

JULIANE KARSTEN

ENVOLVIMENTO DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE NO BLOQUEIO
XILEMÁTICO DE HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*)

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
2009

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

T

K18e
2009

Karsten, Juliane, 1985-

Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio
xilemático de hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*) /
Juliane Karsten. – Viçosa, MG, 2009.
xi, 117f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Fernando Luiz Finger.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

Referências bibliográficas: f. 102-117.

1. *Strelitzia reginae* - Fisiologia pós-colheita. 2. Flores -
Armazenamento. 3. Flores - Conservação. 4. Cinética
enzimática. 5. Peroxidase. 6. Polifenol oxidase. 7. Sacarose.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 584.39

JULIANE KARSTEN

ENVOLVIMENTO DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE NO BLOQUEIO
XILEMÁTICO DE HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO (*Strelitzia reginae*)

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 : 16 de fevereiro de 2009.

José Geraldo Barbosa
(Coorientador)

Raimundo Santos Barros
(Coorientador)

Marialva Alvarenga Moreira

Marcelo Amaral de Moura

Fernando Luiz Finger
(Orientador)

Aos meus amados pais, Arnaldo e Vanilda Karsten

Minha irmã Nissandra

Ao meu namorado 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.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

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

Aos professores Raimundo Santos Barros e José Geraldo Barbosa pelas sugestões e co-orientações.

Aos professores Adilson Ricken Schuelter e Suzana Stefanello, pelos ensinamentos e incentivos para a realização de mais esse sonho.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-Colheita e do Setor da 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.

Aos amigos do Laboratório de Pós-Colheita que não mediram esforços em ajudar na realização deste trabalho. Agradecimento especial a Daniela, Fábio, Jocleita, André e Ana pelas incansáveis madrugadas de TRA.

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.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL:	1
2. CAPÍTULO 1	
ATIVIDADE DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE NA OCLUSÃO VASCULAR EM HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO	6
RESUMO	6
2.1 INTRODUÇÃO	8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.2.1 Tratamentos pós-colheita	10
2.2.2 Variação de massa fresca	11
2.2.3 Teor relativo de água	11
2.2.4 Ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase	12
2.2.5 Variação de massa fresca ao longo da vida de vaso	13
2.2.6 Atividade da peroxidase e polifenoloxidase ao longo da vida de vaso	13
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
2.3.1 Variação de massa fresca	15
2.3.2 Teor relativo de água	17
2.3.3 Atividade da peroxidase e polifenoloxidase	18
2.3.4 Variação de massa fresca ao longo da vida de vaso	21
2.3.5 Atividade da peroxidase e da polifenoloxidase ao longo da vida de vaso	22
2.4 CONCLUSÕES	25
3. CAPÍTULO 2	
PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA PEROXIDASE	26
RESUMO	26
3.1 INTRODUÇÃO	28

3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Extração e purificação parcial da peroxidase	30
3.2.2 Determinação da atividade enzimática da peroxidase	31
3.2.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da peroxidase	31
3.2.4 Estabilidade da peroxidase em função do pH	31
3.2.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase	32
3.2.6 Estabilidade térmica da peroxidase	32
3.2.7 Estabilidade da peroxidase durante o armazenamento	32
3.2.8 Efeito de inibidores na atividade da peroxidase	32
3.2.9 Delineamento experimental	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.3.1 Extração e purificação parcial da peroxidase	34
3.3.2 Determinação do pH ótimo para a atividade da peroxidase	35
3.3.3 Estabilidade da peroxidase em função do pH	36
3.3.4 Determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase	38
3.3.5 Estabilidade térmica da peroxidase	39
3.3.6 Estabilidade da peroxidase durante o armazenamento	42
3.3.7 Efeito de inibidores na atividade da peroxidase	43
3.4 CONCLUSÕES	52
4. CAPÍTULO 3	
PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE	
.....	53
RESUMO	53
4.1 INTRODUÇÃO	54
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase	56
4.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase	57
4.2.3 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase	57
4.2.4 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase	57
4.2.5 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH	58
4.2.6 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase	58
4.2.7 Estabilidade térmica da polifenoloxidase	58
4.2.8 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase	59
4.2.9 - Delineamento experimental	59

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.3.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase	60
4.3.2 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase	62
4.3.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase	63
4.3.4 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH	65
4.3.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase	68
4.3.6 Estabilidade térmica da polifenoloxidase	69
4.3.7 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase	72
4.4 CONCLUSÕES	75
5. CAPÍTULO 4	
UTILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PULSING CONTENDO INIBIDORES ENZIMÁTICOS E SACAROSE EM AVE-DO-PARAÍSO	76
RESUMO	76
5.1 INTRODUÇÃO	78
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	80
5.2.1 Tratamentos pós-colheita	80
5.2.2 Alterações de massa fresca	81
5.2.3 Teor relativo de água	82
5.2.4 Número de floretes abertos	82
5.2.5 Longevidade	83
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.3.1 Alterações de massa fresca	84
5.3.2 Teor relativo de água	90
5.3.3 Número de floretes abertos	92
5.3.4 Longevidade	97
5.4 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

RESUMO

KARSTEN, Juliane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009.
Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*). Orientador: Fernando Luiz Finger. Coorientadores: Raimundo Santos Barros e José Geraldo Barbosa.

Os objetivos deste trabalho foram: determinar o momento de ocorrência do bloqueio vascular e a contribuição da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) neste processo; purificar parcialmente e caracterizar essas enzimas; e verificar o efeito da utilização de inibidores enzimáticos combinados ou não com sacarose na solução de pulsing sobre a vida pós-colheita de ave-do-paraíso. Para determinar o tempo para a oclusão, hastes florais foram armazenadas a seco por diferentes períodos (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas), e após foram colocadas na água. A variação de massa fresca e o teor relativo de água (TRA) das sépalas foram avaliados nas primeiras 24 horas, e a atividade da POD e PPO foram determinadas após 100 horas. Flores colhidas e colocadas imediatamente na água, tiveram sua variação de massa fresca, e atividade da POD e PPO avaliadas diariamente até o 8º dia, quando o 1º florete estava completamente seco. Flores mantidas por até 16 horas em armazenamento a seco, recuperaram os valores de massa fresca e TRA iniciais após serem mantidas em água, sugerindo que o bloqueio vascular esteja ocorrendo após essas 16 horas. A atividade da POD foi maior em hastes controle e a da PPO em hastes que sofreram estresse hídrico moderado (16, 24, 32 e 40 horas). Ao longo da vida de vaso, a atividade da POD alcançou maiores níveis após o 8º dia da vida de vaso, e a da PPO manteve-se constante. A atividade da POD foi superior a da PPO em todas as análises, sugerindo uma maior influência da POD no bloqueio xilemático desta espécie. No processo de caracterização enzimática, o pH ideal e a temperatura ótima para ambas as enzimas foi determinado, bem como o substrato ótimo para a PPO. A estabilidade a diferentes pHs, estabilidade térmica e o efeito de diferentes inibidores também foram acompanhados. Maior

atividade da POD foi encontrada em pH 5,0 e 60°C, e a pré-incubação por 120 minutos em pH 2,5 a 25°C levou a inibição de 93,13% da atividade inicial, 120 minutos a 70°C a 98,69% de inibição, e a 80°C por 10 minutos ou 90°C por 1 minuto levou a inativação completa. Uma completa inibição desta enzima também foi encontrada na presença de diferentes inibidores, como ácido ascórbico, L-cisteína, metabissulfito de sódio, sódio azida, β -mercaptoetanol e DTT. A PPO apresentou maior atividade com 4-metil-catecol como substrato, em pH 6,0 e 40°C. Inativação completa desta enzima foi obtida com pré-incubação por 10 minutos a 80°C ou usando 1 mM de DTT, L-cisteína, metabissulfito de sódio e β -mercaptoetanol. Finalmente, diferentes soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos, combinados ou não com sacarose 40% foram aplicadas por 24 horas. A variação de massa fresca, TRA e o número de floretes abertos foram determinados diariamente, e a longevidade foi acompanhada até o murchamento do último florete aberto. A partir dos inibidores aplicados sozinhos, o sódio azida foi que proporcionou maiores valores de massa fresca, maior longevidade e maior número de floretes abertos. Combinados com sacarose, o ácido ascórbico e o sódio azida foram capaz de proporcionar os melhores resultados, com maior número de floretes abertos e maior longevidade. O bloqueio dos vasos xilêmicos desta espécie está relacionado à atividade da POD e PPO e o uso de soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos é uma técnica eficiente em prolongar a vida de vaso de flores de ave-do-paráíso.

ABSTRACT

KARSTEN, Juliane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009.
Involvement of peroxidase and polyphenoloxidase in the vascular occlusion of stalks of bird-of-paradise (*Strelitzia reginae*). Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-advisers: Raimundo Santos Barros and José Geraldo Barbosa.

The goals of this work were to determine the time in which occurs the vascular occlusion and the contribution of the peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in this process; partially purify and characterize these enzymes and verify the effect of the use of enzymatic inhibitors combined or not with sucrose in the pulsing solution on the postharvest life of the bird-of-paradise. To determine the time of occlusion, the stalks were dry stored for different periods of time (0, 8, 16, 24, 32, 40 and 48 hours), and after being placed in water. The variation of fresh mass and the relative water content (RWC) of the sepals were evaluated within the first 24 hours, and the POD and PPO activity were determined after 100 hours. Harvested flowers were immediately placed in water and had their fresh mass variation, and POD and PPO activity daily evaluated up to 8th day, when the first floret was complete wilted. Flowers maintained for 16 hours under dry storage recuperated the initial fresh mass index and RWC after being placed in water, suggesting that the vascular occlusion occurred after 16 hours of dry storage. The POD activity was higher in control stalks and the PPO was higher in stalks which suffered moderated water stress (16, 24, 32 and 40 hours). Throughout the vase life, the POD activity reached the highest level in the 8th day of vase life, and the PPO was kept constant. The POD activity was higher than the PPO in all the analyses, suggesting a higher influence of the POD in the xylematic occlusion of this specie. In the process of enzymatic characterization, the ideal pH and the optimum temperature for both enzymes were determined, as well as the optimum substrate for the PPO. The stability in different pHs, thermal stability and the effect of different inhibitors were also observed. The highest activity of POD was found in pH 5.0 and 60°C, and the pre-

incubation for 120 minutes in pH 2.5 and 25°C lead to the inhibition of 93.1% of the initial activity, 120 minutes in 70°C to 98.7% of inhibition and 80°C for 10 minutes or 90°C for 1 minute lead to complete inactivation. A complete inhibition of this enzyme was also achieved in the presence of different inhibitors, like ascorbic acid, L-cysteine, sodium metabisulfite, sodium azide, β -mercaptoethanol and DTT. The PPO presented the highest activity with 4-methylcatechol as substrate, in pH 6.0 and 40°C. Complete inactivation of this enzyme was obtained by incubating for 10 minutes at 80°C or using 1 mM of DTT, L-cysteine, sodium metabisulfite and β -mercaptoethanol. Finally, different pulsing solutions containing enzymatic inhibitors, combined or not with sucrose 40% were applied for 24 hours. The fresh mass variation, RWC and number of open florets were daily determined, and the longevity was determined until the wilting of the last opened floret. From the inhibitors applied alone, the sodium azide was able to provide the highest values of fresh mass, longest longevity and highest number of open florets. Combined with sucrose, the ascorbic acid and the sodium azide were able to provide the best results, with the highest number of open florets and longer longevity. The occlusion of xylematic vessels of this species is related to the POD and PPO activity and the use of pulsing solutions containing enzymatic inhibitors is a viable technique to extend the vase life of bird-of-paradise flowers.

1. INTRODUÇÃO GERAL:

As plantas ornamentais tropicais, flores e folhagens, destinadas principalmente para corte, são de grande beleza pelo seu porte e formas exóticas. São apreciadas em arranjos florais e nos jardins devido à rusticidade e ao valor ornamental que apresentam. A diversidade de formas, cores e a durabilidade são características atrativas para a arte floral, o que tem proporcionando significativo aumento no consumo dessas espécies no Brasil e no mundo (Luz *et al.*, 2005). Dentre as espécies tropicais, a ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Aiton) tem sido uma das mais cultivadas para flor-de-corte pela beleza, curiosa forma, durabilidade (Luz *et al.*, 2005), e pelo comprimento da haste (Wood, 1995). A ave-do-paraíso, pertencente à família Strelitziaceae, é uma planta herbácea rizomatosa, entouceirada, acaule, apresentando folhas firmes e coriáceas (Lorenzi & Souza, 2001; Luz *et al.*, 2005). As flores abrem-se sucessivamente de uma bráctea de cor verde-avermelhada e possuem três sépalas grandes de cor alaranjada e duas pétalas azuis modificadas em forma de seta, que abrigam os órgãos sexuais (Castro, 1995).

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 & 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 (Finger *et al.*, 2003). 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). A aparência, qualidade e a longevidade das plantas dependem das condições de cultivo, da época exata de colheita e dos tratamentos pós-colheita relacionados às características genéticas, fisiológicas e anatômicas de cada espécie e cultivar (Nowak & Rudnicki, 1990).

As flores de corte, geralmente são transportadas a seco por um longo período, até atingirem o consumidor, o que pode acarretar em perdas de até 35% (Stringheta *et al.*, 2002). Durante esse transporte, a base das hastes permanecem expostas ao ar, o que pode provocar o bloqueio e secamento dos vasos condutores, prejudicando assim a absorção de água e a reidratação da haste, ocasionando num balanço hídrico negativo (Suzuki *et al.*, 2001). O balanço hídrico é considerado fator determinante do comportamento e da longevidade dos órgãos das plantas, e a deficiência de água no organismo pode acelerar a senescência. Segundo van Doorn (1999), em flores-de-corte, o declínio na absorção de água dependendo da espécie, pode ser devido ao bloqueio fisiológico dos vasos do xilema ou ao bloqueio causado por crescimento bacteriano. O bloqueio fisiológico pode ser resultado da atividade das enzimas peroxidases (POD) e polifenoloxidase (PPO) (van Doorn & Vaslier, 2002), pela deposição de gomas, mucilagens, taninos e resinas sobre a região cortada, cobrindo os elementos condutores do xilema (van Doorn, 1997); ou ainda por embolismo, quando após o corte, o ar flui para dentro dos elementos condutores abertos (van Doorn, 1999). Uma vez que o vaso é bloqueado, a absorção de água é limitada devido à alta resistência hidráulica, porém o processo de transpiração continua, o que leva a um desequilíbrio hídrico, e o murchamento precoce ocorre como resultado da perda prematura do turgor das células (van Meeteren *et al.*, 2001).

Em trabalhos anteriores realizados com *strelitzia*, constatou-se que a perda da condutividade hidráulica está relacionada ao aumento na atividade da peroxidase e polifenoloxidase, induzidas pelo corte da base da haste floral e por crescimento bacteriano (Marques, 2008). O corte induz um ferimento no tecido e conseqüente aumento na atividade da POD e a PPO, que participam da síntese de compostos como lignina e suberina, o que leva a obstrução dos vasos condutores (van Doorn, 1997; van Huystee, 1987).

Para aumentar a longevidade das flores de corte muitos tratamentos são utilizados, reduzindo-se as taxas de senescência e melhorando as relações hídricas da haste. Além do controle da temperatura de armazenamento, umidade relativa e da composição do ar da atmosfera, a utilização de compostos químicos é muito comum no tratamento das flores. Tratamentos de pulsing são muito utilizados em flores após a colheita ou após a sua retirada do armazenamento a frio, onde elas são submetidas a uma solução, contendo uma mistura de substâncias, aplicada por um período de até 48 horas (Finger & Barbosa, 2006). Entre as principais substâncias que compõem essa solução de pulsing estão os açúcares (5 a 50%), ácidos orgânicos (ácido cítrico),

inibidores da síntese (ácido aminooxiacético, aminoetoxivinilglicina e ácido acetilsalicílico) e ação do etileno (tiosulfato de prata e nitrato de prata) e agentes antibacterianos (8-citrato hidroxiquinolina e nitrato de prata). Em algumas espécies florais a vida pós-colheita das flores também pode ser aumentada quando compostos químicos capazes de inibir a atividade da peroxidase e polifenoloxidase são utilizados, atuando diretamente sobre as enzimas ou sobre os intermediários da reação (Araújo, 2004), como 2-mercaptoetanol, *p*-nitrofenol, tropolone e outros (van Doorn & Vaslier, 2002).

A sacarose e outros açúcares constituem um dos grupos de substâncias mais utilizadas para prolongar a longevidade floral, sendo a principal fonte de carbono para a manutenção dos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas após a separação da planta-mãe (Nowak & Rudnicki, 1990). Aos açúcares são atribuídos os benefícios de prolongar a vida de vaso de várias flores de corte, aumentar a abertura floral, intensificar a cor das pétalas e melhorar as relações hídricas por aumentar a taxa de absorção de água (Finger & Barbosa, 2006). Em *Strelitzia reginae*, o uso de 40% de sacarose na solução de pulsing por 24 horas, após armazenamento a 10°C, proporcionou maior vida de vaso e maior número de floretes desenvolvidos (Moraes, 1999).

Segundo Marques (2008), a utilização de inibidores de peroxidase e polifenoloxidase em solução de pulsing não teve efeito significativo no teor relativo de água das sépalas, número de flores abertas e na longevidade de *strelitzia*. van Doorn e Cruz (2000), estudando crisântemo, concluíram que a obstrução dos vasos do xilema está relacionada à atividade da fenoloxidase (principalmente a catecol oxidase) e peroxidase, tendo essas enzimas importante função nas reações de resposta ao dano. A utilização de soluções contendo diferentes substâncias antioxidantes em crisântemo, resultou no aumento da longevidade das inflorescências após a colheita, indicando que no local do corte estavam ocorrendo reações de óxi-redução (van Doorn & Vaslier, 2002). Em flores de *Bouvardia*, a utilização de diferentes inibidores da peroxidase e da catecol oxidase elevou o tempo de murchamento das flores, o que evidencia a participação dessas enzimas na oclusão dos vasos do xilema desta espécie (Vaslier & van Doorn, 2003).

Peroxidases (POD) são glicoproteínas que possuem o grupo prostético heme como cofator (Vianello *et al.*, 1997), oxidam substratos orgânicos, fenóis, precursores da lignina e vários metabólitos secundários, e tem o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora de elétrons (Passardi *et al.*, 2007). Esta classe de enzimas faz parte de uma superfamília e são classificadas em 3 subgrupos: aniônica, neutra e catiônica, de

acordo com o ponto isoelétrico (Intapruk *et al.*, 1993). 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), geralmente em resposta a estresses biótico e abiótico (Veitch, 2004). A enzima pode existir na forma solúvel ou ligada à membrana (Robinson, 1991), sendo que as extracelulares atuam na parede das células, participando da biossíntese de lignina e suberina (van Huystee, 1987).

A polifenoloxidase (PPO) possui na estrutura o cobre como grupo prostético (Walker & McCallion, 1980), com oxigênio molecular como co-substrato. Encontram-se latentes, e se tornam ativas quando liberadas das membranas dos tilacóides devido ao rompimento causado pelo dano, senescência, ataque de insetos ou patógenos (Mayer & Harel, 1991). De acordo com Lax & Vaughn (1991), polifenoloxidases são encontradas nos cloroplastos, mas são sintetizadas no citoplasma. É uma enzima envolvida no processo de óxi-redução (Mayer, 1987), promovendo a hidroxilação de monohidroxifenol para *o*-dihidroxifenol e a desidrogenação deste composto, formando *o*-quinonas, que, ao sofrerem polimerização não-enzimática com aminoácidos ou proteínas, formam pigmentos marrom, vermelho e preto, responsáveis pelo escurecimento dos tecidos (Underhill & Critchley, 1995). À PPO tem sido atribuído um grande número de processos celulares, que inclui defesa contra pragas e patógenos, controle dos níveis de oxigênio no cloroplasto, síntese de compostos fenólicos e cicatrização de danos (Mayer, 1987).

PPO e POD existem em múltiplas formas que diferem em massa molecular, estabilidade térmica, pH e temperatura ótima, substrato específico, função fisiológica, ponto isoelétrico, composição de açúcares e aminoácidos (Veitch, 2004), latência e sensibilidade a inibidores (Martinez & Whitaker, 1995). Além disso, há variação no conteúdo da enzima entre espécies, cultivares, maturidade, idade e parte da planta (Amiot *et al.*, 1995). Informações sobre as propriedades moleculares e catalíticas dessas enzimas são importantes para compreender os mecanismos de regulação, ativação, inibição e para o desenvolvimento de métodos mais efetivos no controle da atividade dessas enzimas. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar o momento de ocorrência do bloqueio vascular e a contribuição da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) neste processo em *strelítzia*, caracterizar a peroxidase e a polifenoloxidase relacionadas a esse bloqueio, e propor uso de soluções de pulsing que

reduzam ou inativem essas enzimas e que permitam solucionar o problema da oclusão, diminuindo as perdas pós-colheita e aumentando a longevidade das flores.

2. CAPÍTULO 1

ATIVIDADE DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE NA OCLUSÃO VASCULAR EM HASTES DE AVE-DO-PARAÍSO

RESUMO

Plantas de ave-do-paraíso possuem inflorescências de alto valor comercial e ornamental, devido a sua durabilidade, rusticidade, cor e forma. Porém, observa-se, ao longo da vida de vaso dessas flores, a perda da condutividade hidráulica devido ao bloqueio xilemático. Um aumento na atividade da peroxidase (POD) e polifenonoloxidase (PPO), induzidas pelo corte, parece preceder o bloqueio dos vasos xilemáticos nessa espécie. O objetivo deste trabalho foi determinar o momento da ocorrência do bloqueio vascular em *strelitzia*, bem como o envolvimento da POD e PPO no processo. Na primeira parte do experimento, as hastes foram submetidas a diferentes tempos de armazenamento a seco (0 a 48 horas), após este período, essas foram colocadas na água destilada e, a cada 6 horas, foi avaliada a variação de massa fresca e o teor relativo de água (TRA), por 24 horas. Após 100 horas de permanência das hastes na água, foi feita a determinação da atividade da POD e PPO. Na segunda parte do experimento, as hastes, após passarem pelo processo de padronização, foram colocadas imediatamente na água e a variação de massa fresca e atividade enzimática da POD e PPO foi avaliada diariamente até o 8º dia (total secamento do primeiro florete). Todos os tratamentos tiveram o mesmo comportamento quanto a variação de massa, sendo que hastes que permaneceram por mais de 32 horas em armazenamento seco apresentaram perda de massa fresca superior a 5%. Após serem colocadas na água, a absorção ocorreu principalmente nas 6 primeiras horas e a recuperação dos níveis de massa fresca e TRA inicial ocorreu somente nas hastes armazenadas a seco por até 16 horas. Maior atividade da POD foi encontrada nas hastes controle e da PPO nas hastes submetidas ao

armazenamento a seco, por 16, 24, 32 e 40 horas. A atividade da POD ao longo da vida de vaso foi maior no 8º dia, enquanto a da PPO manteve-se constante ao longo da vida de vaso. A atividade da POD mostrou-se superior à da polifenoloxidase em todas as análises, o que sugere uma maior influência dessa enzima no bloqueio xilemático de ave-do-paráiso. Conclui-se que, o bloqueio em hastes de strelítzia ocorre em períodos superiores a 16 horas de armazenamento a seco e nesta espécie, a POD parece ter uma importância maior no processo de oclusão do que a PPO.

2.1 INTRODUÇÃO

A strelítzia é uma planta nativa da região costal da África do Sul (Bianchini & Pântano, 1974, apud Moraes, 1999) muito utilizada em jardins, decoração de interiores e como flor de corte (Halevy *et al.*, 1976). É uma planta herbácea rizomatosa, entouceirada, acaule, com altura de 1,2-1,5 m, apresentando folhas firmes e coriáceas (Lorenzi & Souza, 2001). Os floretes abrem sucessivamente de uma bráctea de cor verde-avermelhada, possuem três sépalas laranjadas e duas pétalas azuis modificadas em forma de seta, onde se abrigam os órgãos sexuais (Castro, 1995).

Um dos principais problemas pós-colheita encontrado em flores de corte é o decréscimo na absorção de água, devido ao desenvolvimento da oclusão dos vasos xilemáticos. Em algumas espécies, esse bloqueio é devido à deposição de materiais dentro dos vasos do xilema, enquanto em outras, a inibição da absorção ocorre pela presença de ar nos vasos, que pode ser observado tanto em flores colhidas e colocadas imediatamente na água, ou quando transportadas a seco (van Doorn, 1997).

O dano mecânico nos tecidos da planta, como o que ocorre durante o corte da haste das flores, controla a expressão gênica. Genes não relacionados à defesa da planta têm a expressão diminuída, enquanto os que estão envolvidos com a cicatrização ao dano ou ataque a patógenos são aumentados (Kombrink & Hahlbrock, 1990). Entre os genes que têm a expressão aumentada estão os das enzimas polifenoloxidase e peroxidase (Okey *et al.*, 1997). Essas enzimas estão envolvidas na biossíntese de compostos como lignina e suberina. Essas reações ao dano primariamente servem para impedir a entrada de microrganismos no tecido aberto (Bucciarelli *et al.*, 1998), mas podem resultar na oclusão dos vasos do xilema, devido à deposição de materiais como gomas no lúmen dos vasos (Davies *et al.*, 1981) e formação de tilose em células adjacentes ao mesmo (Zimmermann & Brown, 1977).

As enzimas peroxidase e polifenoloxidase estão envolvidas no bloqueio vascular de muitas espécies, como crisântemo (van Doorn & Vaslier, 2002), bouvardia (Vaslier,

& van Doorn, 2003), *Grevillea* (He *et al.*, 2006) e strelítzia (Marques, 2008). Apesar de já estar estabelecido o envolvimento dessas enzimas no processo de oclusão, poucas informações acerca disso são conhecidas em strelítzia. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o momento de ocorrência da oclusão vascular em strelítzia e verificar a influência e participação da POD e PPO no processo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Hastes florais de *Strelitzia* foram colhidas com um florete aberto (ponto de colheita comercial) em campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, na latitude de 20°45' sul, longitude 42°51' oeste e altitude de 651 m, de abril a maio de 2008, no período da tarde (13:30 horas). Em seguida, as hastes foram levadas para o laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, onde passaram por processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento, sendo o corte realizado dentro da água para evitar a entrada de ar no interior dos vasos do xilema. Após esse procedimento, foram distribuídas aleatoriamente em cada tratamento. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 20\%$ e intensidade luminosa de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.1 Tratamentos pós-colheita

As hastes de *Strelitzia* foram armazenadas a seco sobre as bancas do laboratório por 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas sob temperatura ambiente. Após esse período, as hastes foram colocadas em frascos contendo 400 mL de água destilada, onde foi avaliada a cada 6 horas durante as primeiras 24 horas a variação de massa fresca e o teor relativo de água das sépalas. Após 100 horas de permanência das hastes na água, foram retiradas, congeladas e armazenadas seções de aproximadamente 2 cm da base da haste para posterior análise das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. A cada 48 horas, realizou-se a troca da água dos frascos, para evitar o desenvolvimento de microrganismos e o consequente bloqueio xilemático.

2.2.2 Variação de massa fresca

A perda de massa fresca das hastes de ave-do-paraíso foi avaliada pela diferença entre a massa da haste antes (100%) e após o armazenamento a seco, sendo expresso em % de perda de massa fresca como se segue:

$$\text{PMF} = [(\text{PI} - \text{PF}) \times 100] / \text{PI} \text{ onde:}$$

PMF – perda de massa fresca (%)

PI – massa fresca inicial (g)

PF – massa fresca final (g)

As hastes, após serem colocadas na água, foram pesadas com 6, 12, 18 e 24 horas, sendo expressas como percentual de massa fresca em relação à massa fresca inicial [PMF = (PF/PI) x 100].

Cada tratamento apresentou 5 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por duas hastes. Os dados foram submetidos a análises estatísticas descritivas da média e erro padrão da média.

2.2.3 Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) das sépalas de *strelítzia* foi determinado após o armazenamento a seco, e 6, 12, 18 e 24 horas após a permanência das hastes na água. Para a determinação do TRA, a técnica utilizada foi a de Càtsky (1974), em que 4 discos foram retirados das sépalas das flores com um perfurador de 0,6 cm de diâmetro. Esses discos foram pesados para a obtenção da massa fresca inicial (MF) e colocados em espuma de poliuretano perfurada para hidratação. Os discos permaneceram na espuma até sua completa saturação, quando foram novamente pesados, para a obtenção da massa túrgida (MT). Para a determinação da massa seca (MS), esses discos foram levados para a estufa a 70°C onde permaneceram por 72 horas.

Após isso, procedeu-se a estimação do teor relativo de água, com o emprego da seguinte equação (Weatherley, 1950):

$$\text{TRA} (\%) = [(\text{MT} - \text{MF}) / (\text{MT} - \text{MS})] \times 100 \text{ onde:}$$

MF - massa fresca inicial (g)

MT - massa túrgida (g)

MS - massa seca (g)

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

2.2.4 Ensaio enzimático da peroxidase e polifenoloxidase

O material vegetal utilizado para a determinação da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase foi retirado após a aplicação dos tratamentos e permanência das hastes por 100 horas na água. Para isso, secções de 2 cm da base de cada haste foram retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer horizontal (-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, triturados no politron até a obtenção de massa homogênea, que foi então centrifugada 17.000 g durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática e quantificação das proteínas (Bradford, 1976).

A composição do tampão de extração utilizado para a peroxidase (Neves, 2003) e polifenoloxidase (Concellón *et al.*, 2004) segue no quadro abaixo (Quadro 1):

Quadro 1 – Composição dos tampões de extração utilizados para a peroxidase e polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Enzima	Tampão de Extração
Peroxidase	Tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5, bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15M
Polifenoloxidase	Tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5, polivinilpirrolidona (PVP40) 1% e Tritox X-100 1%

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 fosfato 0,1 M (pH 6,0) e 0,5 mL de H₂O₂ (1,8%). A quantidade de extrato enzimático utilizado variou com a amostra, completando-se os 3 mL da reação. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático que foi substituído por água. 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 25 µL de extrato enzimático foram adicionados ao meio de reação contendo 1,475 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), acrescido de 4-metil-catecol 10 mM, completando-se um volume final de reação de 1,5 mL. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. 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 & Aydemir, 2001).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo os dados interpretados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

2.2.5 Variação de massa fresca ao longo da vida de vaso

As hastes, ao chegarem ao laboratório, passaram pelo processo de seleção e padronização e foram imediatamente colocadas na água destilada. Variações no percentual de massa fresca foram avaliadas a cada 24 horas, durante 8 dias (dia de completo secamento do primeiro florete), como descrito no item 2.2.2.

Cada tratamento apresentou 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por duas hastes. Os dados foram submetidos a análises estatísticas descritivas da média e erro padrão da média.

2.2.6 Atividade da peroxidase e polifenoloxidase ao longo da vida de vaso

As hastes, após serem colhidas e levadas para o laboratório, passaram por um processo de seleção e padronização e foram imediatamente colocadas na água destilada. Amostras da base da haste de strelitzia foram retiradas diariamente até o 8º dia (dia de total secamento do primeiro florete), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas para posterior análise da atividade enzimática ao longo da vida de vaso.

O processo de extração e determinação da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase seguiu o mesmo descrito no item 2.2.4.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo os dados interpretados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Variação de massa fresca

O armazenamento a seco das hastes de ave-do-paráíso por diferentes períodos levou a uma perda de massa fresca considerável ao longo do período de armazenamento (Figura 1). Armazenamentos por 40 e 48 horas proporcionaram perdas de massa fresca superior a 5% (Figura 1).

