

DÉBORA MONIQUE VITOR

**ENZIMAS OXIDATIVAS NA EXPRESSÃO DA INJÚRIA POR FRIO EM  
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CV. GENOVESE EM VASO NA  
SIMULAÇÃO DO TRANSPORTE**

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  
2014

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

T

V845e  
2014

Vitor, Débora Monique, 1986-  
Enzimas oxidativas na expressão da injúria por frio em  
manjeriçõ (*Ocimum basilicum* L.) cv. Genovese em vaso na  
simulação do transporte / Débora Monique Vitor. – Viçosa, MG,  
2014.  
ix, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fernando Luiz Finger.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.66-86.

1. Manjeriçõ - Dano por frio. 2. Enzimas. 3. Peroxidase.  
4. Catalase. 5. Polifenoloxidase. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

DÉBORA MONIQUE VITOR

**ENZIMAS OXIDATIVAS NA EXPRESSÃO DA INJÚRIA POR FRIO EM  
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CV. GENOVESE EM VASO NA  
SIMULAÇÃO DO TRANSPORTE**

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: 4 de dezembro de 2014.

---

Vicente Wagner Dias Casali

---

Eber Antonio Alves Medeiros

---

Fernando Luiz Finger  
(Orientador)

A Felipe, meu esposo,  
que é companheiro e amigo, e que  
participou comigo, pacientemente, de todas  
as etapas desta conquista,  
sempre com amor e generosidade.

## OFEREÇO

A Divino, meu pai, pelo estímulo, força, e  
por me deixar a educação como a maior riqueza  
que se pode dar a um filho, a Marinete, minha  
mãe, pelo amor, e compreensão em todos os momentos,  
a meus irmãos e a meus sobrinhos pelo incentivo.

DEDICO!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que tem me concedido, pela providência e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado, força e sabedoria.

Ao professor Fernando Luiz Finger, meu orientador, pela oportunidade, apoio, ensinamento, confiança e pelo exemplo de dedicação e pela atenção e gentileza com que me tratou.

À Universidade Federal Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização desse curso e ao CNPq pela concessão da bolsa.

À equipe do Laboratório de Pós-colheita e aos colegas do curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pelos momentos divertidos que tornaram o curso mais prazeroso.

À banca examinadora pela disponibilidade, gentileza, paciência e importantes considerações.

À Lucilene, Sarah e Ariana, minhas grandes amigas, pelo carinho da sua amizade, que me ajudaram a suportar os momentos difíceis, por serem tão presente e alegre, tornando mais leve os dias de busca por esse objetivo, pela atenção, prestatividade e ajuda nas análises durante todo o experimento.

Aos funcionários da Horta, vale Agronomia e aos funcionários da Fitotecnia Geraldo, Sebastião, Ribeiro, Quinquim, pela ajuda, disposição durante os experimentos, pelo carinho, agilidade e atenção com que me ajudaram.

Aos meus amigos, Eber, Mariana, Dani, Paula, Rafaela, Silvia, Vanessa e a todos que direta e indiretamente me ajudaram a realizar esse sonho, por me animarem nos momentos difíceis, pelos conselhos, ensinamentos e amizade. Agradeço por terem sido os motivadores da minha vida acadêmica desde a graduação.

**Muito obrigada.**

## **BIOGRAFIA**

Débora Monique Vitor, filha de Divino Daniel Vitor e Marinete Inácio, nasceu no dia 02 de setembro de 1986, em Viçosa-Minas Gerais.

Cursou 2º grau na Escola Estadual Dr. Raimundo Alves Torres em Viçosa, Minas Gerais. Em 2004, no terceiro ano, conquistou uma bolsa de iniciação científica júnior no departamento de Química na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em janeiro de 2012, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa-MG.

Em novembro de 2012, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Pós-colheita, na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa-MG.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. CAPÍTULO 1 - ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO SURGIMENTO DE SINTOMAS DE INJÚRIA POR FRIO E ESCURECIMENTO EM MANJERICÃO cv. GENOVESE EM VASO .....	4
RESUMO .....	4
2.1 INTRODUÇÃO.....	5
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.2.1 Análise visual .....	9
2.2.2 Extravamento de eletrólitos .....	10
2.2.3 Teores de clorofila total.....	11
2.2.4 Análise de evolução de cor .....	11
2.2.5 Atividade da polifenoloxidase .....	12
2.2.6 Atividade da peroxidase .....	12
2.2.7 Atividade da catalase .....	13
2.2.8 Análise Estatística.....	13
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
2.3.1 Análise visual .....	14
2.3.2 Extravasamento de eletrólitos.....	19
2.3.3 Clorofila total.....	21
2.3.4 Análise de evolução de cor .....	23
2.3.5 Atividade da polifenoloxidase .....	28
2.3.6 Atividade da peroxidase .....	31
2.3.7 Atividade da catalase .....	35
2.4 CONCLUSÕES.....	39

3. CAPÍTULO 2 - PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE EM MANJERICÃO cv. GENOVESE .....	40
RESUMO .....	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.2.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase .....	43
3.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase.....	44
3.2.3 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase.....	44
3.2.4 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase .....	44
3.2.5 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH.....	45
3.2.6 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase .....	45
3.2.7 Estabilidade térmica da polifenoloxidase.....	45
3.2.8 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase.....	46
3.2.9 Análise Estatística.....	46
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.3.1 Purificação parcial da polifenoloxidase .....	47
3.3.2 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de manjericão da cv. Genovese .....	48
3.3.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase .....	50
3.3.4 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH.....	52
3.3.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase .....	55
3.3.6 Estabilidade térmica da polifenoloxidase.....	57
3.3.7 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase.....	58
3.4 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CONCLUSÕES GERAIS.....	87

## RESUMO

VITOR, Débora Monique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Enzimas oxidativas na expressão da injúria por frio em manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cv. Genovese em vaso na simulação do transporte.** Orientador: Fernando Luiz Finger

O manjericão possui diversas finalidades como culinários, medicinal, ornamental, cosméticos e possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Manjericão armazenado sob temperaturas baixas podem apresentar sintomas de injúria por frio e escurecimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação das enzimas peroxidase, catalase e polifenoloxidase no surgimento de sintomas e escurecimento provocado por baixas temperaturas causadoras de injúria por frio em manjericão cv. Genovese em vaso e avaliar as condições ótimas para a atividade da polifenol oxidase e possíveis formas de inativá-las. Na verificação do papel da peroxidase, da polifenoloxidase e da catalase no aparecimento de sintomas em manjericão, foi realizado a análise visual das folhas, extravasamento de eletrólitos, teores de clorofilas totais, análise de evolução de cor e a atividade das enzimas oxidativas. Na determinação das condições ótimas de atividade da polifenoloxidase, realizou-se a saturação dos extratos brutos das folhas com quantidades crescentes de sulfato de amônio, entre 20 e 80%. As folhas apresentaram melhor qualidade, com menor escurecimento, quando armazenadas a 10 °C, em relação aquelas a 5 °C. Houve maior extravasamento de eletrólitos em folhas de manjericão refrigeradas a 5 °C coincidindo com o maior grau de injúria por frio e a 10°C não ocorreu essa relação. Os teores de clorofilas totais, os parâmetros de cor a\*, b\* e Chroma foram semelhantes nas folhas refrigeradas a 5 e 10 °C. Houve perda de brilho (L) no segundo dia de avaliação nas folhas mantidas a 5 °C. O aumento da atividade da catalase coincidiu com o aumento dos sintomas de injúria por frio e foi observada relação entre a atividade da polifenoloxidase com o escurecimento do manjericão. Na peroxidase, esta relação, não foi observada. A otimização do ensaio enzimático na polifenoloxidase da folha de manjericão foi conseguida quando o extrato foi saturado de 60 a 80% com sulfato de amônio e a reação processou-se em pH 6,5 a 30 °C. O substrato que proporcionou maior oxidação pela enzima foi o catecol. Inativação da polifenoloxidase ocorreu a partir dos 80 minutos de

pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5 a 25 °C ou após 10 minutos de exposição à 60 °C. Ácido ascórbico, ditioeitol e L-cisteína foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição, seguido pelo tropolone com cerca de 98% de inibição.

## ABSTRACT

VITOR, Débora Monique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2014.  
**Role of oxidative enzymes on chilling injury of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cv. Genovese grown in pots under shipping simulation.** Adviser: Fernando Luiz Finger

Sweet basil has several uses, as condiment, medicinal, ornamental, cosmetics and has antimicrobial and anti oxidant action. Sweet basil stored under low temperatures may develop chilling symptoms and darkening. The goal of this work was to evaluate the role of peroxidase, catalase and polyphenoloxidase on the development of darkening caused by chilling on cv. Genovese stored under low temperature and determine the optimal activity and inactivation of polyphenoloxidase. To evaluate the role of peroxidase, polyphenoloxidase and catalase it was developed visual analysis, ion leakage, chlorophylls, color and enzymes activity. To determine the optimal activity of polyphenoloxidase crude extract was saturated with 20 to 80% ammonium sulfate. Leaves showed better quality, with less darkening, when stored at 10 °C compared to those at 5 °C. There was higher ion leakage in leaves of plants stored at 5 °C, which was coincident with the more intense symptoms of chilling injury, symptom absent at 10 °C. The total chlorophyll and color parameters a\*, b\* and Chrome of leaves were similar in plants stored at 5 or 10 °C. There was lost of brightness (L) at second day of storage at 5 °C. The increase in catalase activity was coincident to the elevation of chilling symptoms and it was determined positive correlation between leaf darkening and polypehnoxidase activity. No relation was observed for peroxidase activity and development of chilling symptoms. Maximal activity of polypehnoxidase was obtained for the farction of 60 to 80% ammonium sulfate saturation, with reaction at pH 6.5 and 30 °C. The best substrate for polyphenoloxidase activity was catechol. Inactivation of polyphenoloxidase occurred after pre incubation in buffer at pH 2.5 at 25 °C or after 10 minutes at 60 °C. Ascorbic acid, dithiothreitol and L-cysteine were the best inhibitors of polyphenoloxidase activity, reaching 100% of inhibition, followed by 98% with tropolone.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.), planta aromática medicinal e ornamental, produz óleo essencial valorizado no mercado internacional pelo teor de linalol. Tem valor culinário popular que se originou na Índia, África e sul da Ásia, sendo cultivada em todo o mundo (PUTIEVSKY e GALAMBOSI, 1999; MAKRI e KINTZIOS, 2007).

O ciclo é anual ou perene, dependendo do local onde é cultivado ou de acordo com as características agronômicas observadas. A planta é arbustiva, atingindo cerca de 60 cm de altura, os caules são quadrangulares e pilosos, com folhas opostas cruzadas, verdes ou roxas, a inflorescência é do tipo glomérulo e hermafrodita de coloração branca (MESSIAS, 2004).

Também denominada de alfavaca, alfavaca-cheirosa, basilico ou manjericão comum, é a espécie da família Lamiaceae mais intensamente cultivada no Brasil. Comercialmente é cultivada em vaso ou em canteiros para utilização de suas folhas verdes e aromáticas, usadas frescas ou secas como aromatizante ou tempero. Os óleos essenciais de plantas aromáticas têm função na atração de agentes polinizadores, de defesa contra herbívoros, além de possuírem propriedades de agentes antimicrobianos e antioxidantes.

As hortaliças, principalmente as folhosas, têm elevada perecibilidade, devido às alterações metabólicas relacionadas com o metabolismo respiratório, deteriorações fisiológica e patológica, biossíntese e ação do etileno, perda de água, e injúria mecânica, que estão diretamente ou indiretamente relacionados com a modificação da temperatura e atmosfera (LANA e FINGER, 2000).

O sucesso da comercialização depende do conhecimento dos fatores que afetam a durabilidade pós-colheita. De acordo com Reid (1991) entre as ferramentas disponíveis na tecnologia pós-colheita, o uso da temperatura controlada é a mais importante, sendo a utilização da baixa temperatura durante o armazenamento a mais conveniente na manutenção da qualidade visual de muitas espécies (NOWAK e RUDNICKI, 1990). Entretanto, Couey (1982) relata que temperaturas abaixo da mínima recomendável podem causar desordens fisiológicas, que se tornam visíveis com o armazenamento prolongado ou após a retirada dos produtos da refrigeração e permanência em condições de temperatura ambiente.

O manjeriço, sendo de origem subtropical, é suscetível a danos por frio durante a baixa temperatura de armazenamento e de transporte. Respostas à injúria por frio são consideradas, na fase inicial, de natureza física, incluindo alterações da permeabilidade das membranas celulares. Posteriormente, ocorrem alterações na taxa respiratória e na síntese de etileno (JACKMAN *et al.*, 1988). Os danos mais prevalentes ocorridos em manjeriço doce exposto a temperaturas abaixo de 12 °C são manchas marrons das áreas internervais da folha seguido do desenvolvimento de necrose preta e abscisão foliar. Outros sintomas visuais que podem ocorrer são a perda de aparência brilhante, murcha e epinastia (AHARONI *et al.*, 1993; CANTWELL e REID, 1993; LANGE e CAMERON, 1994). É importante ressaltar que a severidade dos danos depende da temperatura e da duração de armazenagem. O escurecimento das folhas pode ocorrer em função da ativação das enzimas oxidativas presentes nos tecidos. As enzimas peroxidases e polifenoloxidasas podem estar envolvidas nos processos de escurecimento enzimático de vegetais (LAGRIMINI, 1991; CHAZARRA *et al.*, 1997).

De acordo com o substrato, as polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) podem ser designadas como fenolase, catecolase, cresolase ou difenoloxidase. Catalisam a hidroxilação de monofenóis para orto-difenóis (atividade cresolase) e a oxidação de orto-difenóis (atividade catecolase) para ortoquinonas, que representam o seu principal produto de reação (CHITARRA e CHITARRA, 2005). As reações subsequentes das quinonas levam a acumulação de melanoidina, que é o pigmento causador do escurecimento nos tecidos vegetais (BARBAGALLO, CHISARI, e PATANÉ, 2012).

Normalmente, elas estão contidas dentro de plastídeos e podem ser encontradas no citoplasma celular em condição de senescência ou degeneração dos tecidos vegetais (HAMMER, 1993). A polifenoloxidase (PPO) pode aumentar a atividade da peroxidase (POD) mediada pelo escurecimento (LAMIKANRA, 2002) ou agir de forma independente, também utiliza compostos fenólicos como um substrato, e a sua atividade foi relacionada com sintomas de *chilling* em alguns legumes (BARITAUX *et al.*, 1991; OSE *et al.*, 1995).

O escurecimento como resultado da injúria por frio também pode ser produzido por ação da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7). A peroxidase catalisa reações de escurecimento por meio da geração de peróxido de hidrogênio, utilizando compostos

fenólicos livres ou quinonas, como substratos. Encontra-se no citoplasma (forma solúvel), na parede celular (forma insolúvel), membranas e organelas das células vegetais. Causam mudanças deteriorativas na cor, aroma, sabor e textura das frutas e hortaliças armazenadas em baixas temperaturas (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

O dano pelo *chilling* é muitas vezes acompanhado pela baixa atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase (MACRAE e FERGUSON, 1985; POSMYK *et al.*, 2005). Esse sistema de proteção é capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio, destruindo o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio (ARAÚJO, 2008).

O aparecimento desses danos deprecia a qualidade e resulta em sérias implicações na comercialização e aceitação do produto pelos consumidores. Por esta razão, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas na área de tecnologia pós-colheita de folhosas.

Não foram encontrados na bibliografia consultada trabalhos a respeito da sensibilidade e caracterização da injúria por frio em manjeriço cultivado em vaso na simulação do transporte refrigerado. Por isso, é importante essa caracterização na avaliação dos efeitos da baixa temperatura sobre a perda de qualidade de suas folhas durante e após o tratamento refrigerado.

Na avaliação do grau dos danos provocados pelo armazenamento em baixa temperatura, são necessários estudos fisiológicos que analisem a integridade da membrana celular, o extravasamento de íons e a caracterização bem como a atividade enzimática. Assim, o conhecimento sobre a conservação do manjeriço cultivado em vaso no transporte refrigerado auxiliará a compreender novos procedimentos operacionais que possibilitem a manutenção da qualidade exigida pelo mercado. Desse modo, a caracterização da atividade enzimática *in vitro* é muito importante no desenvolvimento de métodos mais efetivos de controle da expressão pós-transcricional *in vivo*.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a relação da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e catalase e o desenvolvimento de sintomas de injúria por frio em manjeriço cv. Genovese durante o transporte refrigerado simulado e caracterizar parcialmente a enzima polifenoloxidase.

