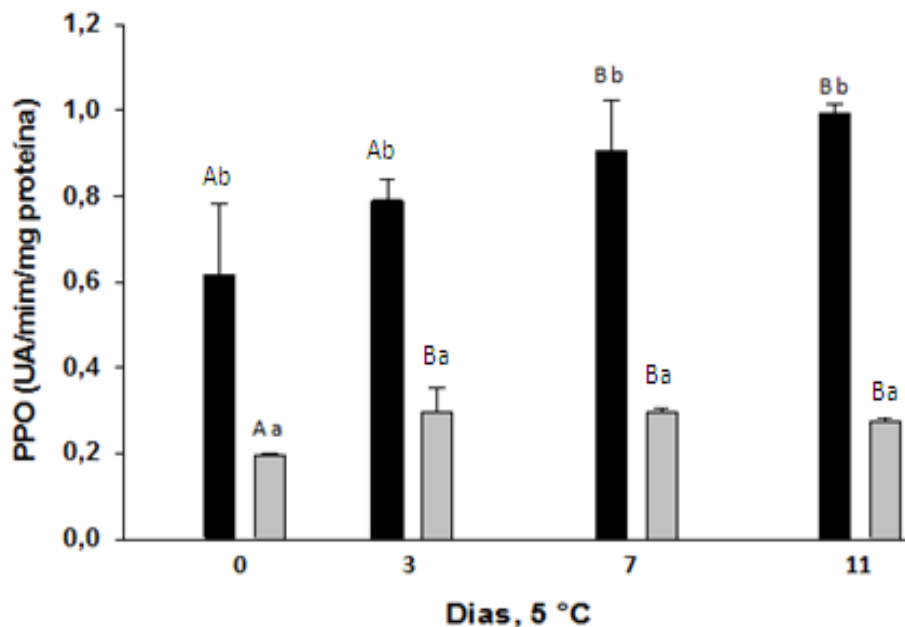


Figura 7 – Médias da atividade específica da polifenoloxidase (PPO) em rodelas da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabissulfito de sódio 0,5%, conservadas por 11 dias a 5 °C. Letras minúsculas e maiúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O metabissulfito de sódio mostrou-se também eficiente na inibição de POD em mandioca (RAMOS, 2011) e em hastes de ave-do-paraíso (KARSTEN, 2009). A atividade da POD está relacionada ao estresse oxidativo provocado pelo processamento mínimo, uma vez que a destruição da camada superficial de células aumenta a respiração e a formação de espécies reativas de oxigênio. A produção de radicais livres – superóxidos e peróxidos de hidrogênio – durante a senescência também induz a peroxidação das membranas, afetando a integridade dos tecidos. A POD atua como agente antioxidante no mecanismo de defesa celular contra os radicais livres, ao catalisar a decomposição de peróxidos (BIRECKA *et al.*, 1979).

A ação dos sulfitos baseia-se na capacidade de sequestrar agentes oxidantes que são formados quando o oxigênio entra em contato com o alimento (MACHADO; TOLEDO, 2006). Também podem agir como inibidores de inúmeras enzimas, incluindo a polifenoloxidase e peroxidase, podendo inibir diretamente a enzima ou impedir sua participação nas reações que levam à formação de pigmentos escuros (IYENGAR; McEVILY, 1992).

O metabissulfito de sódio foi também eficaz em inibir 100% da atividade da polifenoloxidase em hastes florais de ave-do-paraíso (KARSTEN, 2009).

Fenólicos solúveis totais

O teor de compostos fenólicos totais nas rodela tratadas com o inibidor aumentou durante a conservação, em maior proporção que nas sem tratamento de metabissulfito de sódio (Figura 8). Nas rodela não tratadas houve redução transitória do teor de compostos fenólicos aos três dias, seguidos de aumento até o final do período de conservação. Essa redução pode ser decorrente da atividade das enzimas oxidativas e da recuperação e aumento decorrentes da síntese de novos compostos fenólicos associado a uma redução de seu consumo.

A composição e teor de compostos fenólicos nos vegetais são determinados por fatores genéticos e ambientais, podendo ser modificados por reações oxidativas durante o processamento e conservação (ROBARDS *et al.*, 1999). Esses compostos estão envolvidos em processos como escurecimento enzimático, processos antioxidantes em baixas concentrações e oxidantes em altas (ROBARDS *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2009).