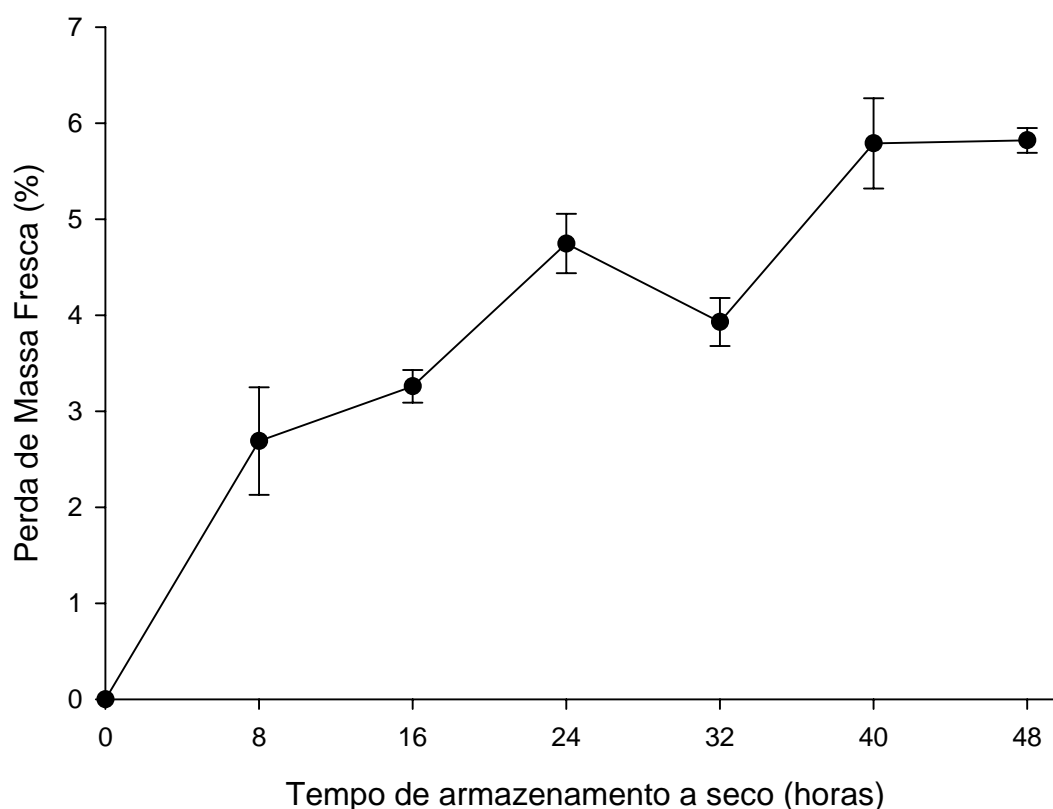


Figura 1. Perda de massa fresca (%) das hastes de *Strelitzia reginae*, submetidas aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Após o estresse hídrico promovido pelo armazenamento a seco das hastes por diferentes períodos, a variação percentual de massa fresca foi acompanhada durante as primeiras 24 horas de permanência em água. Todas as hastes, independentemente do período de armazenamento a seco, após serem colocadas na água, apresentaram a capacidade de absorvê-la durante as primeiras 6 horas em água; no entanto, somente as hastes que permaneceram por até 16 horas nessa condição, tiveram a recuperação completa de massa fresca inicial (Figura 2). Provavelmente, hastes armazenadas por períodos de tempo maiores que 16 horas apresentam interrupção da coluna de água nos vasos xilemáticos, o que resulta em decréscimo da condutância hidráulica, reduzindo assim a absorção de água (van Meeteren & van Gelder, 1999). Vieira (2008), trabalhando com boca-de-leão, não observou recuperação completa da hidratação das flores após os diferentes períodos de armazenamento a seco (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas). Isto pode ser decorrente das diferenças no percentual de perda de massa fresca observadas nessas espécies, em que após 8 horas de armazenamento a seco, a perda em *Strelitzia* foi de 2,54% (Figura 1) e de mais de 20% em boca-de-leão.

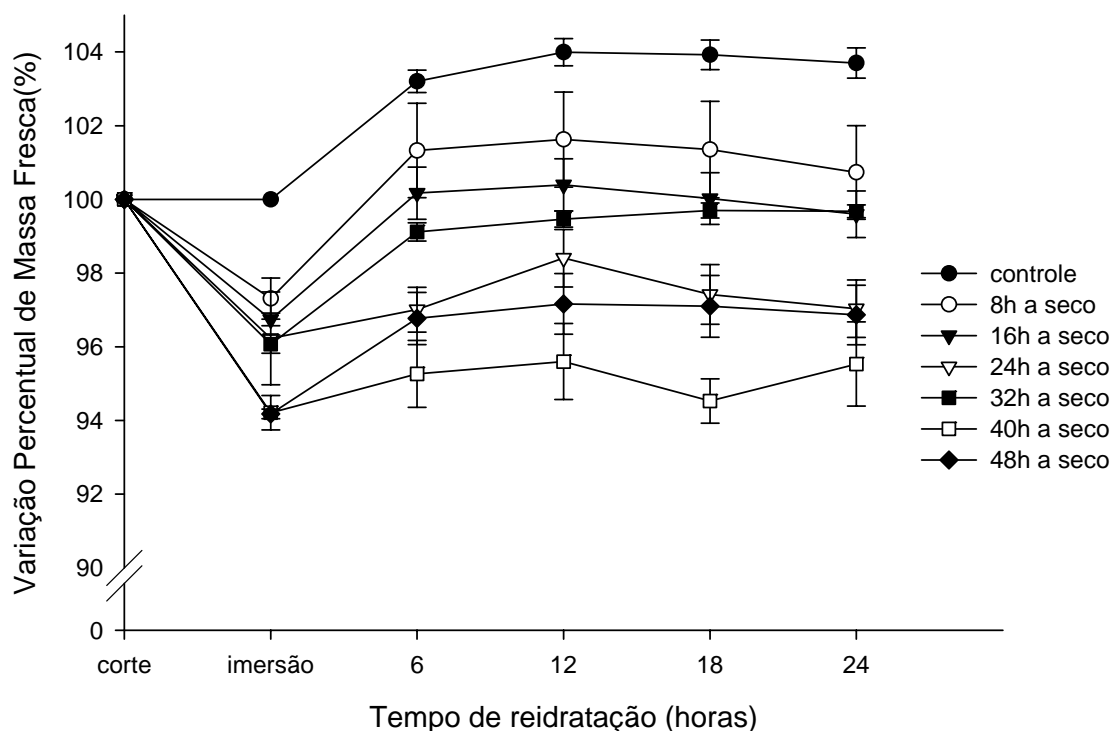


Figura 2. Variação percentual de massa fresca das hastes de *Strelitzia reginae*, submetidos aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas), em função do tempo de reidratação (6, 12, 18 e 24 horas). As barras verticais representam o erro padrão da média.

A duração do período de desidratação que resulta na inibição da absorção de água depende da espécie (Mensink & van Doorn, 2001). Em rosa (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha, após 24 horas de estresse hídrico, houve perda de 28,9% da massa fresca inicial, e mesmo após as hastes serem colocadas na água por 2 horas, essas não tiveram a capacidade de recuperar a massa fresca inicial, permanecendo com 91,5% (Jin *et al.*, 2006). Strelítzia mostrou ser uma planta bastante resistente, sendo que, após 24 horas de armazenamento a seco, somente uma perda de 3,8% de massa fresca foi observada (Figura 1). Apesar da perda de massa fresca em strelítzia ser muito menor quando comparada com a rosa após as 24 horas de estresse, essas hastes também não tiveram a capacidade de recuperar a massa fresca inicial, alcançando o máximo de 98,4% após 12 horas de reidratação (Figura 2). Flores de crisântemo armazenadas a seco, após serem colocadas na água, exibiram um rápido balanço hídrico negativo, ou seja, as taxas de transpiração foram maiores que as taxas de absorção, e isso ocorreu devido à oclusão do xilema na parte basal das hastes (van Meeterem 1989, 1992). Em crisântemo, o efeito das condições de crescimento e pré-colheita afeta a taxa de reidratação após o armazenamento a seco (van Ieperen *et al.*, 2002). Flores cultivadas com baixo conteúdo de água apresentam menor condutância hidráulica, o que parece ser explicado pelo menor diâmetro dos vasos do xilema (van Meeteren *et al.*, 2005).

2.3.2 Teor relativo de água

As sépalas provenientes das hastes controle, mantiveram seus teores relativos de água praticamente constantes ao longo das 24 horas (Tabela 1). Hastes armazenadas a seco por diferentes períodos, tiveram os teores relativos de água de suas sépalas aumentados ao longo dos períodos de reidratação, sendo este aumento mais pronunciado nas primeiras horas, assim como também foi observado na variação de massa fresca (Figura 2 e Tabela 1). Após 24 horas de reidratação, os tratamentos com 16, 24, 32, 40 e 48 horas de armazenamento a seco, tiveram os níveis de TRA em torno de 80%, o que mostra a importância do tempo na recuperação da turgidez (Tabela 1). Vieira (2008) encontrou em boca-de-leão comportamento semelhante de teor relativo de água nas folhas de hastes submetidas aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas), após um período de 24 horas de reidratação.

Após 48 horas de armazenamento a seco o teor relativo de água das sépalas de strelítzia foi de somente 62,67%, redução de 28,98% em relação ao TRA do controle (Tabela 1). Apenas hastes que foram submetidas ao estresse hídrico moderado entre 8 e

16 horas, alcançaram após 12 horas de reidratação os valores de TRA similares ao controle, resultado esse semelhante ao observado na variação percentual de massa fresca, em que somente esses tratamentos conseguiram recuperar os níveis de massa fresca inicial (Figura 2 e Tabela 1).

Devido à capacidade de recuperação dos níveis iniciais de massa fresca e de teor relativo de água das hastes armazenadas a seco por até 16 horas, sugere-se que o bloqueio dos vasos xilemáticos nesta espécie deve estar ocorrendo após este período.

Tabela 1. Teor Relativo de Água (%) de sépalas de *Strelitzia reginae*, submetidos aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas), em função do tempo de reidratação (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Período de Armazenamento (horas)	Tempo de reidratação (horas)				
	0	6	12	18	24
Controle	91,65 A	92,71 A	92,67 A	93,65 A	94,40 A
8	89,46 A	89,46 B	93,11 A	89,53 B	86,05 B
16	83,36 B	86,32 C	92,97 A	88,89 B	82,24 C
24	84,96 B	87,94 B	82,72 B	82,49 C	78,87 C
32	83,71 B	87,72 B	83,05 B	84,11 C	80,23 C
40	74,97 C	81,78 D	89,54 A	80,89 C	79,69 C
48	62,67 D	85,34 C	70,91 C	76,51 D	79,56 C

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade

2.3.3 Atividade da peroxidase e polifenoxidase

A atividade enzimática da peroxidase nas hastes de *strelitzia* após a aplicação dos tratamentos e permanência por 100 horas na água pode ser vista na Figura 3. Maior atividade da peroxidase foi observada nas hastes colhidas e colocadas imediatamente na água. Hastes que foram submetidas a 40 e 48 horas de armazenamento a seco tiveram menores atividades da POD, uma redução de 3,5 vezes em relação ao controle (Figura 3); isso pode ser devido à imposição de um estresse muito severo, proporcionado por esse longo período de armazenamento a seco.

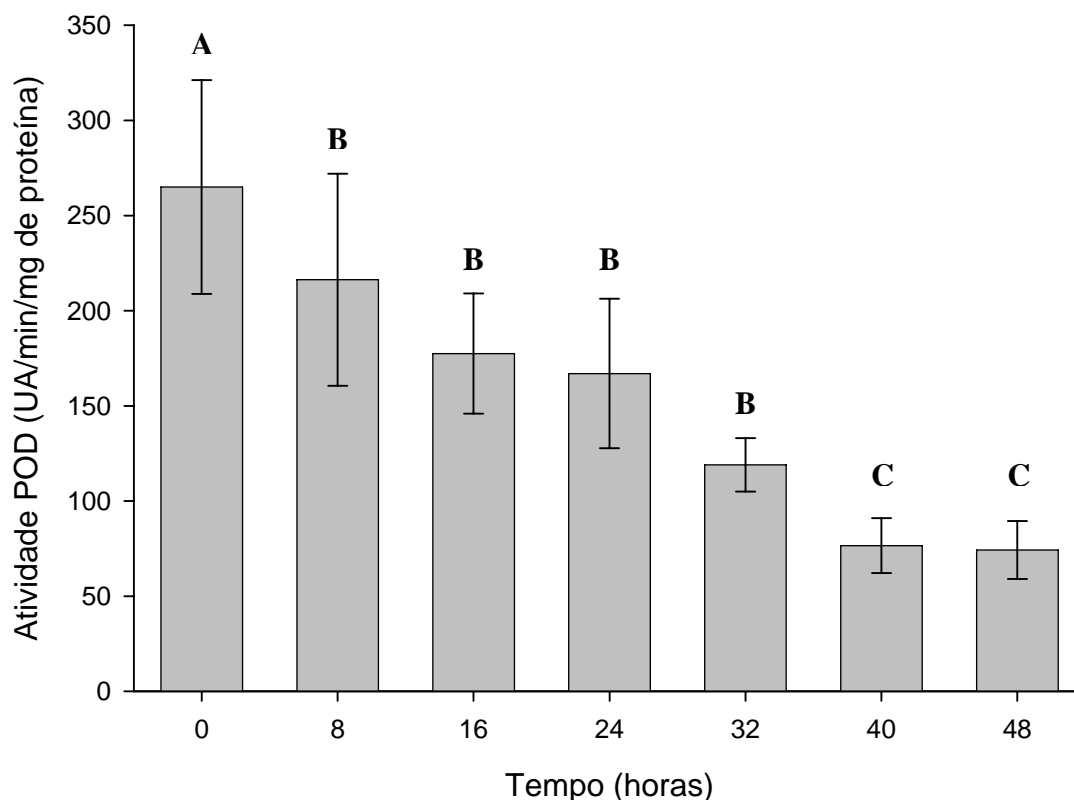


Figura 3. Atividade da enzima peroxidase (UA/min/mg de proteína) em hastes de *Strelitzia reginae*, submetidas aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas) após 100 horas em água. Barras verticais representam o erro padrão da média, letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

A atividade enzimática da polifenoloxidase foi maior em hastes submetidas ao armazenamento a seco entre 16 e 40 horas, seguida de queda (Figura 4). Quando comparada à atividade relativa das duas enzimas nos seus respectivos tratamentos, observa-se que sob todos os períodos de armazenamento, a atividade da peroxidase foi superior à da polifenoloxidase. O máximo de atividade na polifenoloxidase foi de 28,0 UA/min/mg de proteína, após 16 horas de armazenamento seco, enquanto, na peroxidase foi de 264,9 UA/min/mg de proteína em hastes controle, atividade essa 8,9 vezes maior que a da PPO (Figuras 3 e 4). Devido a essas diferenças de atividade, sugere-se que, o bloqueio dos vasos xilemáticos em *strelítzia* provavelmente esteja mais relacionado à atividade da peroxidase do que da polifenoloxidase.

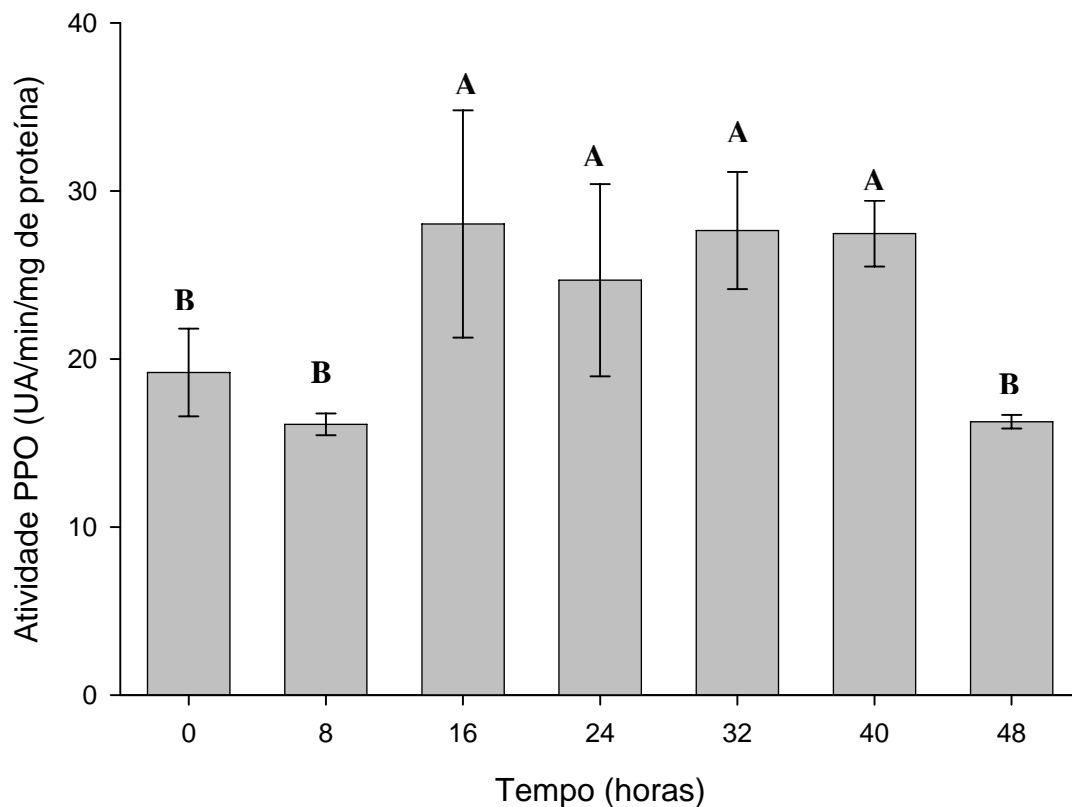


Figura 4. Atividade da enzima polifenoloxidase (UA/min/mg de proteína) em hastes de *Strelitzia reginae*, submetidas aos diferentes períodos de armazenamento a seco (0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas) após 100 horas em água. Barras verticais representam o erro padrão da média, letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Apesar da padronização das hastes antes da aplicação dos tratamentos, uma grande variação na atividade específica de ambas as enzimas foi observada entre as repetições, dentro do mesmo tratamento. Trejo-Gonzalez & Soto-Valdez (1991), trabalhando com polifenoloxidase em maçãs, observaram que a atividade específica da PPO foi altamente distinta entre as repetições. Harel & Mayer (1968) relataram que, diferentes formas de PPO existem nos cloroplastos e parecem variar com o estágio de desenvolvimento do cloroplasto e estágio de maturidade da maçã, e, embora se padronize o estágio de colheita a ser utilizado, variações ambientais podem resultar nessas diferenças. Essas diferenças também podem ser explicadas por variações genéticas no grau de escurecimento enzimático, como foi observado em pêssego (Hansche & Boynton, 1986).

2.3.4 Variação de massa fresca ao longo da vida de vaso

A variação no percentual de massa fresca de hastes de *Strelitzia* foi avaliada até o oitavo dia (Figura 5). Um aumento no percentual de massa fresca foi observado durante o primeiro dia de permanência das hastes na água. Após esse período, o percentual decresceu até o final da avaliação (Figura 5). Segundo van Meeteren (1989, 1992), as flores de corte na água, geralmente desenvolvem um balanço hídrico negativo, ou seja, suas taxas de absorção de água são mais baixas que as taxas de transpiração, e isso ocorre devido a oclusão dos vasos do xilema na parte basal da haste. Em *Strelitzia*, o balanço hídrico negativo ocorreu a partir do 4º dia de vaso (Figura 5).

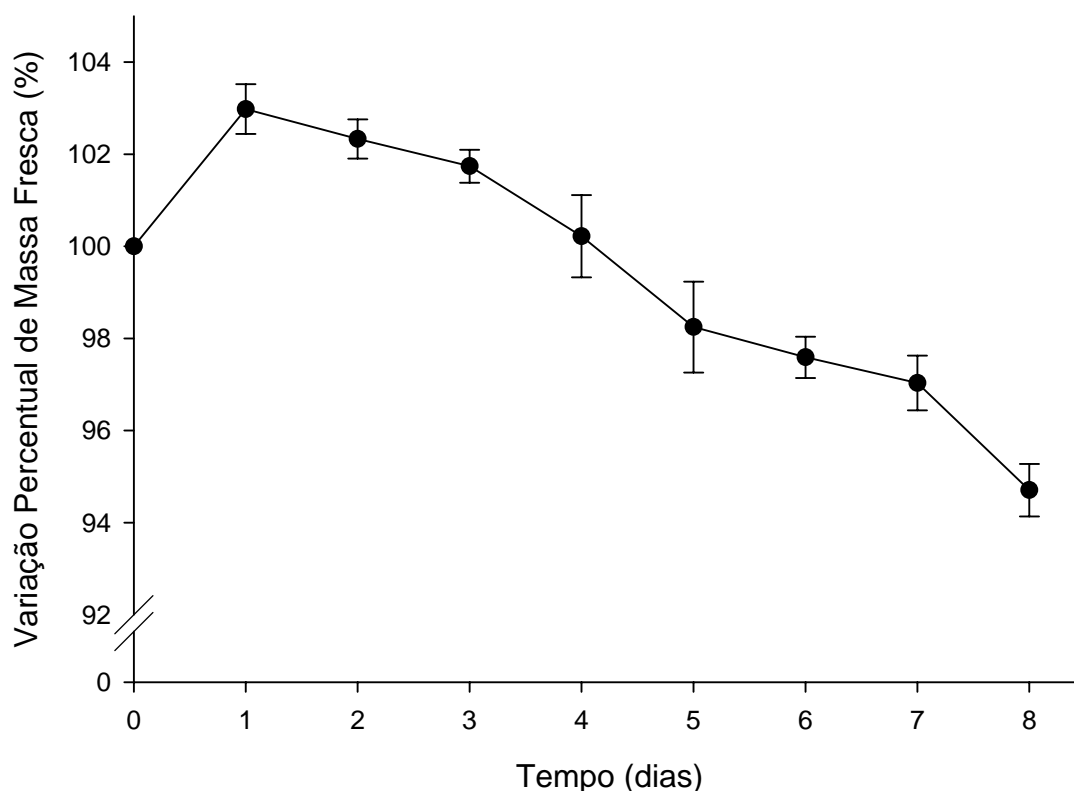


Figura 5. Variação percentual de massa fresca das hastes de *Strelitzia reginae*, ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em flores de *Curcuma alismatifolia*, ao se avaliar o percentual de massa fresca inicial ao longo da vida de vaso, observou-se decréscimo a partir do primeiro dia, e após o sétimo dia este foi de somente 65% da massa fresca inicial, indicando assim, o bloqueio dos vasos do xilema logo nos primeiros dias da vida de vaso (Bunya-Atichard *et al.*, 2004). Em *Strelitzia*, após 7 dias, o percentual de massa fresca foi de 97,03% (Figura 5), uma perda muito menor se comparada com as flores de *Curcuma*.

Inflorescências de *Dendrobium* 'Jew Yuay Tew' apresentaram redução da massa fresca após 5 dias de vida de vaso (Rattanawisalanon *et al.*, 2003). Em flores de cravo, o tempo necessário para que se tenha o balanço hídrico negativo é de 3,6 dias (van Doorn *et al.*, 1995). Hastes de *Zinnia elegans*, que não receberam cortes a cada 12 horas, apresentam declínio contínuo da massa fresca após a colheita, e em paralelo, os sintomas de murchamento de pétalas e folhas foram observados (Carneiro *et al.*, 2002).

A restauração do balanço hídrico pode ser observada quando a base da haste é cortada, removendo assim a região onde o bloqueio xilemático ocorreu. Neste experimento, como o corte da base da haste somente ocorreu no momento da sua padronização, a oclusão dos vasos xilemáticos permaneceu até o final. Uma vez que o vaso é bloqueado, a absorção de água é limitada devido à alta resistência hidráulica e como o processo de transpiração tem continuidade, tem-se o desequilíbrio hídrico (van Meeteren *et al.*, 2001).

2.3.5 Atividade da peroxidase e da polifenoloxidase ao longo da vida de vaso

Como a atividade da POD ao longo dos diferentes períodos de armazenamento a seco foi maior nas plantas controle, neste experimento as flores foram colhidas e colocadas imediatamente na água e a atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase foi determinada diariamente até o oitavo dia (total secamento do primeiro florete). A atividade da peroxidase não apresentou diferença estatística até o sétimo dia e no oitavo dia a atividade praticamente dobrou (Figura 6). Tecidos da casca do caule de tabaco apresentam maior atividade da POD 7 dias após o dano (Lagrimini, 1991).

A atividade da polifenoloxidase não diferiu estatisticamente ao longo de todos os dias de avaliação, (Figura 7). Novamente, a atividade da peroxidase foi maior que a da polifenoloxidase ao longo dos dias, exceto no dia 0, quando a atividade das duas enzimas foi praticamente a mesma (20,49 UA/min/mg de proteína para a POD e 21,41 UA/min/mg de proteína para a PPO) (Figuras 6 e 7). Guimarães (2008) encontrou em *Heliconia bihai*, um decréscimo na atividade da POD e PPO ao longo dos dias após a colheita, não observando influência dos períodos de corte (sem corte, e corte a 24 ou 48 horas) sobre a atividade.

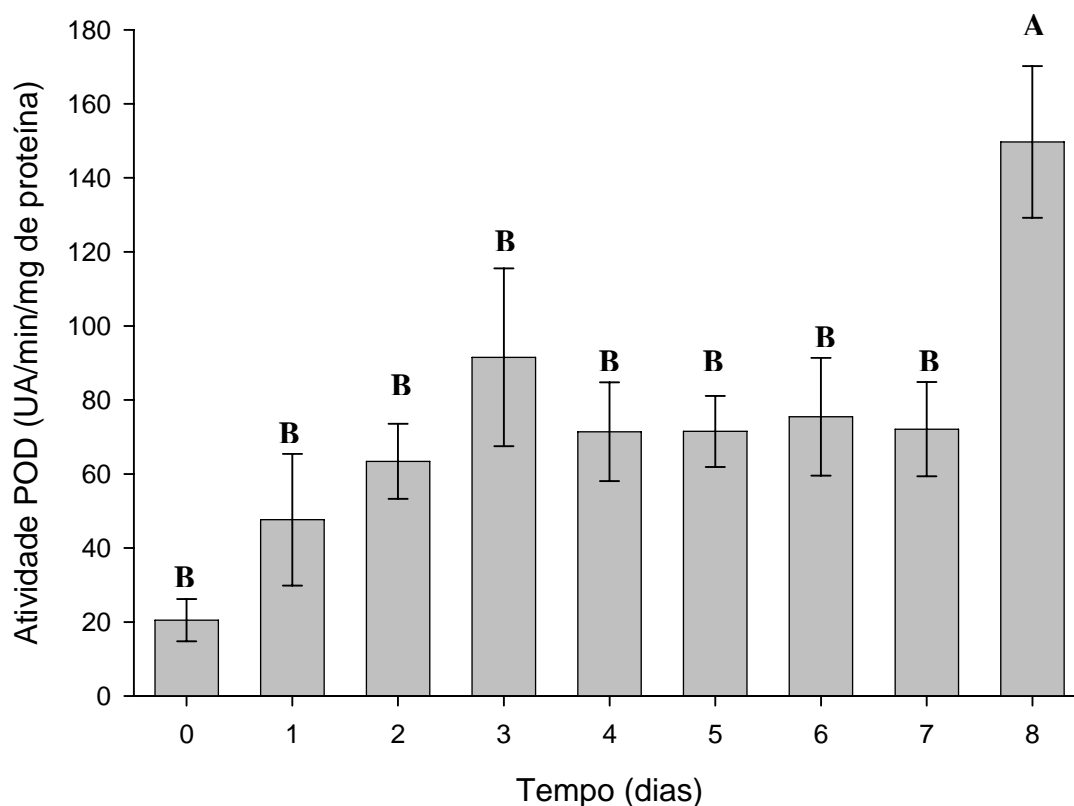


Figura 6. Atividade da enzima peroxidase (UA/min/mg de proteína) em hastes de *Strelitzia reginae*, ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Em raízes de *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban cv. Cristalina um aumento na atividade da POD e PPO foi encontrado 6 dias após o dano, o que sugere a participação dessas enzimas nesse processo. A atividade dessas enzimas parece relacionada com o processo de lignificação ou reparo do tecido danificado. (Aquino-Bolaños & Mercado-Silva, 2004). van Doorn & Vaslier (2002) estudando crisântemo, concluíram que o bloqueio dos vasos do xilema nessa espécie esteve associado a atividade de fenoxidase (principalmente catecol oxidase) e peroxidases. Essas enzimas teriam uma importante função nas reações ao dano causado pelo corte. Como esse bloqueio é produzido, ainda não é conhecido; parece ser devido à deposição de materiais, obstruindo os poros que conectam os vasos do xilema (Blee *et al.*, 2001). Aumento na atividade dessas duas enzimas tem sido observado após o dano, e esse aumento estaria

relacionado à síntese de lignina e suberina. Em tecidos injuriados, o aumento na POD da parede celular parece estar localizado em tiloses; balões que se desenvolvem para fora das células do parênquima e que se projetam no lúmen dos vasos do xilema, o que também pode levar a oclusão vascular (Smith *et al.*, 1994).

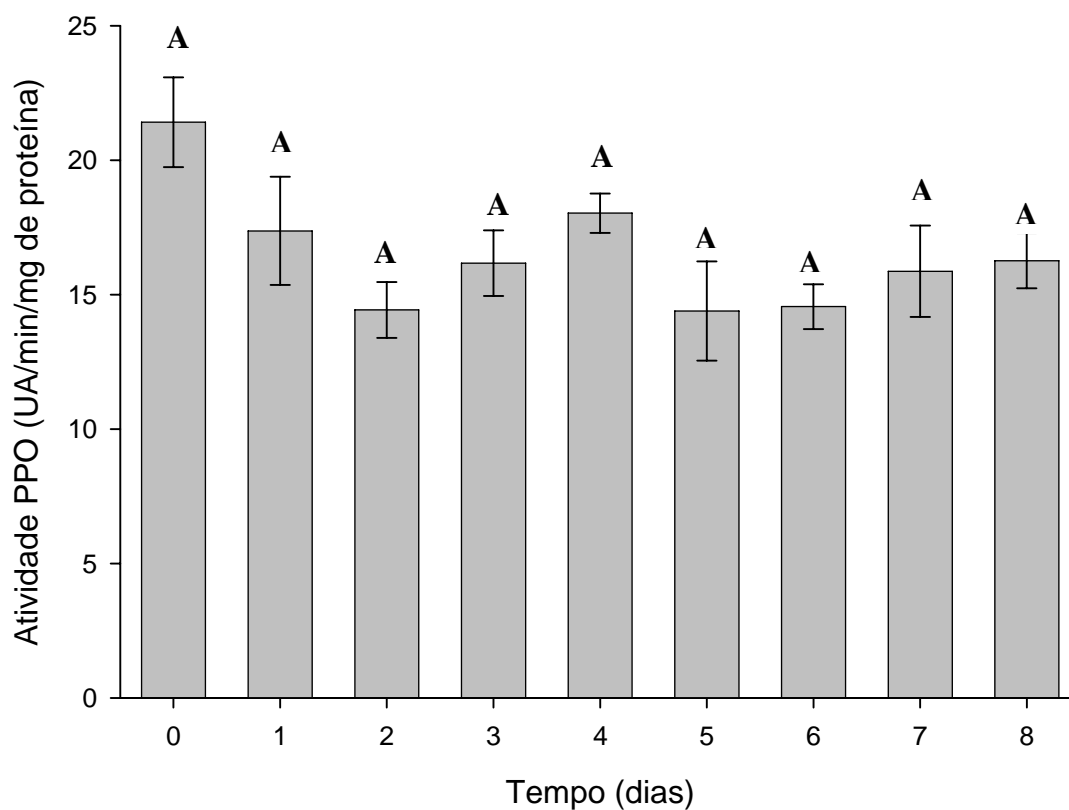


Figura 7. Atividade da enzima polifenoloxidase (UA/min/mg de proteína) em hastes de *Strelitzia reginae*, ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Estudos posteriores deverão ser feitos para determinar se o aumento na atividade da peroxidase no oitavo dia de vaso é somente devido ao aumento da expressão desta enzima, ou se novas isoenzimas passaram a ser expressas.

2.4 CONCLUSÕES

Armazenamentos a seco de hastes de *strelítzia* por mais de 40 horas levaram a perdas de massa fresca superiores a 5%.

Nos diferentes tempos de armazenamento a seco, a absorção de água ocorreu principalmente durante as 6 primeiras horas de permanência das hastes na água, sendo que, somente hastes armazenadas por até 16 horas a seco, recuperaram os valores de massa fresca e teor relativo de água iniciais, indicando que o bloqueio dos vasos xilemáticos nesta espécie deve estar ocorrendo após este período.

Maiores atividades da POD após 100 horas de permanência das hastes na água, foram encontradas no controle, enquanto que na PPO, hastes que sofreram estresses moderados mostraram maiores atividades.

A atividade da POD ao longo da vida de vaso de *strelítzia* foi maior no 8º dia, enquanto que a atividade da PPO manteve-se constante ao longo dos dias de análise.

Em todas as análises, a atividade da POD mostrou-se superior à da PPO, o que sugere maior influência desta enzima no bloqueio dos vasos xilemáticos em *Strelitzia reginae*.

3. CAPÍTULO 2

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA PEROXIDASE

RESUMO

Plantas tropicais como a ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*), estão sendo amplamente cultivadas como flor-de-corte, devido a sua beleza e durabilidade. Porém, observa-se uma perda gradual da condutividade hidráulica quando essas inflorescências são mantidas em vaso, associada ao aumento na atividade da peroxidase e polifenoloxidase em resposta ao dano, levando ao bloqueio dos vasos xilemáticos. O objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar a peroxidase envolvida no bloqueio dos vasos xilemáticos em ave-do-paraíso. As hastes foram colhidas, levadas ao laboratório, selecionadas, padronizadas e colocadas imediatamente em água destilada. Amostras da base da haste, após 8 dias de permanência na água, foram retiradas e congeladas para as análises enzimáticas. Após a extração, o extrato bruto da peroxidase foi submetido à saturação com diferentes concentrações de sulfato de amônio, e o extrato proveniente da fase que proporcionou maior atividade foi utilizado para as análises posteriores. Foram determinados: pH ideal, temperatura ótima, estabilidade do extrato após pré-incubação sob diferentes temperaturas e pHs por diferentes períodos de tempo, estabilidade do extrato no armazenamento e diferentes inibidores. Maior atividade da POD foi encontrada na fase proveniente da saturação com 60-80% de sulfato de amônio. O pH ótimo foi de 5,0 e a temperatura ótima de 60°C. Pré-incubação por 120 minutos sob pH 2,5 e 25°C resultou em 93,13% de inibição da atividade. Amostras pré-incubadas sob 70°C, por 120 minutos, exibiram 1,31% da sua atividade inicial, sendo que, pré-incubações por 10 minutos, a 80°C, ou 1 minuto, a 90°C, levaram a sua inativação completa. Extratos armazenados por 9 dias, a 4°C, mantiveram 90% da sua atividade inicial. Ditioneítról (DTT) 1 mM, ácido

ascórbico 2 mM, L-cisteína 5 mM, metabissulfito de sódio 6 mM, sódio azida 2 mM e β -mercaptoetanol 0,375 mM levaram a 100% de inativação da POD de ave-do-paráiso. Conclui-se que, a atividade ótima da POD de strelítzia ocorre a 60°C e pH 5,0, enquanto a sua inibição pode ser observada após pré-incubação em temperaturas altas, pHs ácidos ou diferentes inibidores.