## **2. CAPÍTULO 1 - ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO SURGIMENTO DE SINTOMAS DE INJÚRIA POR FRIO E ESCURECIMENTO EM MANJERICÃO cv. GENOVESE EM VASO**

### **RESUMO**

O manjericão é uma hortaliça de origem tropical, suas folhas devem ser refrigeradas, visando prolongar sua vida pós-colheita. Mas, a temperatura inadequada de armazenamento induz sintomas de injúria por frio e escurecimento das folhas. Este trabalho objetivou avaliar a relação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase com o escurecimento enzimático do manjericão e analisar o envolvimento da catalase com o aparecimento de sintomas de injúria por frio em folhas de manjericão cv. Genovese refrigeradas a 5 e 10 °C e a temperatura ambiente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 x 2), sendo cinco períodos de amostragem e duas temperaturas, com quatro repetições, e a unidade experimental constituída por folhas de manjericão em vaso. Foi feita a análise visual das folhas e determinado o extravasamento de eletrólitos, os teores de clorofilas totais, análise de evolução de cor, a atividade das enzimas catalase, peroxidase e polifenoloxidase. As folhas com melhor aparência durante o período de conservação (4 dias) foram refrigeradas a 10 °C. Nas folhas mantidas a 5 °C houve maior grau de escurecimento relacionando com a atividade da polifenoloxidase. O aumento na atividade da catalase coincidiu com os sintomas de injúria por frio. O período de maior extravasamento de eletrólitos em folhas de manjericão refrigeradas a 5°C coincidiu com o maior grau de injúria por frio e a 10 °C não ocorreu essa relação. Os teores de clorofilas totais, os parâmetros de cor a\*, b\* e Chroma foram semelhantes nas folhas armazenados a 5 e 10 °C. No segundo dia de avaliação houve perda de brilho (L) nas folhas mantidas a 5 °C. Quanto à peroxidase, esta relação, não foi observada. Nas folhas de manjericão refrigeradas a 10 °C não foi detectada nenhuma relação com os sintomas de injúria por frio e escurecimento.

## 2.1 INTRODUÇÃO

*Ocimum basilicum* L., também conhecido como manjeriço comum, alfavaca, alfavaca-cheirosa ou basílico, é a espécie de maior importância da família *Lamiaceae*. As plantas ocorrem naturalmente na América tropical, Ásia e África (PATON *et al.*, 1999). O manjeriço possui diversas finalidades, pode ser utilizados para fins culinários, farmacêuticos, ornamental, aromático, cosméticos, bem como possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

A grande importância econômica dessa cultura é devida principalmente a extração do seu óleo essencial, que pode ter função medicinal agindo nas vias respiratórias, nas infecções bacterianas e parasitas intestinais, além de melhorar a digestão dos alimentos, utilizado na indústria de cosméticos como perfumes, xampus e sabonetes (BLANK *et al.*, 2004).

As ervas aromáticas frescas ou processadas está cada vez mais populares, expandindo sua produção para atender a procura crescente. Entretanto, a qualidade tem sido grande problema comercial, principalmente, pela sensibilidade ao frio durante o armazenamento de algumas ervas aromáticas como o manjeriço.

O sucesso da comercialização desse produto depende do conhecimento sobre a durabilidade pós-colheita do manjeriço. De acordo com Reid (1991) entre os procedimentos disponíveis na tecnologia pós-colheita, a temperatura controlada é a mais importante, sendo a utilização da baixa temperatura durante o armazenamento a mais conveniente na manutenção da qualidade visual de muitas espécies (NOWAK e RUDNICKI, 1990).

O manjeriço por ser de origem subtropical é suscetível a danos por frio por baixas temperaturas durante o crescimento, transporte e armazenamento. As injúrias ou distúrbios causados pelo frio são denominados de injúria “*chilling*”. A injúria “*chilling*” é o dano fisiológico induzido nos tecidos quando expostos a temperaturas baixas, acima do ponto de congelamento. Os danos mais prevalentes ocorridos em manjeriço exposto a temperaturas abaixo de 12 °C são manchas marrons das áreas internervais da folha, seguido do desenvolvimento de necrose preta e abscisão foliar.

A evolução da injúria por frio é dependente de fatores do ambiente e inerente ao tecido (RAISON e ORR, 1990). Os indicadores visuais da presença de injúria por frio são: pontuações (depressões), manchas de cor marrom/preta, descoloração, amarelecimento e amolecimento dos tecidos. Os sintomas visuais causados pela injúria por frio, geralmente, aumentam significativamente após a transferência de frutos e hortaliças aos ambientes com temperaturas mais elevadas, comparadas aquelas que originalmente são observadas durante o desenvolvimento dos sintomas (MORRIS, 1982).

Cantwell e Reid (1994) relatam que a embalagem de PVC (Policloreto de vinila) e a temperatura de 10 °C amplia o período de comercialização do produto, uma vez que o manjericão é altamente perecível e sua durabilidade é inferior aos três dias quando armazenados à temperatura ambiente. Por outro lado, Lange e Cameron (1997) encontraram apenas quatro dias de prazo de validade, quando as folhas de manjericão foram mantidos a 5 °C, devido a lesão pelo frio.

O aparecimento desses danos deprecia a qualidade e resulta em sérias implicações na comercialização e aceitação do produto pelos consumidores. Por esta razão, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas na área de manejo pós-colheita adequado. Sendo assim, é importante a caracterização dos sintomas de injúria por frio em manjericão, para avaliar os efeitos da baixa temperatura sobre a perda de qualidade de suas folhas durante e após a refrigeração.

As folhas de manjericão são extremamente sensíveis a baixas temperaturas. De acordo com Lange e Cameron (1994), a vida útil de folhas de manjericão foi reduzida quando refrigeradas a 10 °C em relação ao armazenamento a 15 °C. Em 10 °C, nas folhas mais jovens surgiram sintomas de injúria por frio, tornando-se necróticas. A intensidade dos danos causados pelo estresse, agravaram com a redução da temperatura, sendo que à 5 °C ocorreu a perda de 75% do material avaliado em apenas 3 dias, e quando refrigeradas a 0 °C os sintomas pela injúria por frio foram mais graves, com a maioria do tecido apresentando escurecimento.

O dano às membranas provavelmente é o evento inicial no desenvolvimento das injúrias de frio e os sintomas decorrem da geração de espécies reativas de oxigênio

(EROS) em níveis acima da capacidade de remoção pelas enzimas antioxidantes presentes nos tecidos. Se o tecido, órgão ou a planta inteira é exposto a temperaturas prejudiciais por longo período de tempo, em seguida rompe as membranas celulares causando vazamento de íons e metabólitos, os quais pode ser monitorado por determinação de extravasamento de eletrólitos (SHAROM *et al.*, 1994).

A perda de grande parte da produção de frutas e hortaliças pode ser atribuída à ação de enzimas na fase de pós-colheita (LAURENTE e CLEMENTE, 2005). É sabido que o escurecimento está relacionado à ação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, porque as respectivas atividades são aumentadas com o desenvolvimento da injúria pelo frio. O escurecimento enzimático ou descoloração em tecidos vegetais pode causar mudanças indesejáveis na qualidade durante o manuseio, processamento e armazenamento.

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é encontrada em todos os organismos aeróbicos e, em plantas superiores, é uma das principais enzimas responsáveis pela defesa contra estresse oxidativo. A catalase (CAT) é responsável pela inativação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante a conversão do glicolato a glioxalato que ocorre durante a fotorrespiração, onde o peróxido é convertido pela enzima a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (IGAMBERDIEV e LEA, 2002). A enzima é preferencialmente encontrada nos peroxissomos, mas também podem estar presente em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON *et al.*, 2006), os cloroplastos não possuem a enzima (ASADA, 1999).

A descoloração pode ser oriunda de reações catalisadas pela enzima genericamente conhecida como peroxidase (VAMOS-VIGYAZO, 1981; NICOLI *et al.*, 1991 e ARAÚJO, 2001). As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas pertencentes ao grupo das oxirredutases e são encontradas em múltiplas formas moleculares e estão presentes na maioria das frutas e legumes na forma solúvel e acoplada (forma iônica e covalente) onde propriedades catalíticas são influenciadas pela cultivar, crescimento e fases fisiológicas (NEVES, 2002). A peroxidase (POD) é encontrada na forma solúvel e iônica ligada à parede das células (CLEMENTE, 1998).

A POD está envolvida com inúmeros processos fisiológicos na planta, principalmente o desenvolvimento e amadurecimento. Destacam-se a atividade

catalítica na redução do  $H_2O_2$  e doação de elétrons a várias moléculas como compostos fenólicos, precursores de lignina, auxina e outros compostos do metabolismo secundário e na prevenção biológica dos ataques de patógenos e a herbivoria (PASSARDI *et al.*, 2005). A peroxidase (POD) é considerada uma enzima de estresse estimulada por baixas temperaturas, em espécies sensíveis ao frio (EL-HILARI *et al.*, 2003; KUK *et al.*, 2003). Nessas condições, há aumento desordenado na taxa respiratória causando formação de espécies reativas de oxigênio, a enzima aumenta a atividade para reduzir os danos causados por essas espécies reativas de oxigênio, removendo átomos de hidrogênio dos grupos alcoois, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água protegendo, assim, os tecidos (SALISBURY e ROSS, 1991).

A PPO é apontada como importante enzima de defesa vegetal e também está relacionada ao escurecimento em frutas e hortaliças quando ocorre algum tipo de estresse ou injúria. Em danos nos tecidos causados por injúrias mecânicas, ataque de herbívoros e insetos e infecção por patógenos, a compartimentalização é perdida e a PPO de plastídeos reage com os substratos fenólicos do vacúolo, levando a formação das quinonas e como consequência o escurecimento indesejável. Os tecidos impregnados com os polímeros atuam como barreiras das infecções formando a defesa contra a penetração de micro-organismos ou retardando sua proliferação (KOSUGE, 1969; MAYER e HAREL, 1979; VAUGHN *et al.*, 1988). Porém, tais substâncias conferem muitas vezes características comerciais e nutricionais indesejáveis aos produtos vegetais.

Na avaliação é feita caracterização dos sintomas de injúria por frio, a partir da qualidade visual e das respostas fisiológicas, tais como: intensidade de clorofila, teor de extravazamento de eletrólitos e as atividades de enzimas antioxidantes (CAT, POD e PPO).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a relação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase com o escurecimento enzimático e o envolvimento da catalase com o aparecimento de sintomas de injúria por frio em folhas de manjeriço cv. comercial Genovese crescido em vaso.

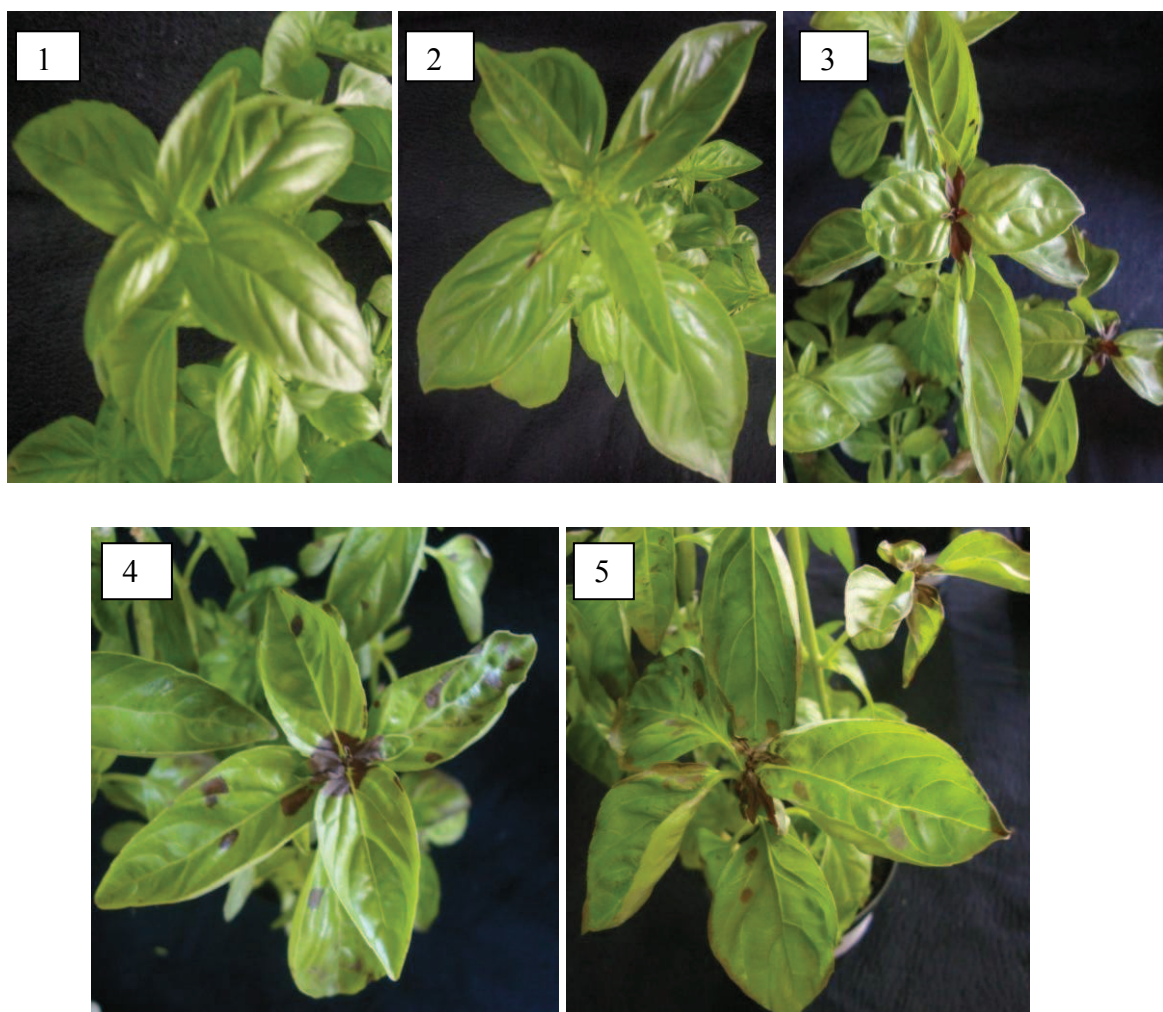
## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Sementes de manjeriço cv. Genovese foram semeadas diretamente em vaso, volume de 3 litros, contendo substrato comercial, na casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa (UFV), entre os meses de maio e junho de 2013. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da UFV, 2-3 meses após a semeadura, no mês de agosto de 2013.

As plantas de manjeriço cultivadas em vaso foram transferidas da casa de vegetação ao laboratório onde foram selecionadas e padronizadas. Os vasos foram armazenados por quatro dias para o experimento um em câmaras com refrigeração a 5 °C e a temperatura ambiente e no experimento dois com refrigeração a 10 °C e a temperatura ambiente. O processo de injúria por frio foi quantificado diariamente, na simulação do tempo de duração médio do transporte refrigerado, no escuro. Após a refrigeração as plantas foram retiradas da câmara fria e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois do armazenamento. Amostras de folhas de manjeriço foram retiradas diariamente até o quarto dia, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas, posteriormente foi feita a análise da atividade enzimática.

### **2.2.1 Análise visual**

A análise visual foi realizada diariamente em folhas durante todo o período de armazenamento. O grau de escurecimento das folhas foi avaliado de acordo com o índice de cinco níveis: 1- 0% das folhas mostrando danos, todas as folhas são livres de sintomas; 2- 1 a 5% das folhas mostram danos; 3- 5 a 20% das folhas mostrando danos; 4- 20 a 75% das folhas mostram danos; 5- > 75% das folhas mostrando danos. A percentagem do grau de escurecimento foi em relação ao número total de folhas para cada vaso. Até o valor de índice de 2,5, o produto foi considerado de qualidade comercial, enquanto acima deste nível significava invendável (AHARONI *et al.*, 2010).



**Figura 1** – Escala visual de avaliação do escurecimento em folhas de manjericão cv. Genovese em vaso armazenados em baixa temperatura, com notas de 1 a 5: 1- 0% das folhas mostrando danos, todas as folhas são livres de sintomas; 2- 1 a 5% das folhas mostram danos; 3- 5 a 20% das folhas mostrando danos; 4- 20 a 75% das folhas mostram danos; 5- > 75% das folhas mostrando danos.

### 2.2.2 Extravamento de eletrólitos

O extravazamento de eletrólitos das folhas foi determinado segundo o método descrito por Whitlow *et al.* (1992). Foram retirados discos de 6 mm de diâmetro de folhas com a massa 0,2 g. Os discos foram lavados com água destilada e colocados em frascos de plástico de 50 mL. Os frascos foram colocados em banho de água a 25 °C sob agitação, por duas horas. Após esse período, foi mensurada a condutividade inicial. Em seguida, estes ficaram a -20 °C durante 24 horas. Após o período de congelamento,

foram colocados em banho de água em ebulição durante 25 minutos, sendo colocados novamente em agitação a 25 °C, até a estabilização da temperatura e mensurada a condutividade total. O extravasamento de eletrólitos foi calculado em porcentagem de eletrólitos extravasados no início em relação ao total, após o descongelamento das amostras.

### 2.2.3 Teores de clorofila total

Os teores de clorofilas foram determinados utilizando cinco discos da folha de manjeriço, com três milímetros de espessura e seis milímetros de diâmetro. Os discos foram pesados e colocados em tubos contendo 10 mL de N,N-Dimetilformamida, com refrigeração a 4 °C, no escuro. Após, 10 dias, procedeu a filtragem do solvente e a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 647 e 664,5 nm em espectrofotômetro (INSKEEP e BLOM, 1985).

### 2.2.4 Análise de evolução de cor

A evolução de cor da superfície das folhas foi mensurado de acordo com o método usado por Palou *et al.*(1999), diariamente, com o auxílio do colorímetro (Color Reader CR-10, Minolta) calibrado com a cor branca. As leituras foram realizadas após acoplar o sensor do aparelho à superfície das folhas sendo que *a* indica cromaticidade no eixo da cor verde (-) para vermelha (+); *b* indica a cromaticidade no eixo da cor azul (-) para amarela (+); *L* indica a luminosidade e *c* indica a intensidade ou saturação de cor, com os dados das leituras foi estimada a descoloração dos tecidos, de acordo com a equação 1.