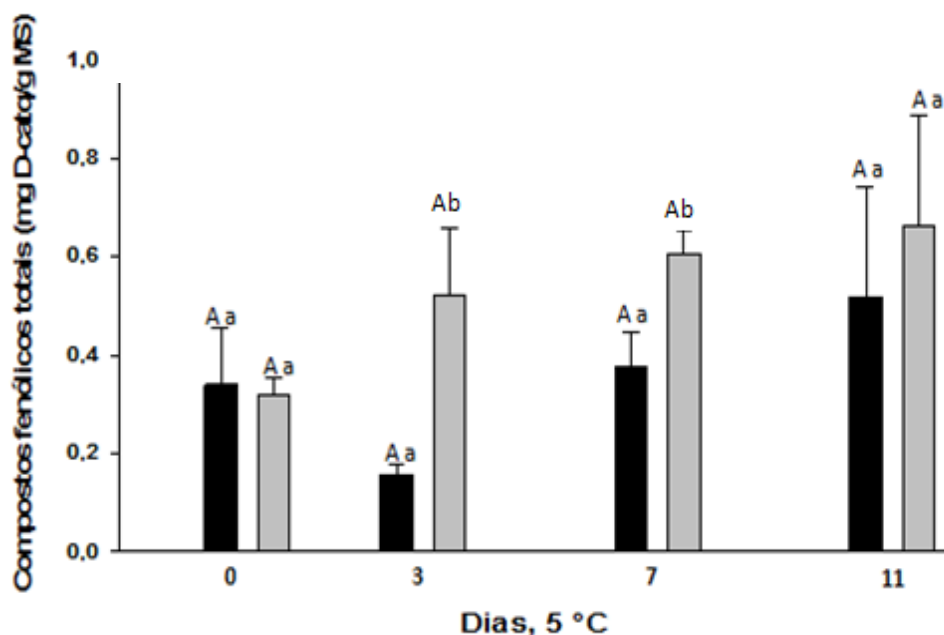


Figura 8 – Médias da concentração de compostos fenólicos solúveis totais em rodela da região nobre do palmito de pupunha minimamente processadas sem (■) e com (□) imersão em metabissulfito de sódio 0,5%, conservadas por 11 dias a 5 °C. Letras minúsculas e maiúsculas iguais indicam, respectivamente, semelhança entre tratamentos e entre os dias de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Carotenoides totais

O teor de carotenoides foi estável nas rodela de palmito de pupunha minimamente processadas durante a conservação refrigerada (Tabela 1), evidenciando que o amarelecimento da superfície das rodela foi oriundo da síntese de carotenoides nos tecidos.

Tabela 1 – Carotenoides totais ao início e final do período de conservação de rodela da região nobre de palmito de pupunha minimamente processado, mantido a 5 °C durante 15 dias. Letras maiúsculas iguais não diferem entre os dias de avaliação pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade

DIAS	Carotenoides totais (µg/g de matéria fresca)
0	5,93 ± 0,07a
15	6,04 ± 0,06 a

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças da cor não foram significativas, embora houvesse aumento na coordenada +b*, que indica amarelecimento e não escurecimento como relatado para o palmito de outras espécies de palmeiras.

A ausência de mudanças expressivas na cor ocorreu independentemente da inibição ou não das enzimas oxidativas, verificando-se a tendência natural do palmito pupunha a não apresentar escurecimento durante o processamento e a vida de prateleira.

A aplicação do metabissulfito de sódio 0,5% reduziu a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e resultou em maiores valores dos compostos fenólicos no palmito de pupunha, sugerindo ação inibitória sobre a atividade catalítica dessas enzimas.

Não foi observada diferença nos valores de carotenoides entre o dia zero e o 15º dia de conservação refrigerada, indicando que o amarelecimento observado e quantificado não tem relação com a síntese de carotenoides.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 601 p.

BELLUZZO, A.S.F. **Caracterização parcial da polifenoloxidase e avaliação de compostos fenólicos e antioxidantes em pêssego (cv. Biuti)**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

BIRECKA, H.; CHASKES, M.J.; GOLDSTEIN, J. Peroxidase and senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 116, p. 565-573, 1979.

BOTELHO, M.C.; LEME, S.C.; LIMA, L.C.O.; ABRAHÃO, A.S.; SILQUEIRA, H.H.; CHITARRA, A.B. Qualidade de palmito pupunha minimamente processado: aplicação de antioxidantes. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, MG, v. 34, n. 5, p. 1312-1319, 2010.

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

EMBRAPA. **Processamento do palmito de pupunheira em agroindústria artesanal** – Uma atividade rentável e ecológica. 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pupunha/PalmitoPupunheira>>. Acesso em: 14 Fev. 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FONSECA, K.S. **Caracterização físico-química, anatômica de palmito pupunha para processamento mínimo**. 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

IYENGAR, R.; McEVILY, A.J. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 60-64, 1992.

KARSTEN, J. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático se hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*)**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, 2008. 242 p.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plantas – Recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, p. 11-20, 1987.

MORA-URPÍ, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): origen, biología floral y manejo agronómico. In: **Palmeras poco conocidas de América tropical**. Turrialba, Costa Rica: CATIE/FAO, 1983. p. 118-160.

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

RAMOS, P.A.S. **Papel das enzimas oxidativas na deterioração fisiológica de mandioca**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROCHA, S.A. **Antioxidantes em vegetais pós-colheita de origem orgânica**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal Micronutricion Analytical**, v. 5, p. 191-225, 1989.

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heatshock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 61-69, 2000.

SAWAZAKI, H.E.; BOVI, M.L.A.; SODEK, L.; COLOMBO, C.A. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 681-691, 1998.

SILVA, M.V.; ROSA, C.I.L.F.; VILAS BOAS, E.V.B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83-96, 2009.

WALKER, J.R.L.; FERRAR, P.H. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v. 15, p. 468, 1998.