3.1 INTRODUÇÃO

Strelitzia reginae é a espécie mais importante entre as cinco do gênero *Strelitzia*. Apresenta grande potencial para cultivo, devido a sua rusticidade e por ser resistente a pragas e doenças. Como flor de corte, apresenta características favoráveis como tamanho longo das hastes e cores fortes da sua inflorescência (Wood, 1995). Nessa espécie, quedas na absorção de água podem ser observadas quando as flores são mantidas em vaso. Essa queda é decorrente da obstrução dos vasos xilemáticos ocasionada pela atividade de enzimas oxidativas como a peroxidase e polifenoloxidase em resposta ao dano causado pelo corte, levando à maior resistência hidráulica e conseqüente menor absorção de água (Marques, 2008).

Peroxidase (POD) são oxidoreduases que catalizam a oxidação de compostos fenólicos, precursores de lignina e metabólitos secundários, tendo o peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos como agentes oxidantes (Kader *et al.*, 2002). A reação envolve a oxidação da enzima pelo peróxido de hidrogênio e duas seqüenciais reduções com transferência de um elétron a partir de substratos redutores, tipicamente pequenos fenóis (Castillo *et al.*, 2002). As peroxidases são classificadas em 3 grupos: a classe I compreende peroxidases intracelulares, classe II enzimas secretadas por fungos e a classe III as peroxidases extracelulares secretadas pelas células das plantas (López-Molina *et al.*, 2003). Em plantas, elas são usualmente classificadas em 3 subgrupos: aniônicas, neutras e catiônicas, dependendo do seu ponto isoelétrico (Intapruk *et al.*, 1993) e podem existir na forma solúvel ou ligada à membrana (Thongsook & Barrett 2005), e as extracelulares atuam na parede das células, participando da biossíntese de lignina e suberina (van Huystee, 1987).

Essa enzima participa de uma variedade de processos bioquímicos como catabolismo das auxinas, formação de suberina e lignina, ligação entre componentes da parede celular, defesa contra patógenos, alongamento celular (Passardi *et al.*, 2005) e amadurecimento de frutos (Robinson, 1991). A atividade da POD em alimentos está

associada com mudanças no sabor, textura, coloração e valor nutricional. No processo de lignificação, a peroxidase catalisa a oxidação do álcool coniferil para formar radicais fenóxi que então polimerizam não enzimaticamente para formar a lignina, um forte e resistente polímero (Robinson, 1991).

A POD é codificada por uma família multigênica e múltiplas formas de isoperoxidasas podem ser encontradas na mesma fonte vegetal. Essas podem diferir com respeito a sua massa molecular, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótima, especificidade ao substrato, composição de açúcares e aminoácidos e estabilidade térmica (Veitch, 2004).

Determinações *in vitro* das condições de atividade ótima da peroxidase e redução e/ou inibição dessa, são importantes para o desenvolvimento de métodos mais efetivos no controle da atividade desta enzima. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar a peroxidase envolvida com o bloqueio dos vasos xilemáticos em *Strelitzia reginae*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Hastes florais de ave-do-paráíso foram colhidas no campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (latitude 20°45' sul, longitude 42°51' oeste e altitude de 651 m), e levadas ao Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, onde passaram por processo de seleção e padronização para 80 cm, sendo o corte realizado na água para evitar a formação de bolhas de ar. As hastes foram colocadas imediatamente em frascos contendo 400 mL de água destilada, sendo essa trocada a cada 48 horas para evitar o desenvolvimento de microrganismos. No final do 8º dia, secções de aproximadamente 2 cm da base da haste de *Strelitzia* foram cortadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20°C) para posterior análise enzimática.

3.2.1 Extração e purificação parcial da peroxidase

Para a extração da peroxidase, 50 g de material vegetal foram homogeneizados em politron com 150 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, acrescido de 0,1% de bissulfito de sódio e 0,15 M de cloreto de sódio). Esse homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado por 17.000 g por 20 minutos, a 4°C. Uma amostra do sobrenadante foi retirada, sendo considerada como extrato bruto. O restante do sobrenadante foi saturado com sulfato de amônio 0 - 20%, 20 - 40%, 40 - 60%, 60 - 80% por meio de homogeneização a 4°C, por 30 minutos e posterior centrifugação em cada etapa. O sobrenadante final foi descartado e o precipitado formado em cada saturação e centrifugação foi ressuspenso em 2 mL de tampão de diálise (tampão fosfato 10 mM, pH 6,5, com 0,1% de bissulfito de sódio) e dialisado por 15 horas, à 4°C, em membranas de celulose modelo D-0405 da Sigma, contra o mesmo tampão (Neves, 2003).

3.2.2 Determinação da atividade enzimática da peroxidase

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 fosfato 0,1 M (pH 6,0) e 0,5 mL de H₂O₂ (1,8%). A quantidade de extrato enzimático utilizada variou conforme a fase de saturação com sulfato de amônio, totalizando os 3 mL da reação. O branco foi constituído por todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. 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).

O mesmo extrato utilizado para a determinação da atividade enzimática foi utilizado para a quantificação da proteína pelo método de Bradford (1976), utilizando Albumina Sorobovina (ASB) como padrão.

A concentração de sulfato de amônio na qual a enzima apresentou maior atividade foi utilizada para as análises posteriores.

3.2.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da peroxidase

Para determinar-se o efeito do pH na atividade da peroxidase, 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 calculada com relação a ela.

3.2.4 Estabilidade da peroxidase em função do pH

Para análise da estabilidade da enzima em relação ao pH, foi feita pré-incubação do extrato enzimático em solução tampão (1:1) de pHs 2,5 e 9,0 por um período de 0 a 120 minutos, sendo retiradas amostras a cada 10 minutos (Neves, 2003). A pré-incubação foi realizada a 25°C e banho de gelo (4°C). A atividade relativa foi determinada utilizando-se o tampão com o pH ótimo de reação e a temperatura de 25°C. Foi considerado 100% de atividade relativa amostras sem pré-incubação e nos demais tempos de pré-incubação a atividade foi calculada com base nesta.

3.2.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade, os extratos enzimáticos e o tampão de reação foram incubados por 10 minutos em 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.

3.2.6 Estabilidade térmica da peroxidase

Para avaliar a estabilidade térmica, o extrato enzimático foi incubado com o tampão fosfato 0,1M pH 5,0, a 70°C, por 120 minutos, 80°C por 10 minutos e 90°C por um minuto, sendo retiradas amostras ao longo do período de incubação. Após sair do banho-maria, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo (4°C), por 30 minutos, posteriormente sendo adicionado o substrato específico e a atividade relativa foi determinada em espectrofotômetro sob temperatura ambiente (Neves, 2003). Atividade relativa de 100% foi considerada para amostras sem pré-incubação, e a atividade ao longo da pré-incubação foi calculada com base nesta.

3.2.7 Estabilidade da peroxidase durante o armazenamento

Para determinar a estabilidade do extrato ao longo dos dias de armazenamento, os extratos enzimáticos foram armazenados durante 12 dias a 4°C e, diariamente a atividade específica foi determinada. A atividade no momento da extração foi considerada como 100% e a atividade relativa ao longo dos dias foi calculada com base nesta.

3.2.8 Efeito de inibidores na atividade da peroxidase

Para determinar-se o efeito de diferentes inibidores sobre a atividade enzimática, extratos enzimáticos foram incubados por 50 minutos, a 4°C, e por 10 minutos, a 25°C, em tampão de reação contendo 1 mM dos seguintes compostos: EDTA, sódio dodecil sulfato (SDS), sódio azida, L-cisteína, β-mercaptoetanol, ácido ascórbico, metabissulfito

de sódio e ditioeritrol (DTT) e, após isso, a atividade específica foi determinada (Márquez *et al.*, 2008).

Diferentes concentrações desses mesmos inibidores foram testadas até se atingir 100% de inibição. Na ausência de inibidores a atividade relativa foi considerada como 100% e as demais foram calculadas com base nesta.

3.2.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, sendo os dados submetidos à análise estatística descritiva da média e erro-padrão da média

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Extração e purificação parcial da peroxidase

A fração protéica que apresentou maior atividade foi aquela submetida à faixa de 60 - 80% de saturação com sulfato de amônio (Tabela 1). Quando comparado à atividade enzimática do extrato cru, com aquela proveniente da saturação com 60 - 80% de sulfato de amônio, verifica-se um aumento de 51% na atividade específica (Tabela 1).

Em *Beta vulgaris* L. (Rudrappa *et al.*, 2007), batata baroa (Menolli, 2006) e frutos de quiabo (Neves, 2003) maiores atividades da peroxidase também foram encontradas na fração de extrato que sofreu 60 - 80% de saturação com sulfato de amônio.

O objetivo da purificação é reter o máximo possível da enzima que se quer purificar e eliminar também o máximo possível de outras proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias (Segel, 1979). A adição de um sal em grandes quantidades precipita seletivamente algumas proteínas (Nelson & Cox, 2006). A utilização de sulfato de amônio permite separar facilmente cerca de 75% das proteínas presentes na solução, uma soma razoável de purificação para um processo rápido e simples como esse (Cooper, 1977, apud Neves, 2003). À medida que altas concentrações de sal são adicionadas à solução, a solubilidade da proteína vai decrescendo, devido à competição por moléculas de água pelo sal adicionado e por outros solventes dissolvidos. Altas concentrações de sal levam a grande quantidade de íons solvatados e pouco solvente sobra para dissolver as proteínas, levando a precipitação da mesma (Voet *et al.*, 2002).

Tabela 1. Atividade da peroxidase após saturação do extrato enzimático bruto proveniente de hastes de *Strelitzia reginae* com diferentes porcentagens de sulfato de amônio.

Sulfato de amônio (%)	UA/min/mg de proteína	Atividade Relativa (%)
0	407,1	100
0 - 20	7,6	1,9
20 - 40	30,1	7,4
40 - 60	529,6	130,1
60 - 80	614,6	151

3.3.2 Determinação do pH ótimo para a atividade da peroxidase

A maior atividade da peroxidase foi encontrada quando a reação enzimática se processou em tampão de ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 (Figura 1). Esse resultado está de acordo com o encontrado por Duarte-Vázquez *et al.*, (2000) em *Brassica napus* L. var *esculenta* e Deepa & Arumugan (2002) em folhas de *Elaeis guineensis* Jacq.

As enzimas possuem uma faixa de pH ótimo no qual a atividade é máxima, e *in vitro* esse pH é geralmente próximo ao do meio em que ela é encontrada *in vivo* (Nelson & Cox, 2006). Pelo fato de a peroxidase de strelítzia, ter apresentado um pH ótimo ácido, sugere-se que a enzima nessa espécie esteja localizada no vacúolo (Márquez, *et al.*, 2008).

Uma grande variação no pH ótimo é encontrada entre diferentes espécies. *Vanilla planifolia* apresentou o pH ótimo 3,8 (Márquez, *et al.*, 2008), *Olea europaea* L. 7,0 (Saraiva *et al.*, 2007), raízes de *Beta vulgaris* L. foi em torno de 6,0-7,0 (Rudrappa *et al.*, 2007), batata baroa 6,0 (Menolli, 2006), frutos de *Sclerocarya birrea* 4,0 (Mdluli, 2005), frutos de quiabo 6,5 (Neves, 2003), batata doce 3,5 e 5,5 (Castillo *et al.*, 2002) morango 5,2 (Martínez *et al.*, 2001) e em *Ipomoea cairica* foi 6,0 (Lin *et al.*, 1996). Essas diferenças podem ser devidas à existência de várias isoenzimas, diferentes localizações (parede celular, espaços livres da parede celular e vacúolo), tipo do doador de hidrogênio e da solução tampão utilizado para o ensaio enzimático (Halpin *et al.*, 1989). Doğan *et al.* (2007), estudando três espécies de *Salvia* concluíram que o pH ótimo de reação depende da espécie e do substrato utilizado.

A peroxidase de strelítzia apresentou baixa atividade em pH 2,5 e 9,0, como também foi observado em batatas baroa (Menolli, 2006) e frutos de quiabo (Neves, 2003). Quando comparado os níveis de atividade em pH 5,0 e pH 2,5, a enzima

conservou 18,7% da sua atividade, enquanto sob pH 9,0 a enzima foi praticamente inativada, mantendo somente 4,6% (Figura 1). Portanto, a peroxidase de ave-do-paráiso, apresenta maior suscetibilidade para a redução da atividade em pHs na faixa alcalina. O declínio na atividade sob esses pHs pode ser resultado da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima, ou ambos, pela inativação da enzima ou ainda pela combinação desses efeitos (Segel, 1979).

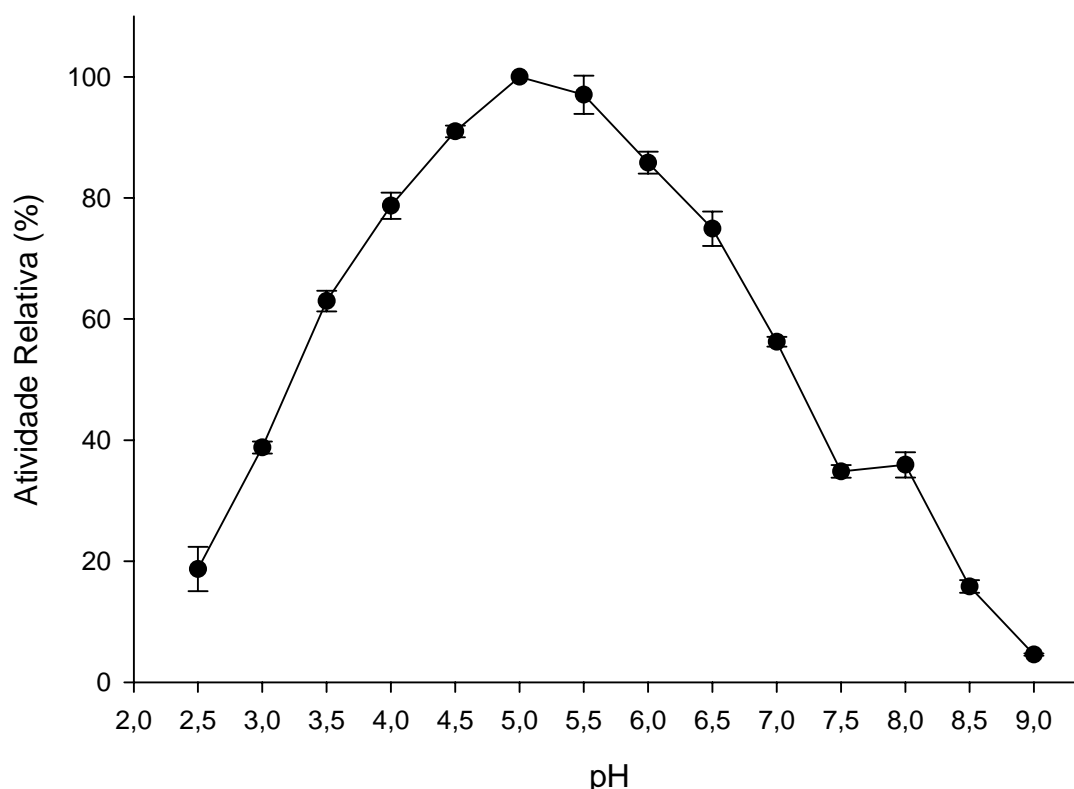


Figura 1. Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade da enzima peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.3.3 Estabilidade da peroxidase em função do pH

A pré-incubação em pH 2,5 proporcionou maior queda na atividade se comparada com as amostras pré-incubadas em pH 9,0, independentemente da temperatura de pré-incubação. Essa diferença foi maior quando a pré-incubação foi feita à 25°C (Figura 2). A pré-incubação em pH 2,5 e 25°C proporcionou uma queda drástica na atividade nos primeiros 10 minutos, permanecendo com 14% da atividade inicial, e após 120 minutos sua atividade foi de 6,9%. À 4°C, essa queda foi muito menor, e após 120 minutos de pré-incubação, 50% da atividade ainda permanecia (Figura 2). Redução da atividade da peroxidase em pH baixo é atribuída à perda do grupo prostético heme do

sítio ativo da enzima (Deepa & Arumughan, 2002). Tem sido sugerido, que a liberação do grupo heme do sítio ativo é pH-dependente e ocorre mais rapidamente em pHs abaixo de 4,0, o que proporciona a perda da atividade da POD (Thongsook & Barrett, 2005). Pré-incubação em pH 2,5 deve ter levado a uma inibição irreversível, pois mesmo após a enzima ser colocada de volta sob condições ótimas de atividade (pH 5,0), não houve recuperação de sua atividade.

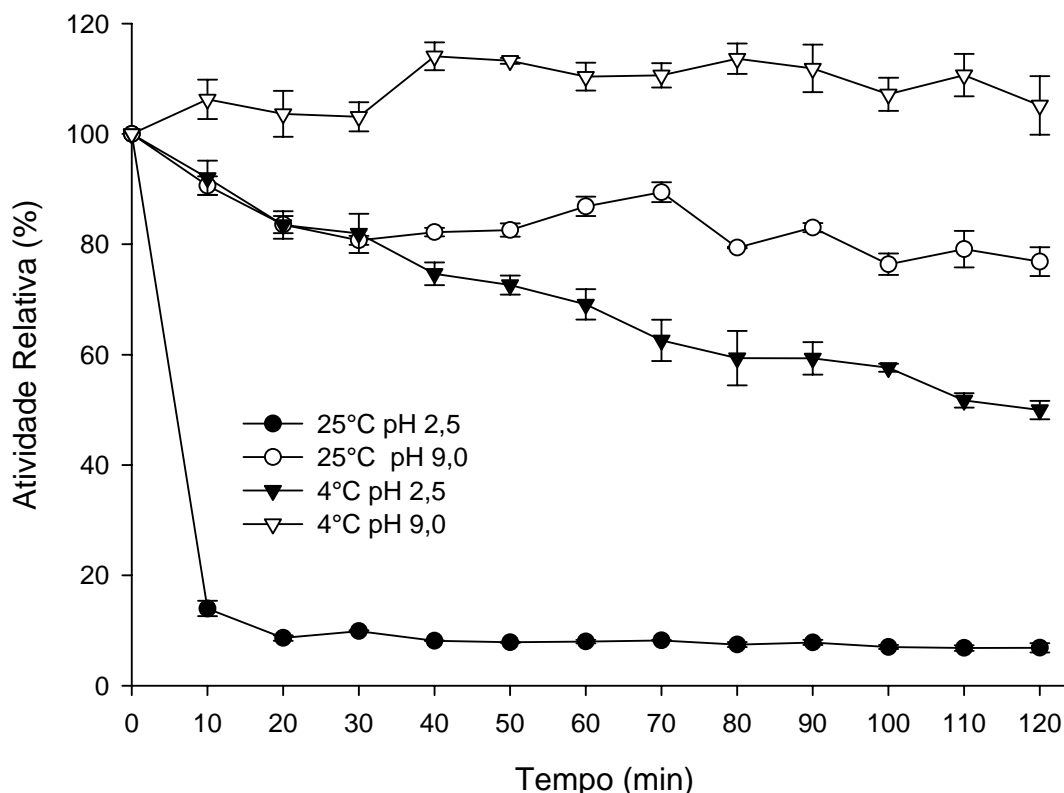


Figura 2. Efeito do tempo de pré-incubação em pH 2,5 e 9,0, a 4 e 25°C, sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados sob pH 5,0 e 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Amostras de peroxidase pré-incubadas sob pH 9,0 e 4°C mantiveram sua atividade inalterada ao longo dos 120 minutos de análise, enquanto 25°C ela caiu levemente, permanecendo com 76,9% da atividade inicial, após os 120 minutos (Figura 2), mostrando que a enzima é mais estável em pHs básicos que em ácidos, quando a atividade foi realizada no pH ótimo da enzima.

Quando se determinou o pH ótimo, observou-se uma baixa atividade da peroxidase quando esta foi processada em pH 9,0 (Figura 1). Quando a pré-incubação foi feita nesse pH, e a atividade processada em pH ótimo da POD, a redução na

atividade foi muito menor (Figura 2). Este resultado sugere que, o retorno do extrato às condições de máxima atividade (pH 5,0), após a pré-incubação em pH 9,0, permitiu que a enzima retomasse em parte a sua atividade a 25°C e totalmente a 4°C, à semelhança do encontrado por Neves (2003) em frutos de quiabeiros.

Após a pré-incubação do extrato enzimático de POD de *Vanilla planifolia* por 26 horas a 4 e 15°C, sob pHs de 2 a 12, observou-se alta estabilidade desta enzima em pH alcalino (Márquez *et al.*, 2008), enquanto que, houve redução na atividade enzimática em pHs ácidos. Resultados semelhantes foram encontrados em frutos de *Sclerocarya birrea* após a pré-incubação em diferentes pHs, por 30 minutos, a 25°C (Mdluli, 2005).

A estabilidade de uma enzima em função do pH depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima. Em muitos casos, um substrato pode induzir uma mudança conformacional na enzima para uma forma que será mais ou menos resistente à desnaturação por pH ou temperatura (Segel, 1979). Assim, quando se deseja reduzir a atividade da peroxidase em ave-do-paraíso, deve-se utilizar os pHs ácidos, uma vez que a POD mostrou maior estabilidade em pH alcalino.

3.3.4 Determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase

A peroxidase de ave-do-paraíso apresentou atividade máxima a 60°C, com elevação de 40,7% em relação à atividade encontrada a 20°C (Figura 3), o que pode ser considerado como elevada termoresistência. Folhas de *Secale cereale* L. apresentam temperatura ótima de 45-50°C (Murakami *et al.*, 2007), enquanto em *Olea europaea* L. esta foi de 34,7°C (Saraiva *et al.*, 2007), *Vanilla planifolia* 16°C (Márquez, *et al.*, 2008), batata baroa 30°C (Menolli, 2006), frutos de quiabo 36,5°C (Neves, 2003), morango 35°C (Martínez *et al.*, 2001), nabo 45°C (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000) e em *Ipomoea cairica* L. 50°C (Lin *et al.*, 1996).

Temperaturas de 70°C levaram à redução na atividade da peroxidase, enquanto a 80°C a enzima foi praticamente inativada (Figura 3). À medida que a temperatura é aumentada, maior é a energia cinética das moléculas de reagentes e, conseqüentemente, maiores colisões produtivas por unidade de tempo. As enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica provém 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 dessa estruturas terciárias e a enzima desnatura-se, perdendo assim sua capacidade catalítica (Segel, 1979).

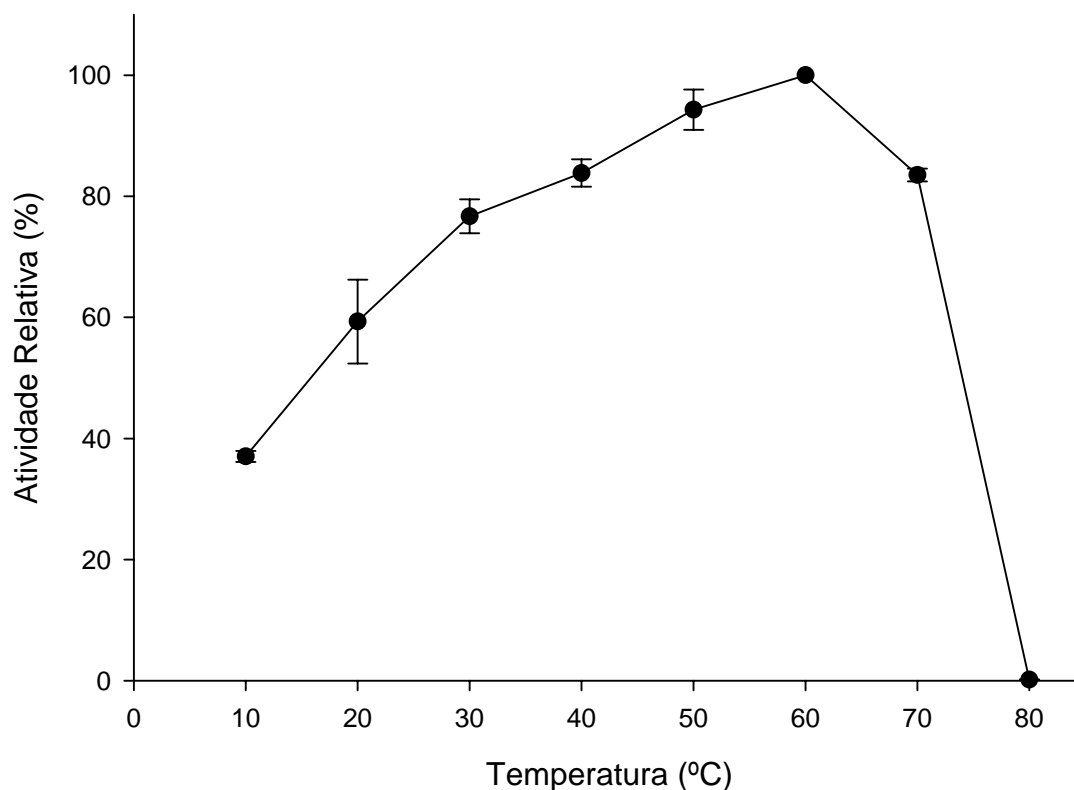


Figura 3. Influência da temperatura do meio de reação sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliadas em pH 5,0. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.3.5 Estabilidade térmica da peroxidase

Para avaliar o efeito da co-ação entre o tempo e a temperatura sobre a atividade enzimática da peroxidase, realizou-se a pré-incubação do extrato enzimático a 70, 80 e 90°C, por diferentes tempos, seguido de 30 minutos a 4°C. Extratos enzimáticos pré-incubados a 70°C por 120 minutos, apresentaram somente 1,3% da atividade inicial (Figura 4). Pré-incubação por 2 minutos a 80°C, levou a uma perda de 50% na atividade da POD, sendo que, após 10 minutos essa foi totalmente inativada (Figura 5). Quando a pré-incubação foi realizada a 90°C, um minuto foi suficiente para inativar totalmente a enzima (Figura 6).

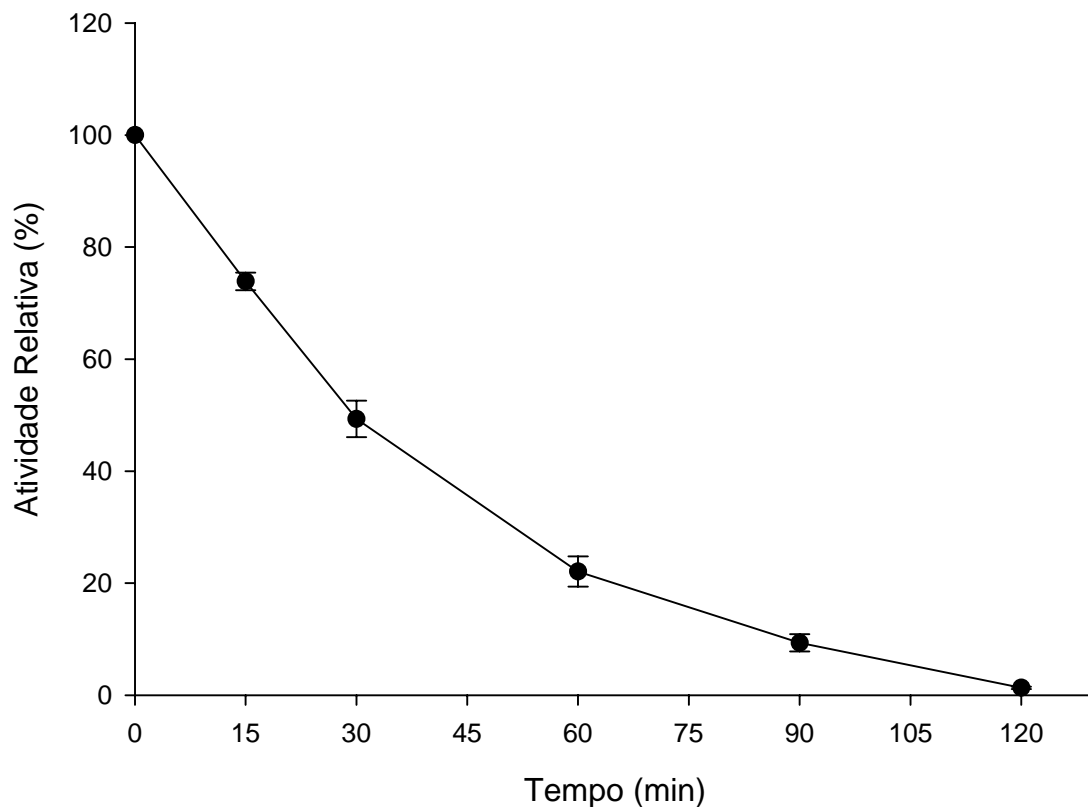


Figura 4. Efeito do tempo da pré-incubação a 70°C sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 5,0 e temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Menolli (2006), em batata baroa, observou inativação da POD após 15 minutos, a 60°C ou 5 minutos, a 70°C, enquanto Neves (2003), obteve inativação completa da POD de quiabo após pré-incubação a 70°C, por 14 minutos. Em *Olea europaea* L. a pré-incubação por 5 minutos, a 50 ou 60°C, foi suficiente para não se detectar mais atividade enzimática, indicando moderada estabilidade térmica da POD nessa espécie (Saraiva *et al.*, 2007). Pré-incubação a 70°C, por 30 minutos, levou à redução de 82% na atividade da POD de *Ipomoea cairica* (Lin *et al.*, 1996). POD provenientes de *Elais guineensis* Jacq, mostraram ser bastante resistentes a pré-incubação por 60 minutos a temperaturas de até 80°C (Deepa & Arumughan, 2002), o mesmo também foi observado em *Roystonea regia*, em que decréscimos na atividade foram encontrados somente a 90°C (Sakharov *et al.*, 2001). As PODs são consideradas como uma das classes de enzimas mais termoestáveis em plantas, como observado em ervilha, em que são necessários 6 minutos de exposição a 121°C para a sua inativação (Vamos-Vigyazo, 1981).

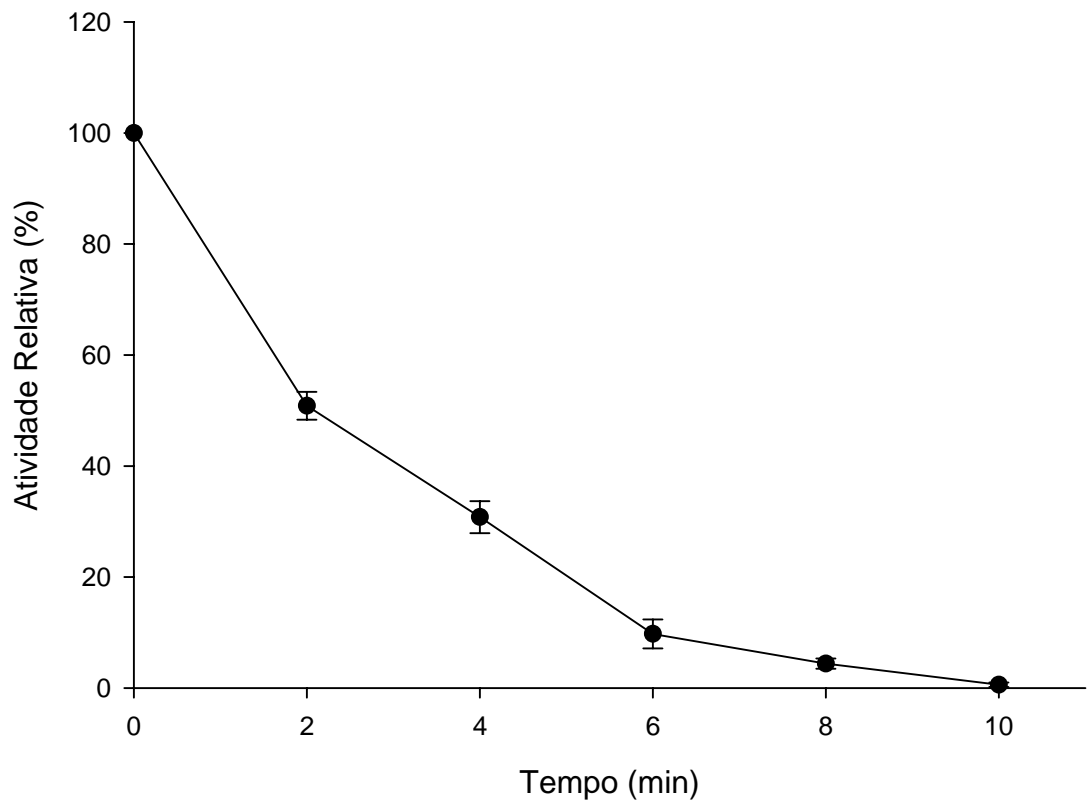


Figura 5. Efeito do tempo da pré-incubação a 80°C sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 5,0 e temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de diversos fatores que incluem o pH, força iônica do meio e a presença de ligantes (Segel, 1979). A variabilidade na estabilidade térmica pode ser largamente atribuída às estruturas particulares da enzima. Interações não covalentes, eletrostáticas e hidrofóbicas de isoenzimas podem ajudar na estabilidade, bem como pares extras de íon, pontes de hidrogênio e o grau de glicosilação (Adams, 1991). A presença de um grande número de resíduos de cisteína na cadeia polipeptídica também interfere na estabilidade da enzima (Deepa & Arumughan, 2002), uma vez que estes resíduos apresentam a propriedade de formar pontes dissulfeto com outros resíduos de cisteína da mesma proteína, o que pode estabilizar a sua estrutura (Nelson & Cox, 2006).