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2} \longrightarrow \text{(eq.1)}$$

Onde, C= Chroma

### **2.2.5 Atividade da polifenoloxidase**

Na obtenção do extrato enzimático, 5 g de material vegetal foi homogeneizado em 25 mL de tampão de extração. A composição do tampão de extração foi: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Polivinilpirrolidona (PVP) + 1% Triton X-100 + 10 mM ácido ascórbico. Após isso, o homogeneizado foi centrifugado a 17.000 g durante 30 minutos, a 4 °C. Na determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de 10 mM de catecol e 0,5 mL de tampão fosfato a 0,1 M (pH 6,5) completando o volume total da 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 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 e AYDEMIR, 2001).

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando soro albumina bovino (BSA) como padrão.

### **2.2.6 Atividade da peroxidase**

Na extração da peroxidase, 5 g de material vegetal foram homogeneizados em 25 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 a 17.000 g por 30 minutos, a 4 °C.

Na 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%). 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 470 nm, a 25 °C, e expressa em UA/min/mg de proteína (NEVES, 2003).

O mesmo extrato utilizado na determinação da atividade enzimática foi utilizado na quantificação da proteína pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sorobovina (BSA) como padrão.

### **2.2.7 Atividade da catalase**

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método de Kar e Mishra (1976), com algumas modificações. Foi pesado 1 g de folhas frescas e homogeneizadas em 10 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) e a suspensão resultante foi centrifugada a 14000 g, a 5 °C, por 30 minutos. A mistura de reação foi incubada em banho maria a 25 °C por 5 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual foi titulado com KMnO<sub>4</sub> (0,01 M) até a coloração púrpura fraca persistir. A atividade da catalase foi expressa em  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de MF.

### **2.2.8 Análise Estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 x 2), sendo cinco períodos de amostragem e duas temperaturas, com quatro repetições, e a unidade experimental constituída por folhas de manjerição em vaso. Os dados foram analisados por meio de testes de média Tukey, usando-se o programa SAEG 9.1 – Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 2007). Os resultados da análise visual das folhas e das atividades enzimáticas foram avaliados utilizando-se estatística descritiva.

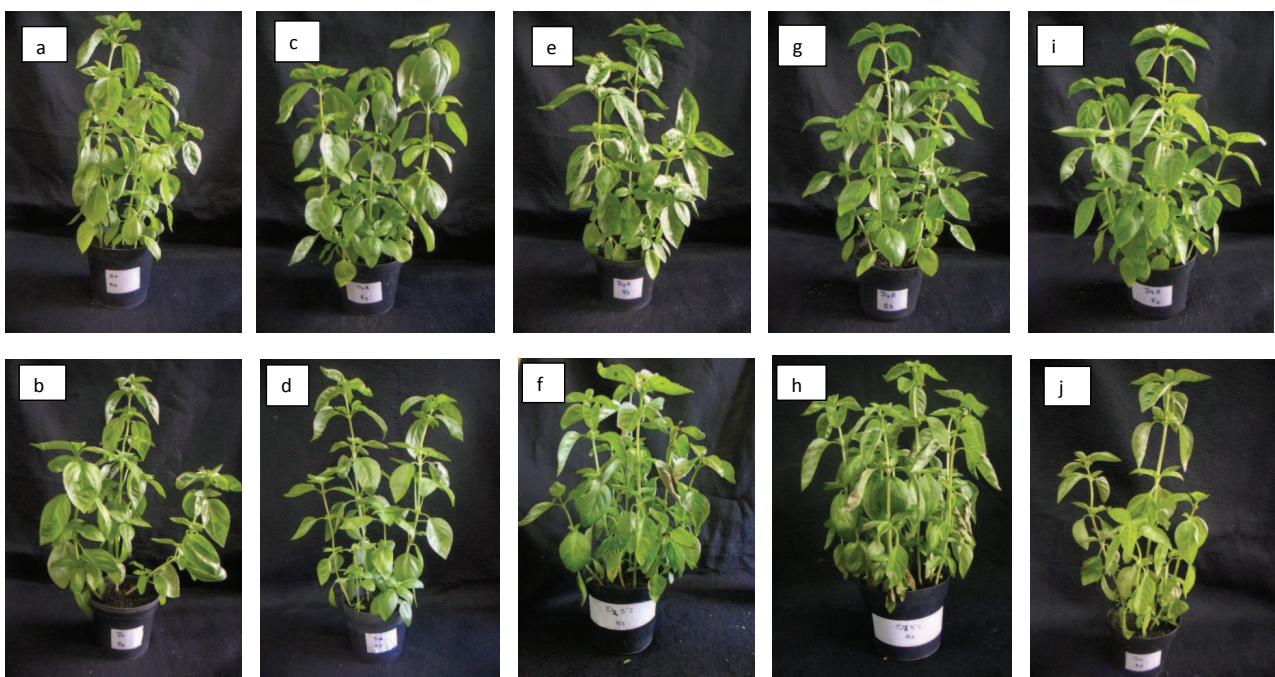
## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Análise visual

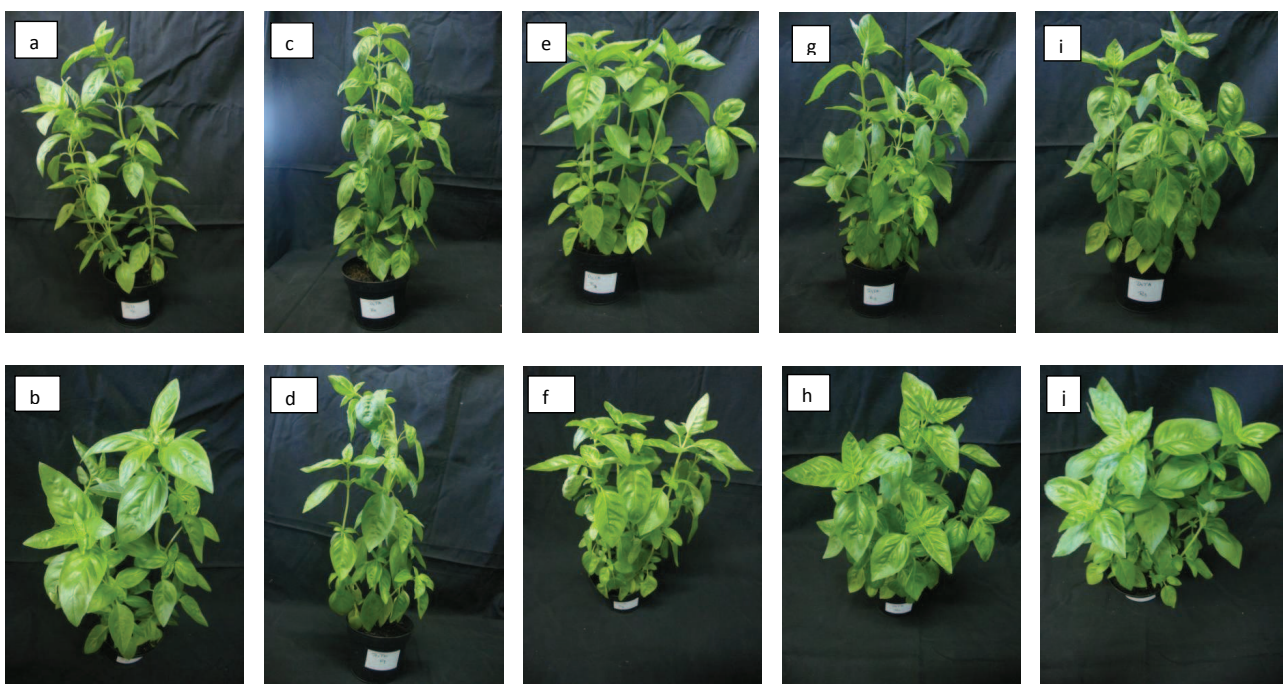
Neste estudo, o uso da refrigeração influenciou negativamente a aparência das folhas de manjericão cv. Genovese, em vaso, analisadas após 2 horas a 25 °C depois do armazenamento por quatro dias a 5 °C (Figura 2). A injúria por frio se manifestou em 90% dos casos, quando os vasos ainda estavam a 5 °C. Portanto, nestes vasos, o armazenamento à temperatura ambiente, após a refrigeração, não induziu aparecimento de novas manchas na maioria das folhas.

Quando avaliados durante todo o período de armazenamento com refrigeração nas folhas de manjericão havia manchas escuras, murcha e encarquilhamento (Figura 2), que resultaria na rejeição do consumidor. Já naquelas mantidas a temperatura ambiente teve boa aparência das folhas de manjericão durante todo o período de análise (Figura 2). Porém, ambos os tratamentos mantiveram odor e sabor característicos das folhas de manjericão cv. Genovese, em vaso, embora não mantivessem características visualmente ideais para a comercialização.

Segundo Aharoni *et al.* (2010) os danos mais comuns em manjericão armazenado em temperaturas abaixo de 12 °C são manchas marrons das áreas internervais da folha seguido pelo desenvolvimento de necrose preta e abscisão foliar. Alguns outros sintomas visuais que podem ocorrer são a perda de aparência brilhante, murcha e epinastia (AHARONI *et al.*, 1993; CANTWELL e REID, 1993; LANGE e CAMERON, 1994), porém a severidade dos danos depende da temperatura e da duração de armazenagem.



**Figura 2-** Aparência das folhas de manjeriço, da cv. Genovese, em vasos durante os dias 0 (a, b), 1 (c,d), 2 (e,f), 3 (g,h) e 4 (i,j), após duas horas a 25 °C depois do armazenamento sem refrigeração (T1) e a 5 °C (T2), respectivamente.



**Figura 3-** Aparência das folhas de manjeriço, da cv. Genovese, em vasos durante os dias 0 (a, b), 1 (c,d), 2 (e,f), 3 (g,h) e 4 (i,j), após duas horas a 25 °C depois do armazenamento sem refrigeração (T1) e a 10 °C (T2), respectivamente.

O uso da refrigeração influenciou positivamente a aparência das folhas de manjeriço na simulação do transporte refrigerado a 10 °C. Quando avaliados, durante todos os dias de armazenamento, as folhas de manjeriço cv. Genovese em vasos mantidos sem refrigeração e a 10 °C apresentaram com boa aparência, hidratados e sem nenhum sinal de escurecimento (Figura 3) preservando a qualidade pós-colheita durante o armazenamento por quatro dias.

Considerando as plantas no primeiro dia de armazenamento a 5 °C as folhas de manjeriço tiveram o menor índice de escurecimento da escala, com os sintomas iniciais como pequenas áreas com manchas escuras, enquanto que as folhas mantidas sem refrigeração estavam sem sintoma. Nos dias dois e três as folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C apresentaram a maioria das folhas com danos, assim atingiram o estágio 4 de escurecimento visual, no outro tratamento nenhuma proporção de escurecimento foi atingida (Quadro 1).

Os resultados do presente estudo confirmam resultados anteriores (CANTWELL e REID, 1993; MEIR *et al*, 1995), mostrando que 4 °C é a temperatura que induz danos graves de refrigeração em folhas de manjeriço após 2 dias de armazenamento. Ao contrário do resultado deste trabalho, Joyce *et al*. (1986) sugeriram que o armazenamento a 5 °C até 7 °C era ótima no armazenamento a longo prazo de manjeriço.

**Quadro 1-** Nota da avaliação do escurecimento em folhas de manjeriço da cv. Genovese, em vaso, submetidos a 25 °C por 2 horas após o armazenamento por 0, 1, 2, 3 e 4 dias, sem refrigeração e a 5 °C.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	1	2	3	4
Temperatura ambiente	1	1	1	1	1
5°C	1	2	4	4	3,5

Nas folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso mantidas a temperatura ambiente e a 10 °C não foram observados os sintomas de injúria por frio, assim nenhuma proporção de escurecimento foi atingida (Quadro 2). O grau da injúria por frio da planta, ou seus órgãos, é variável em função da temperatura, da duração da exposição e da sensibilidade de cada espécie (KAYS, 1991). Wongsheree *et al.* (2009) observaram o escurecimento visível em folhas de manjeriço limão a 4 °C, ao passo que o armazenamento a 12 °C resultou em sintomas leves em folhas maduras ou nenhum sintoma em folhas jovens. Em folhas maduras o escurecimento visível foi encontrado 12 horas após o armazenamento a 4 °C, e em seguida, foi aumentado rapidamente, já neste trabalho houve início do escurecimento visível após o primeiro dia de armazenamento dos vasos de manjeriço cv. Genovese a 5 °C e nenhum sintoma quando as plantas foram mantidas a 10 °C.

**Quadro 2-** Nota da avaliação do escurecimento em folhas de manjeriço da cv. Genovese, em vaso, submetidos a 25 °C por 2 horas após o armazenamento por 0, 1, 2, 3 e 4 dias, sem refrigeração e a 10 °C.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	1	2	3	4
Temperatura ambiente	1	1	1	1	1
10°C	1	1	1	1	1

Cantwell e Reid (1994) avaliaram a fisiologia pós-colheita de ervas frescas de manjeriço armazenados a 0 °C, 10 °C e 20 °C, observaram que o manjeriço teve melhor aparência a 10 °C e recebeu nota 8, que significa boa qualidade. No entanto, recebeu nota 2 quando conservadas a 0 °C porque estava danificado pelo frio, e a 20 °C, recebeu nota 7, o que significa boa qualidade, mas menor durabilidade. Estes resultados coincidem com o estudo em questão, pois a 10 °C as plantas de manjeriço cv. Genovese apresentaram menor nota e a 5 °C houve injúria pelo frio.

Na comparação dos efeitos do armazenamento a 5 e a 10 °C na cv. Genovese em vaso houve melhor aparência visual nas folhas de manjeriço refrigeradas a 10 °C, o que permitiria o transporte eficiente a longas distâncias ou pode permitir o aumento do tempo entre a colheita e os procedimentos de preparo e a comercialização.

### 2.3.2 Extravasamento de eletrólitos

Os resultados do extravasamento de eletrólitos em folhas de manjeriço armazenadas a temperatura ambiente e refrigeradas a 5 °C mostram que houve interação significativa (Tabela 1). Houve maior taxa de extravasamento nas plantas mantidas a temperatura ambiente no dia dois (Tabela 1). Isso indica que mesmo aquelas folhas dos vasos que foram armazenados a temperatura mais elevada foram ligeiramente danificadas.

**TABELA 1** – Variação média da estimativa do teor de extravasamento de eletrólitos de folhas de manjeriço cv. Genovese, em vaso, após 2 horas a 25 °C após o armazenamento por 0, 1, 2, 3 e 4 dias, a temperatura ambiente e a 5 °C. Viçosa – Minas Gerais, 2014.

Tempo de Armazenamento (dias)	Tratamentos	
	Temperatura ambiente	5°C
0	18,30 bA	18,30 aA
1	14,18 bA	15,61 aA
2	47,87 aA	18,48 aB
3	27,71 bA	21,90 aA
4	16,06 bA	18,76 aA

Letras minúsculas na mesma coluna comparam médias de tratamento para cada dia. Letras maiúsculas na linha comparam médias de dia para cada tratamento. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferiram em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dias onde ocorreu o maior extravasamento de eletrólitos em folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C coincidiram com o maior grau de injúria por frio. Este fato pode ser explicado segundo Larcher (2006) e Paiva e Oliveira, (2006), no qual a injúria por frio é desenvolvida progressivamente tendo como primeiro efeito, a interrupção do fluxo protoplasmático, seguido da redução da atividade fotossintética e por fim da perda da semipermeabilidade das membranas, comprometendo os

compartimentos celulares e culminando no extravasamento de suco celular nos espaços intercelulares.

Nas folhas refrigeradas a 5 °C, a taxa de extravasamento de eletrólitos aumentou em 19,7% no dia três em relação ao dia zero e de 51,4% nas folhas armazenadas sem refrigeração (Tabela 1). Efeito semelhante foi observado por Aharoni (1994) em folhas de manjeriço armazenadas e não embaladas, a 4 °C e 80-85% de umidade relativa, que também observou aumento no escurecimento das folhas e extravasamento de íons dentro de dois dias.

O extravasamento de eletrólitos é um dos marcadores fisiológicos, bem conhecidos pela perda da semi-permeabilidade da membrana, é amplamente utilizado por pesquisadores ao avaliar indiretamente a integridade da membrana celular (SHAROM *et al*, 1994). Pela aplicação destas abordagens metodológicas na avaliação da integridade da membrana celular, é possível avaliar o impacto da injúria por frio em frutas e hortaliças com muita precisão (SHEWFELT e PURVIS, 1995).

Em baixas temperaturas ocorrem mudanças físicas dos lipídios saturados das membranas, que pode explicar o escurecimento em manjeriço. As moléculas lipídicas passam do estado gel para o estado gel cristalino, permitindo oxidações enzimáticas, sendo essa mudança lipídica uma resposta primária dos tecidos sensíveis ao frio. Dentre as espécies de vegetais com esse tipo de tecido, está o manjeriço. Essa resposta pode resultar em alterações do metabolismo, como, extravasamento de íons, perda da atividade mitocondrial, alterações na produção de etileno, nos sistemas enzimáticos associados à membrana, e acúmulo de metabólitos tóxicos como etanol e acetaldeído (RIBEIRO, 2003).

Em cultivares de ameixa, no armazenamento de curto período de tempo, Candan *et al*. (2008) observaram a relação positiva entre a intensidade de extravasamento de íons e a incidência de injúria por frio. O extravasamento de íons em *Heliotropium arborescens* e *Lantana camara* aumentou gradualmente quando foram armazenadas em temperaturas entre 6 e 2 °C. Em *Lantana*, esse aumento foi proporcional ao aumento da injúria por frio (FRIEDMAN e ROT, 2006), igualmente como nos resultados obtidos neste estudo com plantas de manjeriço mantidas em refrigeração a 5 °C.