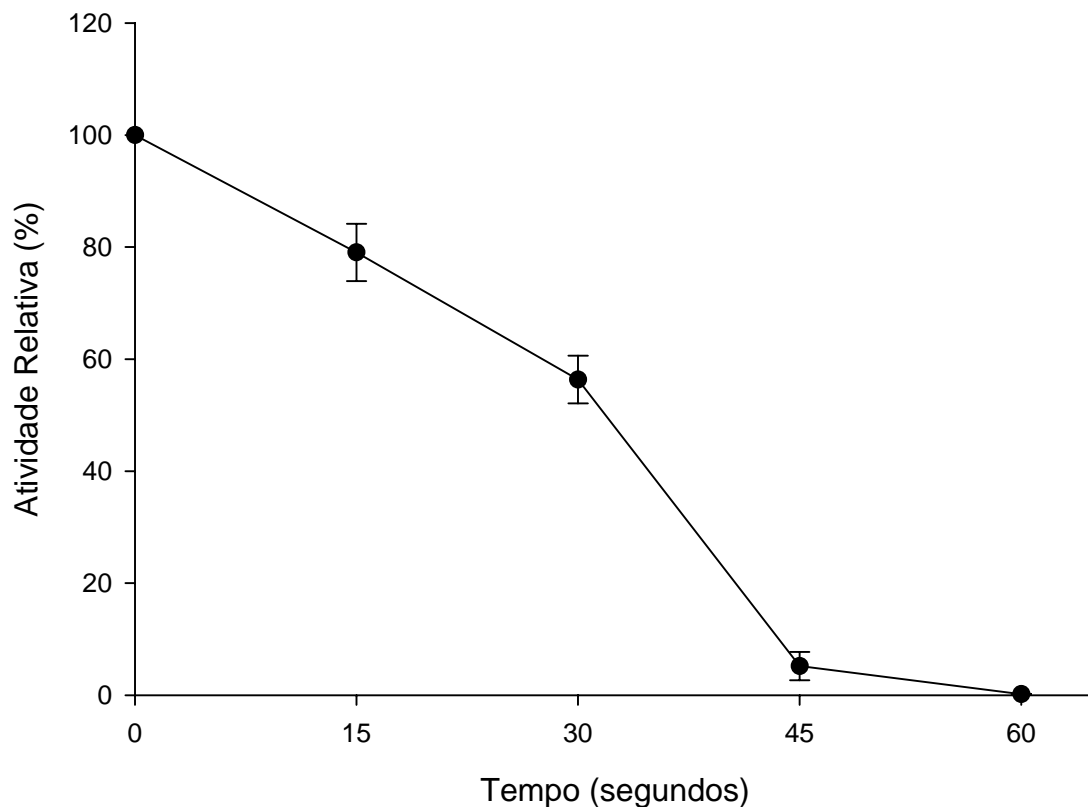


Figura 6. Efeito do tempo da pré-incubação a 90°C sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 5,0 e temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.3.6 Estabilidade da peroxidase durante o armazenamento

O efeito do período de armazenamento sobre a atividade de extratos parcialmente purificados de POD da base das hastes de *strelitzia* foi estudado durante 12 dias, a 4°C (Figura 7). A atividade relativa da peroxidase após o 1º dia de armazenamento foi de 91,3%. Valores próximos a 90% da atividade inicial foram encontrados até o 9º dia de armazenamento e após este período a atividade caiu, sendo de 77% no 12º dia (Figura 7).

Segundo Fatibello-Filho & Vieira (2002), extratos brutos de abobrinha, rabanete, batata doce e nabo podem ser armazenados a 4°C e suas atividades determinadas periodicamente durante vários dias. Em extratos armazenados, foi encontrada atividade de peroxidase constante durante 6 meses, e após 10 meses, somente uma redução de 15 a 20% foi observada.

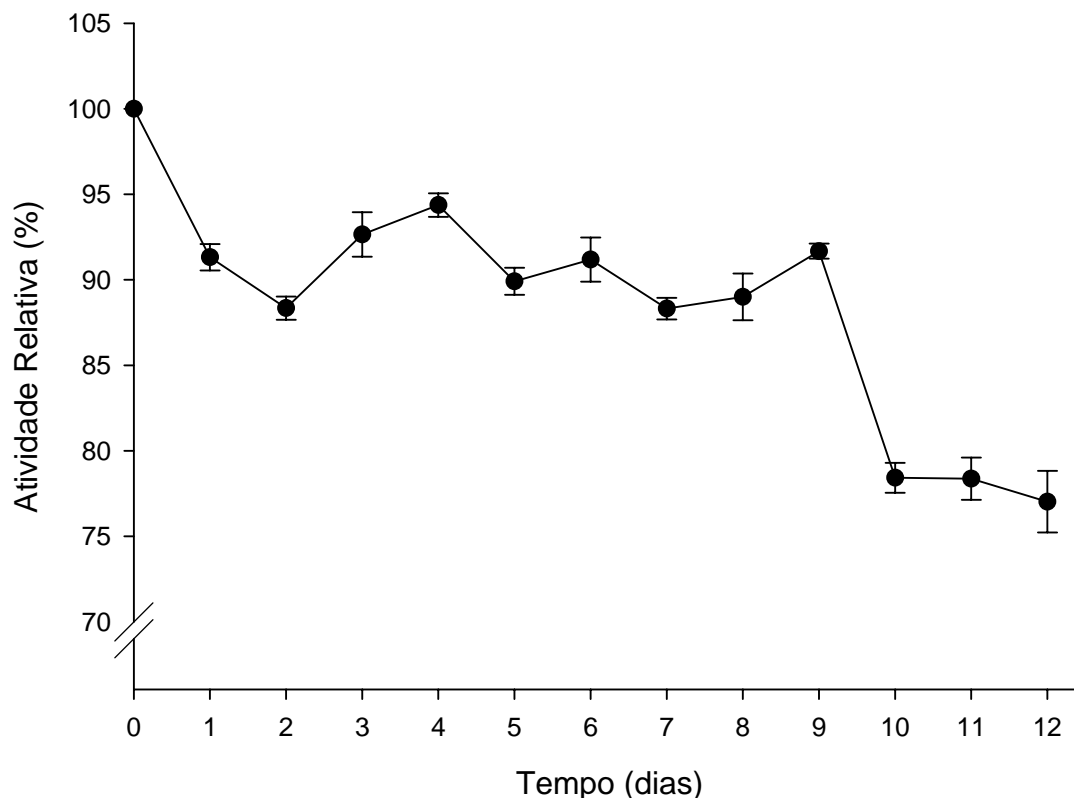


Figura 7. Efeito do período de armazenamento do extrato enzimático a 4°C sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.3.7 Efeito de inibidores na atividade da peroxidase

Muitas substâncias alteram a atividade de uma enzima, associando-se reversivelmente a ela, de forma a influenciar na ligação do substrato e/ou no seu número de reciclagem, ou seja, no número de processos reacionais que cada sítio ativo catalisa por unidade de tempo (Voet *et al.*, 2002). Qualquer substância que reduza a velocidade de uma reação enzimática pode ser considerada como inibidora (Segel, 1979).

O efeito de diferentes compostos em concentração de 1 mM sobre a atividade da peroxidase foi avaliada (Tabela 2). O ditioeritrol (DTT) e β -mercaptoetanol inibiram totalmente a atividade da peroxidase, enquanto as amostras tratadas com sódio azida mantiveram 5,9% da atividade. O EDTA não apresentou capacidade de inibição da atividade da POD nessa concentração (Tabela 2). O metabissulfito de sódio levou a um leve aumento na atividade da POD, enquanto o SDS aumentou a atividade em mais de 20% (Tabela 2). SDS é muito utilizado para ativação da PPO e o aumento observado na

atividade da POD poderia ser influência desta. Para avaliar se a atividade da PPO estava presente no extrato enzimático da POD, a reação foi realizada na ausência de H₂O₂, agente oxidante da POD e na presença do substrato fenólico. Nenhuma atividade da PPO foi encontrada (dados não apresentados), o que sugere que o aumento na atividade da POD não está sendo devido à ação da PPO. O mecanismo de como o SDS estaria atuando na ativação da POD ainda é desconhecido, e estudos posteriores precisam ser realizados.

Em *Vanilla planifolia* diferentes inibidores na concentração de 1 mM também foram testados, sendo que, o sódio azida foi o único que causou inibição total da atividade e amostras incubadas com DTT e β-mercaptoetanol mantiveram 1,25 e 5,7% da atividade, respectivamente. Os piores inibidores em *Vanilla* coincidem com os encontrados em *Strelitzia* (EDTA, SDS e metabissulfito de sódio), mas estes tiveram a capacidade de reduzirem em 30% a atividade enzimática nessa espécie (Márquez, *et al.*, 2008), o que não ocorreu em *Strelitzia* (Tabela 2). O DTT e o β-mercaptoetanol, nas concentrações de 1 mM, também inibiram em 100% a atividade da peroxidase em rabanete (Young & Soo, 1998).

Tabela 2. Efeito de diferentes inibidores (1mM) sobre a atividade da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Inibidores (1 mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100
SDS	120,39 ± 2,54
EDTA	96,17 ± 1,43
Ácido Ascórbico	33,57 ± 0,79
DTT	0
β-mercaptoetanol	0
L-cisteína	17,7 ± 0,95
Metabissulfito de Sódio	104,64 ± 2,04
Sódio Azida	5,9 ± 0,9

Como somente dois, dos oito inibidores testados, apresentaram inibição completa na concentração de 1 mM, diferentes concentrações desses inibidores foram utilizadas na tentativa de alcançar 100% de inibição.

Os dados encontrados da atividade para o EDTA não foram consistentes e, por isso, a utilização desse composto como inibidor de POD foi descartada. O EDTA reage como agente quelante do átomo de Fe^{2+} encontrado no centro ativo da POD (Dębowska & Podstolski, 2001). Lin *et al.*, (1996), estudando *Ipomoea cairica* L., também não encontraram sucesso com a utilização de EDTA como inibidor de peroxidase.

A utilização SDS como inibidor de POD também não foi bem sucedida. Altas concentrações de SDS tiveram que ser usadas e, mesmo assim, a inibição completa não foi observada. A incubação do extrato enzimático da peroxidase com 50 mM de SDS levou a uma inibição de 70% na sua atividade (Figura 8).

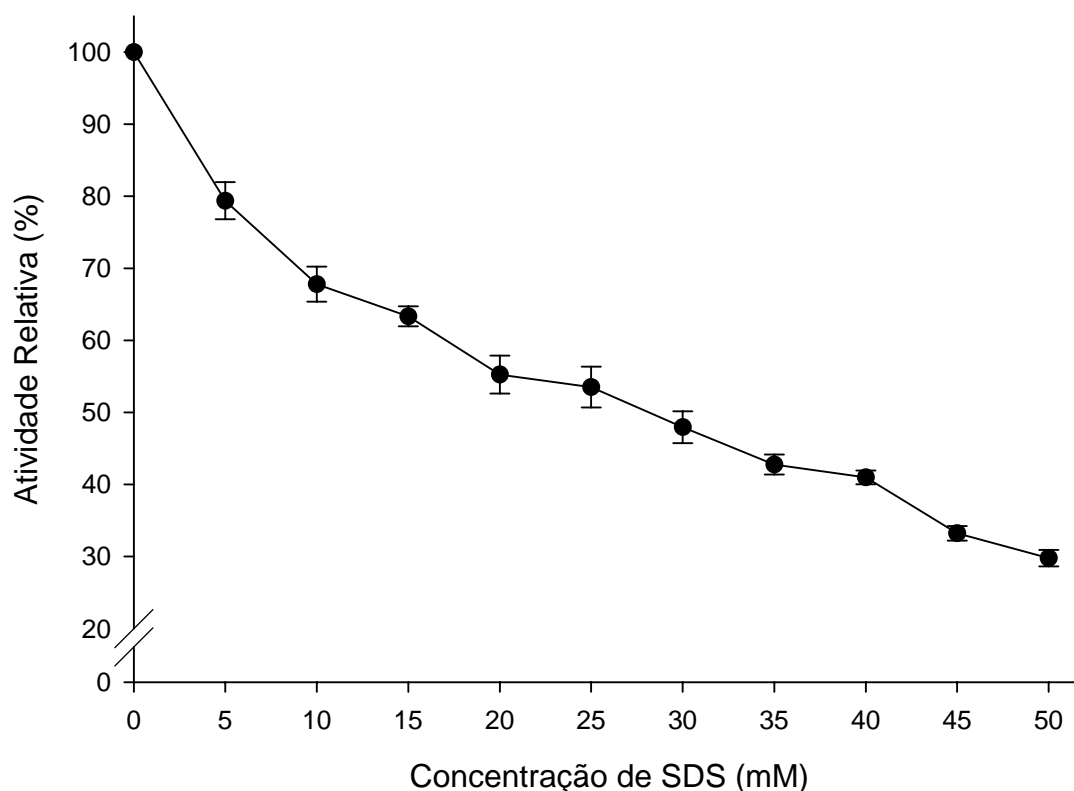


Figura 8. Efeito da concentração de SDS (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Tióis (compostos orgânicos que contem o grupo $-\text{SH}$), considerados agentes redutores, como o metabissulfito de sódio, DTT, L-cisteína e o β -mercaptoetanol são muito utilizados como inibidores de peroxidase. O β -mercaptoetanol foi, dentre os compostos utilizados, o que proporcionou inibição completa da atividade da peroxidase em menores concentrações, 0,3 mM (Figura 9). Segundo Sariri *et al.*, (2006) o β -

mercaptoetanol mostra um mecanismo duplo de inibição, pois apresenta o grupo –SH, em que mudanças nessa molécula aumenta a tendência de se ligar fortemente ao sítio ativo da enzima, assim como também, apresenta o grupo hidroxil que é capaz de causar inibição.

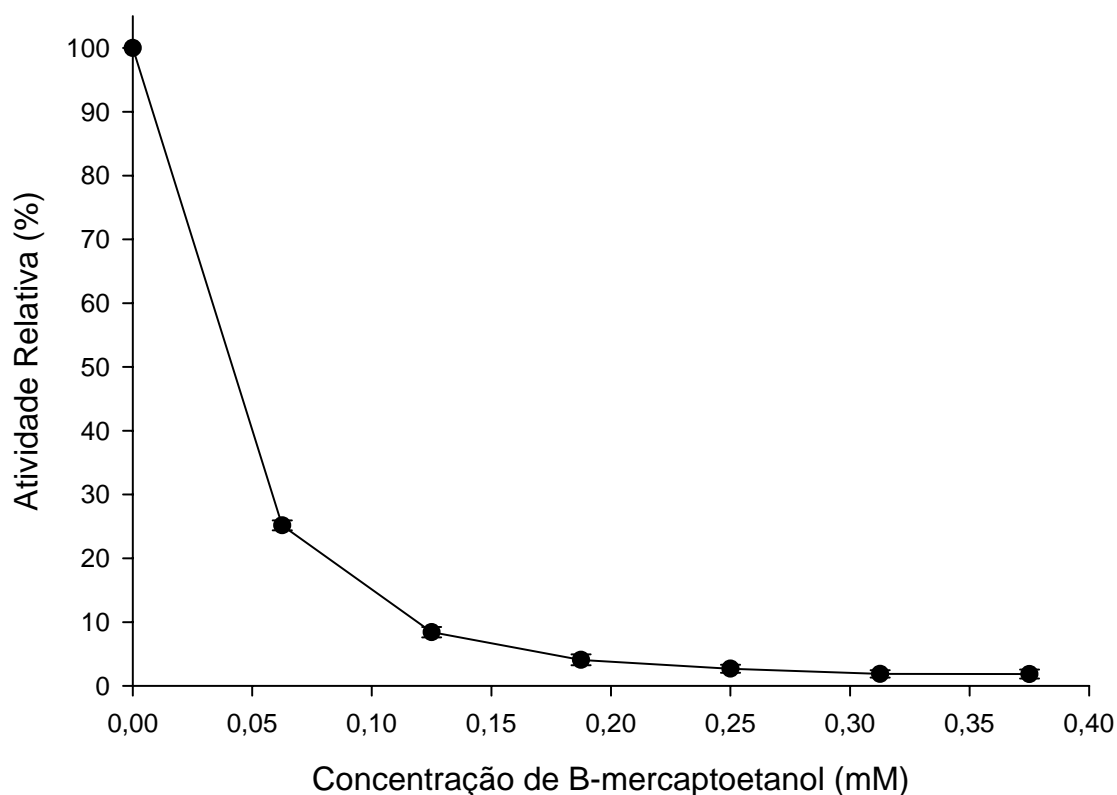


Figura 9. Efeito da concentração de β -mercaptoetanol (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

O DTT somente foi testado até concentrações de 0,4 mM o que proporcionou inibição de 51,7% (Figura 10). Concentrações mais altas deste composto fizeram com que as repetições respondessem de forma diferente à inibição e, por isso, seus dados foram descartados. Inibição completa foi encontrada com 1 mM de DTT (Tabela 2) e esse composto, nessa concentração, proporcionou 100% de inibição em *Elaeis guineensis* Jacq. (Deepa & Arumughan, 2002) e 78,9% em morango (Martínez *et al.*, 2001).

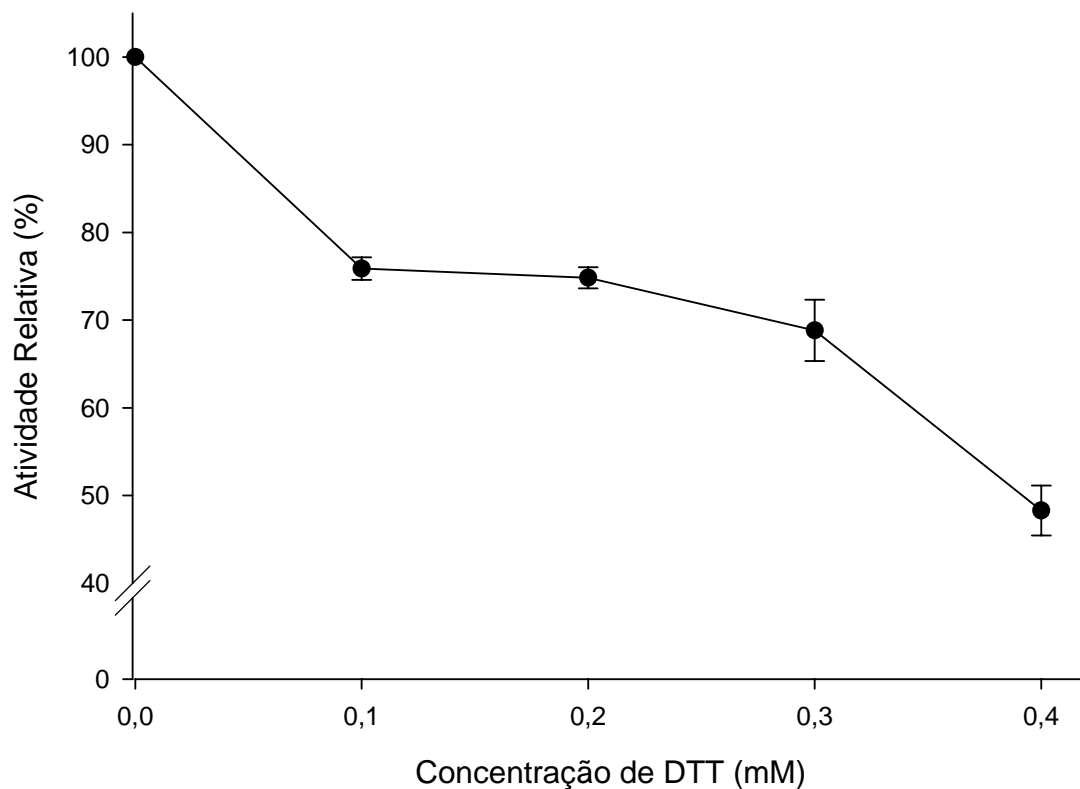


Figura 10. Efeito da concentração de DTT (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Concentrações de até 4 mM de metabissulfito de sódio inibiram somente 20% da atividade da peroxidase, enquanto 5 mM reduziu em 32,3%. O aumento da concentração deste composto para 6 mM levou à inibição total da enzima (Figura 11). Em *Metroxylon sagu*, 0,05 mM de metabissulfito foi capaz de inibir totalmente as duas isoenzimas da peroxidase desta espécie (Onsa *et al.*, 2004) e 1mM também inibiu a atividade em *Elaeis guineensis* Jacq. (Deepa & Arumughan, 2002). Tem sido sugerido que o metabissulfito esteja envolvido na redução de H_2O_2 . A eliminação do peróxido de hidrogênio causa o bloqueio da atividade enzimática e mantém o substrato doador de elétrons na sua forma reduzida (Vamos-Vigyazo, 1981).

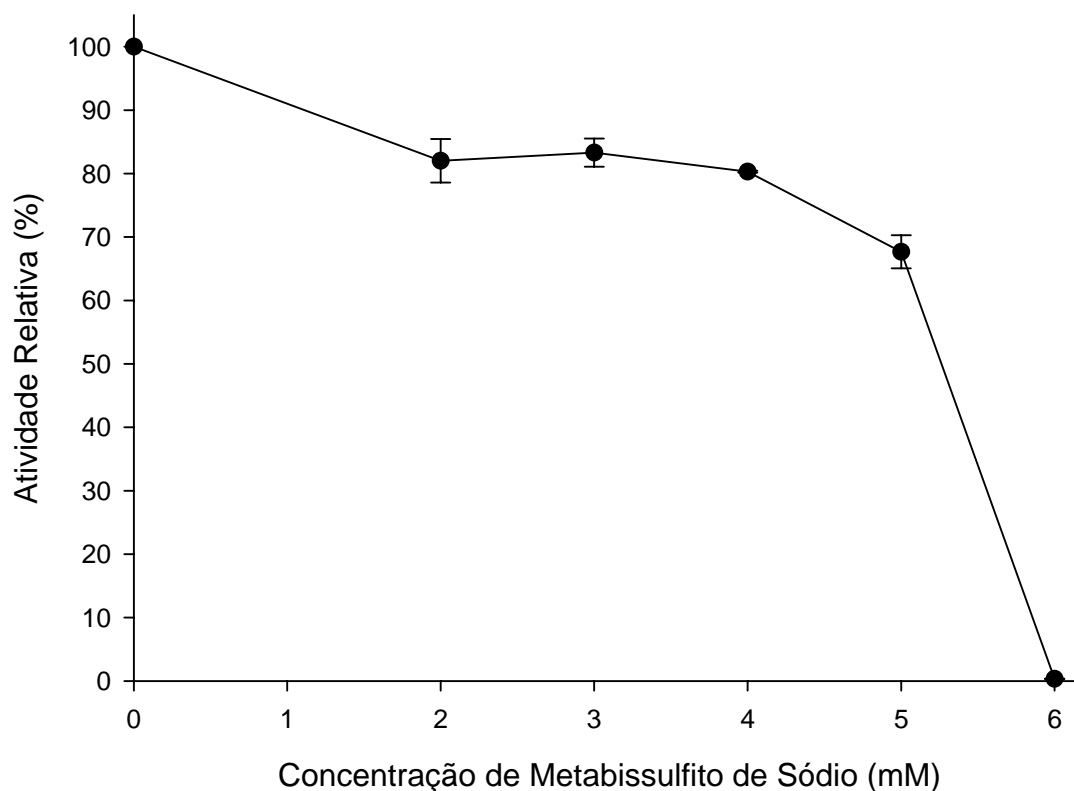


Figura 11. Efeito da concentração de metabissulfito de sódio (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A utilização de L-cisteína como inibidor da peroxidase levou a uma forte redução (63,8%) na atividade, em concentração de 0,5 mM. Com o aumento da concentração do composto para 2,5 mM, tem-se apenas 6,1% da atividade inicial, e concentrações maiores, levam a uma queda lenta na atividade, alcançando inibição completa com 5 mM (Figura 12). L-cisteína na concentração de 0,2 mM levou a 90% de inibição em *Metroxylon sagu* (Onsa *et al.*, 2004) e 1 mM a 89,9% de inibição em morango (Martínez *et al.*, 2001) e 100% em POD HRP (Sariri *et al.*, 2006).

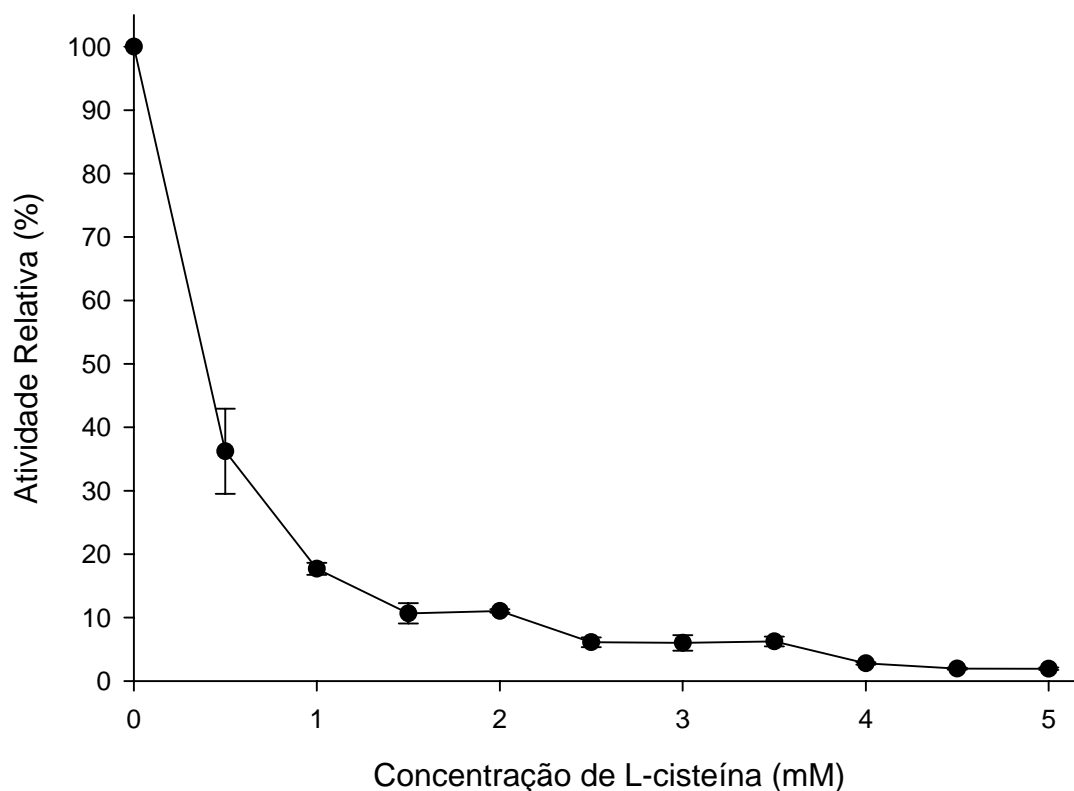


Figura 12. Efeito da concentração de L-cisteína (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Concentrações crescentes de ácido ascórbico levaram à redução linear na atividade da peroxidase, alcançando 100% de inibição a concentração de 2 mM (Figura 13). Onsa *et al.* (2004) encontraram 100% de inibição em *Metroxylon sagu* com concentração de 0,05 mM. Em *Capsicum annum* L., o ácido ascórbico mostrou-se o mais eficiente inibidor da peroxidase, em que 0,03 mM proporcionou inibição total da enzima (Serrano-Martínez, 2008); já em morango, 1 mM levou a 94,5% de inibição (Martínez *et al.*, 2001).

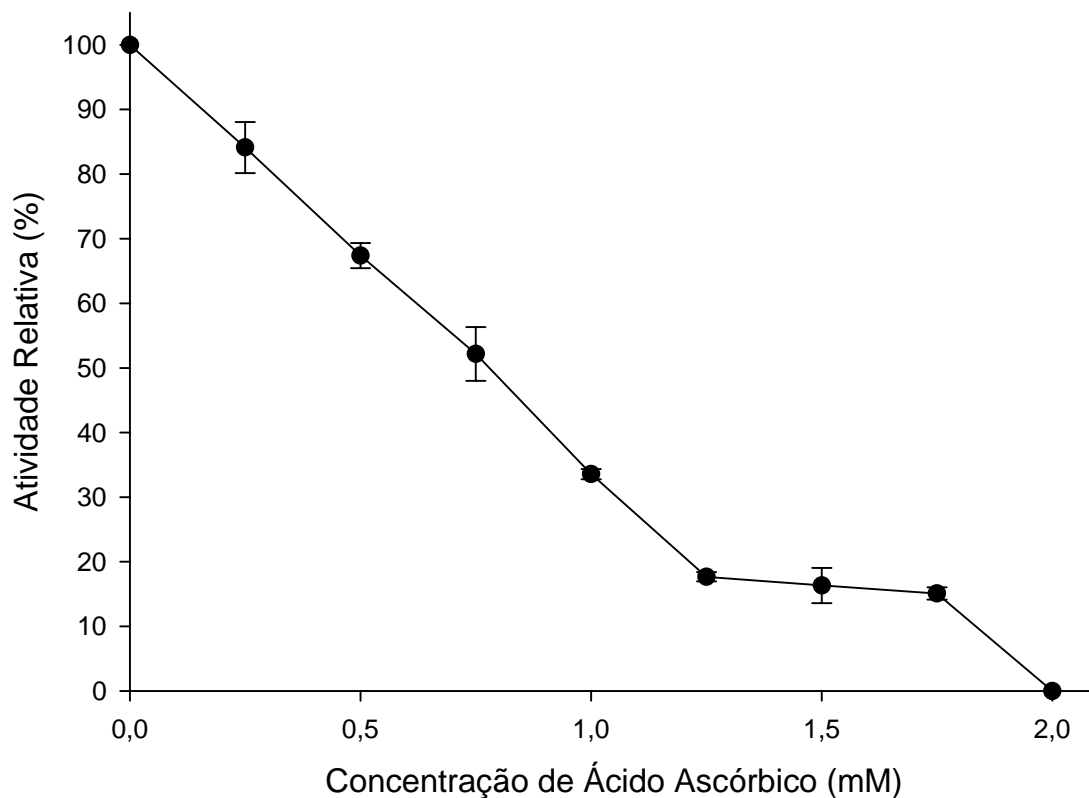


Figura 13. Efeito da concentração de ácido ascórbico (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

L-cisteína, DTT e ácido ascórbico são agentes redutores. Altas concentrações desses agentes induzem aumento na fase lag e redução na atividade da POD. Isso se deve à redução na concentração de peróxido de hidrogênio causado pelo seu consumo durante a oxidação do DTT, cisteína e ácido ascórbico (Martínez *et al.*, 2001).

Sódio azida à concentração de 0,25 mM inibiu em 70% a atividade inicial e, com 2 mM, tem-se a inibição total na atividade da peroxidase (Figura 14). Deepa & Arumughan (2002), encontraram em *Elaeis guineensis* Jacq 25% de inibição sob concentrações de 1 mM e 98% com 20 mM.

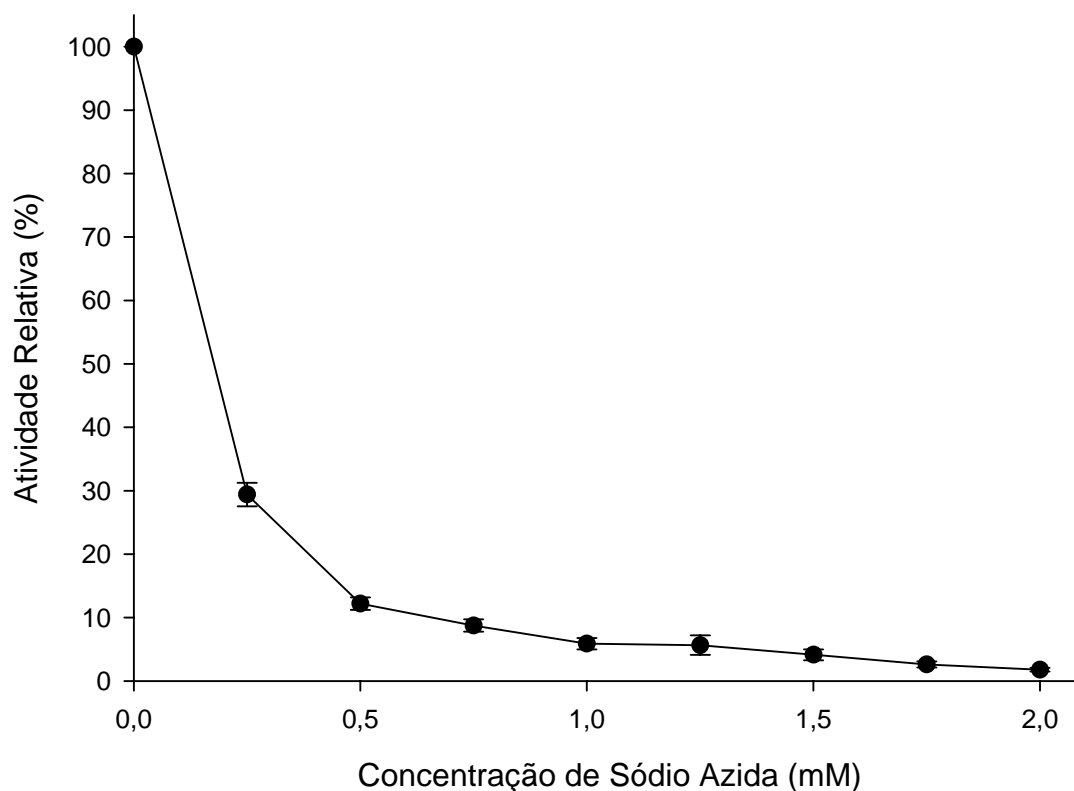


Figura 14. Efeito da concentração de sódio azida (mM) sobre a atividade enzimática da peroxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Os inibidores atuam por meio de uma variedade de mecanismos. Alguns inibidores enzimáticos são substâncias que se assemelham estruturalmente aos substratos dessas enzimas, sendo muito utilizados para investigar a natureza química ou conformacional do sítio ativo, mas não reagem, ou reagem muito lentamente, enquanto outros interferem na atividade catalítica sem interferir na ligação do substrato e muitos realizam ambos os processos (Voet *et al.*, 2002).