Não houve interação significativa entre os tratamentos e o tempo de armazenamento no extravasamento de eletrólitos das folhas de manjeriço cv. Genovese, em vaso, refrigeradas a 10 °C ou mantidas a temperatura ambiente.

No segundo dia de amostragem, houve acréscimo de 34% nas folhas de manjeriço a temperatura ambiente (28,93) em relação ao extravasamento de eletrólitos das folhas refrigeradas a 10 °C (19,11). Efeitos semelhantes foram observados em ramos de manjeriço, porém quando submetidos a 5 °C, durante cinco dias, houve o aumento do extravasamento de eletrólitos, ainda que esse extravasamento não estivesse associado ao aparecimento dos sintomas visuais de injúria por frio (MESSIAS, 2006).

O período de armazenamento e a temperatura de 5 °C influenciaram na alteração da permeabilidade da membrana e em consequência no extravasamento de eletrólitos, que foram respostas fisiológicas evidenciadas pela visualização dos sintomas de injúria por frio. Resultado semelhante foi observado por Larcher (2006) o qual foi observado quanto menor for a temperatura e maior for a duração do tempo de exposição, maior é a extensão da injúria.

### **2.3.3 Clorofila total**

Não houve interação significativa entre os tratamentos e o tempo de armazenamento nos teores de clorofila total das folhas de manjeriço cv. Genovese, em vaso, analisadas após 2 horas a 25°C depois do armazenamento por quatro dias em refrigeração ou mantidas a temperatura ambiente, e não ocorreu diferença entre as médias dos vasos dos tratamentos em cada dia e nem dos dias em cada tratamento.

Durante a avaliação do experimento, não foram observadas alterações visíveis na cor verde das folhas dentro de cada tratamento, nem durante os primeiros dias e nem durante o restante do tempo de armazenamento. Provavelmente, os tratamentos a baixa temperatura não influenciaram os teores de clorofila das amostras, mesmo sendo temperaturas causadoras de injúria por frio.

Nestes tratamentos, o teor de clorofila total foi maior no primeiro ( $9,48\pm 0,09$ ) e no segundo dia de avaliação ( $11,54\pm 0,16$ ) nas folhas mantidas a temperatura ambiente e a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Nas plantas refrigeradas a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  o teor de clorofila foi máximo no quarto dia ( $13,19\pm 1,04$ ) de análise. Segundo Yamauchi e Watada (1991) a degradação da clorofila indica a condição fisiológica dos tecidos de órgãos verdes. Provavelmente ocorreu menor tendência de degradação de clorofila nas folhas de manjeriço nesses dias de armazenamento.

Apesar de não ter sido feita a comparação entre as médias das folhas do manjeriço da cv. Genovese em vaso refrigeradas a  $5$  e a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , os valores foram semelhantes, indicando que as temperaturas causadoras de “*chilling*” parecem não alterar a quantidade de clorofilas totais presentes nas folhas. Estes resultados comprovam os de Della-justina (1998) que não encontrou diferenças nos teores de clorofilas em quiabos da cultivar Amarelinho, armazenados nestas duas temperaturas.

O teor de clorofila é usado ao avaliar o avanço do processo de senescência e conservação pós-colheita (CANTWELL e REID, 1994; PHILOSOPH-HADAS *et al.*, 1994; MEIR *et al.*, 1997). Assim como o presente estudo a análise de clorofila foi utilizada por MEIR *et al.* (1997) na quantificação da susceptibilidade das folhas à injúria por frio, variando a temperatura e o tempo de armazenamento em cultivares de manjeriço. Diversos autores observaram, no entanto, que durante o tempo de armazenamento houve perda de clorofila em consequência do processo de senescência dos tecidos vegetais, efeito semelhante aos resultados das plantas de manjeriço cv. Genovese, pois não houve degradação da clorofila relacionada ao processo de “*chilling*” (PHILOSOPH-HADAS *et al.*, 1994; HEATON e MARANGONI, 1996).

A baixa temperatura impediu a degradação de clorofila resultando em folhas verdes ao final do armazenamento. De acordo com Park *et al.* (1999) a temperatura é o fator crítico principal da taxa de degradação da clorofila em hortaliças folhosas. Dessa forma, se o objetivo é manter a qualidade com aumento da vida útil, é indispensável à manutenção do produto em baixa temperatura, já que a coloração implica na aceitabilidade ao consumidor.

### **2.3.4 Análise de evolução de cor**

#### **2.3.4.1 Parâmetro de cor a\***

Quanto ao parâmetro de cor a\* das folhas de manjeriço mantidas a temperatura ambiente e refrigerada, durante os quatro dias de armazenamento a interação não foi significativa, e não ocorreu diferença entre as médias das folhas de manjeriço em vaso dos tratamentos em cada dia e nem dos dias em cada tratamento. Assim, as folhas de manjeriço mantiveram a coloração verde durante todo o período de avaliação.

No primeiro dia de análise as folhas de manjeriço apresentaram maior valor negativo do parâmetro de cor a\* ( $-10,13 \pm 0,54$ ) quando comparado aos demais dias de armazenamento, tanto nas plantas refrigeradas a 5 °C quanto nas plantas mantidas sem refrigeração, indicando a tendência na diminuição da intensidade de cor verde nessas folhas com o decorrer do tempo. Houve maior cor verde nas folhas a temperatura ambiente ( $-10,29 \pm 0,49$ ) e as mantidas a 10 °C ( $-10,04 \pm 0,60$ ) nos dias três e quatro, respectivamente. Provavelmente o transporte refrigerado a 10 °C pode ser satisfatório na manutenção da intensidade da cor verde em folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso.

Nos dias dois ( $-9,23 \pm 0,83$ ) e três ( $-9,29 \pm 0,47$ ), as folhas de manjeriço armazenadas sem refrigeração apresentaram maior tonalidade verde quando comparado ao dia um ( $-8,97 \pm 0,43$ ) e quatro ( $-6,68 \pm 0,59$ ), os quais apresentaram menor valor. Já as folhas refrigeradas a 5 °C mantiveram a pigmentação verde durante o período de armazenamento, conforme indicado pelo acréscimo nos valores negativos do parâmetro de cor a\* do terceiro ( $-8,44 \pm 0,53$ ) para o quarto dia de armazenamento ( $-8,81 \pm 0,58$ ).

Nos vasos mantidos a temperatura ambiente houve menor valor negativo do parâmetro de cor a\* no último dia de amostragem ( $-6,68 \pm 0,59$ ), enquanto que no dia dois ( $-5,49 \pm 0,98$ ) de armazenamento foram as folhas dos vasos refrigeradas a 5 °C. No entanto, nos vasos mantidos sem refrigeração e com refrigeração a 10 °C observou-se em suas folhas menor valor negativo da variável a\* no primeiro dia de amostragem ( $-8,81 \pm 1,05$ ). Possivelmente, houve tendência de menor coloração verde nas folhas nesse dia.

O processo de alteração da cor verde pode ser explicado pela degradação da clorofila pelas clorofilases (CHITARRA e CHITARRA, 2005) e também é resultante da quebra da estrutura da clorofila, causada principalmente pelas mudanças de pH, presença de ácidos orgânicos provenientes do vacúolo das células e presença de sistemas oxidantes (AWAD, 1993).

É sabido que a temperatura influencia no metabolismo da fruta e hortaliça, seu abaixamento diminui a degradação da clorofila, devido à redução da biossíntese e da ação direta do etileno (ABELES *et al.*, 1992). Portanto, provavelmente, a baixa temperatura nas folhas paralisou o processo de degradação, fazendo com que as plantas no final do armazenamento a 5 e a 10 °C estivessem verdes. Desse modo, se o objetivo é manter a qualidade com aumento da vida útil, é indispensável a manutenção do produto em baixa temperatura, já que a coloração importa na atratividade ao consumidor.

#### **2.3.4.2 Parâmetro de cor b\***

Em folhas de manjeriço durante os quatro dias de armazenamento a interação não foi significativa, e não ocorreu diferença entre as médias das folhas de manjeriço em vaso dos tratamentos em cada dia e nem dos dias em cada tratamento.

No quarto dia de análise (26,13±0,97), as folhas de manjeriço armazenadas sem refrigeração tiveram evolução na variável de cor b\*, indicando maior tendência na coloração amarela das folhas, enquanto nas folhas a 5 °C houve decréscimo no valor desse parâmetro (24,30±0,71). Na temperatura de refrigeração, pode ter ocorrido uma minimização da biossíntese de pigmentos amarelos (ABELES *et al.*, 1992) o que proporcionou melhora na coloração das plantas de manjeriço.

Com o aumento do período de armazenamento as folhas de manjeriço mantidas sem refrigeração e a 10 °C apresentaram maior média do parâmetro de cor b\* no dia três (27,98 e 27,09, respectivamente) indicando maior tendência na coloração amarela das folhas, havendo decréscimo no último dia de avaliação.

No terceiro ( $24,05\pm 0,83$ ) e quarto dia de armazenamento ( $24,30\pm 0,71$ ) nas folhas de manjeriço ocorreram as menores médias do parâmetro de cor  $b^*$ , no tratamento a temperatura ambiente e a  $5\text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Nos dias um ( $27,4\pm 0,28$ ) e três de amostragem ( $27,31\pm 0,94$ ), nas folhas mantidas a  $5\text{ }^\circ\text{C}$  houve maiores médias do parâmetro  $b^*$ , indicando tendência na intensidade de cor amarela devido aos sintomas da injúria pelo frio, como tiveram na análise visual (Figura 1).

Efeito semelhante foi observado na redução da intensidade de amarelo ( $b^*$ ) em função da refrigeração em hastes de *Heliconia bilhai* para a cv. Lobster Claw (LC) e cv. Halloween (HW) a partir do quarto dia ( $+30,43$ ) e ( $+37,86$ ), respectivamente. Na cv. LC a redução foi maior a partir do sexto dia e na cv. HW foi maior no oitavo dia, em relação aos demais períodos de armazenamento, indicando que houve agravamento do sintoma de injúria por frio com o aumento do tempo de armazenamento (COSTA, 2009).

#### **2.3.4.3 Parâmetro de cor L**

Os resultados de cor das folhas de manjeriço, referentes à luminosidade (L), mantidos a  $5\text{ }^\circ\text{C}$  e a temperatura ambiente mostram que a interação foi significativa, e ocorreu diferença entre as médias das folhas nos dias de armazenamento (Tabela 2).

Durante o armazenamento, houve perda de brilho (L) em ambos os tratamentos no dia dois. No primeiro dia de armazenamento, as folhas mantidas sem refrigeração as médias de luminosidade foram significativamente superiores, ou seja, as plantas apresentavam maior brilho.

Quanto ao efeito dos dias de armazenamento das folhas de manjeriço dentro dos tratamentos, as folhas armazenadas a temperatura ambiente apresentaram significativamente as maiores médias de luminosidade. Enquanto, nas folhas refrigeradas a  $5\text{ }^\circ\text{C}$ , houve tendência maior das médias nos dias 3 e 4 (Tabela 2).

A deterioração da membrana celular favorece a oxidação provocando o escurecimento do tecido (JIANG *et al.*, 2004). Costa (2009) observou no tratamento com refrigeração em hastes de *Heliconia bilhai* que houve escurecimento do tecido das

brácteas e em consequência perda de brilho a partir do sexto dia na cv. Lobster Claw (LC) (38,84) e do quarto dia na cv. Halloween (HW) (53,57), devido à ocorrência de injúria por frio.

**Tabela 2-** Variação média da estimativa do parâmetro de cor L de folhas de manjeriço cv. Genovese em função do tempo por até 4 dias armazenadas a temperatura ambiente e a 5 °C e avaliadas após 2 horas de estocagem. Viçosa – Minas Gerais, 2014.

Tempo de Armazenamento (dias)	Tratamentos	
	Temperatura ambiente	5°C
0	30,53 abA	30,53 aA
1	33,64 aA	28,63 aB
2	25,55 bA	27,49 aA
3	29,56 abA	32,53 aA
4	30,84 aA	32,29 aA

Letras minúsculas na mesma coluna comparam médias de tratamento para cada dia. Letras maiúsculas na linha comparam médias de dia para cada tratamento. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados da luminosidade em folhas de manjeriço, em vaso, cv. Genovese mostram que a interação não foi significativa, e não ocorreu diferença entre as médias das folhas mantidas sem refrigeração e com refrigeração a 10 °C em cada dia e nem dos dias em cada tratamento.

Com o aumento do período de armazenamento as folhas de manjeriço mantidas sem refrigeração e a 10 °C apresentaram menor perda de brilho (L) nos dias um dois e três havendo decréscimo no último dia de análise. No primeiro (26,54) e último dia (25,06) de análise nas folhas de manjeriço houve maior perda de brilho (L) quando comparada aos demais dias de avaliação.

Em todos os tratamentos houve menor brilho das folhas no quinto dia de avaliação (24,69 e 25,44, nas plantas sem refrigeração e a 10 °C, respectivamente), que poderia indicar a perda de brilho das folhas de manjeriço, porém os valores são similares ao dia zero (26,54). A descoloração dos tecidos resultante da injúria por frio é indesejável, porque segundo Kays (1991) a cor é o atributo de qualidade mais atrativo ao consumidor e é um dos parâmetros utilizados na avaliação da qualidade após a colheita.

Desse modo, a refrigeração a 10 °C não influenciou o parâmetro de cor nas folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso.

#### **2.3.4.4 Parâmetro de saturação de cor (Chroma)**

Segundo McGUIRE (1992), os valores do Chroma indicam analogamente a intensidade ou saturação de cor. Os resultados de saturação de cor (Chroma) mostram que a interação não foi significativa, e não ocorreu diferença entre as médias das folhas de manjeriço em vaso dos tratamentos em cada dia e nem dos dias em cada tratamento.

Nas folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C ocorreu menor saturação de cor (Chroma) nos dias um (24,78) e dois (23,15) de análise. Já, a maior saturação de cor (Chroma) das folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C foi observado no dia quatro (28,34), enquanto que nas folhas mantidas a temperatura ambiente foi no segundo dia de avaliação (29,44).

A descoloração dos tecidos pode ser devida a oxidação de compostos fenólicos que gerou a coloração escura nos tecidos. De acordo com Cano *et al.* (1990) mudanças bioquímicas durante o processo de armazenamento podem produzir perdas significativas da qualidade do produto resfriado. Em frutos e hortaliças, a cor é utilizada como indicador de maturação, senescência e desordens fisiológicas (INIBAP, 2002). Portanto, as plantas refrigeradas a 5 °C são mais favoráveis à perda de cor e em consequência dos sintomas de injúria por frio.

Durante os três primeiros dias os vasos de manjeriço armazenados sem refrigeração apresentaram médias superiores da cor Chroma em comparação com as folhas refrigeradas a 10 °C, com redução no dia quatro. Em relação aos vasos mantidos a 10 °C ocorreu maior saturação de cor nas suas folhas (26,17) em comparação aos vasos à temperatura ambiente (25,64) somente no último dia de análise.

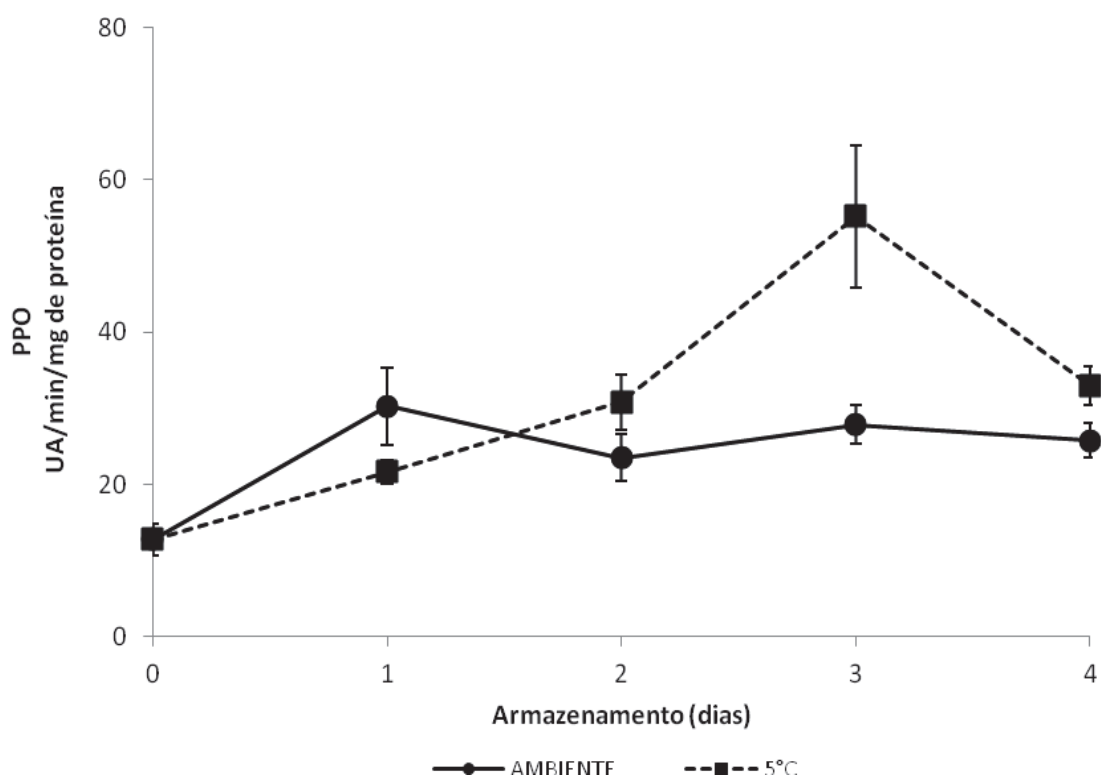
Quanto aos resultados referentes aos parâmetros de cor ( $b^*$ ,  $L^*$  e Chroma) e a clorofila total possivelmente houve tendência na senescência das folhas de manjeriço da cv. Genovese a partir do terceiro de armazenamento em ambos os tratamentos. Embora, as folhas de manjeriço mantidas a 10 °C estavam sem sintomas de injúria por frio.