3.4 CONCLUSÕES

A maior purificação da peroxidase de strelítzia ocorreu com 60-80% de sulfato de amônio.

Maior atividade da POD foi encontrada em pH 5,0 e temperatura de 60°C.

Pré-incubações em pH 2,5 reduziram a atividade da POD enquanto em pH 9,0 esta enzima mostrou-se estável.

Pré-incubações em altas temperaturas levaram à inibição completa da POD.

Extratos enzimáticos da POD apresentaram grande estabilidade quando armazenadas a 4°C.

Inibição parcial da POD foi encontrada com SDS e inibição total com DTT, ácido ascórbico, L-cisteína, metabissulfito de sódio, sódio azida e β -mercaptoetanol.

4. CAPÍTULO 3

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE

RESUMO

Em ave-do-paraíso, observa-se a perda da condutividade hidráulica ao longo da vida de vaso, devido ao bloqueio xilemático, o que limita a sua vida pós-colheita. Nessa espécie, a perda da condutividade está relacionada ao aumento da atividade da peroxidase e polifenoloxidase induzidas pelo corte da base da haste, levando a oclusão vascular. Este trabalho teve por objetivo purificar parcialmente e caracterizar a polifenoloxidase relacionada ao bloqueio xilemático em ave-do-paraíso. Amostras de secções da base das hastes de *Strelitzia* foram retiradas após 8 dias de permanência na água destilada, congeladas e armazenadas. Após a obtenção do extrato parcialmente purificado, obtido por meio da extração com acetona -20°C, avaliou-se a atividade enzimática da polifenoloxidase em diferentes substratos, pHs, temperaturas, inibidores e tempos de pré-incubação em diferentes pHs e temperaturas, na tentativa de inativa-lá. Maior atividade foi encontrada quando a reação se processou com 4-metil-catecol 10 mM como substrato, pH 6,0 e temperatura de 40°C. Inibição de 96,14% da atividade foi encontrada após a pré-incubação em pH 2,5, por 15 minutos, a 25°C. Extratos pré-incubados a 60°C, por 120 minutos, mostraram uma redução de 68,37% na atividade. Essa redução foi maior quando a pré-incubação se realizou a 70° e 80°C, por 10 minutos, levando a 85,73 e 100% de redução, respectivamente. Inativação completa da PPO foi encontrada com a utilização de DTT, L-cisteína, metabissulfito de sódio e β -mercaptoetanol à concentração de 1 mM. Conclui-se que a enzima apresentou maior atividade em pH 6,0, temperatura de 40°C e com 4-metil-catecol como substrato; sua inativação completa foi observada com pré-incubação sob pH ácido, altas temperaturas e diferentes inibidores.

4.1 INTRODUÇÃO

A strelítzia é uma das mais importantes flores tropicais produzidas atualmente, que se destaca pela beleza, curiosa forma e comprimento das hastes (Luz *et al.*, 2005). A perda na vida pós-colheita desta espécie é devida a um rápido declínio na absorção de água após a sua colheita, associada ao possível bloqueio dos tecidos vasculares da haste (Jaroenkit & Paull, 2003). São várias as causas que levam ao bloqueio dos vasos xilemáticos, dentre elas, embolismo, crescimento bacteriano na água de vaso ou na própria base da haste e por processos de natureza fisiológica, o que inclui a atividade de enzimas como a peroxidase e polifenoloxidase, que tem a atividade aumentada em resposta ao dano (van Doorn, 1997).

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima responsável pela melanização em animais e escurecimento em plantas. Essa enzima catalisa duas distintas reações: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois (ação da cresolase) e a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas (ação da catecolase) (Aydemir, 2004). Quinonas são moléculas eletrofílicas altamente reativas que podem se polimerizar levando a formação de pigmentos de cor marrom ou preta. A PPO é uma enzima que contém cobre em sua estrutura e possui o oxigênio molecular como co-substrato (Vaughn & Duke, 1984).

A PPO parece estar envolvida nas reações de imunidade, biossíntese de componentes da planta, extravasamento de radicais livres de tecidos fotossintetizantes (Heimdal *et al.*, 1994), controle dos níveis de oxigênio no cloroplasto e síntese de compostos fenólicos (Vaughn & Duke, 1984). É responsável pelo fenômeno de escurecimento enzimático que ocorre em frutos e vegetais, o que causa uma diminuição das propriedades sensoriais e valor nutricional (Prota, 1988).

A PPO é considerada uma enzima plastídica em plantas superiores, localizada na membrana dos tilacóides (Zawistowski *et al.*, 1991). Pode existir livre no citoplasma em tecidos degenerados e senescentes como em frutos maduros (Flurkey & Jen, 1978). O nível de PPO na planta é dependente da espécie, cultivar, maturidade e idade (Vamos-

Vigyazo, 1981). A PPO geralmente é codificada por uma família multigênica e expressa diferentemente nas partes da planta (Thyngesen *et al.*, 1995). Apresenta uma grande heterogeneidade acerca do substrato específico, sensibilidade a inibidores, pH ótimo, latência, inativação térmica, número de isoformas e massa molecular (Mayer & Harel, 1979).

Nenhum estudo sobre caracterização de PPO em *Strelitzia* foi feito até o momento. Conhecendo a importância da enzima no bloqueio dos vasos xilemáticos, vê-se a necessidade de estudos para se determinar as condições *in vitro* em que a atividade desta enzima possa ser reduzida ou inativada para posteriormente, utilizar destas informações para aplicações *in vivo*. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar a polifenoloxidase envolvida com o bloqueio xilemático em *ave-do-paráiso*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Hastes florais de ave-do-paráíso foram colhidas no campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (latitude 20°45' sul, longitude 42°51' oeste e altitude de 651 m) e levadas ao Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, onde passaram por um processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento, sendo o corte realizado na água para evitar a formação de bolhas de ar. Após isto, foram colocadas imediatamente em frascos contendo 400 mL de água destilada, sendo essa trocada a cada 48 horas para evitar o desenvolvimento de microrganismos. No final do 8º dia, secções de aproximadamente 2 cm da base da haste de *Strelitzia* foram cortadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20°) para posterior análise enzimática.

4.2.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase

Para a obtenção do extrato enzimático, 2 g de material vegetal foi triturado em politron com 10 mL de tampão de extração, até a completa homogeneização. Após isso, esse homogeneizado foi centrifugado a 17.000 *g* durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da polifenoloxidase e quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) e o precipitado descartado. Diferentes composições do tampão de extração foram testadas: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Polivinilpirrolidona (PVP); tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Triton X-100; e tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% PVP + 1% de Triton X-100 (Concellón *et al.*, 2004).

Na tentativa de purificar a polifenoloxidase, a utilização de acetona resfriada como extrator foi testada. Para isso, 2 g de material vegetal foi triturado em politron com 10 mL de acetona pura à -20°C até a obtenção de uma massa homogênea, essa foi então filtrada em uma camada de papel filtro. O material retido no filtro foi levado até a

geladeira onde permaneceu por 15 horas até a completa secagem e o filtrado foi descartado. Após, o material retido no filtro foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de extração que proporcionou maior atividade, determinado em teste anterior, homogeneizado durante 5 minutos em agitador magnético, filtrado em duas camadas de gaze, centrifugado por 15 minutos a 17.000 g a 4°C e a atividade enzimática foi determinada (Serradell *et al.*, 2000).

4.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase

Para a determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de 4- metilcatecol (10 mM) e 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). A quantidade de extrato enzimático utilizado variou com a amostra, totalizando o volume total da reação (1,5 mL). O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. A atividade enzimática foi analisada em espectrofotômetro, observando-se a variação na absorbância em comprimento de onda de 420 nm a 25°C e expressa em UA/min/mg de proteína (Kavrayan & Aydemir, 2001).

4.2.3 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase

Para determinar-se o substrato que proporciona maior atividade enzimática de polifenoloxidase, diferentes substratos foram testados. Catecol (420 nm), 4-metilcatecol (420 nm), pirocatequina (420 nm), ácido clorogênico (420 nm), ácido cafeico (400 nm), L-dopa (480 nm) e L-tirosina (420 nm), à concentração de 10 mM foi adicionada ao meio de reação e a atividade enzimática determinada em espectrofotômetro. O substrato que proporcionou maior atividade foi considerado como 100% de atividade relativa e foi utilizado nos ensaios subsequentes (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008).

4.2.4 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase

Para determinar o efeito do pH na atividade da polifenoloxidase, diferentes soluções-tampão de reação foram utilizadas 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 pHs foram corrigidos utilizando NaOH e HCl 1M. A atividade relativa foi considerada como 100%

no pH ótimo de reação, e a atividade nos demais pHs foi calculada com base nessa (Neves, 2003).

4.2.5 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH

Para análise da estabilidade da enzima sob condições extremas de pH, foram feitas pré-incubações do extrato enzimático em soluções-tampão em que a enzima apresentou baixa atividade, para verificar a possibilidade de inativação da mesma. Para isso o extrato enzimático foi incubado (1:1) em solução tampão 0,1 M, pHs 2,5 e 9,0 por um período de 0 a 120 minutos, sendo retiradas amostras a cada 10 minutos (Neves, 2003). A pré-incubação foi realizada a 25°C e em banho de gelo (4°C) e a atividade relativa foi determinada utilizando o tampão com pH ótimo de reação para a enzima e temperatura de 25°C. Atividade relativa de 100% foi considerada na ausência da pré-incubação e ao longo da pré-incubação a atividade foi calculada com base nesta.

4.2.6 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase

Para a determinação da temperatura ótima para a atividade, os extratos enzimáticos e o tampão de reação foram incubados, por 10 minutos, em temperaturas que variaram de 10 a 80°C, em intervalos de 10°C e imediatamente foi efetuada a leitura em espectrofotômetro na mesma temperatura da incubação (Neves, 2003). Na temperatura ótima, a atividade relativa foi considerada como 100%, e a atividade nas demais temperaturas foi calculada com relação a esta.

4.2.7 Estabilidade térmica da polifenoloxidase

Para avaliar a estabilidade térmica, o extrato enzimático foi incubado com o tampão fosfato a 60°C, por 120 minutos e a 70 e 80°C por 10 minutos, sendo retiradas amostras ao longo do período de incubação. Após retirada do banho-maria, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo (4°C), por 30 minutos, e posteriormente, determinada a atividade relativa em temperatura ambiente (Neves, 2003). Atividade de 100% foi considerada na ausência da pré-incubação e ao longo dos períodos de pré-incubação a atividade foi calculada em relação a esta.

4.2.8 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase

Para verificar o efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO, os extratos enzimáticos foram incubados por 50 minutos, a 4°C, e 10 minutos, a 25°C, em tampão de reação contendo 1 mM dos seguintes compostos: EDTA, L-cisteína, β -mercaptoetanol, metabissulfito de sódio, ditioeritrol (DTT), ácido ascórbico e sulfato de sódio e, após isso, a atividade específica foi determinada. Na ausência de inibidores, a atividade foi considerada como 100% e as demais foram calculadas com base nessa.

4.2.9 - Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo os dados dos diferentes substratos interpretados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SISVAR, enquanto nas outras análises, os dados foram submetidos a análises estatísticas descritivas da média e o erro padrão da média foi calculado.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase

Quando a extração foi realizada com as 3 diferentes composições do tampão de extração, não se observou diferença na atividade da PPO (dados não apresentados). Em raízes de banana ao testar diferentes composições do tampão de extração, os melhores resultados foram encontrados com o tampão que teve adição de 0,25% de Triton X-100 e 5% de PVPP (Wuyts *et al.*, 2006). Em pêras Williams, Gaillard & Richard-Forget (1997) não encontraram nenhuma adição na atividade quando o tampão de extração foi suplementado com Triton X-100 ou Tween 20, sugerindo que todo o conteúdo da enzima é fração solúvel.

O PVP é um agente adsorvedor de fenol que pode ser adicionado no tecido ou no tampão de extração, para remoção de substratos fenólicos da PPO e assim prevenir a polimerização e inativação da enzima, durante a extração. Triton X-100 é um detergente, e a sua utilização como constituinte do tampão de extração tem efeito positivo na atividade por causar a lise dos plastídeos, solubilização da PPO ligada à membrana e ativação da PPO latente (Mayer & Harel 1979).

Existe uma grande dificuldade no processo de isolamento de PPO a partir de plantas (Mathew & Parpia, 1971, apud Zawistowski *et al.*, 1991). A PPO é localizada exclusivamente em plastídeos em tecidos de plantas intactos, e os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (Vaughn & Duke, 1984). Uma vez que os vacúolos e plastídeos se misturam, devido à perda da organização celular, tem-se como consequência os fenólicos endógenos sendo oxidados enzimaticamente para quinonas, que se polimerizam levando ao escurecimento enzimático (Zawistowski *et al.*, 1991). Devido a isso, é importante a utilização do PVP como componente do tampão de extração.

Uma vez que a composição do tampão de extração não teve influência sobre a atividade da PPO de hastes de *strelitzia*, o tampão fosfato 0,1 M + 1% de PVP foi utilizado nos ensaios subseqüentes. Esse tampão foi escolhido, devido à facilidade de manipulação. Quando o Triton X-100 foi utilizado como constituinte do tampão de extração, este causou excesso de espuma durante o processo de extração, bem como a formação de bolhas durante a reação.

A extração da polifenoloxidase de hastes de *strelitzia* com acetona levou a um aumento de 2,2 vezes na atividade específica (Tabela 1). Precipitação com acetona seguida por extração com tampão é um dos métodos mais usados para isolamento da PPO. Essa técnica oferece a vantagem de obtenção de um extrato com alto rendimento e livre de interferentes (Dizik & Knapp, 1970 apud Zawistowski *et al.*, 1991).

Tabela 1. Atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae* após utilização de diferentes substâncias extratoras.

Extrator	UA/min/mg de proteína	Atividade Relativa (%)
Tampão Fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% PVP	19,1	100
Acetona	42,1	220,4

A função das técnicas de separação para obtenção de proteínas purificadas não é necessariamente minimizar as perdas da proteína desejada, mas eliminar seletivamente os demais componentes indesejáveis da mistura, de forma que somente a substância de interesse permaneça. Algumas propriedades da proteína são utilizadas para os procedimentos de separação como: solubilidade, carga iônica, volume hidrodinâmico, tamanho molecular e especificidade de ligação com outras moléculas biológicas (Voet *et al.*, 2002).

Em função de as proteínas possuírem muitos grupos carregados, sua solubilidade depende da concentração de sais dissolvidos, da polaridade do solvente, do pH e da temperatura. Algumas dessas variáveis podem ser manipuladas para precipitar seletivamente proteínas (Voet *et al.*, 2002). A adição de solventes orgânicos como etanol, éter etílico e acetona às soluções aquosas de proteínas podem levar à precipitação das mesmas, devido ao fato desses solventes apresentarem constante dielétrica inferior à da água. A utilização desses solventes em baixas temperaturas serve para a separação de misturas protéicas, levando à precipitação das proteínas, sem que

elas sofram desnaturação (Fernandez & Alves). No caso da extração da PPO, a acetona foi utilizada para a eliminação de possíveis interferentes, como pigmentos.

4.3.2 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase

Para determinar o melhor substrato para a atividade da PPO, catecol, 4-metil-catecol, pirocatequina, ácido clorogênico, ácido cafeíco, L-dopa e L-tirosina à concentração de 10 mM foram testados.

O substrato que proporcionou melhor atividade foi o 4-metil-catecol (4-MC), seguido pela pirocatequina e catecol (Figura 1). Maiores atividades quando o 4-metil-catecol foi utilizado como substrato também foi encontrado em frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra (Mdluli, 2005), berinjela (Concellón *et al.*, 2004), abacate (Gómez-López, 2002), batata, taro (Duangmal & Apenten, 1999), feijão mungo (Shin *et al.*, 1997), raízes áreas de *Aranda* ‘Christine 130’ (Ho, 1999) e maçã “Anna” (Trejo-Gonzalez & Soto-Valdez, 1991). O 4-metil catecol parece ser um dos substratos mais utilizados e eficientes para determinação da atividade da PPO.

A utilização de L-tirosina (monofenol) como substrato foi ineficiente, proporcionando uma atividade muito baixa quando comparada com os demais substratos (Figura 1), o que sugere a falta de atividade da enzima cresolase que catalisa a hidroxilação de monofenóis para difenóis. O mesmo também foi encontrado em alface (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008), hastes e folhas de *Ferula* sp. (Erat *et al.*, 2006), raízes de banana (Wuyts *et al.*, 2006), castanha (Xu *et al.*, 2004), feijão (Nagai & Suzuki, 2003), abacate (Gómez-López, 2002), *Mentha piperita* (Kavrayan & Aydemir, 2001), pêra (Gauillard & Richard-Forget, 1997), raízes áreas de *Aranda* ‘Christine 130’ (Ho, 1999), frutos de mirtilo (Kader *et al.*, 1997), manga (Prabha & Patwardhan, 1982) e banana (Galeazzi & Sgarbieri, 1981).

A razão da atividade da difenolase:monofenolase varia com a planta, mais a difenolase geralmente é 5 a 10 vezes maior que a monofenolase (Vamos-Vigyazo, 1981). Segundo Zawistowski *et al.*, (1991), são comuns extratos enzimáticos que não apresentam atividade da monofenolase.

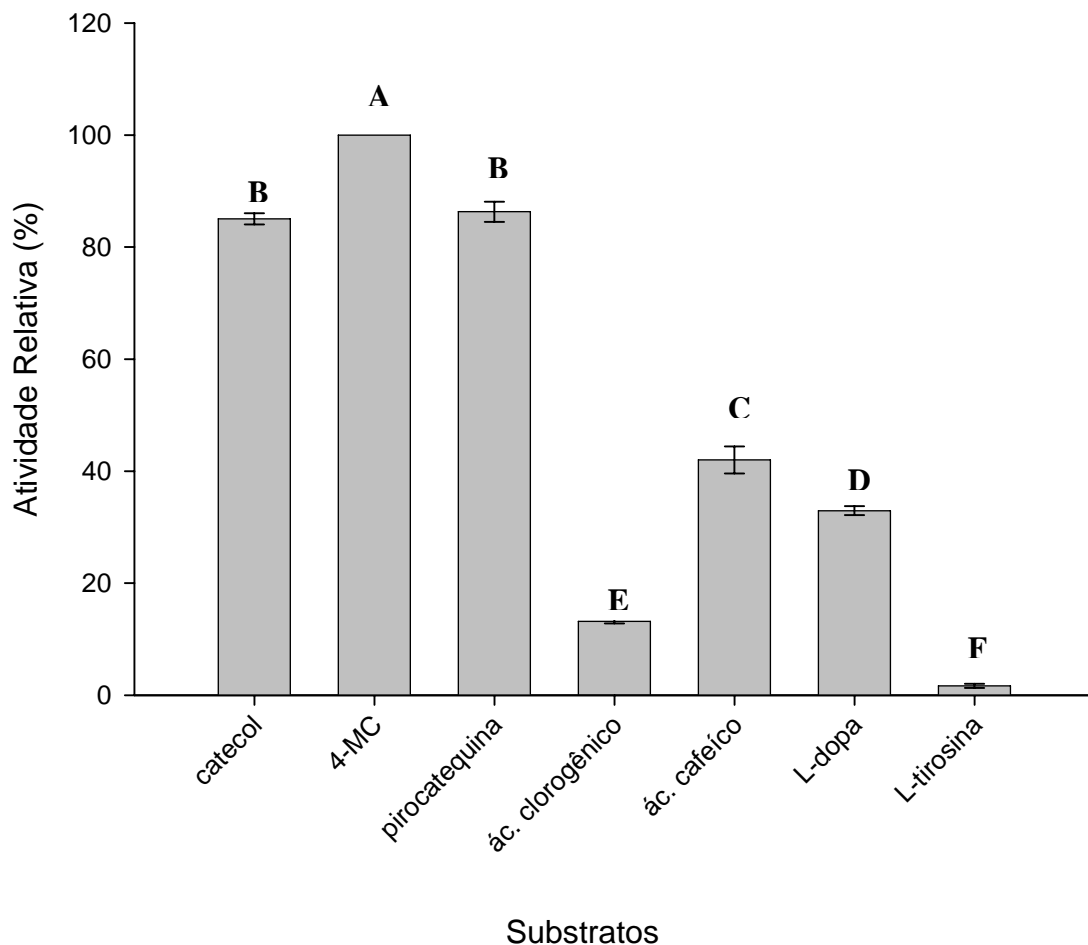


Figura 1. Efeito de diferentes substratos (10 mM) sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

4.3.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase

Maior atividade da polifenoloxidase foi encontrada quando o meio de reação utilizado foi o tampão fosfato com pH 6,0 (Figura 2). Erat *et al.*, (2006) também encontraram um pH ótimo de 6,0 para folhas e hastes de *Ferula* sp. assim como Shin *et al.*, (1997) em feijão mungo.

Em geral, a maioria das plantas apresenta máxima atividade da PPO em valores de pH próximos ao neutro. Em alface, o pH ótimo foi de 6,8 (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008), lichia 6,5 (Sun *et al.*, 2008), brócolis 5,72 (Gawlik-Dziki *et al.*, 2007), batata baroa 7,5 (Menolli, 2006), frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra 7,0 (Mdluli, 2005), castanha 5,0 (Xu *et al.*, 2004), *Mentha piperita* 7,0 (Kavrayan & Aydemir, 2001)

morango 5,3 (Serradell *et al.*, 2000), batata 6,8 (Duangmal & Apenten, 1999), raízes áreas de Aranda ‘Christine 130’ 7,0 (Ho, 1999), *Anethum graveolens* L. 7,0 (Arslan & Tozlu, 1997) e maçã “Anna” 5,4 (Trejo-Gonzalez & Soto-Valdez, 1991).

Variações no pH ótimo de atividade podem ocorrer devido a propriedades genéticas (variedade), natureza do substrato fenólico, método de extração (Duangmal & Apenten, 1999), estágio de maturidade, pureza da enzima e forma da isoenzima (Zawistowski *et al.*, 1991). Segundo Mayer & Harel (1981), o pH ótimo da PPO também está relacionado com a sua localização subcelular e idade do tecido. Nkya *et al.* (2003) encontrou em *Chrysanthemum coronarium* L. que o pH ótimo varia com o substrato fenólico utilizado, sendo de 4,0 para ácido clorogênico e 8,0 para (-) epicatequina.

Quando a reação foi processada nos extremos de pHs, uma grande redução na atividade foi observada. Sob pH 2,5, observou-se redução de 87,4% da atividade em comparação com o pH ótimo. Essa redução é ainda maior sob pH 9,0 com redução de 94,3% (Figura 2). PPO de frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra (Mdluli, 2005) e *Colocasia esculenta* e *Solanum tuberosum* var. Romano (Duangmal & Apenten, 1999) apresentam baixas atividades sob pHs menores que 4,0, enquanto que em feijão mungo, não foi encontrada atividade em pHs abaixo de 4,0, devido à instabilidade dessa enzima nessas condições (Shin *et al.*, 1997). Alteração da atividade enzimática com a variação do pH ocorre devido a mudanças na protonação de grupos essenciais do sítio ativo da enzima e/ou de seus próprios substratos (Segel, 1979).

A maioria das enzimas é ativa em um estreito intervalo de pH, devido a uma combinação de fatores como: a ligação do substrato à enzima, o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica da enzima, a ionização do substrato e a variação da estrutura da proteína (significativo em valores extremos de pH) (Voet *et al.*, 2002).

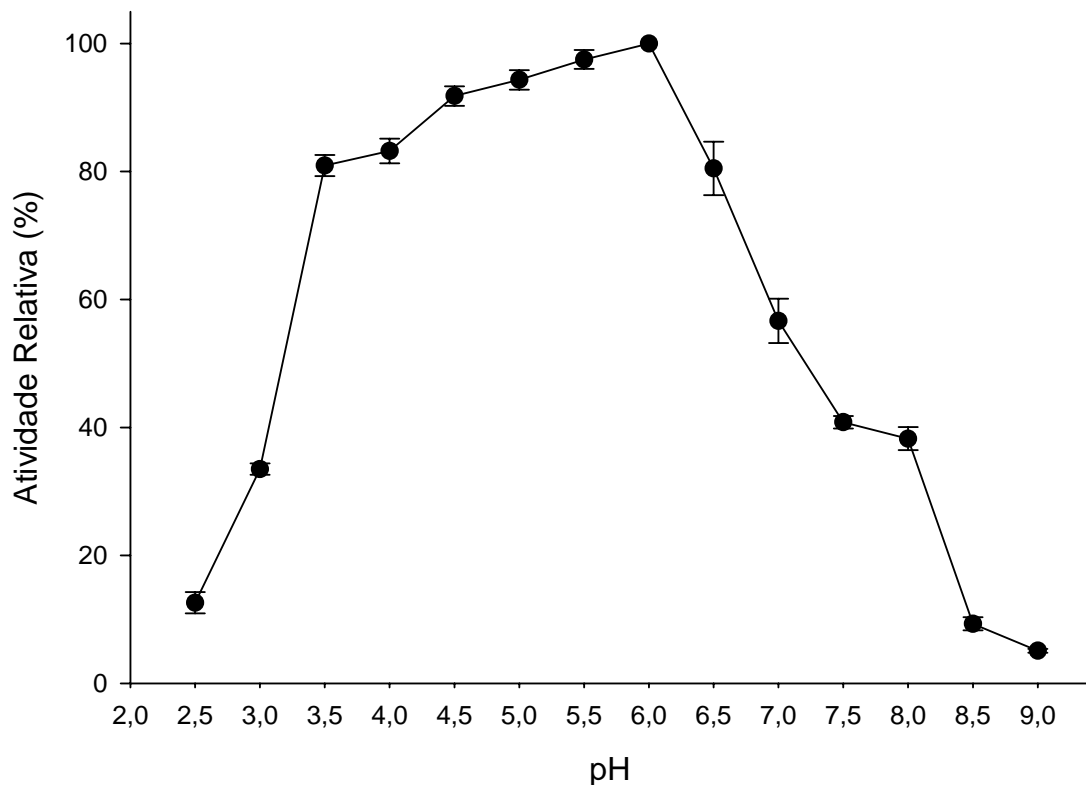


Figura 2. Efeito do pH no meio de reação sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

4.3.4 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH

Para determinar-se o tempo necessário para a possível inativação da polifenoloxidase, o extrato enzimático foi incubado por 120 minutos em pH 2,5 e 9,0 a 4 e 25°C, e a reação processada sob pH ótimo e temperatura de 25°C.

Amostras pré-incubadas a 25°C e pH 2,5 apresentaram 95% de inibição nos primeiros 10 minutos (Figura 3). Assim, a atividade foi avaliada somente durante os 15 primeiros minutos. Pré-incubação sob pH 2,5, a 25°C, após 15 minutos, levou à inibição de 96,1% da atividade, enquanto a 4°C, 24,5% da atividade inicial foi mantida após esse período (Figura 4).

PPO de frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra também se apresentaram instáveis após 30 minutos de incubação em pHs ácidos e temperatura ambiente e em pHs abaixo de 3,0 nenhuma atividade foi detectada (Mdluli, 2005). PPO de taro e batata também se mostraram instáveis em pHs abaixo de 4,0 (Duangmal & Apenten, 1999).

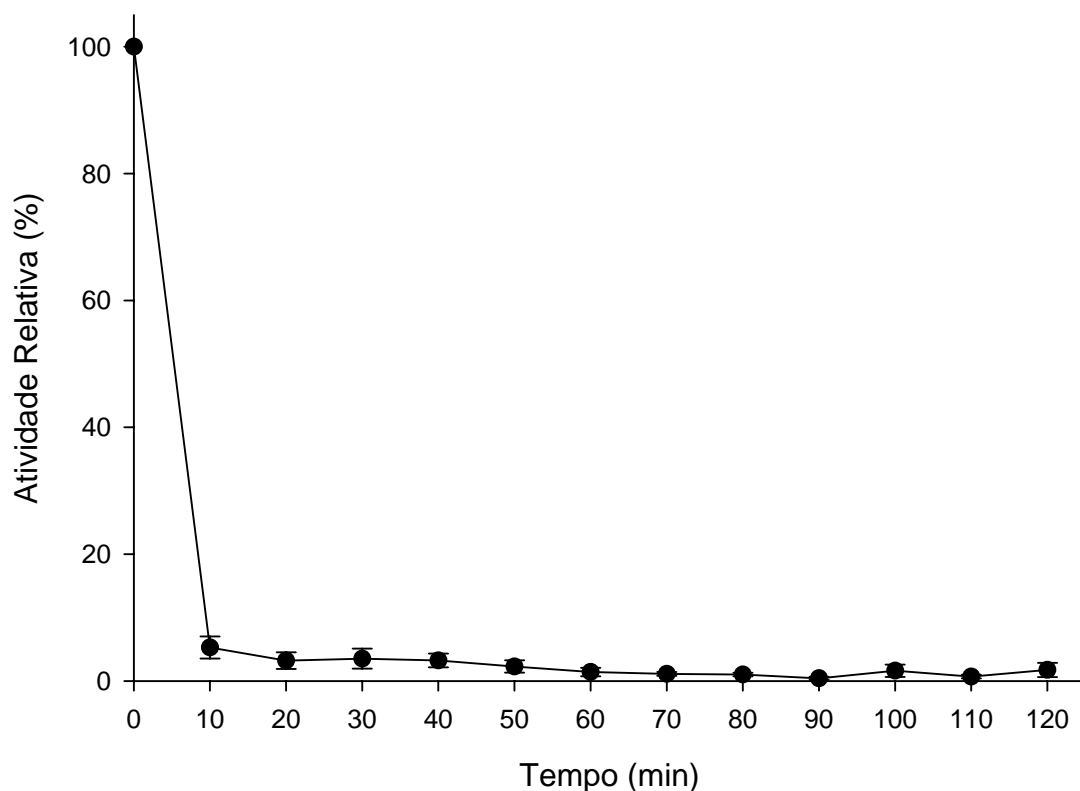


Figura 3. Efeito do tempo de pré-incubação sob pH 2,5, a 25°C, sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Pré-incubações sob pH 9,0, a 4°C, e a 25°C mantiveram a atividade enzimática da PPO integral e constante durante os 120 minutos de avaliação (Figura 5). PPO de *Mentha piperita* também mostrou-se mais estável sob pHs básicos do que em ácidos, sendo que a incubação por 30 minutos, em pH 9,0, levou à perda de 33% da atividade (Kavrayan & Aydemir, 2001), assim como em frutos de quiabo, em que apenas uma redução de 10% foi observada após os 120 minutos de pré-incubação no mesmo pH (Neves, 2003).

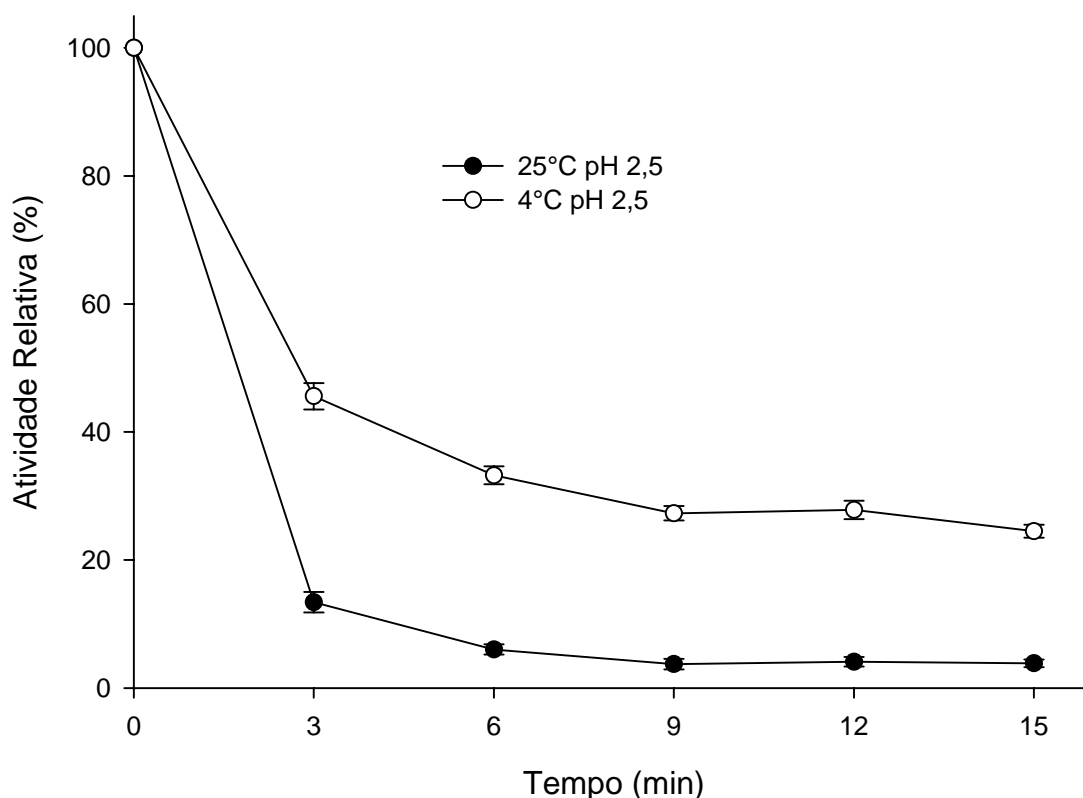


Figura 4. Efeito do tempo de pré-incubação sob pH 2,5, a 4 e 25°C, sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Com a polifenoloxidase, assim como aconteceu com a peroxidase, amostras incubadas em pH 9,0 ao retornarem para condições de ótima atividade (pH 6,0), tiveram capacidade de retomar a atividade, sendo que a 25°C um aumento da atividade da PPO pôde ser observado após os 120 minutos de pré-incubação (Figura 5). O mesmo não foi observado com as amostras pré-incubadas com pH 2,5, que devem ter sofrido danos irreversíveis (Figura 4). Portanto, somente a utilização de valores de pHs ácidos possibilita resultados satisfatórios para a inibição da atividade da polifenoloxidase em *Strelitzia reginae* devido a sua alta instabilidade nessas condições.

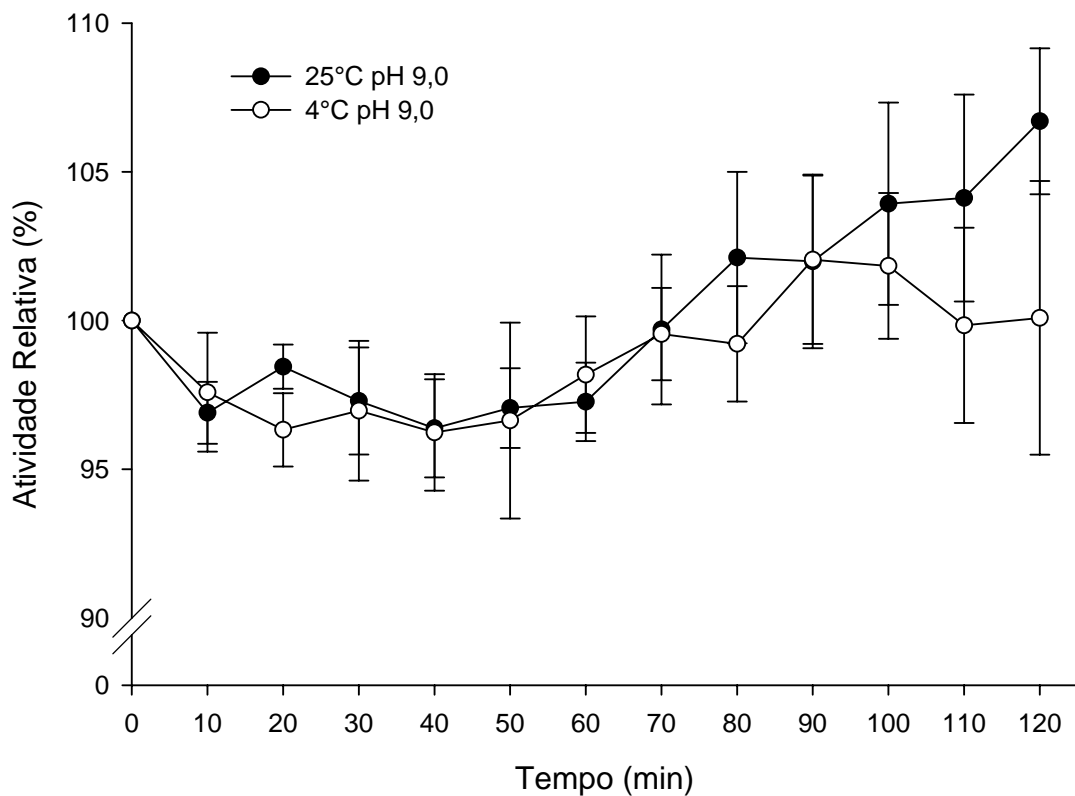


Figura 5. Efeito do tempo de pré-incubação em pH 9,0, a 4 e 25°C, sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

4.3.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase

Para determinar-se a temperatura ótima de atividade da polifenoloxidase, temperaturas na faixa de 10 – 80°C foram avaliadas. PPO de *strelitzia* não apresentou pico de atividade ao longo das diferentes temperaturas, sendo a atividade praticamente constante entre 10 e 40°C (Figura 6).

A maioria das PPOs apresenta temperatura ótima de atividade, dentro dessa faixa encontrada em *strelitzia*. Em *berinjela*, a máxima atividade foi encontrada em 30°C, mais aproximadamente 80% da atividade é mantida entre 0 – 40°C (Concellón *et al.*, 2004). PPO de *lichia* apresenta sua temperatura ótima a 35°C (Sun *et al.*, 2008), *alface* 35°C (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008), *Ferula* sp. 25°C (Erat *et al.*, 2006), *batata baroa* 30°C (Menolli, 2006), *quiabo* 31°C (Neves, 2003), *Mentha piperita* 30°C (Kavrayan & Aydemir, 2001), *taro* 30°C, *batata* 25°C (Duangmal & Apenten, 1999), *morango* 50°C (Serradell *et al.*, 2000), *maçã “Anna”* 35°C (Trejo-Gonzalez & Soto-Valdez, 1991) e *manga* 50°C (Prabha & Patwardhan, 1982).

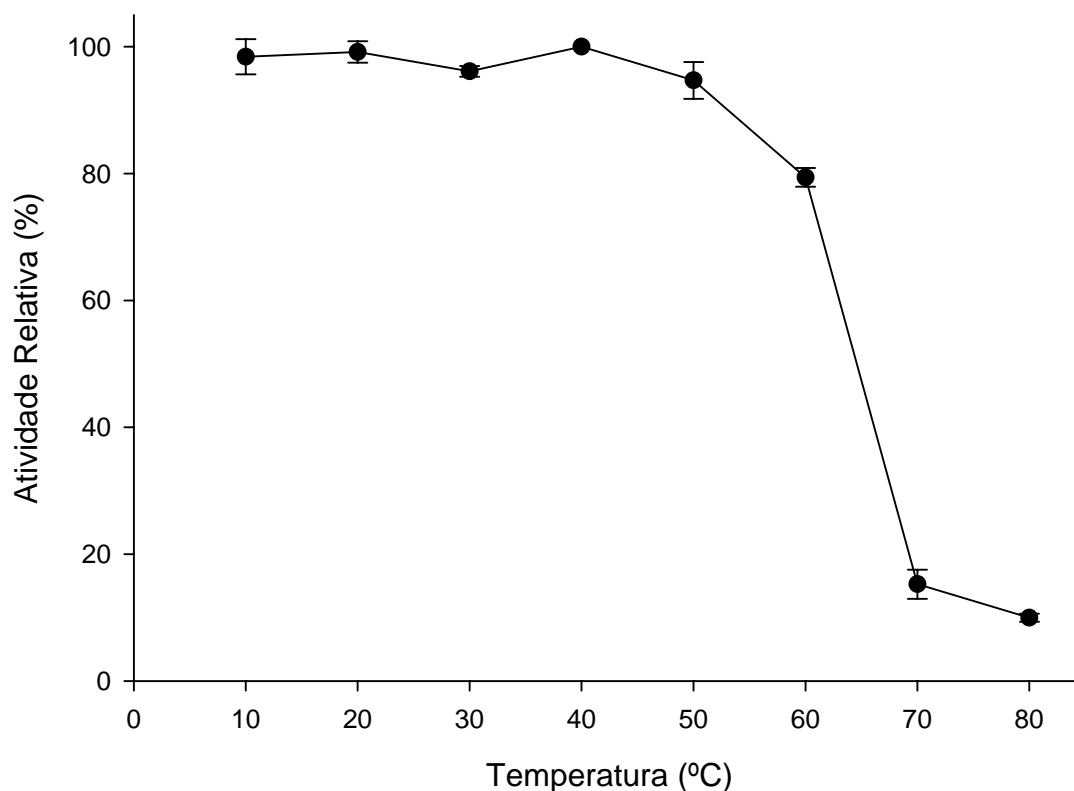


Figura 6. Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Temperaturas de 70 e 80°C levaram a uma forte redução na atividade da PPO, que manteve somente 15,3 e 10% da atividade, respectivamente (Figura 6). Neves (2003) observou perda total da atividade catalítica de PPO de quiabo a temperaturas de 80°C

4.3.6 Estabilidade térmica da polifenoloxidase

Para determinar-se o tempo necessário para a inativação da PPO, pré-incubações a 60, 70 e 80°C, por diferentes tempos, seguidas por 30 minutos a 4°C foram testadas. Pré-incubação por 60°C, por 120 minutos, causou redução de 68,4% na atividade (Figura 7). Neves (2003) encontrou 42% de redução na atividade de PPO de quiabo a mesma temperatura e tempo de exposição. PPO de *Ferula* sp. apresentou inativação completa após 40 minutos de exposição a 60°C (Erat *et al.*, 2006), enquanto temperaturas maiores que 65°C em exposição por 30 minutos causaram perda completa na atividade da PPO em morango (Serradell *et al.*, 2000).

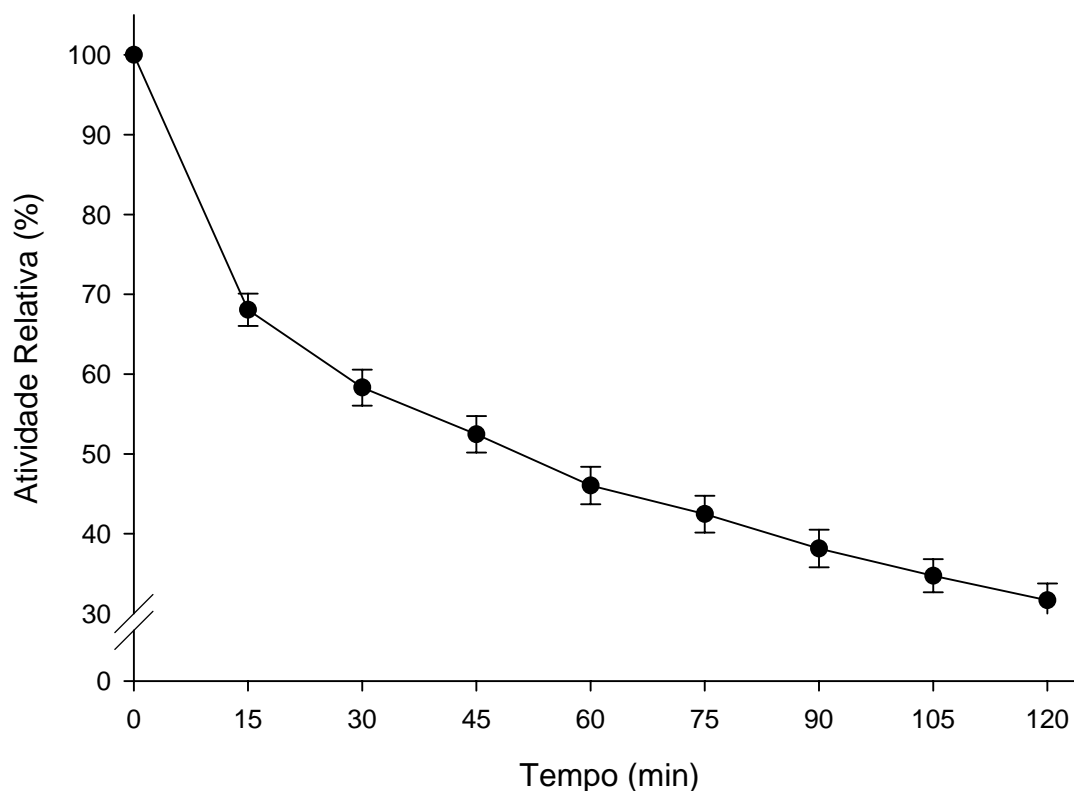


Figura 7. Efeito do tempo da pré-incubação à 60°C sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Quando a temperatura utilizada foi 70°C, em exposição por 10 minutos, levou a uma redução de 85,7% da atividade (Figura 8). Menolli (2006), encontrou em batata baroa 92% de redução na atividade da PPO, após 5 minutos de exposição a 70°C. Já a PPO de batata e taro são inativadas quando aquecidas por 10 minutos a 70°C (Duangmal & Apenten, 1999), enquanto a exposição por 30 minutos a mesma temperatura causou a uma redução de 92% da atividade da PPO em castanha (Xu *et al.*, 2004).

A 80°C, por 2 minutos, observou-se redução de 94,1% da atividade e, após 10 minutos, a inativação foi completa (Figura 8). Exposição por 5 minutos, 80°C, levou à inativação completa da PPO em batata baroa (Menolli, 2006) e, em lichia, a atividade manteve-se em 7,6% e 36,8% quando (-) epicatequina e catecol foram usados como substratos, respectivamente (Sun *et al.*, 2008). Em *Anethum graveolens* L. a pré-incubação por 15 minutos a 80°C levou à redução de 50% da atividade (Arslan & Tozlu, 1997) enquanto em maçã “Anna”, a pré-incubação a 80°C por 10 minutos reduziu a atividade para níveis indetectáveis (Trejo-Gonzalez & Soto-Valdez, 1991).

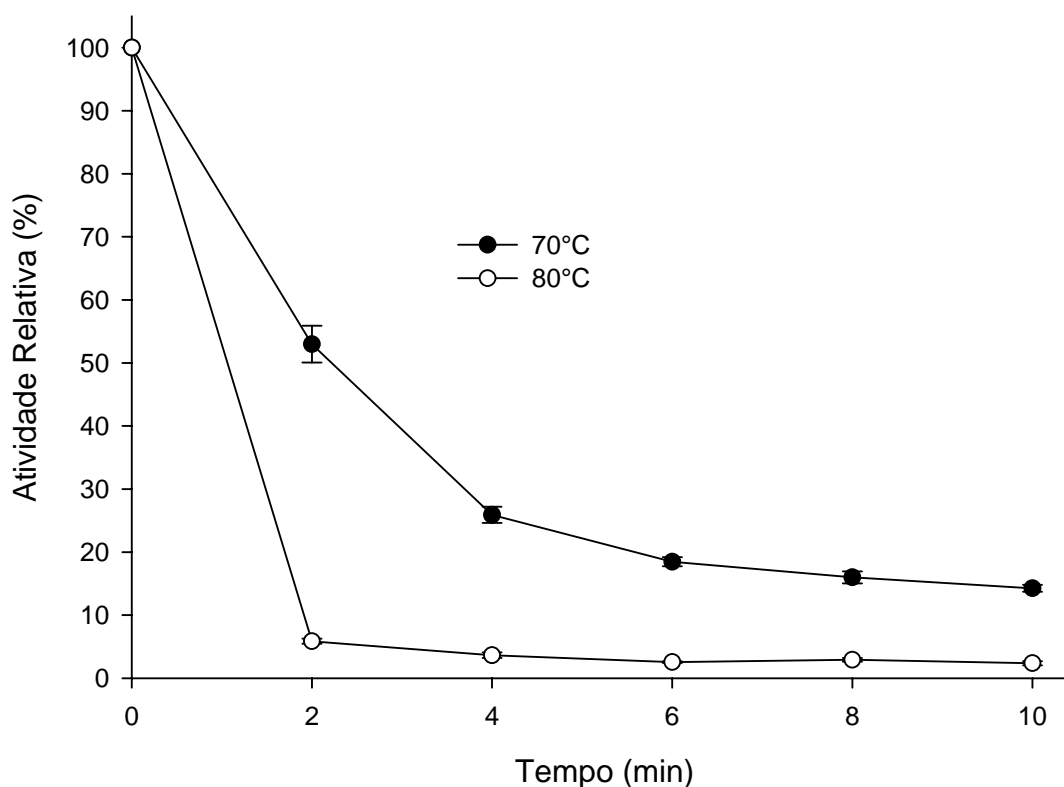


Figura 8. Efeito do tempo da pré-incubação à 70 e 80°C sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*, avaliados em pH 6,0 e temperatura de 25°C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Esse comportamento bifásico observado, ou seja, rápida redução da atividade quando a enzima é exposta às altas temperaturas, e, após, um declínio gradual durante a exposição contínua, também foi encontrado em frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra quando exposto a temperaturas altas (Mdluli, 2005). Segundo Gómez-López (2002), a primeira fase deste comportamento é chamada de termolábil e a seguinte de termoresistente, e isso pode refletir na existência de isoenzimas com diferentes propriedades térmicas.

A temperatura influencia na atividade enzimática de duas maneiras, ou seja, um aumento na temperatura de incubação aumenta a velocidade da reação, mas simultaneamente leva à desnaturação da enzima (Sun *et al.*, 2008). A queda na atividade sob altas temperaturas é devida a mudanças na estrutura terciária da enzima.

PPO não é considerada uma enzima termoestável, e curtos tempos de exposição a temperaturas de 70 - 90°C são suficientes para causar a destruição total ou parcial da atividade catalítica (Vamos-Vigyazo, 1981). A estabilidade térmica da enzima parece estar relacionada à maturidade da planta e em alguns casos também é pH dependente.

Diferentes formas moleculares de uma mesma fonte parecem ter diferentes termoestabilidade (Park & Luh, 1985).

4.3.7 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase

Para avaliar o efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO de ave-do-paráíso, EDTA, sulfato de sódio, ácido ascórbico, DTT, L-cisteína, β -mercaptoetanol e metabissulfito de sódio, à concentração de 1 mM foram utilizados.

DTT, L-cisteína, β -mercaptoetanol e metabissulfito de sódio foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição. O EDTA e o sulfato de sódio apesar de serem classificados como inibidores, não mostraram esse efeito sobre a atividade da PPO de strelítzia, pelo contrário, pequena ativação foi observada quando esses compostos foram utilizados (Tabela 2). Em casca de banana 1 mM de ácido ascórbico ou de L-cisteína resultou em 100% de inibição (Yang *et al.*, 2001) e 1 mM de ácido ascórbico também levou à inativação completa da PPO em *Chrysanthemum coronarium* L. (Nkya *et al.*, 2003).

Segundo Vamos-Vigyazo (1981), os inibidores de PPO podem ser divididos em 3 classes: os que atuam sobre o substrato, os que atuam sobre os produtos da reação (ácido ascórbico e os tióis) e os que agem sobre a enzima em si (agentes complexantes que interagem com o cobre do sítio ativo da enzima).

Como a PPO é uma metaloproteína, pode ser inibida por agentes quelantes como DIECA, tropolone, cianeto, 2-mercaptobenzotiazole e EDTA (Vamos-Vigyazo, 1981). O EDTA tem a capacidade de formar um complexo com o Cu^{2+} da PPO levando à redução na atividade. Segundo Luh & Phithakpol (1972) o pH da mistura de reação pode afetar a afinidade do EDTA para com o cobre. Vários são os relatos que demonstram que o EDTA não tem se mostrado bom inibidor da PPO, como foi observado em cereja (Kumar *et al.*, 2008), lichia (Sun *et al.*, 2008), raízes de banana (Wuyts *et al.*, 2006), alcachofra (Aydemir, 2004), casca de banana (Yang *et al.*, 2001) e manga (Prabha & Patwardhan, 1982). Dębowska & Podstolski (2001) encontraram que baixas concentrações de NaEDTA estimularam a atividade da difenolase de raízes de *Vanilla planifolia*.

Tabela 2. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da polifenoloxidase de hastes de *Strelitzia reginae*.

Inibidor (1 mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100
EDTA	110,33 ± 1,55
Sulfato de Sódio	107,53 ± 2,55
Ácido Ascórbico	33,6 ± 1,7
DTT	0
L-cisteína	0
β-mercaptoetanol	0
Metabissulfito de Sódio	0

O metabissulfito de sódio pode atuar como um agente redutor para *o*-benzoquinonas (Wong *et al.*, 1971). A ação de sulfitos na prevenção do escurecimento enzimático pode ser explicada por vários processos: 1) ação sobre as quinonas, formando os complexos quinonas-sulfito, prevenindo assim a sua polimerização (Embs & Markakis, 1965); 2) a ação do metabissulfito diretamente sobre a estrutura da PPO, em que ele reage com as pontes dissulfídicas, levando à ocorrência de mudanças na estrutura terciária da enzima e conseqüente inativação (Golan-Goldhirsh & Whitaker, 1984), e 3) pela redução dos intermediários quinonas. Metabissulfito foi o inibidor que apresentou maior poder de redução da atividade em *Mentha piperita* (Kavrayan & Aydemir, 2001), raízes de banana (Wuyts *et al.*, 2006), taro, batata (Duangmal & Apenten, 1999) e *Ferula* sp. (Erat *et al.*, 2006). Em uva Victoria 0,5 mM de metabissulfito resultou em inativação completa da PPO (Rapeanu *et al.*, 2006)

DTT é um agente redutor, além de ser considerado um efetivo inibidor pela capacidade de se ligar ao cobre no sítio ativo da PPO (Mayer & Harel, 1979). DTT foi um dos inibidores mais efetivos da PPO em raiz de banana (Wuyts *et al.*, 2006) e em alcachofra (Aydemir, 2004).

A inibição por L-cisteína pode ser explicada por três vias: 1) redução nos níveis de oxigênio, devido ao aumento na duração da fase lag; 2) complexação do inibidor com produtos da reação levando a formação de complexos incolores (Richard-Forget *et al.*, 1992), e 3) a cisteína pode se ligar irreversivelmente a proteína enzimática (Valero *et al.*, 1991). Em manga, 10 µM de L-cisteína levou a 100% de inibição (Prabha & Patwardhan, 1982). Esse inibidor também mostrou ser o mais efetivo em lichia, quando a (-) epicatequina foi usada como substrato (Sun *et al.*, 2008), assim como em abacate

(Gómez-López, 2002) e maçã (Oktay *et al.*, 1995). Concentração de 10 mM de L-cisteína resultou em 98% de inibição em cereja (Kumar *et al.*, 2008) e 100% em *Chrysanthemum coronarium* L. (Nkya *et al.*, 2003). Em uva Victoria 0,5 mM de L-cisteína resultou em inativação completa da PPO (Rapeanu *et al.*, 2006).

O β -mercaptoetanol, outro agente redutor, atua reduzindo as quinonas formadas pela PPO para polifenóis, enquanto ele próprio é oxidado (Arslan & Tozlu, 1997). Em cereja 10 mM de β -mercaptoetanol causou 72% de inibição da polifenoloxidase (Kumar *et al.*, 2008), enquanto em castanha, 1 mM e 5 mM levaram a inibição de 19 e 61,3%, respectivamente (Xu *et al.*, 2004). Incubação da PPO de banana com 17 mM de β -mercaptoetanol levou à completa inativação da enzima (Galeazzi & Sgarbieri, 1981) enquanto em *Anethum graveolens* L., 1 mM inibiu 57% da atividade da PPO (Arslan & Tozlu, 1997). Em feijão, 3 mM β -mercaptoetanol levou à inibição de 100% da atividade da PPO (Nagai & Suzuki, 2003).

O mecanismo de inibição do ácido ascórbico envolve a redução de quinonas geradas pela PPO. A PPO catalisa a oxidação de substâncias fenólicas para *o*-quinonas enquanto o ácido ascórbico converte as quinonas para compostos fenólicos. O ácido ascórbico atua mais como antioxidante do que como inibidor enzimático, reduzindo as quinonas antes que elas sofram as reações secundárias que levam ao escurecimento (Rapeanu *et al.*, 2006). Outros dois mecanismos de inibição envolvem a interação direta com a enzima: quelação do cobre do sítio ativo e redução do Cu^{2+} para Cu^+ (Gómez-Lopez, 2002). Em lichia, quando catecol foi utilizado como substrato, o ácido ascórbico foi o inibidor mais eficaz (Sun *et al.*, 2008). Ácido ascórbico 10 mM levou a 96,6% de inibição em alface (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008). Em manga, 0,1 mM de ácido ascórbico levou a 100% de inibição da atividade da PPO (Prabha & Patwardhan, 1982), enquanto em uva Victoria foram necessários 5 mM (Rapeanu *et al.*, 2006), feijão 3 mM (Nagai & Suzuki, 2003), batata 5 mM e taro 10 mM, para se obter o mesmo resultado (Duangmal & Apenten, 1999).

A capacidade de diferentes compostos em inibir a PPO depende da natureza e concentração do inibidor, fonte de PPO, disponibilidade de substrato (O_2 , fenóis), pH e temperatura (Vamos-Vigyazo, 1981).

4.4 CONCLUSÕES

A extração da PPO de secções da base da haste de strelítzia com acetona foi eficiente para a obtenção de um extrato parcialmente purificado.

A polifenoloxidase de hastes de strelítzia apresentou atividade ótima em pH 6,0, temperatura de 40°C, utilizando-se 4-metil-catecol como substrato.

A inativação da PPO é mais efetiva sob pHs ácidos do que sob pHs alcalinos.

A pré-incubação em altas temperaturas reduziu ou inativou completamente a enzima.

DTT, L-cisteína, metabissulfito de sódio e β -mercaptoetanol levaram à inibição completa da PPO de ave-do-paráíso, enquanto o ácido ascórbico levou a apenas uma inibição parcial.

5. CAPÍTULO 4

UTILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PULSING CONTENDO INIBIDORES ENZIMÁTICOS E SACAROSE EM AVE-DO-PARAÍSO

RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência das enzimas peroxidases e polifenoloxidase no bloqueio dos vasos xilemáticos de hastes de *Strelitzia reginae*, diferentes inibidores enzimáticos (L-cisteína 5 mM, ácido ascórbico 2 mM, metabissulfito de sódio 6 mM, sódio azida 2 mM e β -mercaptoetanol 0,375 mM) foram utilizados na presença ou não de 40% de sacarose em solução de pulsing, por 24 horas, temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 20\%$. Após o tratamento de pulsing, as hastes foram mantidas em água destilada até o final da sua vida de vaso, sendo está trocada a cada 48 horas. As variáveis avaliadas foram: variação de massa fresca, teor relativo de água das sépalas, número de floretes abertos e a longevidade. Quando os inibidores foram utilizados sem a sacarose, o sódio azida foi o que proporcionou maiores valores de massa fresca, longevidade e número de floretes abertos. O metabissulfito de sódio, sódio azida e a L-cisteína isoladamente proporcionaram aumento de massa fresca durante 2 dias, enquanto nos demais tratamentos isso ocorreu somente no primeiro dia de vaso. Sobre o grau de escurecimento da base da haste, o ácido ascórbico e β -mercaptoetanol tiveram o escurecimento semelhante ao controle, enquanto o metabissulfito e o sódio azida reduziram esse escurecimento. O β -mercaptoetanol proporcionou um dos menores valores de TRA ao longo de todos os dias de vaso. A combinação de ácido ascórbico + sacarose 40% e sódio azida + sacarose 40% levaram a uma maior longevidade e número de floretes abertos em *strelitzia*. Os resultados positivos encontrados quanto à utilização de inibidores enzimáticos em soluções de pulsing em *strelitzia*, é um indicativo que as enzimas

peroxidase e polifenoloxidase estão envolvidas no bloqueio dos vasos xilemáticos desta espécie.

5.1 INTRODUÇÃO

O sucesso comercial de flores de corte depende da qualidade estética, produção e longevidade após a colheita (Halevy & Mayak, 1979). As principais causas da deterioração pós-colheita envolvem a exaustão das reservas, principalmente de carboidratos pela respiração, ocorrência de bactérias e fungos, produção de etileno e perda excessiva de água. Para obter maior longevidade e manter a qualidade das flores, são necessárias práticas pós-colheita adequadas e o tratamento com soluções de condicionamento ou pulsing imediatamente após a colheita (Nowak & Rudnicki, 1990).

Um dos maiores problemas encontrados em ave-do-paraíso, assim como na maioria das flores de corte, é o balanço hídrico negativo observado após as flores serem mantidas em água, em que, as taxas de transpiração se tornam superiores às de absorção, devido ao aumento da resistência hidráulica, consequência do bloqueio dos vasos xilemáticos (van Meeteren, 1992). Esse bloqueio pode ser decorrente do crescimento microbiano na haste ou na água, cavitação ou respostas fisiológicas ao corte (van Doorn, 1997). O estresse hídrico gerado por este bloqueio acelera a senescência e reduz a longevidade das flores de corte (Spikman, 1986).

Quando o bloqueio dos vasos xilemáticos é de ordem fisiológica, observa-se aumento na atividade das enzimas peroxidase e catecol oxidase após o corte, enzimas relacionadas à síntese de lignina e suberina (Okey *et al.*, 1997; Botella *et al.*, 1994). Nesse aspecto, o bloqueio parece ser devido à deposição de material nas membranas das pontuações do xilema, bem como a formação de tilose (Smith *et al.*, 1994). A utilização de inibidores enzimáticos como componentes de solução de pulsing tornou-se uma prática efetiva, e resultados positivos têm sido encontrados em flores de *Grevillea* (He *et al.*, 2006), bouvardia (Vaslier & van Doorn, 2003) e crisântemo (van Doorn & Vaslier, 2002).

Os carboidratos são a principal fonte de energia necessária para a manutenção dos processos bioquímicos e fisiológicos após a separação das flores da planta-mãe

(Nowak & Rudnicki, 1990). Açúcares fornecidos em soluções conservantes ou de pulsing são translocados e acumulam-se nas flores, aumentando a pressão osmótica, melhorando a capacidade de absorção e manutenção da turgescência das pétalas, favorecendo, desse modo, o balanço hídrico das flores de corte (Halevy *et al.*, 1976). O uso de sacarose tem sido eficiente no prolongamento da vida de vaso, promoção da abertura de botões imaturos, propiciando colheita antecipada e maior vida de vaso de flores de corte (Barbosa *et al.*, 2006).

Em *Strelitzia*, Moraes (1999) encontrou resultados positivos quanto à utilização de sacarose 40% em solução de pulsing após períodos de armazenamento a 10°C, levando a uma maior vida de vaso após armazenamento e maior número de floretes desenvolvidos. A utilização de inibidores enzimáticos da peroxidase e polifenoloxidase em solução de pulsing nessa espécie não teve influência sobre a longevidade e número de floretes abertos (Marques, 2008). Entretanto, as concentrações utilizadas, foram baseadas em trabalhos realizados com espécies diferentes, o que pode explicar a falta de resultados positivos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de diferentes inibidores enzimáticos, na presença ou não de sacarose sobre a vida pós-colheita de inflorescências de *ave-do-paráíso*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Hastes florais de *strelitzia* contendo um florete aberto (ponto de colheita comercial) foram colhidas em campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG (latitude 20°45' sul, longitude 42°51' oeste e altitude de 651 m), em setembro de 2008, no período da tarde (13:30 horas). Em seguida, foram levadas para o laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, onde passaram por processo de seleção e padronização para 80 cm de comprimento, sendo o corte realizado dentro da água para evitar a entrada de ar no interior dos vasos do xilema. Após este procedimento, as hastes florais foram distribuídas aleatoriamente em cada tratamento. O experimento foi conduzido em temperaturas de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 20\%$ e intensidade luminosa de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.2.1 Tratamentos pós-colheita

Os tratamentos consistiram na aplicação de diferentes soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos, na presença ou não de sacarose 40% (Quadro 1), aplicadas por um período de 24 horas. Os inibidores e as concentrações dos inibidores utilizados foram de acordo com as determinadas *in vitro* que proporcionaram 100% de inibição da POD e PPO, em *strelitzia*. Após esse período, as soluções foram substituídas por água destilada, sendo essa trocada a cada 48 horas, processo que perdurou até o fim da longevidade das flores.

Os produtos químicos utilizados foram diluídos em água destilada e o pH de cada solução foi corrigido quando necessário para 6,0 com NaOH ou HCl 1 M, para evitar que o pH tenha efeito sobre o resultado, uma vez que algumas substâncias alteram os valores dos mesmos.

Quadro 1. Composição das diferentes soluções fornecidas em pulsing as hastes de *Strelitzia reginae*.

Tratamento	Solução
T0	Água destilada
T1	Sacarose 40%
T2	L-cisteína 5 mM
T3	Ácido Ascórbico 2 mM
T4	Metabissulfito de Sódio 6 mM
T5	Sódio Azida 2 mM
T6	β -mercaptoetanol 0,375 mM
T7	L-cisteína 5 mM + Sacarose 40%
T8	Ácido Ascórbico 2 mM + Sacarose 40%
T9	Metabissulfito de Sódio 6 mM + Sacarose 40%
T10	Sódio Azida 2 mM + Sacarose 40%
T11	β -mercaptoetanol 0,375 mM + Sacarose 40%

5.2.2 Alterações de massa fresca

As hastes florais, após a padronização foram pesadas para a obtenção da massa fresca inicial, peso esse considerado como 100%. Subseqüentes pesagens foram realizadas a cada 24 horas até o término da longevidade das flores, sendo os resultados expressos em porcentagem de massa fresca (PMF).

$$\text{PMF (\%)} = (\text{PF/PI}) \times 100 \quad \text{onde:}$$

PI - massa fresca inicial (g)

PF – massa fresca final (g)

Cada tratamento foi constituído de 4 repetições, sendo cada unidade experimental composta por 2 hastes florais. Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e erro padrão da média.