### 2.3.5 Atividade da polifenoloxidase

As folhas de manjeriço cv. Genovese mantidas a 5 °C tiveram maior atividade enzimática quando comparado às folhas sem refrigeração (Figura 4) o que está relacionada ao grau de escurecimento das folhas, devido à exposição à temperatura capaz de promover o *chilling*. Esse escurecimento ocorre devido à ação catalítica da enzima polifenoloxidase (LIMA *et al.*, 2000), a qual na presença de oxigênio provoca a oxidação de o-difenóis, presente nos tecidos. Esta reação de oxidação resulta na produção de o-quinonas, produzindo pigmentos marrons (YAMASHITA *et al.*, 2000).

No presente estudo os distúrbios, conhecidos como danos por frio, muitas vezes decorrem da exposição dos vegetais a baixas temperaturas, pois as folhas de manjeriço cv. Genovese expostas em câmara fria a 5 °C tiveram menor durabilidade e maior atividade de PPO, comparadas com as armazenadas em temperatura ambiente com o decorrer do período experimental. Segundo Stewart *et al.* (2001) a PPO é mais ativa em temperaturas mais propensas a causar injúria por frio.

A atividade da PPO foi máxima em folhas de manjeriço no terceiro dia de armazenamento com o aumento da atividade de quatro vezes em relação ao dia zero. Em todos os tratamentos a atividade da PPO foi reduzida no último dia de armazenamento (Figura 4). Ao comparar-se a atividade enzimática nos dois tratamentos em relação à escala de escurecimento visual a partir do dia dois ambos os resultados foram superiores nas folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C (Figura 4 e Quadro 1). Este fato leva a hipótese que, como a PPO foi mais ativa nas folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso a 5 °C, provavelmente foram mais suscetível ao escurecimento.



**Figura 4.** Estimativa da atividade da polifenoloxidase em folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 5 °C ( ■ ) e a temperatura ambiente ( ● ) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois da estocagem. As barras representam o erro padrão da média.

Houve relação positiva entre a atividade da PPO e o extravasamento de eletrólitos coincidindo com o aumento do escurecimento das folhas de manjeriço, que pode ser explicada pelo fato que o “*chilling*” promove modificação no estado físico das membranas, local onde estas enzimas encontram-se inativas, permitindo que as enzimas tornem-se ativas ao entrar em contato com o oxigênio e os substratos fenólicos (UNDERHILL e CRITCHLY, 1995).

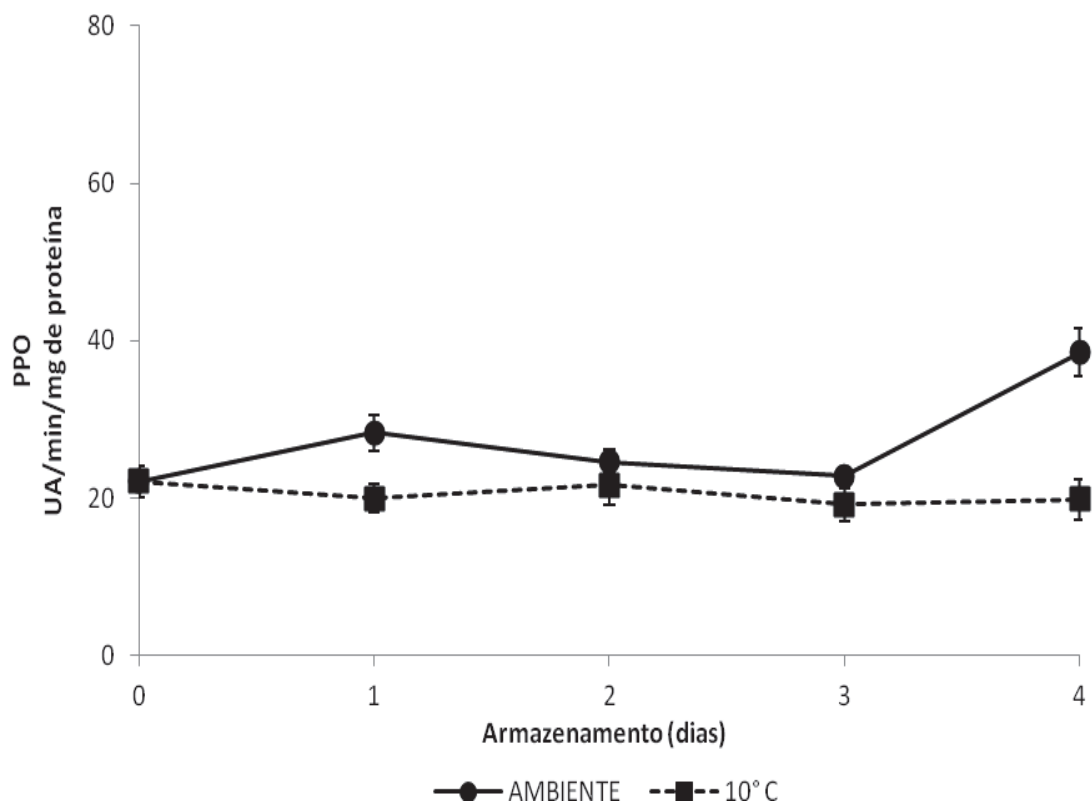
O comportamento da atividade enzimática coincidiu com o grau de escurecimento das folhas de manjeriço induzido pela baixa temperatura (Figura 2 e 4). A relação entre escurecimento e aumento da atividade da polifenoloxidase foi descrita em várias espécies, incluindo batata (WALTER e PURCELL, 1980), pêssego (FLURKEY e JEN, 1980), banana (KAHN, 1985), uva (VALERO *et al.*, 1988), maçã (MARQUÈS *et al.*, 1995) e abacaxi (STEWART *et al.*, 2001).

Pongprasert e Srilaong (2007) constataram que folhas maduras de manjeriço desenvolvem sintomas mais graves de injúria por frio que folhas jovens e têm níveis mais elevados de polifenoloxidase (PPO) e lipoxigenase (LOX). Shafran *et al.* (2007) encontraram variação na atividade da PPO de manjeriço em relação a cultivar, idade da planta, e a posição das folhas de determinada planta.

Durante todo o período de armazenamento, o comportamento enzimático foi diferente entre os tratamentos, mantendo-se superior nas folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso mantidas a temperatura ambiente (Figura 5). Este resultado não era esperado, pois, segundo Stewart *et al.* (2001) a PPO é mais ativa sob temperaturas mais propensas a causar injúria por frio. Esse efeito não foi observado neste estudo, pois nas folhas de manjeriço expostas em câmara fria a 10 °C houve maior durabilidade e menor atividade de PPO, comparadas com as armazenadas sem refrigeração durante todo o período experimental. A permanência das plantas em temperaturas mais elevadas acelera o processo de senescência, que implica na perda da permeabilidade da membrana e em consequência ocorre maior atividade da PPO. Isso pode ser evitado com o armazenamento em baixa temperatura, pois ocorre redução das reações metabólicas de folhas.

O crescimento em vasos de manjeriço cv. Genovese manteve a atividade da PPO nas folhas praticamente constante com o decorrer do tempo (Figura 5). Ao comparar com os resultados da análise visual, os tratamentos causaram menor atividade enzimática efeito semelhantes em relação ao escurecimento, assim não resultando em nenhum dano por frio (Figura 3 e 5).

Segundo Antunes *et al.* (2003) a utilização da baixa temperatura no armazenamento de amoreira-preta reduziu a atividade enzimática. Comportamento semelhante foi obtido por Magee (1999) ao avaliar a qualidade de frutos de mirtilo “Jubilee” e “Climax”, refrigerados (1 °C a 3 °C).



**Figura 5.** Estimativa da atividade da polifenoloxidase em folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 10 °C ( ■ ) e a temperatura ambiente ( ● ) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois da estocagem. As barras representam o erro padrão da média.

De acordo com o esse presente estudo, o transporte refrigerado a 10 °C de vasos de manjeriço cv. Genovese é o ideal para evitar o processo de injúria por frio e assim manter a qualidade e aceitação pelos consumidores.

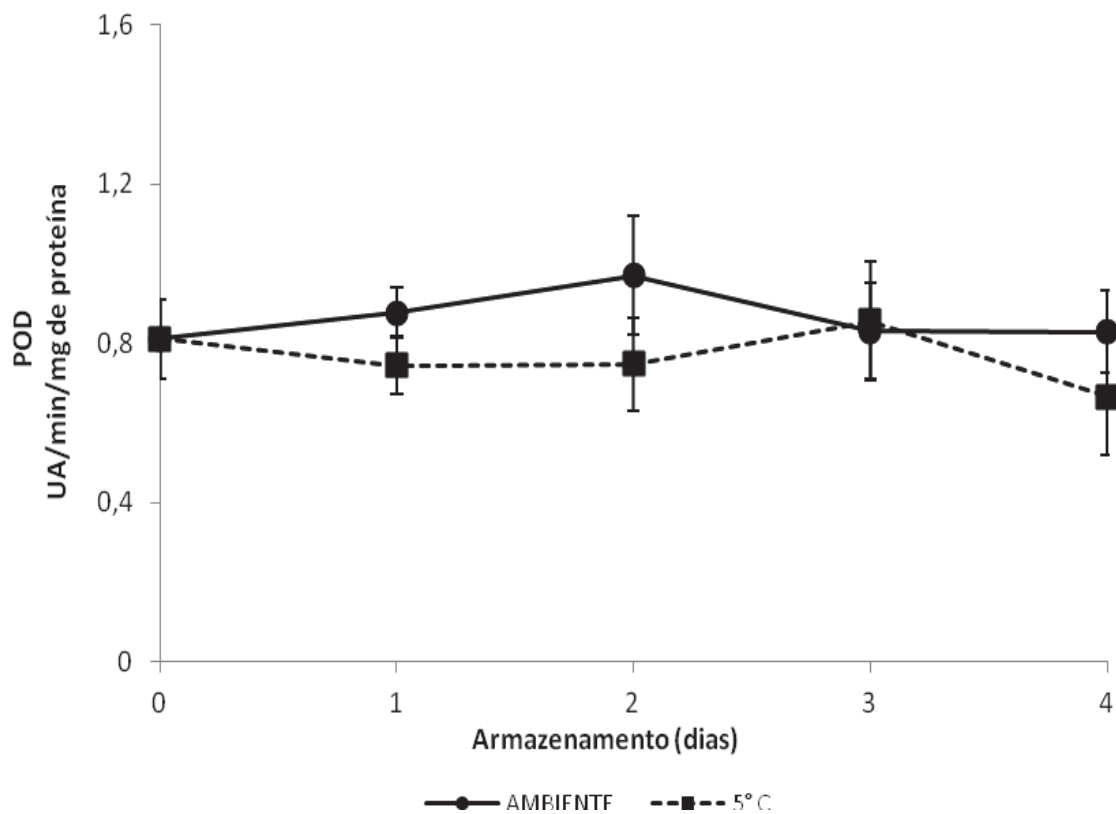
### 2.3.6 Atividade da peroxidase

O comportamento da POD nas folhas de manjeriço cv. Genovese (Figura 6 e 7) mostrou que a atividade da enzima é mais elevada em folhas armazenadas em temperatura ambiente durante todo o experimento quando comparados aos armazenados em câmara fria a 5 e a 10 °C. Segundo Lagrimini e Rothstein (1987) o nível de expressão das POD pode ser alterado como resposta a diferentes estresses. Portanto, o

estresse por frio parece não influenciar a atividade da POD em folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso.

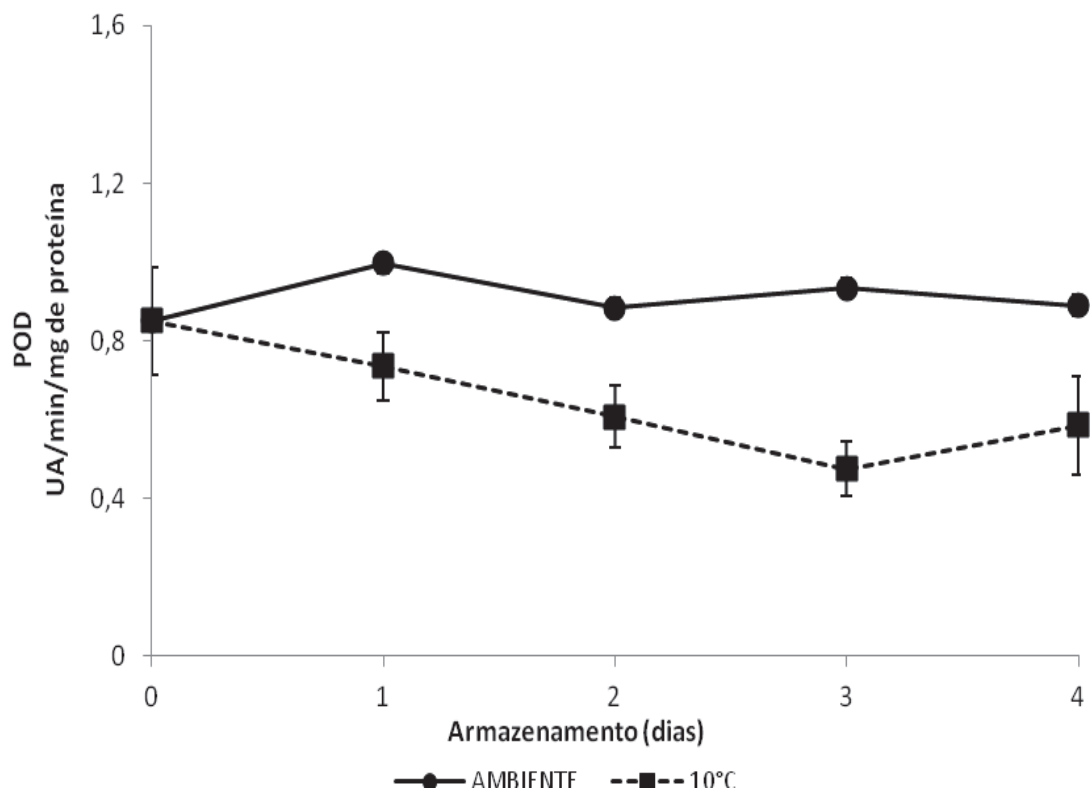
Avaliando-se estes resultados e confrontando-os com os da análise visual, foi impossível relacionar o escurecimento com o aumento da atividade da POD, pois, o processo de escurecimento, além de ter iniciado primeiro, atingiu maior grau (estágio 4) em folhas refrigeradas a 5 °C e não ocorreram sintomas de injúria por frio a refrigeração de 10 °C. Entretanto, Lagrimini e Rothstein (1987) e Lagrimini (1991) mostraram que as POD podem ser responsáveis pelo escurecimento induzido por estresse em diferentes espécies vegetais. Em trabalhos realizados com pêssigo (FLURKEY e JEN, 1980), manga (ZAUBERMAN *et al.*, 1988) e lichia (HUANG *et al.*, 1990), o escurecimento coincidiu com o aumento da atividade da POD, durante o armazenamento sob baixas temperaturas. Em manjeriço a enzima associada ao escurecimento foi a PPO não havendo aparente relação direta com a POD.

A temperatura ambiente houve pequena elevação na atividade enzimática no segundo dia de armazenamento, com posterior declínio, bem como, houve nas folhas de manjeriço mantidas em câmara fria a 5 °C maior atividade da POD no terceiro dia de armazenamento (Figura 6). A razão desse aumento pode estar associado a outro tipo de estresse, como estresse hídrico ou reação a baixa luminosidade. Segundo Kudrev (1994) a redução da quantidade de água disponível as plantas também leva ao aumento da atividade das enzimas hidrolíticas e a redução da intensidade fotossintética o que induz respostas metabólicas, como o declínio na taxa de crescimento, acúmulo de solutos e substâncias antioxidantes e expressão de genes específicos de estresse (SINGH-SANGWAN *et al.*, 1994). Logo, um dos mecanismos que a célula dispõe para dismutar radicais livres produzidos em condição de deficiência hídrica é a ativação de enzimas antioxidativas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidase (POX E.C 1.11.1.7) (MITTLER, 2002).



**Figura 6.** Estimativa da atividade da peroxidase em folhas de manjeriço cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 5 °C (■) e a temperatura ambiente (●) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois da estocagem. As barras representam o erro padrão da média.

A temperatura ambiente houve maior atividade da enzima mantendo-se praticamente constante com o decorrer do tempo de amostragem (Figura 7). Desempenho diferente ocorreu em frutos de mandarino, que são sensíveis ao frio, armazenados a 4 °C e 8 °C, durante quatro semanas aumentaram continuamente a atividade da POD durante esse período quando armazenados a 4 °C, enquanto que, a 10 °C houve acréscimo na atividade da enzima nas duas semanas com subsequente declínio (EL-HILARI *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Estimativa da atividade da peroxidase em folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 10 °C ( ■ ) e a temperatura ambiente ( ● ) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois da estocagem. As barras representam o erro padrão da média.