5.2.3 Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) das sépalas de strelítzia foi determinado a cada 24 horas durante 7 dias. A técnica utilizada foi a de Càtsky (1974), em que 4 discos foram retirados das sépalas das flores com um perfurador de 0,6 cm de diâmetro, sendo pesado para a obtenção da massa fresca inicial (MF) e colocados em uma espuma de poliuretano perfurada para hidratação. Os discos permaneceram na espuma até sua completa saturação, quando foram novamente pesados para a obtenção da massa túrgida (MT). Para a determinação da massa seca (MS), os discos foram levados para a estufa a 70°C, onde permaneceram por 72 horas.

Após isso, procedeu-se a estimativa do teor relativo de água com o emprego da seguinte equação (Weatherley, 1950):

$$\text{TRA (\%)} = [(MT - MF)/(MT - MS)] \times 100 \quad \text{onde:}$$

MF - massa fresca inicial (g)

MT - massa túrgida (g)

MS - massa seca (g)

Para a determinação do teor relativo de água das sépalas de strelítzia, 6 repetições por tratamento foram utilizadas, e os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, em 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

5.2.4 Número de floretes abertos

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

Cada tratamento apresentou 4 repetições, sendo cada unidade experimental composta por duas hastes. Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e erro padrão da média.

5.2.5 Longevidade

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

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada unidade experimental composta por 2 hastes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade através do programa estatístico SISVAR.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Alterações de massa fresca

O metabissulfito de sódio, sódio azida e L-cisteína aplicados isoladamente, proporcionaram aumento de massa fresca até o segundo dia (Figuras 1, 2 e 3), enquanto com os demais inibidores e com o controle, o aumento ocorreu somente no primeiro dia (Figuras 4 e 5). Marques (2008) observou aumento nos valores de massa fresca na mesma espécie até o 2º dia após a aplicação de soluções de pulsing contendo diferentes inibidores enzimáticos.

Quando se compara a influência dos inibidores enzimáticos na ausência de sacarose com o controle sobre as alterações de massa fresca, o ácido ascórbico teve comportamento semelhante ao controle (Figura 4), o β -mercaptoetanol foi um pouco superior (Figura 5) enquanto que os demais apresentaram valores de massa fresca superior ao controle (Figuras 1, 2 e 3). O melhor resultado foi encontrado com o pulsing de sódio azida 2 mM, que manteve os valores de massa fresca superiores ao controle ao longo de todos os dias de análise; no 9º dia, a massa fresca das hastes tratadas com esta substância foi 5,8% maior que o controle (Figura 2). Já o metabissulfito de sódio e L-cisteína apresentaram valores de massa fresca 4% maior que o controle até o 4º dia (Figuras 1 e 3).

Guimarães (2008) não encontrou influência do β -mercaptoetanol a concentrações de 10 e 15 mM sobre a variação de massa fresca em flores de *Heliconia bihai*. Marques (2008), avaliando o efeito de diferentes inibidores sobre a massa fresca em *strelitzia*, encontrou que o metabissulfito 10 mM proporcionou maiores valores de massa fresca, atingindo 106% em relação à massa fresca inicial, enquanto diferentes concentrações de ácido ascórbico (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM) não foram eficientes para este mesmo parâmetro.

O comportamento da variação de massa das hastes tratadas com pulsing de 40% de sacarose ou dos inibidores + 40% de sacarose, mostrou-se semelhante em todos os tratamentos (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). A combinação inibidor + sacarose somente no sódio azida não proporcionou maiores valores de massa fresca que o pulsing com o inibidor sozinho (Figura 2). Todas as hastes submetidas ao pulsing com sacarose, apresentaram perda de massa fresca durante a aplicação do pulsing devido à diferença de potencial osmótico. A solução de pulsing por ter alta concentração de soluto, apresenta um baixo potencial osmótico e conseqüente potencial hídrico menor que os da haste. Como a água flui de um meio de maior potencial hídrico para o de menor, a haste tende a perder água, o que explicaria a perda de massa fresca observada durante a aplicação do pulsing. O aumento de massa fresca foi observado somente um dia após sua retirada da solução (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).

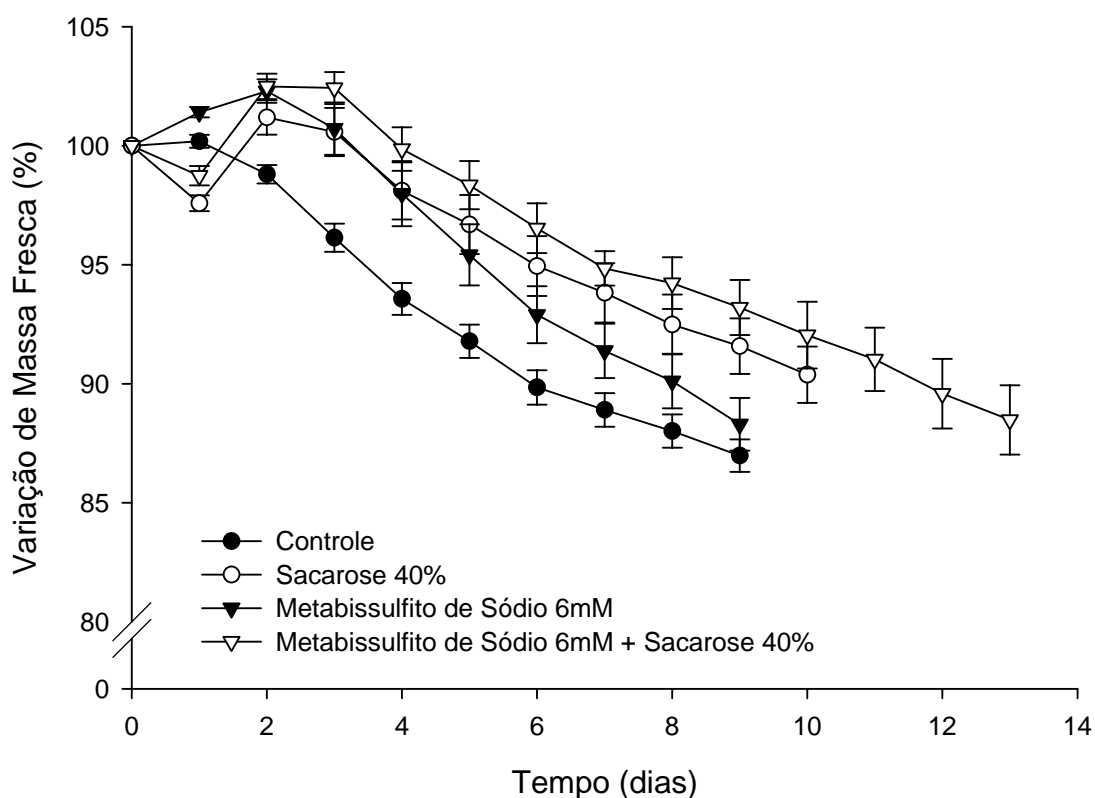


Figura 1. Efeito do metabissulfito de sódio 6 mM na presença ou ausência de sacarose sobre a variação de massa fresca (%) em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

He *et al.*, (2006) utilizando diferentes concentrações de S-carvone (anti-microbiano e inibidor da PAL) e 4-hidrylresorcinol (inibidor da catecol oxidase),

encontraram resultados positivos desses compostos sobre a massa fresca de flores de *Grevillea*.

Flores de corte mantidas em água desenvolvem balanço hídrico negativo ao longo da vida de vaso, ou seja, suas taxas de absorção são mais baixas que as taxas de transpiração, e isso deve-se a oclusão do xilema na parte basal da haste. Em crisântemo, esse balanço negativo pode ser observado poucas horas após as flores serem colocadas na água (van Meeteren, 1989, 1992). O balanço hídrico negativo das hastes de *Strelitzia* controle e tratadas com ácido ascórbico ocorreu partir do 2º dia (Figura 4), em hastes tratadas com β -mercaptoetanol no 3º dia (Figura 5), enquanto nos demais tratamentos com inibidores isolados, combinados com sacarose ou somente com sacarose ocorreu no 4º dia (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5), com exceção do sódio azida isolado, onde esse comportamento foi observado somente no 5º dia (Figura 2).

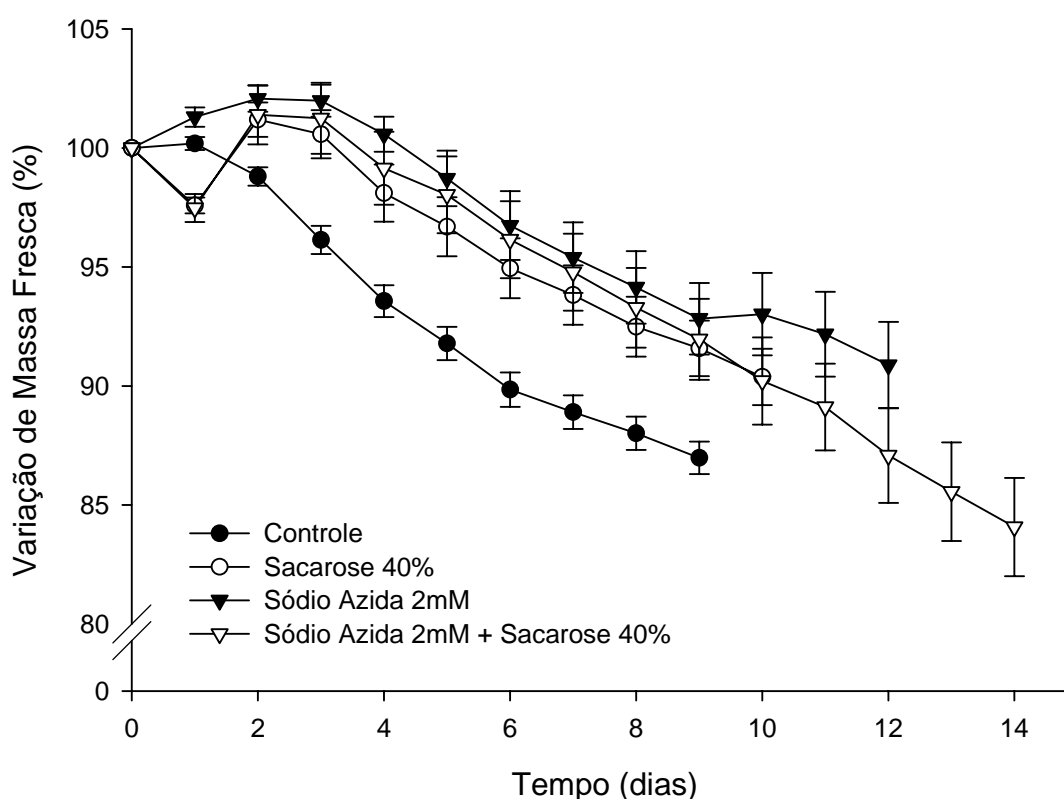


Figura 2. Efeito do sódio azida 2 mM na presença ou ausência de sacarose sobre a variação de massa fresca (%) em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A taxa de absorção de água nas flores de corte depende da condutância hidráulica dos vasos das hastes e da diferença de potencial hídrico entre a água do vaso

e os tecidos da flor. O potencial hídrico das flores de corte é afetado pela perda de água devido à transpiração e pelos processos que levam ao alongamento celular, especialmente durante o crescimento das pétalas das flores durante a abertura (van Meeteren & van Gelder, 1999), enquanto o fornecimento de açúcares em pulsing melhora o balanço hídrico pela regulação da transpiração, pela redução do potencial osmótico e aumento da absorção de água (Nowak & Rudnicki, 1990).

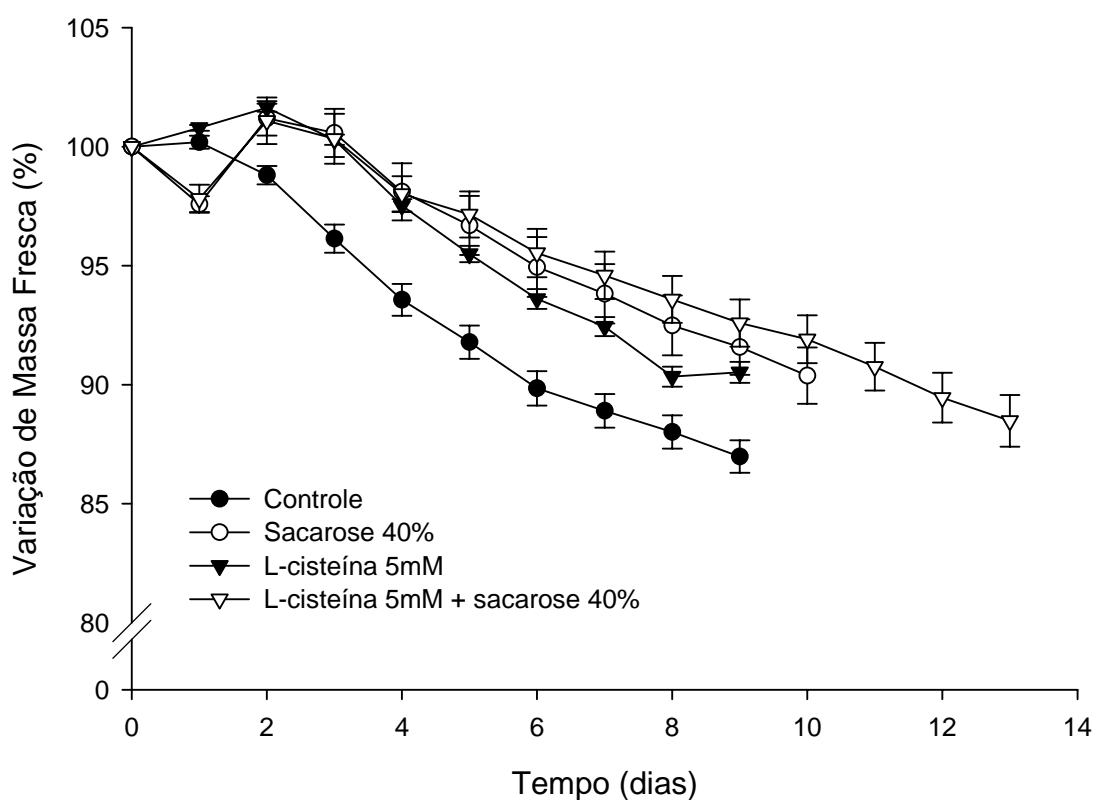


Figura 3. Efeito da L-cisteína 5 mM na presença ou ausência de sacarose sobre a variação de massa fresca (%) em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

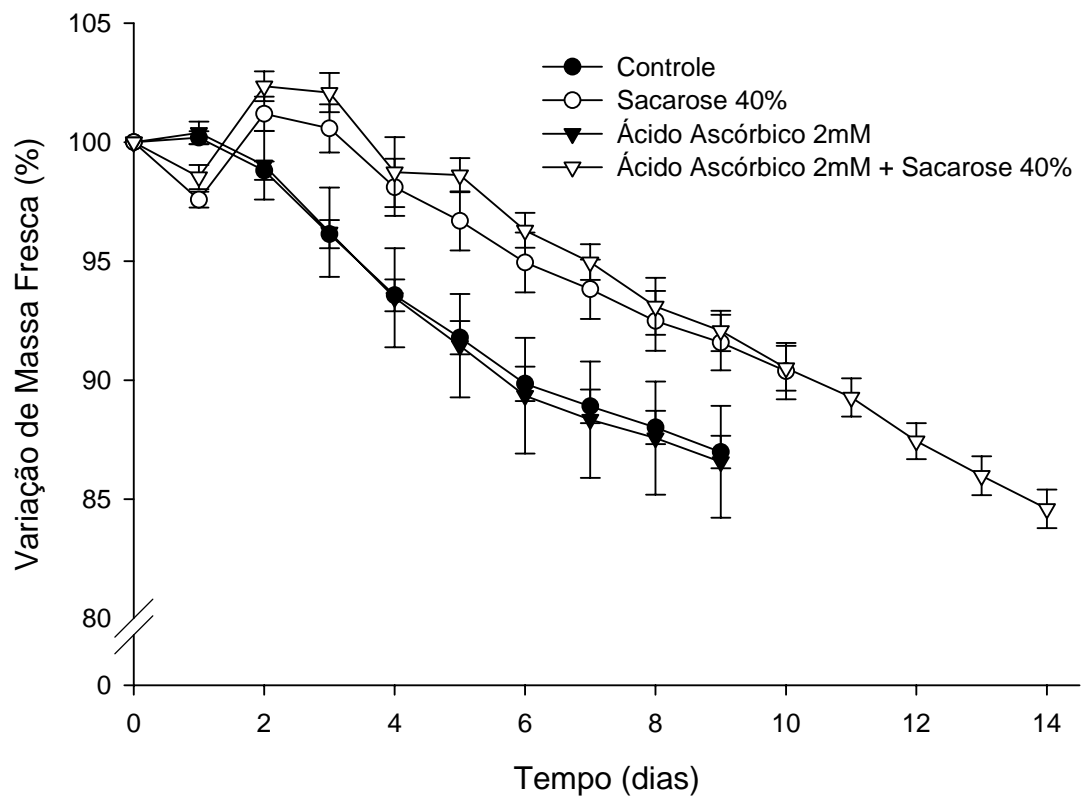


Figura 4. Efeito do ácido ascórbico 2mM na presença ou ausência de sacarose sobre a variação de massa fresca (%) em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

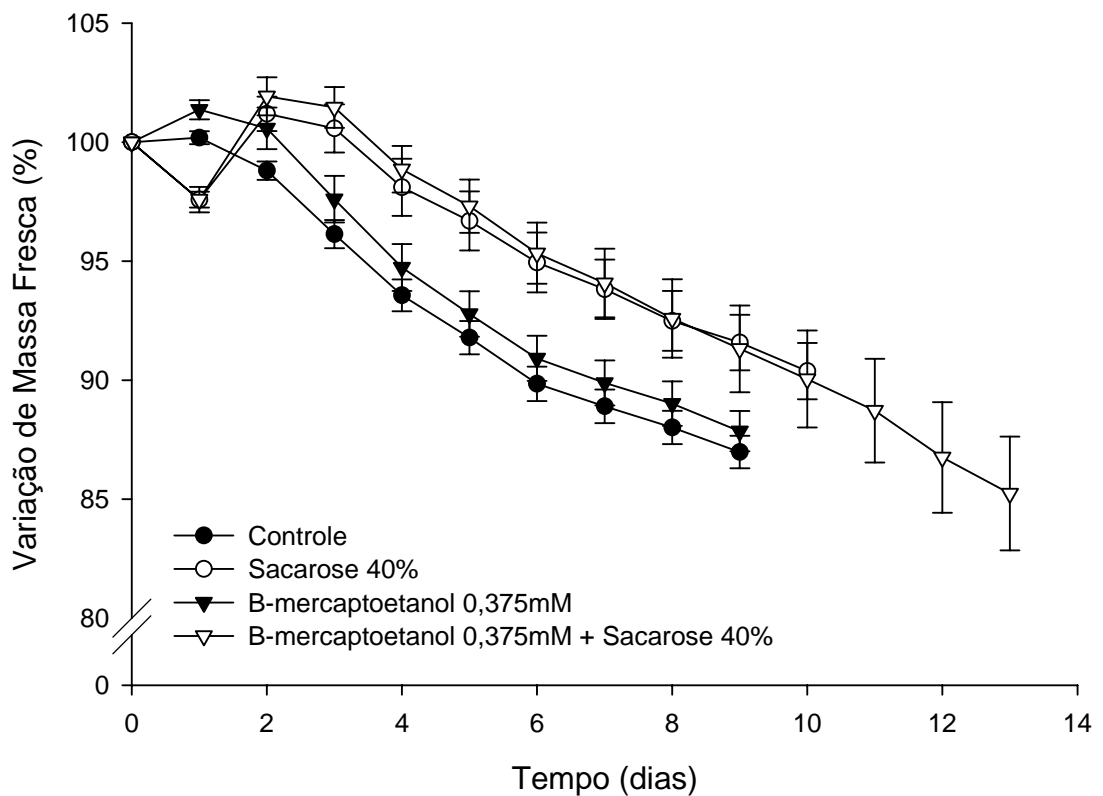


Figura 5. Efeito do β -mercaptoetanol 0,375 mM na presença ou ausência de sacarose sobre a variação de massa fresca (%) em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

O aspecto da base das hastes após 8 dias da aplicação das soluções de pulsing, pode ser observado na Figura 6. Hastes tratadas com ácido ascórbico e β -mercaptoetanol apresentaram taxas de escurecimento comparáveis às do controle e superior aos demais tratamentos (Figura 6 D e G). Esses tratamentos parecem não ter inibido as enzimas causadoras do escurecimento, o que pode explicar os valores inferiores de massa fresca encontradas nos mesmos (Figuras 4 e 5). Hastes tratadas com o metabissulfito não apresentaram escurecimento (Figura 6E), enquanto leve escurecimento pôde ser observado nas hastes tratadas com sódio azida (Figura 6F). Isso se deve a uma possível inibição enzimática que possa ter ocorrido na base das hastes, o que poderia explicar os maiores valores de massa fresca encontrados nesses tratamentos (Figuras 1 e 2). Quando a combinação de inibidor + sacarose foi utilizada como solução de pulsing, nenhuma diferença visual na base das hastes entre as soluções foi observada (Figura 6 H, I, J, K e L).



Figura 6. Aspecto do corte das hastes de *Strelitzia reginae* 8 dias após a aplicação das soluções de pulsing: água destilada (A), sacarose 40% (B), L-cisteína 5 mM (C), ácido ascórbico 2 mM (D), metabissulfito de sódio 6 mM (E), sódio azida 2 mM (F), β -mercaptoetanol 0,375 mM (G), L-cisteína + 40% de sacarose (H), ácido ascórbico + 40% sacarose (I), metabissulfito de sódio + 40% de sacarose (J), sódio azida + 40% de sacarose (K) e β -mercaptoetanol + 40% de sacarose (L).

5.3.2 Teor relativo de água

A maioria dos tratamentos apresentou quedas nos valores de TRA seguidas por um aumento. Isto ocorreu devido mudanças no florete utilizado para a determinação desta variável. (Tabela 1). Até o 3º dia, todas as amostras foram provenientes do primeiro florete, e a influência dos tratamentos sobre esta variável pode ser observada. L-cisteína com ou sem sacarose e β -mercaptoetanol foram os tratamentos que levaram aos menores valores de TRA no 3º dia de vaso (Tabela 1).

Tabela 1. Teor relativo de água (%) de sépalas de *Strelitzia reginae*, submetidas as diferentes soluções de pulsing.

Tratamento	Tempo (dias)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Controle	90,36 A	95,24 A	95,24 A	93,89 A	92,56 A	76,25 D	83,13 C	93,56 A
Sacarose	90,36 A	96,70 A	94,48 A	88,32 B	89,94 B	81,23 C	92,23 A	88,08 A
L-cisteína	90,36 A	96,67 A	89,92 B	81,65 D	92,39 A	91,84 A	81,12 D	82,02 B
Ácido Ascórbico	90,36 A	95,94 A	94,52 A	93,10 A	87,26 B	81,91 C	83,98 C	93,54 A
Metabissulfito de Sódio	90,36 A	93,56 B	91,91 B	90,18 B	89,36 B	93,21 A	85,62 C	72,88 C
Sódio Azida	90,36 A	94,90 B	95,06 A	88,61 B	93,35 A	87,55 B	77,35 D	89,99 A
β -mercaptoetanol	90,36 A	95,99 B	89,52 B	81,74 D	88,67 B	78,94 D	69,95 E	58,94 D
L-cisteína + Sacarose	90,36 A	93,47 B	90,39 B	83,42 D	82,11 C	92,25 A	88,05 B	90,71 A
Ac. Ascórbico + Sacarose	90,36 A	91,69 A	95,23 A	86,22 C	92,33 A	92,55 A	84,82 C	82,85 B
Metabissulfito + Sacarose	90,36 A	94,76 B	94,38 A	93,00 A	90,56 B	86,42 B	91,46 A	91,29 A
Sódio Azida + Sacarose	90,36 A	90,80 A	93,48 A	89,03 B	90,57 B	86,72 B	78,63 D	90,07 A
β -mercaptoetanol + Sacarose	90,36 A	96,70 B	88,76 B	85,34 C	89,15 B	83,75 C	84,54 C	89,02 A

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Ao longo de todos os dias de análise, duas soluções se destacaram: a solução contendo β -mercaptoetanol, que proporcionou os menores valores de TRA e a contendo metabissulfito de sódio + sacarose, responsável por alguns dos maiores valores de TRA (Tabela 1). O efeito negativo do β -mercaptoetanol no TRA de sépalas de strelítzia se deve às menores taxas de absorção de água observadas pelos menores valores de massa fresca ao longo da vida de vaso (Figura 5). Marques (2008) não encontrou diferença entre os TRA de sépalas de strelítzia ao utilizar diferentes inibidores enzimáticos como solução de pulsing.

5.3.3 Número de floretes abertos

Quando comparado o efeito dos diferentes inibidores aplicados isoladamente com o controle sobre o número de floretes abertos, observou-se que somente o β -mercaptoetanol não provocou um efeito positivo sobre essa variável (Figura 7), sendo que os demais proporcionaram abertura de floretes maior que o controle (Figuras 8, 9, 10 e 11). Melhores resultados foram encontrados com metabissulfito de sódio (Figura 10) e sódio azida (Figura 11), que possibilitaram média de 2,1 e 2,3 floretes abertos por haste no final da sua vida de vaso, respectivamente.

Com exceção do metabissulfito, que com ou sem sacarose, possibilitou o mesmo número de floretes abertos que a sacarose aplicada isoladamente, (Figura 10), nos demais tratamentos a combinação do inibidor mais sacarose levou a um maior número de floretes abertos se comparado com o controle ou o inibidor sozinho (Figuras 7, 8, 9 e 11). Melhores resultados da combinação do inibidor com a sacarose foram encontrados com o ácido ascórbico e o sódio azida, que possibilitaram média de 2,9 e 3 floretes abertos por haste, respectivamente (Figuras 9 e 11).

Marques (2008), não encontrou diferenças significativas no número de floretes abertos em strelítzia, após a aplicação de diferentes soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos. Pulsing com 40% de sacarose, por 24 horas, após 7 dias de armazenamento a 10°C proporcionou abertura de 2,5 floretes por haste na mesma espécie (Moraes, 1999).

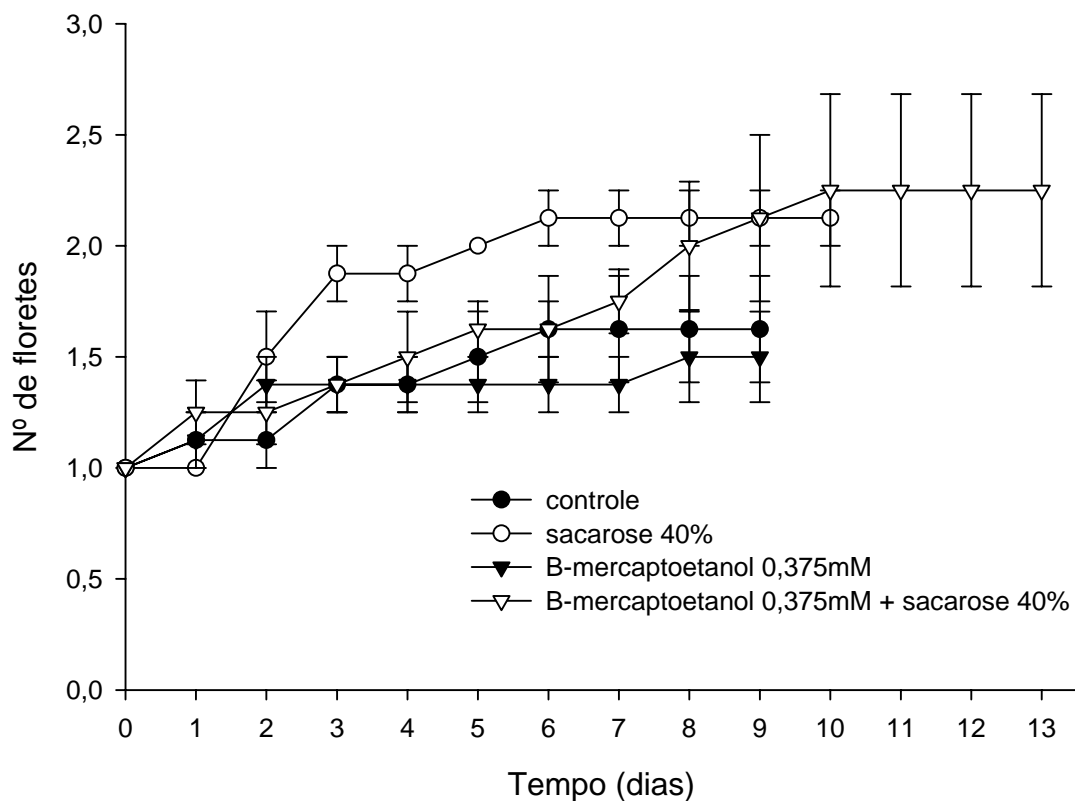


Figura 7. Efeito do β -mercaptoetanol 0,375 mM na presença ou ausência de sacarose sobre o número de floretes abertos em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em várias espécies a sacarose tem sido eficiente em prolongar a vida de vaso e promover a abertura de botões imaturos, propiciando colheita antecipada e maior vida de vaso da flor cortada (Barbosa *et al.*, 2006). A turgescência é necessária para o desenvolvimento de botões florais e também para a continuidade da atividade metabólica da flor cortada. Sobre estes aspectos, a sacarose tem marcante influência, pois favorece o balanço hídrico das flores cortadas (Hastenreiter *et al.*, 2006). Inflorescências de lírio colhidas no estágio A (maior botão = $7,0 \pm 1$ cm; menor botão = $5,0 \pm 1,0$ cm) apresentam a abertura dos 3 botões quando solução com sacarose a 5% foi utilizada (Barbosa *et al.*, 2006).