Estudos com tubérculos de batata, a resposta ao armazenamento em baixas temperaturas, a POD reduz o peróxido de hidrogênio à água, devido a sua maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio que a catalase, tendo como função a desintoxicação do meio (KAWAKAMI *et al.*, 2002). Já nesse estudo observa-se que houve maior atividade da catalase em folhas de manjeriço cv. Genovese a 10 °C e menor atividade da POD.

Nenhum padrão na atividade da POD nas folhas de manjeriço cv. Genovese submetidas à refrigeração, independente da temperatura e do tempo de armazenamento. Embora essa enzima possa ser considerada um marcador bioquímico de estresse induzido por diferentes fatores (LIMA *et al.*, 1999), houve outros constituintes do sistema antioxidativo atuando em reação aos tratamentos aplicados.

### 2.3.7 Atividade da catalase

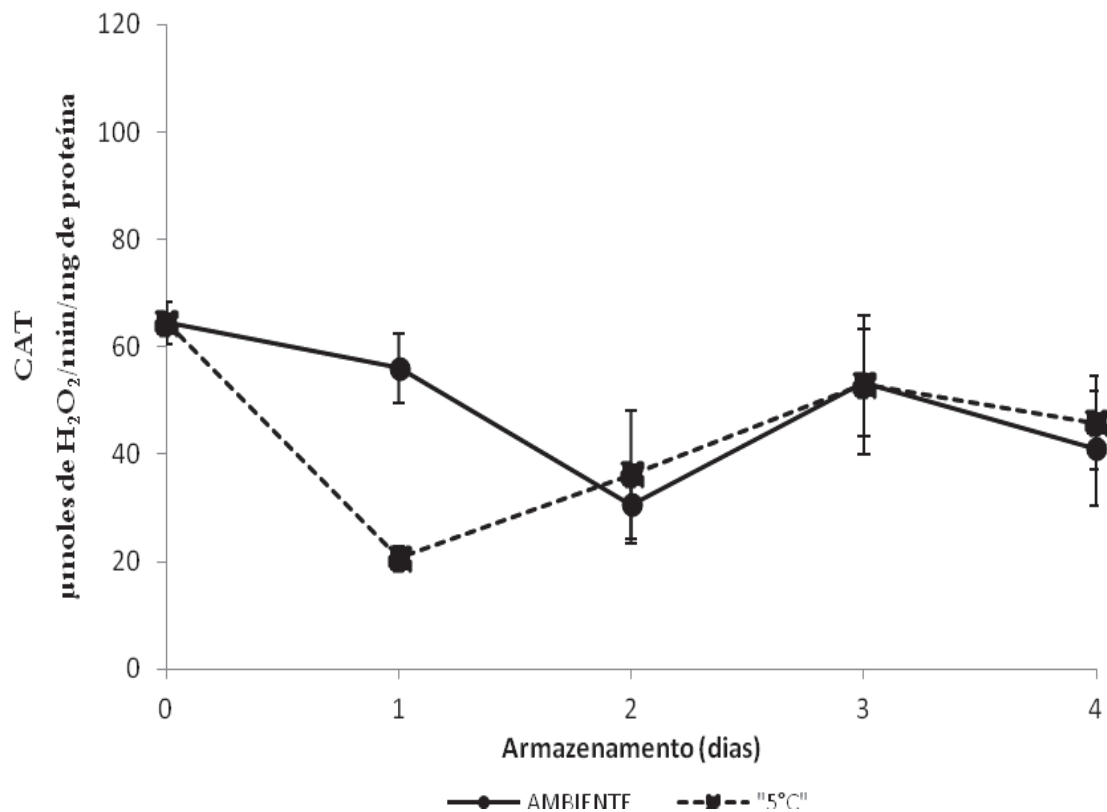
Em plantas armazenadas em refrigeração, os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram detectados, particularmente, os níveis de peróxido de hidrogênio. Os antioxidantes e enzimas antioxidantes protegem contra estas moléculas potencialmente perigosas. A SOD converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Lee e Lee, 2000).

Ao comparar-se o comportamento dos tratamentos em relação à atividade da CAT das folhas de manjeriço cv. Genovese, em vaso, houve acréscimo na atividade enzimática no terceiro dia de armazenamento (46,2 e 74,3% nos tratamentos sob refrigeração a 5 °C e sem refrigeração, respectivamente) em relação ao dia dois (Figura 8). Assim como, foi observado acréscimo na atividade da enzima de 54% nos vasos refrigerados a 10 °C, no dia quatro de armazenamento em relação aos vasos mantidos a temperatura ambiente (Figura 9), indicando que ocorreu maior tendência de estresse oxidativo. A atividade da CAT foi associada ao desenvolvimento dos sintomas de injúria por frio, como o estresse oxidativo, por isso a remoção do peróxido de hidrogênio pela CAT parece estar diretamente envolvida com a regulação da resposta deste estresse nas plantas (SALA, 1998).

Os resultados dos efeitos dos tratamentos sobre a atividade da enzima, juntamente com os resultados da análise visual e o extravasamento de eletrólitos revelam a descoloração dos tecidos e o grau de rompimento das membranas, respectivamente, evidenciando os sintomas visuais de injúria por frio, que coincidiu com o aumento da atividade enzimática, possivelmente, confirmando a hipótese de que o acréscimo na atividade da CAT pode continuar com a peroxidação de lipídios das membranas. A CAT também apresenta atividade peroxidativa, podendo utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação de substratos orgânicos e causar a peroxidação dos lipídeos das membranas (SCANDALIOS, 1993).

A CAT é responsável pela inativação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante a conversão do glicolato a glioxalato que ocorre durante a fotorrespiração, onde o peróxido é convertido pela enzima a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (IGAMBERDIEV e LEA, 2002). A CAT pode também

decompor o peróxido formado durante a oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos em tecidos de armazenamento de gordura (HOLTMAN *et al.*, 1994). A enzima é preferencialmente encontrada nos peroxissomos, mas também podem estar presentes em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON *et al.*, 2006), os cloroplastos não possuem a enzima (ASADA, 1999).



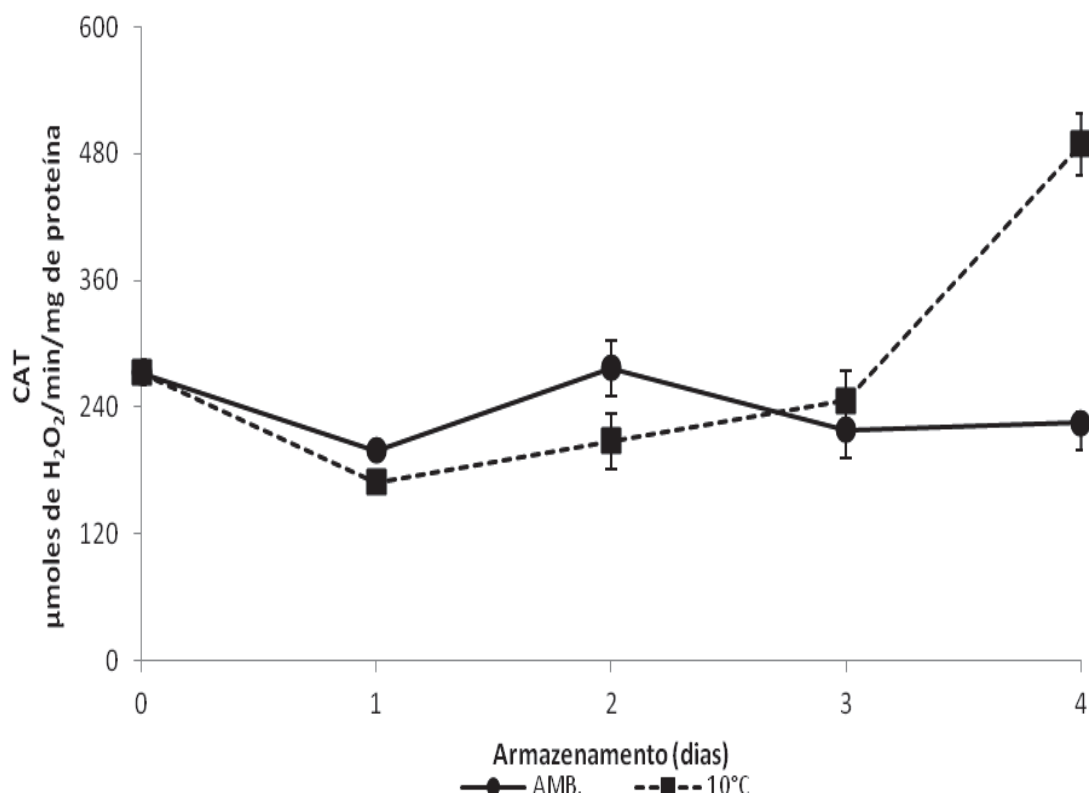
**Figura 8.** Estimativa da atividade da catalase em folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 5 °C (■) e a temperatura ambiente (●) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois do armazenamento. As barras representam o erro padrão da média.

T. Wongspheree *et al.* (2009) sugeriram que a maior sensibilidade a danos por frio em folhas maduras em comparação com folhas jovens de manjeriço limão foi relacionado com a atividade superior de LOX e com atividade menor da CAT nas folhas maduras. Este resultado indica que, pelo menos, a atividade da CAT pode ser um fator que determina a maior tolerância ao *chilling* em folhas jovens. Resultado semelhante foi obtido em folhas de Saintpaulia (violeta africana), onde as cultivares que eram menos sensíveis a injúria por frio tiveram maior nível de SOD e CAT (YANG *et al.*, 2001). Da

mesma forma, a aclimação pelo frio em folhas de arroz foi relacionada ao aumento dos valores de CAT e ascorbato peroxidase (KUK *et al.*, 2003). Adicionalmente, as plantas de arroz com superexpressão da CAT mostraram melhora na tolerância ao *chilling* (MATSUMURA *et al.*, 2002).

No primeiro e segundo dia de armazenamento, houve menor atividade da CAT nas folhas de manjeriço mantidas a 10 °C, enquanto que as folhas armazenadas sem refrigeração tiveram maior atividade enzimática (Figura 9).

Quanto aos efeitos dos tratamentos sobre a atividade da CAT, relacionando-os com os resultados da análise visual, os vasos armazenados a 10 °C estavam sem sintomas de injúria por frio nas folhas de manjeriço, portanto não houve similaridade com o aumento da atividade da CAT, nos dias dois, três e quatro. Já, ao comparar o extravasamento de eletrólitos e a atividade da CAT, houve conformidade entre os seus resultados nos vasos mantidos a 10 °C no dia dois, indicando maior tendência na peroxidação lipídica das membranas nesse dia.



**Figura 9.** Estimativa da atividade da catalase em folhas de manjeriço da cv. Genovese em vaso armazenadas por 4 dias à 10 °C (■) e a temperatura ambiente (●) e avaliadas após 2 horas a 25 °C depois do armazenamento. As barras representam o erro padrão da média.

Møller (2001) sugeriu que a defesa da planta contra o estresse oxidativo é conseguida de duas maneiras. A primeira é pela ativação de expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na redução da ativação de ROS, tais como oxidase alternativa (AOX). A segunda defesa contra o estresse oxidativo é por indução da atividade ou a expressão gênica de sequestradores de ROS, dentre as enzimas antioxidantes estão a catalase (CAT). Maior atividade enzimática do sistema antioxidante leva à redução de ROS, melhorando a integridade da membrana e, finalmente, induz a resistência de estresses abióticos, como a injúria por frio (MITTLER, 2002). A atividade da CAT pode ser um parâmetro marcador de degeneração, dos tecidos escurecidos e extravasamento de eletrólitos. Este fato leva a hipótese que o aumento na atividade da CAT em folhas de manjeriço cv. Genovese pode ser uma tendência na melhora da integridade da membrana reduzindo assim o extravasamento de eletrólitos dos tecidos e em consequência impede os danos por frio.

Yang et al. (2011) relataram que o tratamento de pêsego com ácido gama amino butírico (GABA) reduziu a injúria por frio, aparentemente porque este tratamento aprimora a atividade antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase da glutathione (GPX), glutathione S-transferase (GST), peroxidase do ascorbato (APX), redutase do desidroascorbato (DHAR) e atividades redutase do monodesidroascorbato (MDHAR).

O presente estudo mostrou que o transporte refrigerado a 10 °C por até quatro dias pode ser viável para os vasos de manjeriço cv. Genovese, pois as folhas permaneceram com as suas qualidades visuais durante o período de armazenamento. Assim, pode chegar ao destino final com características desejáveis pelos consumidores.

## 2.4 CONCLUSÕES

O manjeriço cv. Genovese em vaso armazenado a 10 °C teve maior qualidade durante o período de conservação (4 dias), evidenciado pela menor atividade enzimática, escurecimento e sintomas de injúria por frio.

Ao longo dos dias de análise os teores de clorofilas totais, parâmetro de cor  $a^*$ ,  $b^*$  e Chroma mantiveram constantes em folhas de manjeriço refrigeradas e a temperatura ambiente.

O aumento da atividade da CAT em folhas mantidas a 5 °C coincidiu com o aumento dos sintomas de injúria por frio.

O incremento da atividade da PPO foi superior ao da POD, possivelmente houve maior influência desta enzima no escurecimento em folhas de manjeriço cv. Genovese quando refrigeradas a 5 °C.

### **3. CAPÍTULO 2 - PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE EM MANJERICÃO cv. GENOVESE**

#### **RESUMO**

Em manjericão, observam-se sintomas de injúria por frio e escurecimento devido ao armazenamento em baixas temperaturas, o que limita a sua vida sua pós-colheita. Em muitas espécies, tem sido observada relação entre a atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) com escurecimento de hortaliças resfriadas em temperaturas inadequadas. Por isto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade da enzima PPO em manjericão, sob diferentes condições de pH, temperatura e uso de diferentes inibidores, determinando as condições ótimas na atividade e formas possíveis de inativá-las. Realizou-se a saturação dos extratos brutos da folha com quantidades crescentes de sulfato de amônio, entre 20 e 80%. Maior atividade foi encontrada quando o extrato foi saturado de 60 a 80% com sulfato de amônio e a reação se processou com catecol 10 mM como substrato, pH 6,5 e temperatura de 30 °C. A temperatura de 50 °C reduziu em 65% a atividade da PPO, não sendo possível a inativação, enquanto que a 60 °C por 10 min de exposição foram suficientes na redução de 80% na atividade enzimática. Sua inativação ocorreu a partir dos 80 minutos de pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5 a 25 °C ou com a utilização de ácido ascórbico, ditioeitol (DTT) e L-cisteína levando a 100% de inibição, seguido pelo tropolone, agente inibidor específico, com cerca de 98% de inibição. A enzima apresentou maior atividade em pH 6,5, temperatura de 30 °C e com catecol como substrato. Sua inativação completa foi observada com pré- incubação em pH ácido, altas temperaturas e diferentes inibidores.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As ervas aromáticas e medicinais da família Lamiaceae, como o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), são conhecidos por serem fontes ricas em compostos polifenólicos, particularmente os ácidos fenólicos (CAPECKA, MARECZEK, e LEJA, 2005; ZGÓRKA e GLOWNIAK, 2001) que contribuem numa forte capacidade antioxidante (SHAN *et al.*, 2005; SURVESWARAN *et al.*, 2007; LEE e SCAGEL, 2009, 2010).

Evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em frutas e hortaliças estão associadas à redução do risco de várias doenças devido a propriedades antioxidantes dos fitoquímicos, diminuindo assim, o estresse oxidativo em humanos (ZHANG *et al.*, 2013). Antioxidantes tem efeito protetor contra a ocorrência de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer ( GROSS, 2004; NEUHOUSER , 2004).

O manjeriço fresco é altamente perecível, com um tempo de armazenamento de 4 a 5 dias à temperatura ambiente (CANTWELL e REID, 2002). Por ser de origem tropical, o manjeriço apresenta sintomas de injúria por frio quando armazenado em temperaturas inferiores a 12 °C. As folhas injuriadas pelo frio apresentam lesões escuras, seguido de degeneração e senescência (LANGE e CAMERON, 1994 ).

As enzimas peroxidases e polifenoloxidase estão relacionadas ao escurecimento enzimático de frutos e hortaliças submetidos à injúria por frio (MARQUÈS *et al.*, 1995; LAGRIMINI *et al.*, 1997), visto que baixas temperaturas, que causam injúria por frio, também induzem o estresse oxidativo em vegetais (PURVIS e SHEWFELT, 1993). Em trabalhos realizados com abacaxi, mandarino e plantas de arroz (GONÇALVES *et al.*, 2000; EL HILARI *et al.*, 2003; KUK *et al.*, 2003) foi observado aumento na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidase quando ocorre o chamado *chilling*.

De acordo com o substrato, as polifenoloxidases (PPO, EC 1.14.18.1) podem ser designadas como fenolase, catecolase, cresolase ou difenoloxidase. Polifenoloxidase (PPO) é uma enzima que contém cobre e com um centro de cobre dinucleares, catalisa a hidroxilação de monofenol no seu correspondente orto-difenol (hidroxilação ou atividade monofenolase) e também a oxidação do orto-difenol ao correspondente orto-

quinonas (atividade difenolase , EC 1.10.3.1), na presença de oxigênio molecular, que são polimerizados a pigmentos (GAO , HAN , e XIAO , 2009). A PPO utiliza como substratos os compostos fenólicos e o oxigênio molecular (MAYER, 2006). As reações subsequentes das quinonas levam a acumulação de melanoidina, que é o pigmento causador do escurecimento nos tecidos vegetais (BARBAGALLO, CHISARI, e PATANÉ, 2012).

PPO é descrita como uma proteína hidrófila com uma cauda hidrófoba curta que ancora a enzima na membrana (MARQUES *et al.*, 1994). Como uma enzima de cloroplastos em plantas superiores, geralmente, está localizado na membrana de tilacoide (ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991), enquanto os substratos fenólicos estão localizados nos vacúolos. A enzima também pode existir livre no citoplasma em tecidos degenerados e senescentes como em frutos maduros (FLURKEY e JEN, 1978). O nível de PPO na planta é dependente da espécie, cultivar, maturidade e idade (VAMOS-VIGYAZO, 1981). A PPO tem grande heterogeneidade acerca do substrato específico, sensibilidade a inibidores, pH ótimo, latência, inativação térmica, número de isoformas e massa molecular (MAYER e HAREL, 1979).

O grau de escurecimento depende da natureza e da quantidade de compostos fenólicos, da presença de oxigênio, das substâncias reduzidas , dos íons metálicos, do pH, da temperatura e da atividade da polifenoloxidase (YORUK e MARSHALL, 2003). O escurecimento afeta a aceitabilidade do produto pelo consumidor e é uma das principais causas de perda de qualidade (MARTÍNEZ e WHITAKER, 1997), uma vez que a cor é um atributo de qualidade de frutas e hortaliças.

Objetivou-se com o presente trabalho purificar parcialmente e caracterizar a enzima polifenoloxidase envolvida na injúria por frio em folhas de manjeriço cv. Genovese, pelo estabelecimento das condições ótimas na atividade da PPO, e inativação da enzima.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Sementes de manjerição cv. Genovese foram semeadas diretamente em vaso, volume de 3 litros, contendo substrato comercial, na casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no mês de outubro do ano 2013. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da UFV, 3 meses após a semeadura, nos meses de janeiro a fevereiro de 2014.

### **3.2.1 Extração e purificação parcial da polifenoloxidase**

Na obtenção do extrato enzimático, 10 g de material vegetal foi homogeneizado em 50 mL de tampão de extração. A composição do tampão de extração foi: tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 + 1% Polivinilpirrolidona (PVP) + 1% Triton X-100 + 10mM ácido ascórbico.

Após isso, o homogeneizado foi centrifugado a 17.000 g durante 30 minutos, a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi armazenada (extrato bruto) e o restante saturado para 20%, 40%, 60% e 80% com sulfato de amônio, via homogeneização por 30 min em banho de gelo e posterior centrifugação, para cada etapa. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento resultante de cada etapa de saturação foi ressuspenso com 2 mL de tampão de diálise e dialisado por 15 h em membranas de celulose modelo D-9777 da Sigma. A composição do tampão de extração foi: tampão fosfato 0,01 M pH 6,5 + 100 mM ácido ascórbico. Todas as centrifugações foram realizadas a 4 °C e 17.000 g por 30 min.

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando soro albumina bovino (BSA) como padrão.

As diferentes frações de saturação com sulfato de amônio foram avaliadas na determinação da maior atividade específica e, estas foram utilizados nas avaliações posteriores de pH, temperatura e inibidores.

### **3.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase**

Na determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase foi adicionada uma alíquota de extrato enzimático ao meio de reação contendo 0,5 mL de 10 mM de catecol e 0,5 mL de tampão fosfato a 0,1 M (pH 6,5) totalizando o volume total da 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 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 e AYDEMIR, 2001).

### **3.2.3 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase**

Na determinação do substrato que proporcionou maior atividade enzimática na fração com saturação com sulfato de amônio da polifenoloxidase, diferentes substratos foram testados: Catecol (420 nm), 4-metil-catecol (420 nm), pirocatequina (420 nm), ácido clorogênico (420 nm), ácido cafeico (400 nm), L-dopa (480 nm), L-tirosina (420 nm), pirogalo (420 nm). A concentração de 10 mM de cada substrato 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).

### **3.2.4 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase**

Na determinação do 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 a 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).

### **3.2.5 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH**

Na 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, na verificação da possibilidade de inativação da mesma. Para isso o extrato enzimático foi incubado (1:1) em solução tampão 0,1 M em pHs 2,5 e a 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.

### **3.2.6 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase**

Na determinação da temperatura ótima para a atividade, os extratos enzimáticos e o tampão de reação foram incubados, por 4 minutos, em temperaturas que variaram de 10 a 60 °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.

### **3.2.7 Estabilidade térmica da polifenoloxidase**

Na avaliação da estabilidade térmica, o extrato enzimático foi incubado com o tampão fosfato a 50 e 60 °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.

### **3.2.8 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase**

Na verificação do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO, os extratos enzimáticos foram incubados por 30 minutos a 25 °C, em tampão de reação contendo 1mM de EDTA, L-cisteína, metabissulfito de sódio, ditioeitol (DTT), ácido ascórbico e sulfito de sódio. Na ausência de inibidores, a atividade foi considerada como 100% e as demais foram calculadas com base nessa.

### **3.2.9 Análise Estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, os dados foram submetidos a análises estatísticas descritivas da média e o erro padrão da média foi calculado.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Purificação parcial da polifenoloxidase

A fração enzimática na qual a PPO manteve maior atividade foi a saturada entre 60 e 80% com sulfato de amônio (Tabela 1). Quando se comparou a atividade específica encontrada no extrato saturado de 60 a 80% com a do extrato bruto, nesta ocorreu um aumento de 166% com a saturação. Este aumento foi considerado relevante na realização das etapas posteriores do trabalho, na concentração da PPO e eliminação de compostos moduladores e substratos.

Em trabalho realizado por Prabha e Patwardhan (1982) com mangas, mais de 90% da enzima presente no material foi precipitada com a saturação de 70 a 80% com sulfato de amônio. Oktay *et al.* (1995) trabalhando com maçãs, encontraram maior atividade da PPO apenas na fração enzimática saturada a 80%. Estes resultados são semelhantes ao presente estudo.

**Tabela 1-** Atividade da polifenoloxidase após saturação do extrato bruto de manjeriço da cv. Genovese com diferentes porcentagens de sulfato de amônio (SA)

SA (% sat)	UA.mim <sup>-1</sup> .mL <sup>-1</sup>	mg proteína.mL <sup>-1</sup>	UA.mim <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> proteína
0	6,634	0,2218	29,90982867
0-20	4,8	1,5081	3,182812811
20-40	11	0,7936	13,8608871
40-60	4,2	0,1273	32,99293009
60-80	6,28	0,079	79,49367089

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 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

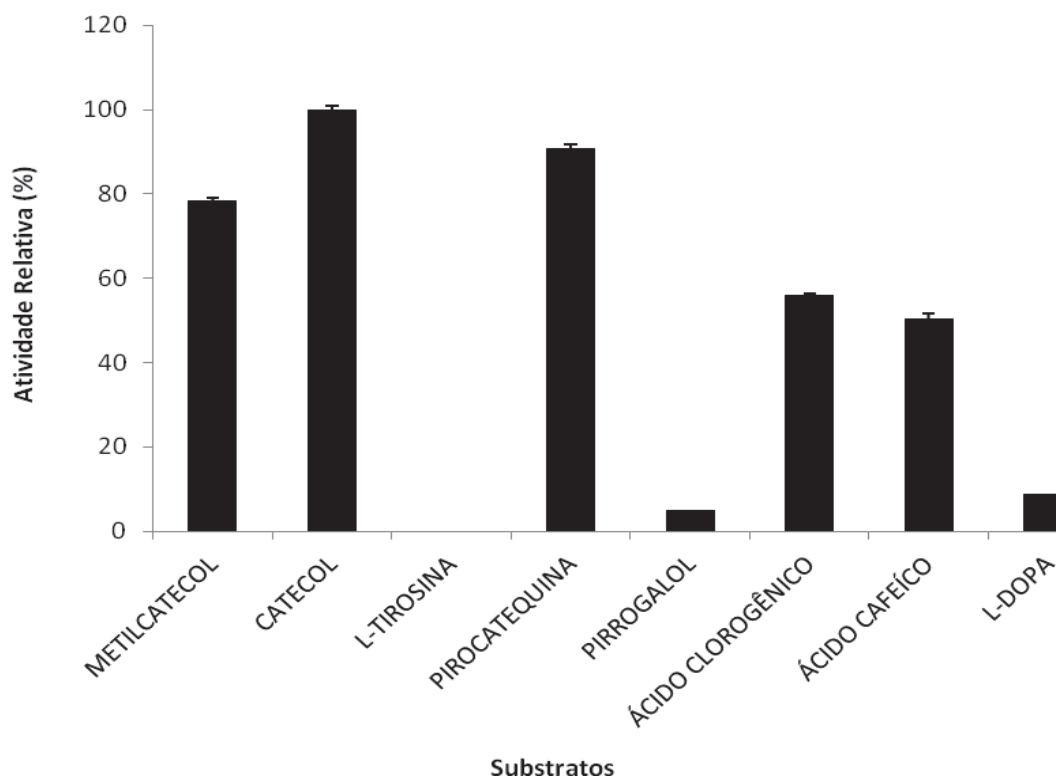
NEVES, 2003). Algumas propriedades da proteína são utilizadas nos procedimentos de separação como: solubilidade, carga iônica, volume hidrodinâmico, tamanho molecular e especificidade de ligação com outras moléculas biológicas (VOET *et al.*, 2002).

A adição de um sal em grandes quantidades precipita seletivamente algumas proteínas (NELSON e COX, 2006). A medida que altas concentrações de sal são adicionadas à solução, a solubilidade da proteína vai decrescendo, devido a 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).

Com a purificação parcial da polifenoloxidase, seguida de diálise, usando a fração de 60 a 80%, houve a caracterização enzimática, analisando os efeitos do pH, da temperatura e dos inibidores sobre o comportamento da enzima.

### **3.3.2 Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de manjerição da cv. Genovese**

Na verificação da especificidade de substrato da PPO com manjerição da cv. Genovese, substratos monofenólicos (L-tirosina) e difenólicos (catecol, 4-metil-catecol, pirocatequina, L-dopa, ácido clorogênico, ácido cafeico, pirogallol) na concentração de 30 mM foram testados. O substrato que proporcionou maior oxidação pela PPO foi o catecol, seguido pela pirocatequina e 4-metil-catecol, enquanto a enzima foi incapaz de oxidar L-tirosina, que é um substrato monofenólico (Figura 1). Um dos pré-requisitos na escolha do substrato foi a alteração da cor da solução, no momento da reação e logo após, diante disso houve a estabilidade dos mesmos. Assim, o substrato de maior afinidade e estabilidade com a PPO, foi o catecol.



**Figura 1.** Efeito de diferentes substratos (30 mM) sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de folhas de *Ocimum basilicum* L. da cv. Genovese. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A utilização de L-tirosina (monofenol) como substrato foi ineficiente (Figura 1), possivelmente houve falta da 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 e SUZUKI, 2003), abacate (GÓMEZ-LOPEZ, 2002), *Mentha piperita* (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001), pera (GAUILLARD e RICHARD-FORGET, 1997), raízes de Aranda ‘Christine 130’ (HO, 1999), frutos de mirtilo (KADER *et al.*, 1997), manga (PRABHA e PATWARDHAN, 1982) e banana (GALEAZZI e SGARBIERI, 1981).

A PPO de cogumelo, batata e fava, catalizam ambas a hidroxilação de monofenóis e a oxidação de orto-difenóis. A PPO presente em folha de manjeriço teve especificidade por catecol, demonstrando atividade para substrato o-difenóis, como reportado para PPO de outras plantas como alcachofra, e nenhuma atividade para

monofenóis, caracterizando-se, portanto, como uma catecolase. Segundo Zawistowski *et al.* (1991) são comuns extratos enzimáticos que não ocorrem atividade da monofenolase. Estes resultados são consistentes com outros estudos indicando que o-difenol, como 4-metil-catecol, catecol, são substratos muito eficientes para difenolases de várias origens. 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). Muitos fatores afetam a cinética da reação catalisada por enzimas como a concentração do substrato, concentração da enzima, ativadores, inibidores, temperatura, pH e força iônica (POLESEL *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Determinação do pH ótimo para a atividade da polifenoloxidase

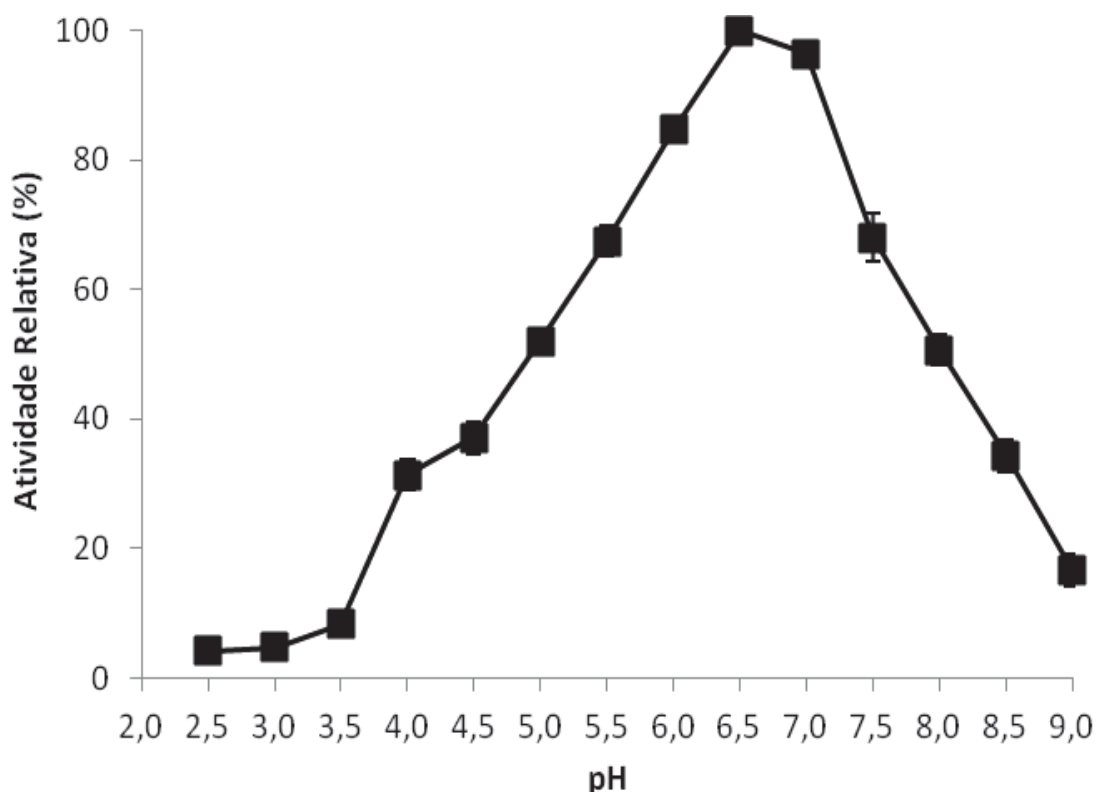
Maior atividade da polifenoloxidase foi encontrada quando o meio de reação utilizado foi o tampão fosfato com pH 6,5 (Figura 2). Este resultado foi semelhante ao da maioria das pesquisas, realizadas com diferentes espécies, causaram máxima atividade da PPO em valores de pH próximos ao neutro. Em frutas de atemóia, o pH ótimo foi de 5,6-6,5 (RODRIGUES CHAVES *et al.*, 2011), alface 6,8 (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2007), lichia 6,5 (SUN *et al.*, 2008), brócolis 5,72 (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2007), batata baroa 7,5 (MENOLLI, 2006), raiz de banana 7,0 (WUYTS *et al.*, 2006), frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra* 7,0 (MDLLULI, 2005), castanha 5,0 (XU *et al.*, 2004), frutas de nêspera 6,5 (DINCER *et al.*, 2002), *Mentha piperita* 7,0 (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001), polpa de banana 6,5 (YANG *et al.*, 2000), morango 5,3 (SERRADELL *et al.*, 2000), batata 6,8 (DUANGMAL E APENTEN, 1999), raízes áreas de Aranda ‘Christine 130’ 7,0 (HO, 1999), *Anethum graveolens* L. 7,0 (ARSLAN e TOZLU, 1997) e maçã “Anna” 5,4 (TREJO-GONZALEZ e SOTO-VALDEZ, 1991).

Gomes *et al* (2001) trabalhando com nove cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a PPO houve atividade máxima em pH 7,2 sobre o catecol. Já trabalhos realizados com batata-doce, demonstraram que o pH ótimo foi em solução de pH 7,0 (PATIL e ZUCKER, 1965). Trabalho realizado com pêssego, na determinação da atividade da

PPO houve maior afinidade com catecol em pH 6,2 (TORALLES *et al.*, 2010). Em trabalhos realizados com hortelã (*Mentha arvensis*) avaliando diferentes substratos em intervalos de pHs 5,5 a 7,0, o pH ótimo na atividade da PPO com o substrato catecol foi 6,5, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho com folhas de manjeriço da cv. Genovese.