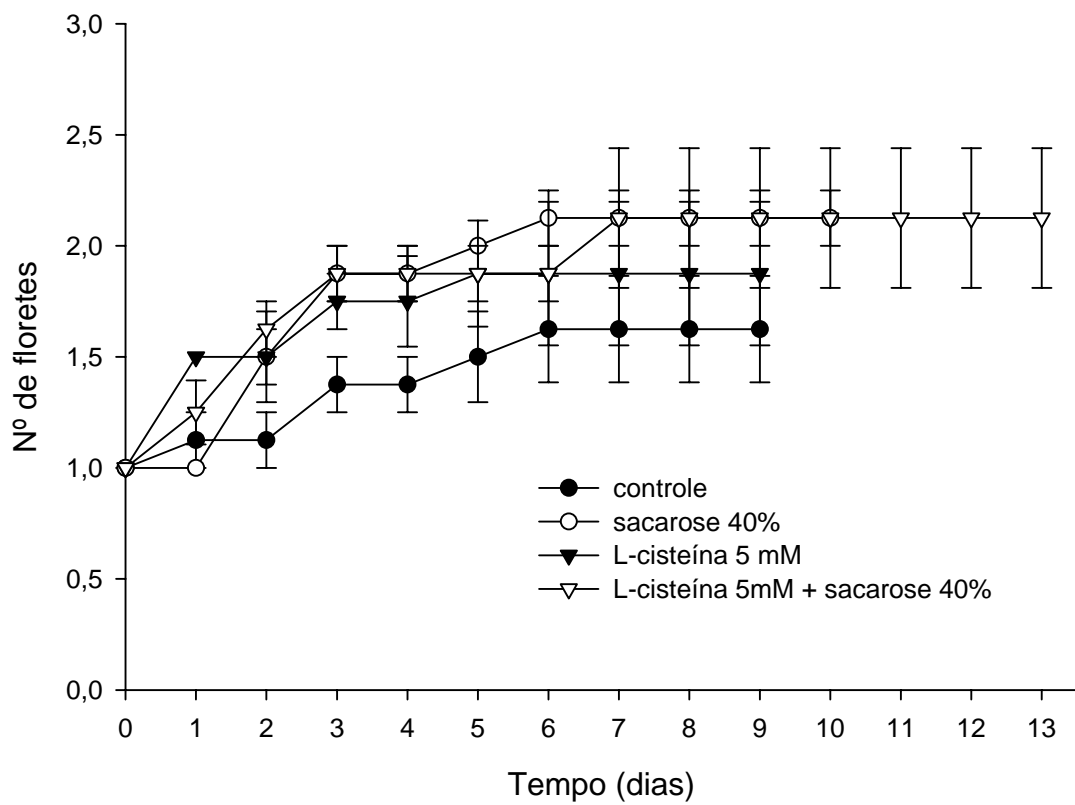


Figura 8. Efeito da L-cisteína 5 mM na presença ou ausência de sacarose sobre o número de floretes abertos em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

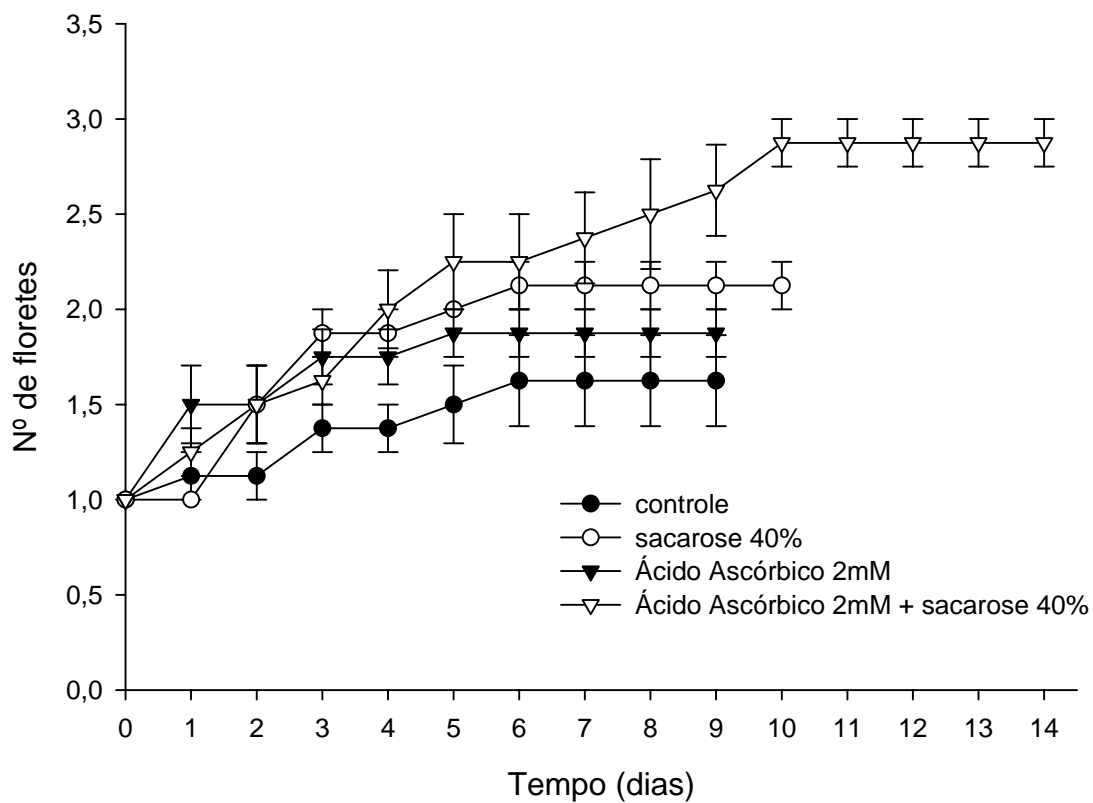


Figura 9. Efeito do ácido ascórbico 2 mM na presença ou ausência de sacarose sobre o número de floretes abertos em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

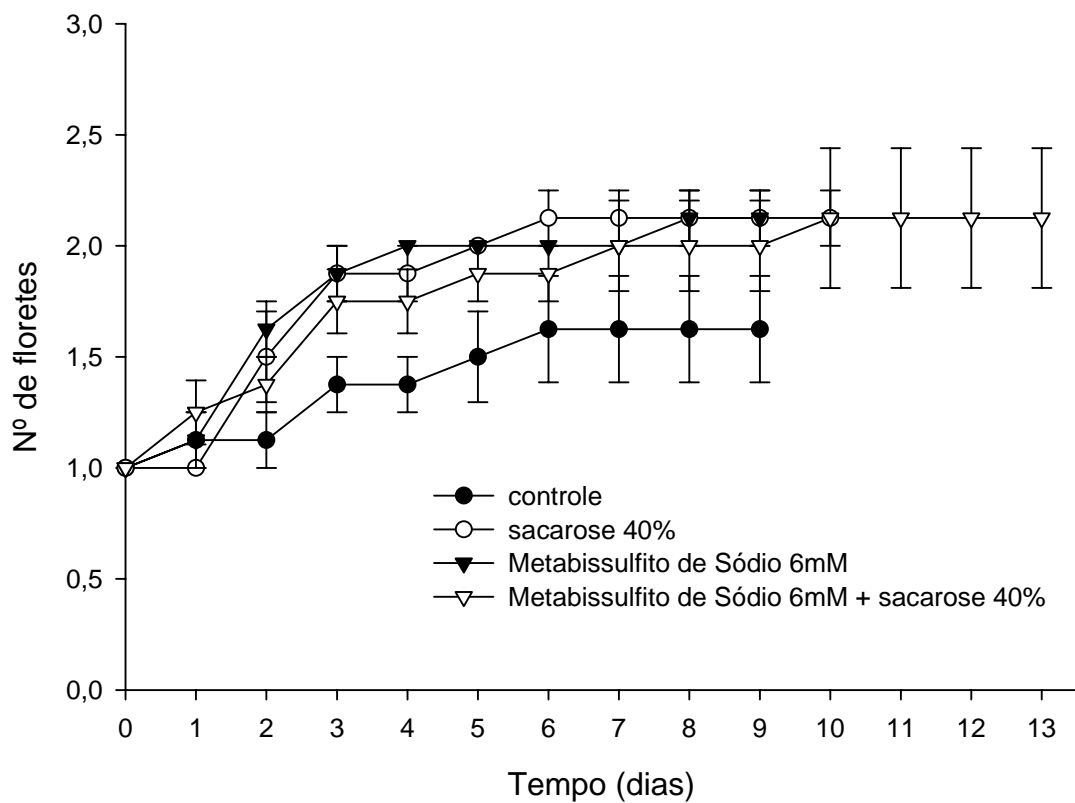


Figura 10. Efeito do metabissulfito de sódio 6 mM na presença ou ausência de sacarose sobre o número de floretes abertos em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

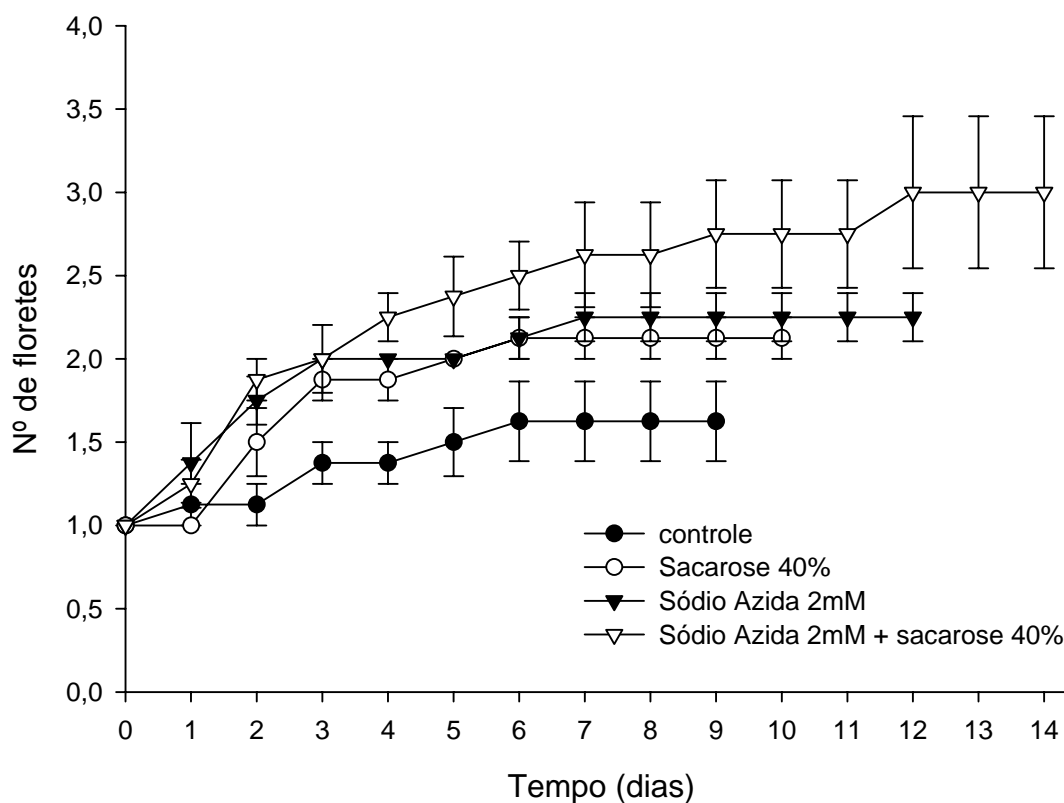


Figura 11. Efeito do sódio azida 2 mM na presença ou ausência de sacarose sobre o número de floretes abertos em hastes de *Strelitzia reginae* ao longo da vida de vaso. As barras verticais representam o erro padrão da média.

5.3.4 Longevidade

Os tratamentos que proporcionaram maiores longevidades foram sódio azida (9,3 dias), metabissulfito de sódio + sacarose (9,4 dias), β -mercaptoetanol + sacarose (9,6 dias), sódio azida + sacarose (11 dias) e ácido ascórbico + sacarose (11,8 dias). Os demais não diferiram do controle quanto à longevidade (Figura 12). Com exceção da L-cisteína, todos os demais inibidores quando combinados com sacarose proporcionaram maior longevidade se comparados com a solução de sacarose, mostrando assim, a influência benéfica da combinação entre o inibidor enzimático e a fonte de carboidrato sobre esta variável (Figura 12).

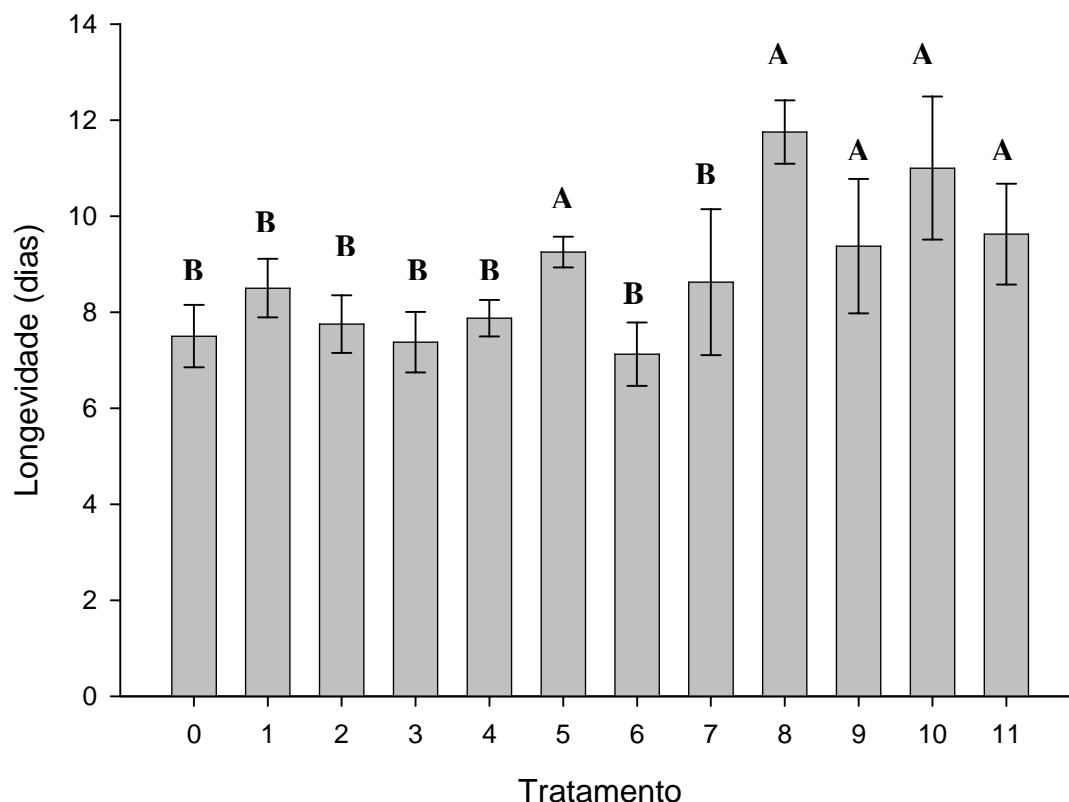


Figura 12. Longevidade de *Strelitzia reginae* após aplicação dos diferentes tratamentos: água destilada (0), sacarose 40% (1), L-cisteína 5 mM (2), ácido ascórbico 2 mM (3), metabissulfito de sódio 6 mM (4), sódio azida 2 mM (5), β -mercaptoetanol 0,375 mM (6), L-cisteína + 40% de sacarose (7), ácido ascórbico + 40% sacarose (8), metabissulfito de sódio + 40% de sacarose (9), sódio azida + 40% de sacarose (10) e β -mercaptoetanol + 40% de sacarose (11). As barras verticais representam o erro padrão da média e letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott em 5% de probabilidade.

Em flores de bouvardia, o tratamento de pulsing por 5 horas com inibidores da peroxidase e catecol oxidase e com o cobre (inibidor não específico da peroxidase) levou a um aumento no tempo até o total murchamento das flores. 2-mercaptoetanol à concentração de 10 mM, também proporcionou bons resultados na mesma espécie (Vaslier & van Doorn, 2003). Em flores de crisântemo, o uso de diferentes inibidores da peroxidase, fenoloxidase e catecol oxidase também retardou o tempo até o total murchamento das flores (van Doorn & Vaslier, 2002).

Marques (2008) não encontrou diferenças significativas na longevidade de *strelitzia* entre os tratamentos aplicados com inibidores enzimáticos, sendo a faixa de

longevidade das hastes florais entre 7 e 9 dias. Em *Heliconia bihai*, também nenhuma influência do β -mercaptoetanol a concentrações de 10 e 15 mM sobre a longevidade foi observada (Guimarães, 2008). A utilização de S-carvone e 4-hexilresorcinol como constituinte da solução de pulsing em flores de *Grevillea* estendeu a sua vida de vaso (He *et al.*, 2006).

Diferenças na longevidade de strelítzia foram observadas por Moraes (1999) quando o pulsing com 40% de sacarose foi feito antes ou após o armazenamento. Hastes que sofreram o tratamento de pulsing antes do armazenamento foram armazenadas já com um florete aberto (abertura estimulada pela sacarose), ou seja, tiveram maior superfície exposta ao estresse e como consequência disso, menor longevidade foi encontrada. Após 7 dias de armazenamento a 10°C, os tratamentos sem pulsing ou com pulsing após o armazenamento possibilitaram vida de vaso de 8,3 e 8,6 dias respectivamente, enquanto as que receberam condicionamento antes, a longevidade foi de apenas 5,6 dias.

A vida pós-colheita de ave-do-paraíso varia entre 6 – 16 dias. Essa diferença reflete em parte as condições de crescimento, maturidade na colheita, diferentes condições de armazenamento, condições de transporte e diferentes critérios usados para avaliar a longevidade das inflorescências (Bayogan *et al.*, 2008). A perda de vida pós-colheita é provavelmente um resultado de um rápido declínio na absorção de água após a colheita, associada com um possível bloqueio dos tecidos vasculares das hastes e brácteas senescentes (Jaroenkit & Paull, 2003).

O comprimento das hastes também tem influência sobre a longevidade de strelítzia. Hastes de strelítzia mais compridas (70 cm) proporcionaram maior vida de vaso que as hastes curtas (35 cm) (Bayogan *et al.*, 2008). Como a absorção de água é limitante após a colheita, hastes mais longas apresentam uma maior reserva de água (Jaroenkit & Paull, 2003).

A longevidade das flores é determinada por vários fatores pré e pós-colheita, e está relacionada também com as características genéticas e anatômicas da espécie e cultivar (Nowak & Rudnicki, 1990). O murchamento de flores de corte é geralmente agravado pela oclusão dos vasos do xilema, que resulta num decréscimo na taxa de absorção e como resultado tem-se o prematuro murchamento devido à perda de turgor (Mayak *et al.*, 1974).

A sacarose tem sido utilizada para aumentar a longevidade de muitos tipos de flores. O açúcar proporciona energia para os processos celulares fundamentais, tais como manutenção da estrutura e funcionamento da mitocôndria e outras organelas e

ajuda na regulação do fluxo de água e minerais dentro dos vasos do xilema por controlar a transpiração (Nowak & Rudnicki, 1990).

O processo de senescência em células vegetais é provocado por uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas como: aumento da atividade de enzimas, degradação de amido e clorofila, modificações nas membranas, aumento no processo respiratório, aumento na produção de etileno, perda na permeabilidade da parede celular e redução no peso de matéria fresca, provocado pela perda de água (Mayak, 1987).

A correção do pH nas soluções de pulsing é importante, uma vez que soluções com pHs baixos podem aumentar a durabilidade das flores devido à inibição das enzimas nessas condições (efeito do pH e não do inibidor), bem como a inibição do crescimento de microrganismos. Em crisântemos a adição de antioxidantes como ácido ascórbico 1 mM (pH 3,9) e ácido benzóico 0,5 mM (pH 3,4) durante pulsing por 5 horas aumentou o tempo até o murchamento das flores, mas esse resultado foi devido ao baixo pH que essas soluções apresentaram e não devido à utilização de substâncias antioxidantes, uma vez que soluções controle com pHs baixos também levaram a resultados positivos de longevidade. Outros antioxidantes com pH mais altos, retardaram o tempo para o murchamento das flores, indicando a função da oxidação na reação ao dano (van Doorn & Cruz, 2000).

Segundo Durkin (1979 e 1980), apud Williamson & Milburn (1995), a acidificação da água aumenta o fluxo em hastes de rosa, uma vez que esta proporciona um aumento no movimento lateral de água através das paredes dos vasos, possivelmente por quebra das ligações de pectato de cálcio.

Os resultados positivos encontrados na variação de massa fresca, teor relativo de água das sépalas, número de floretes abertos e longevidade, avaliados em ave-do-paráíso após o tratamento com soluções de pulsing contendo inibidores enzimáticos com ou sem sacarose indica a participação da POD e PPO no processo de oclusão vascular nesta espécie.

A utilização de diferentes soluções de pulsing, de diferentes composições, com outras características determinadas na caracterização enzimática, capazes de inibir essas enzimas, como pHs ácidos e altas temperaturas, devem ser testadas, bem como sua utilização como solução de vaso, determinando-se a atividade enzimática após a aplicação desses tratamentos. Devido aos resultados encontrados, maior destaque ao sódio azida deve ser dado em estudos subsequentes.

5.4 CONCLUSÕES

Entre todos os inibidores testados na solução de pulsing isoladamente, o sódio azida proporcionou maiores valores de massa fresca, longevidade e números de floretes abertos em strelítzia.

O metabissulfito de sódio, sódio azida e L-cisteína quando aplicados isoladamente, proporcionaram aumento da massa fresca por dois dias, e as taxas de escurecimento nas bases das hastes foram reduzidas.

Menores valores de TRA foram encontrados com a solução de pulsing contendo β -mercaptoetanol.

Maiores longevidade e número de floretes abertos foram encontrados com a combinação de ácido ascórbico + sacarose e sódio azida + sacarose.

De todos os inibidores testados em solução de pulsing, com ou sem sacarose, o sódio azida mostrou ser o mais eficaz e, por isso, muitos estudos acerca dele ainda deverão ser feitos.

A utilização de inibidores enzimáticos em soluções de pulsing sugere que as enzimas peroxidase e/ou polifenoloxidase atuam no bloqueio dos vasos xilemáticos de ave-do-paráíso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J. 1991. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. **International Journal of Food Science and Technology**. 26, 1-20.

Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S. Y.; Oleszek, W. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43, 1132-1137.

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. 2004. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3 ed. Viçosa: UFV. 478 p.

Arslan, O.; Tozlu, I. 1997. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenoloxidase from *Anethum graveolens* L. **Italian Journal of Food Science**. 9, 249-253.

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

Barbosa, J. G.; Medeiros, A. R. S.; Finger, F. L.; Reis, F. P.; Álvares, V. S.; Barbosa, M. S. 2006. Longevidade de inflorescências de lírio, de diferentes estádios de colheita, pré-tratadas com sacarose e tiosulfato de prata (STS). **Ciência Rural**. 36, 99-104.

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

Blee, K. A.; Wheatley, E. R.; Bonham, V. A.; Mitchell, G. P.; Robertson, D.; Slabas, A. R.; Burrell, M. M.; Wojtaszek, P.; Bolwell, G. P. 2001. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. **Planta**. 212, 404-415.

Botella, M. A.; Quesada, M. A.; Medina, M. I.; Pliego, F.; Valpuesta, V. 1994. Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue. **FEBS Letters**. 347, 195-198.

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.

Bucciarelli, B.; Jung, H. G.; Ostry, M. E.; Anderson, N. A.; Vance, C. P. 1998. Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). **Canadian Journal of Botany**. 76, 1282–1289.

Bunya-Atichard, K.; Ketsa, S.; van Doorn, W. G. 2004. Postharvest physiology of *Curcuma alismatifolia* flowers. **Postharvest Biology and Technology**. 34, 219-226.

Carneiro, T. F.; Finger, F. L.; Santos, V. R.; Neves, L. L. M.; Barbosa, J. G. 2002. Influência da sacarose e do corte da base da haste na longevidade de inflorescências de *Zinnia elegans*. **Pequisa Agropecuária Brasileira**. 37, 1065-1070.

Castillo, L.; Alpeeva, I. S.; Chubar, T. A.; Galaev, I.; Csoregi, E.; Sakharov, I. 2002. Purification and substrate of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science**. 163, 1011-1019.

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

Càtsky, J. 1974. Water content. In: Slavik, B. **Methods of study plant water relations**. Berlim: Springer-Verlang, p.121-131.

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.

Davies, F. S.; Munoz, C. E.; Sherman, W. B. 1981. Opening and vase life extension of peach flowers on detached shoots with sucrose and ethanol. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 106, 809–813.

Dębowska, R.; Podstolski, A. 2001. Properties of diphenolase from *Vanilla planifolia* (Andr.). Shoot primordia cultured in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 3432-3437.

Deepa, S. S.; Arumugan, 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.

Duangmal, K.; Apenten, R. K. O. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. 64, 351 – 359.

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.

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

Erat, M.; Sakiroglu, H.; Kufrevioglu, O. I. 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**. 95, 503-508.

Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. 2002. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**. 25, 455-464.

Fernandez, L. G.; Alves, S. **Caracterização de aminoácidos e proteínas**. Disponível em: <<http://saulo.alvesnet.net/ufba/>>. Acesso em 12 de novembro de 2008.

Ferreira, D. F. **Programa Estatístico SISVAR** (Software) Versão 5.0. Lavras: UFLA. 1999-2007.

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.

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

Flurkey, W. H.; Jen, J. J. 1978. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. **Journal of Food Science**. 43, 1828-1831.

Galeazzi, M. A. M.; Sgarbieri, V. C. 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.) **Journal of Food Science**. 46, 1404-1406.

Gauillard, F.; Richard-Forget, F. 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L, cv Williams): activation, purification and some properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 74, 49-56.

Gawlik-Dziki, U.; Szymanowska, U.; Baraniak, B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food Chemistry**. 105, 1047-1053.

Gawlik-Dziki, U.; Zlotek, U.; Świeca, M. 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). **Food Chemistry**. 107, 129-135.

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.

Gómez-López, V. M. 2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**. 77, 163-169.

Guimarães, A. A. 2008. **Manejo pós-colheita de hastes florais de *Heliconia bihai***. 159 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Halevy, A. H.; Kofranek, A. M.; Kubota, J. 1976. Effect of environmental conditions on flowering of *Strelitzia reginae*, Ait. **HortScience**. 11, 584.

Halevy, A. H.; Mayak, S. 1979. Senescence and postharvest physiology of cut flowers Part 1. **Horticultural Reviews**. 1, 224-236.

Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). **Journal of Food Science**. 54, 644-649.

Hansche, P. E.; Boynton, B. 1986. Heritability of enzymatic browning in peaches. **HortScience**. 21, 1195-1197.

Harel, E.; Mayer, A. M. 1968. Interconversion of sub-units of catechol oxidase from apple chloroplasts. **Phytochemistry**. 7, 199-204.

Hastenreiter, F. A.; Vieira, J. G. Z.; Faria, R. T. 2006. Longevidade pós-colheita de flores de *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**. 27, 27-34.

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.

Heimdal, H.; Larsen, M. L.; Poll, L. 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 42, 1428-1433.

Ho, K. 1999. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* 'Christine 130'. **Plant Physiology and Biochemistry**. 37, 841-848.

Intapruk, C.; Yamamoto, K.; Fujiyama, K.; Takano, M.; Shinmyo, A. 1993. Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana* and their organ-specific expression. **Journal of Fermentation Bioengineering**. 75, 166-172.

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

Jin, J.; Shan, N.; Ma, N.; Bai, J.; Gao, J. 2006. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. **Postharvest Biology and Technology**. 40, 236-243.

Kader, F.; Rovel, B.; Girardin, M.; Metche, M. 1997. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial purification and characterisation of blueberry polyphenol oxidase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 73, 513-516.

Kader, R.; Irmoulj, M.; Nicolas, J. P.; Metche, M. 2002. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanism of abthocyanin degradation in blueberry juice. **Journal of Food Science**. 67, 911-915.

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

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

Kumar, V. B. A.; Mohan, T. C. K.; Murugan, K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**. 110, 328-333.

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

Lax, A. R.; Vaughn, K. C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. **Plant Physiology**. 96, 26-31.

Lin, Z.; Chen, L.; Zhang, W. 1996. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties. **Process Biochemistry**. 31, 443-448.

López-Molina, D.; Heering, H. A.; Smulevich, G.; Tudela, J.; Thorneley, R. N. F.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N. 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. **Journal Inorganic Biochemistry**. 94, 243-254.

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

Luh, B. S.; Phithakpol, B. 1972. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. **Journal of Food Science**. 37, 264-268.

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-paráiso (*Strelitzia reginae* Aiton)**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

Martínez, G. A.; Civello, P. M.; Chaves, A. R.; Añón, M. C. 2001. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. **Phytochemistry**. 58, 379-387.

- Martinez, M. V.; Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science & Technology**. 6, 195-200.
- Mayak, S.; Halevy, A. H.; Sagie, S.; Bar-Yosef, A.; Bravdo, R. 1974. The water balance of cut rose flowers. **Plant Physiology**. 32, 15-22.
- Mayak, S. 1987. Senescence of cut flowers. **HortScience**. 22, 863-868.
- Mayer A. M.; Harel E.; 1979. Review. polyphenol oxidase in plants. **Phytochemistry**. 18, 193-215.
- Mayer, A. M.; Harel, E. 1981. Polyphenol oxidase in fruits. Changes during ripening. In: Friend, J. & Rhodes, M. J. C. **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetable**. London: Academic Press, 161-180.
- Mayer, A. M. 1987. Polyphenol oxidases in plantas – recent progress. **Phytochemistry**. 26, 11-20.
- Mayer, A. M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidasas and their significance in fruit and vegetables. In: Fox, P. F. **Food enzymology**. New York: Elsevier, 373-398.
- Mdluli, K. M. 2005. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**. 92, 311-323.
- Menolli, L. N. 2006. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas à injúria por frio**. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Mensink, M. G. J.; van Doorn, W. G. 2001. Small hydrostatic pressures overcome the occlusion by air emboli in cut rose stems. **Journal of Plant Physiology**. 158, 1495-1498.

Moraes, P. J. 1999. **Efeito da refrigeração e do condicionamento em sacarose sobre a conservação pós-colheita de flores de *Strelitzia reginae***. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Murakami, S.; Takahara, H.; Shiraiwa, M. 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. **Phytochemistry**. 68, 777-784.

Nagai, T.; Suzuki, N. 2003. Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). **Journal of Food Science**. 68, 16-20.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2006. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier. 1202 p.

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.

Nkya, E.; Kouno, C.; Li, Y-J.; Yang, C. P.; Hayashi, N.; Fujita, S. 2003. Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 5467-5471.

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

Okey, E. N.; Duncan, J. E.; Sirju Charran, G.; Sreenivasan, T. N. 1997. *Phytophthora* canker resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. **Journal of Phytopathology**. 145, 295-299.

Oktay, M.; Küfrevioglu, I.; Kocaçaliskan, I.; Sakiroglu, H. 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **Journal of Food Science**. 60, 494-496.

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.

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.

Park, E. Y.; Luh, B. S. 1985. Polyphenoloxidases of kiwifruit. **Journal of Food Science**. 50, 678-684.

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

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.

Prabha, T. N.; Patwardhan, M. V. 1982. Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). **Journal of Bioscience**. 4, 69-78.

Prota, G. 1988. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. **Medicinal Research Reviews**. 8, 525-556.

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.

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

Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 40, 2108-2113.

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.

Sakharov, I. Y.; Vesga, M. K.; Galaev, I. Y. Sakharova, I. V. Pletjushkina, O. Y. 2001. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. **Journal of Plant Science**. 161, 853-860.

Saraiva, J. A.; Nunes, C. S.; Coimbra, M. A. 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**. 101, 1571-1579.

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.

Serradell, M. A.; Rozenfeld, P. A.; Martínez, G. A.; Civello, P. M.; Chaves, A. R.; Añón, M. C. 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80, 1421-1427.

Serrano-Martínez, A.; Fortea, M. I.; Amor, F. M.; Núñez-Delicado, E. 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**. 107, 193-199.

Shin, R.; Froderman, T.; Flurkey, W. H. 1997. Isolation e characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. **Phytochemistry**. 45, 15-21.

Smith, C. G.; Rodgers, M. W.; Zimmerlin, A.; Ferdinando, D.; Bolwell, G. P. 1994. Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyls tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**. 192, 155-164.

Spikman, G. 1986. The effect of water stress on ethylene production and ethylene sensitivity of freesia inflorescences. **Acta Horticulturae**. 181, 135-140.

Stringueta, A. C. O.; Lírio, V. S.; Silva, C. A. B.; Reis, B. S.; Aguiar, D. R. D. 2002. Diagnóstico do segmento de produção da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 8, 77-90.

Sun, J.; Shi, J.; Zhao, M.; Xue, S. J.; Ren, J.; Jiang, Y. 2008. A comparative analysis of property of lychee polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. **Food Chemistry**. 108, 818-823.

Suzuki, A.; Leonard, R. T.; Nell, T. A.; Barrett, J. E.; Clark, D. G. 2001. Effects of retail hydration on water uptake and quality of ‘Madame Delbard’ roses after long term transport. **Acta Horticulturae**. 543, 251-256.

Thongsook, T.; Barrett, M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica) peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 3206-3214.

Thyngesen, P. W.; Dry, I. B.; Robinson, S. P. 1995. Polyphenol oxidase in potato: A multigene family that exhibits differential expression patterns. **Plant Physiology**. 109, 525-531.

Trejo-Gonzalez, A.; Soto-Valdez, H. 1991. Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from ‘Anna’ apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 116, 672-675.

Underhill, S. J. R.; Critchley, C. 1995. Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn pericarp. Aust. **Journal Plant Physiology**. 22, 627-632.

Valero, E.; Varón, R.; Garcia-Carmona, F. 1991. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. **Biochememical Journal**. 277, 869-874.

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.; Witte, Y.; Harkema, H. 1995. Effect of high numbers of exogenous bacteria on the water relations and longevity of cut carnations flowers. **Postharvest Biology and Technology**. 6, 111-119.

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

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.; 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.; 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 Huystee, R. B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**. 38, 205-217.

van Ieperen, W.; van Meeteren, U.; Nijssse, J. 2002. Embolism repair in cut flower stems: a physical approach. **Postharvest Biology and Technology**. 25, 1-14.

van Meeteren, U. 1989. Water relations and early leaf wilting of cut chrysanthemums. **Acta Horticulturae**. 261, 129-135.

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

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.

van Meeteren, U.; van Gelder, A.; van Ieperen, W. 2005. Effect of growth conditions on postharvest rehydration ability of cut chrysanthemum flowers. **Acta Horticulturae**. 669, 287-295.

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.

Vaughn, K. C.; Duke. S. O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Plant Physiology**. 60, 106-112.

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

Vianello, A.; Zancani, M.; Nagy, G.; Macrí, F. 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. **Journal Plant Physiology**. 150, 573-577.

Vieira, L. M. 2008. **Conservação pós-colheita de inflorescências de boca-de-leão (*Antirrhinum majus* L.) em relação à condição hídrica das hastes**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

Walker, J. R. L.; McCallion, R. F. 1980. The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases. **Phytochemistry**. 19, 373-377.

Weatherley, P. E. 1950. Studies in water relations of cotton plant. In: The field measurement of water deficits in leaves. **New Phytology**. 49, 81-97.

Williamson, V.; Milburn, J. A. 1995. Cavitation events in cut stems kept in water: implications for cut flower senescence. **Scientia Horticulturae**. 64, 219-232.

Wong, T. C.; Luh, B. S.; Whitaker, J. R. 1971. Isolation and purification of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. **Plant Physiology**. 48, 19-23.

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

Wuyts, N.; Waele, D.; Swennen, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. **Plant Physiology and Biochemistry**. 44, 308-314.

Xu, J.; Zheng, T.; Meguro, S.; Kawachi, S. 2004. Purification and characterization polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). **Journal Wood Science**. 50, 260-265.

Yang, C. P.; Fujita, S.; Kohno, K.; Kusubayashi, A.; Ashafuzzaman, M.; Hayashi, N. 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 1446-1449.

Young, L. M.; Soo, K. S. 1998. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agent. **Phytochemistry**. 49, 23-27.

Zawistowski, J.; Biliaderis, C. G.; Eskin, A. A. M. 1991. Polyphenol oxidase. In: Robinson, D. S. & Eskin, N. A. M. (eds.) **Oxidative Enzymes in Foods**. London & New York: Elsevier Applied Science, p. 217-274.

Zimmermann, M. H.; Brown, C. L. 1977. **Trees structure and function**. Berlin: Springer. 335 p.