O resultado do pH na PPO de manjeriço indicou que a enzima ficou estável dentro da faixa de pH entre 6 e 7 (Figura 2), retendo mais de 80 % da sua atividade. Por outro lado, a enzima foi instável e inativa quando estava nos extremos, sob pH 9,0, houve redução de 87,4% da atividade em comparação com o pH ótimo. Essa redução foi ainda maior sob pH 2,5 com redução de 94,3% (Figura 2). A PPO de frutos de *Sclerocarya birrea* subsp. Caffra (MDLULI, 2005) e *Clocasia esculenta* e *Solanum tuberosum* var. Romano (DUANGMAL e APENTEN, 1999) tiveram baixas atividades sob pHs menores que 4,0, enquanto que feijão Mungo, não foi encontrada atividades 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 mudança 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).



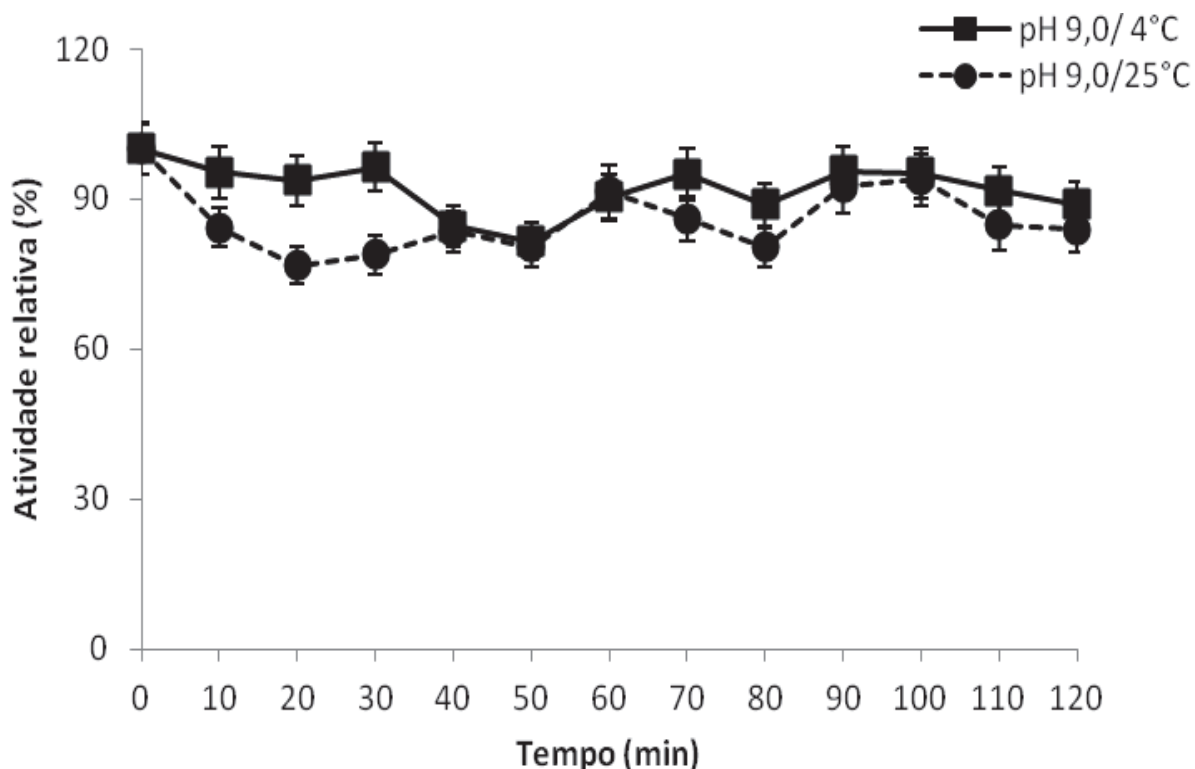
**Figura 2.** Efeito do pH no meio de reação sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de manjeriço cv. Genovese. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Um valor de pH adequado, é essencial para PPO alcançar a atividade máxima, pode variar devido a propriedades genéticas (variedade), natureza do substrato fenólico, método de extração (DUANGMAL e APENTEN, 1999), estágio de maturidade, pureza da enzima e forma da isoenzima (ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991). Segundo Mayer e Harel (1981) o pH ótimo da PPO também está relacionado com a sua localização subcelular e idade do tecido. Nkya *et al.* (2003) encontraram 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.

### 3.3.4 Estabilidade da polifenoloxidase em função do pH

O comportamento da PPO em pH 9,0 com pré-incubação em temperatura ambiente ou gelo, foi diferente do verificado em pH 2,5. Isto porque, não houve redução drástica na atividade da enzima nas duas condições de pré-incubação. A queda da

atividade em pH 9,0 nas duas temperaturas não foi acentuada com 10 minutos de pré-incubação, e a estabilidade ocorreu durante todo período (Figura 3).

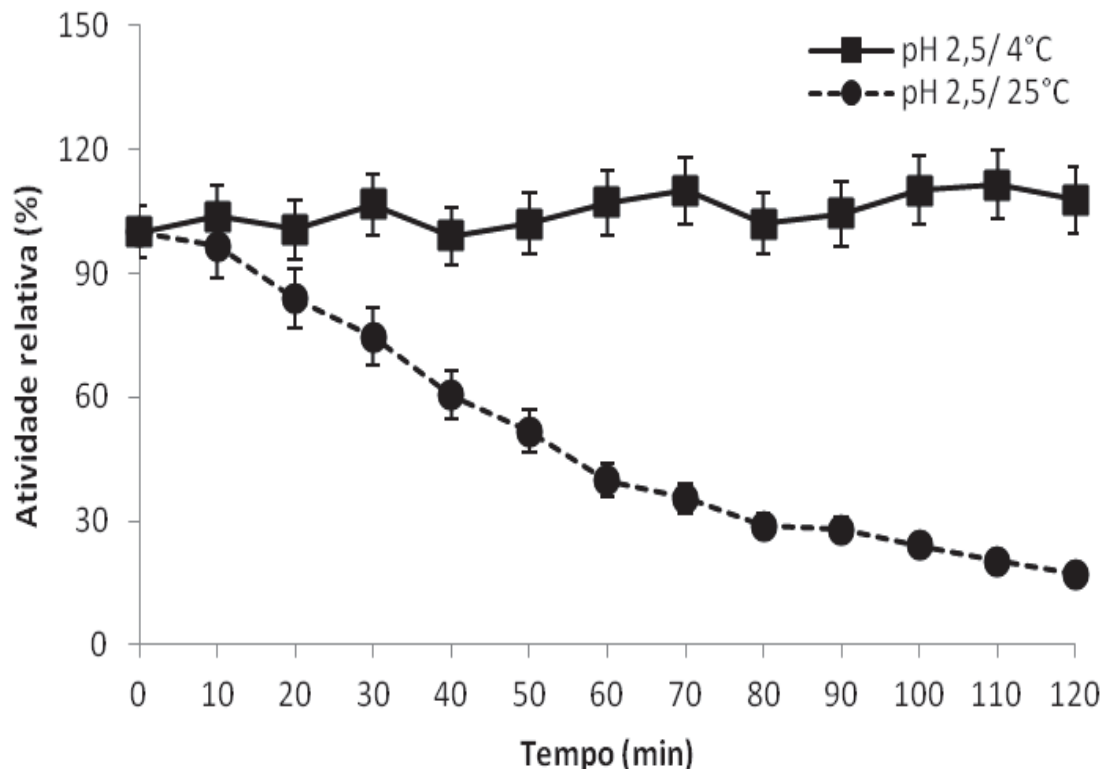


**Figura 3.** Efeito do tempo de pré-incubação em pH 9,0, a 4 e 25 °C, sobre a atividade da polifenoloxidase de manjeriço da cv. Genovese, avaliados em pH 6,0 e a temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

PPO de *Mentha piperita* também se mostrou 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 e 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). Resultado similar foi encontrado em morango (SERRADELL *et al.*, 2000), em ave-do-paraiso (KARSTEN, 2009) e em mandioca *in natura* (RAMOS, 2011) onde, em pH 9 foi verificada leve redução da atividade da PPO.

A pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5, a 25 °C, a partir dos 80 minutos, promoveu redução significativa na atividade da enzima polifenoloxidase em

relação à atividade máxima em pH 6,5 (Figura 4). Não houve o mesmo comportamento da enzima quando pré-incubada em pH 2,5, a 4 °C, quando foi mantida a atividade até os 120 minutos (Figura 4). Com temperatura de pré-incubação de 25 °C o pH ácido reduziu a atividade da PPO, mas não o suficiente para inativá-la completamente.



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

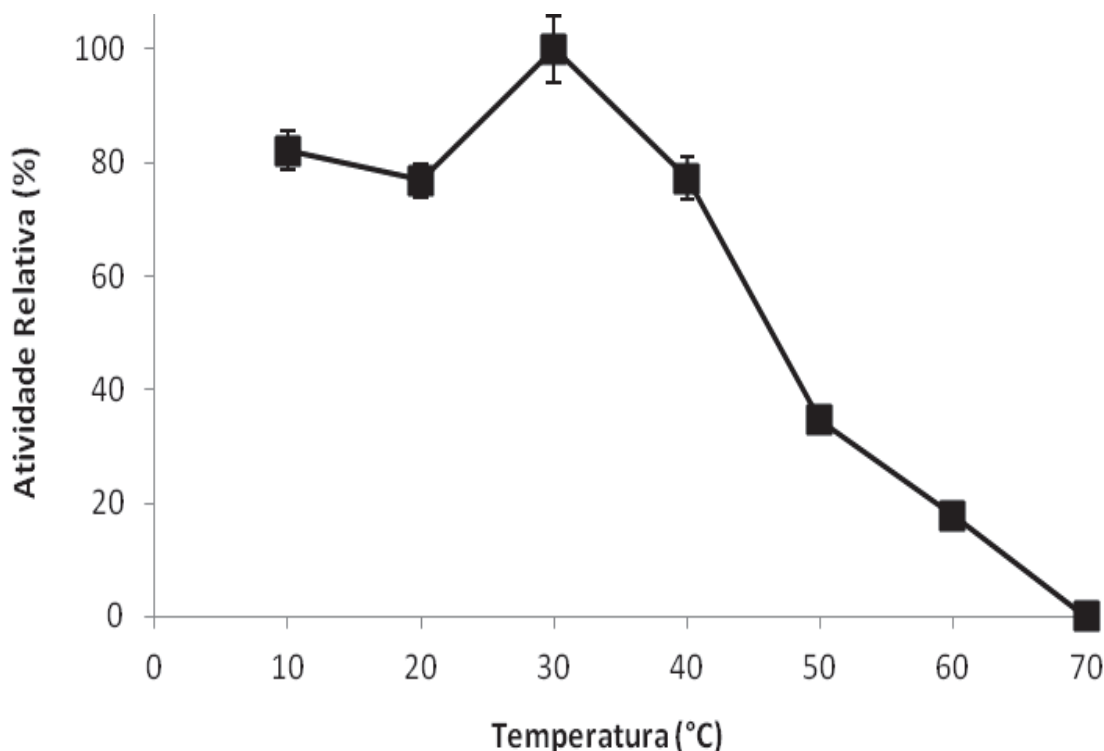
Em trabalho realizado por Zemel *et al.* (1990), a incubação do extrato de maçã, por 20 minutos em pH 2,5, promoveu pequena redução da atividade da PPO, mas quando o tratamento foi prolongado por até 3 horas, a enzima foi praticamente inativada, ocorrendo somente 12% de atividade.

Amostras pré-incubadas em pH 9,0 ao retornarem para condições de ótima atividade (pH 6,5) tiveram capacidade de retornar a atividade (Figura 3). O mesmo não foi observado com as amostras pré-incubadas em pH 2,5 a 25 °C, que devem ter sofrido

danos irreversíveis (Figura 4). Somente a utilização de valores de pHs ácidos possibilitou resultados satisfatórios na inibição da atividade da polifenoloxidase em *Strelitzia reginae* (KARSTEN, 2009), resultado semelhante ao desse trabalho, devido a sua alta instabilidade nessas condições. Não foi testado o efeito do pH superior a 9,0 sobre a atividade da PPO porque segundo Soderhall (1995) há ocorrência de oxidação espontânea do substrato enzimático em pHs elevados, assim os resultados em pH superior a 9,0 não seriam confiáveis.

### **3.3.5 Determinação da temperatura ótima para a atividade da polifenoloxidase**

Na determinação da temperatura ótima sobre a atividade da PPO, temperaturas entre 10 e a 70 °C foram avaliadas, foi utilizado tampão fosfato de sódio com pH 6,5. A PPO teve pico de atividade máxima em temperatura de 30 °C, representando aumento de 82% em relação a sua atividade a 60 °C (Figura 5). Uma temperatura adequada é necessária para conseguir a atividade enzimática máxima. Temperaturas maiores que 30 °C induziram a redução gradativa da atividade, com perda total de sua função catalítica a partir de 70 °C.



**Figura 5.** Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade da enzima polifenoloxidase de manjericão da cv. Genovese. As barras verticais representam o erro padrão da média.

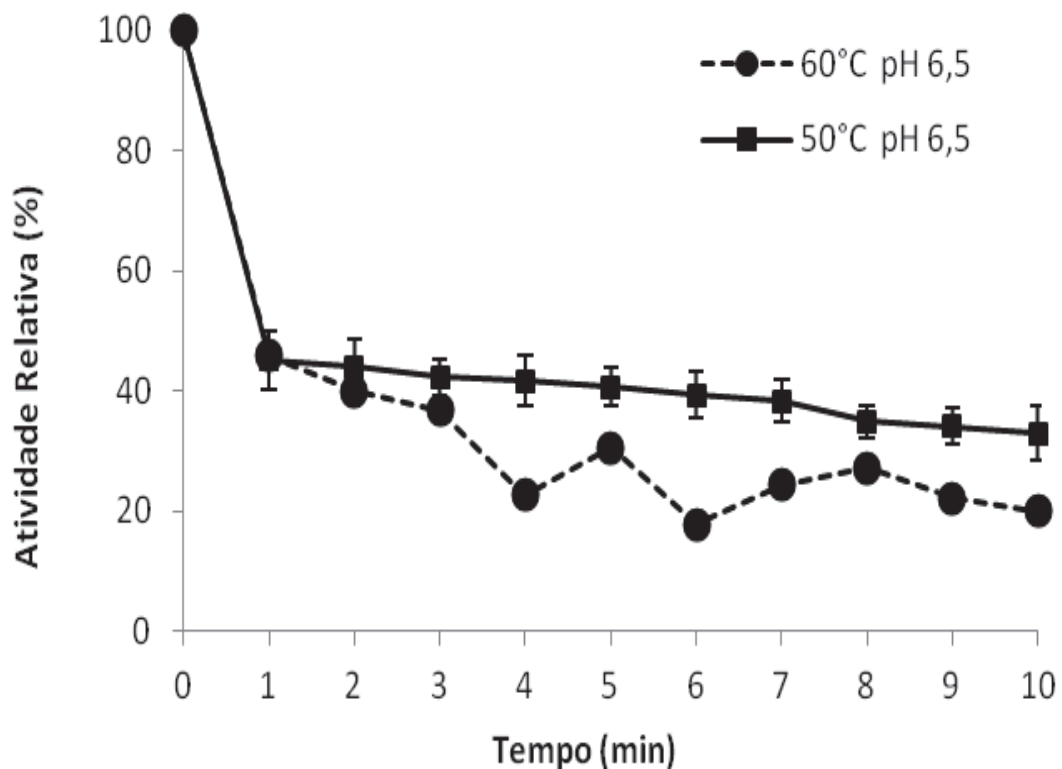
De acordo com a literatura, as maiorias das PPOs tiveram temperatura ótima, dentro dessa faixa encontrada em manjericão da cv. Genovese. Em berinjela, a máxima atividade foi encontrada em 30°C, mais aproximadamente 80% da atividade é mantida entre 0-40 °C (CONCELLÓN *et al.*, 2004). PPO de frutas *Pouteria sapota* teve sua temperatura ótima a 35-45 °C (PALMA-OROZCO *et al.*, 2011), frutas de atemóia 28 °C (RODRIGUES CHAVES *et al.*, 2011), pimenta 30 °C (ARNNOK *et al.*, 2010), alface manteiga 35 °C (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2008), lichia 35 °C (SUN *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 e AYDEMIR, 2001), taro 30 °C, batata 25 °C (DUANGMAL e APENTEN, 1999) e pêssego 37 °C (JEN e KAHLER, 1974).

Toralles *et al.* (2005) em trabalho realizado com termo-desnaturação da PPO em pêssego, variedade Granada, usando o catecol como substrato, demonstrou que a atividade diminuiu rapidamente com temperaturas superiores a 55 °C, já em manjerição da cv. Genovese houve redução na atividade a 50 °C de 65% em relação a 30 °C (Figura 5).

### **3.3.6 Estabilidade térmica da polifenoloxidase**

O tempo de incubação necessária na possível inativação da PPO, as temperaturas de 50 e 60 °C, foi realizada a pré-incubação dos extratos por 10 minutos, sendo retiradas amostras ao percorrer do tempo, seguidas por 30 minutos a 4 °C. A temperatura de 50 °C reduziu em 65% a atividade da PPO, houve uma tendência em manter constante a atividade da enzima por 10 minutos de exposição do extrato (Figura 6), não sendo possível a inativação, enquanto que a 60 °C, 10 minutos de exposição foram suficientes na redução de 80% na atividade enzimática (Figura 6).

Em outros trabalhos de inativação térmica da PPO, como em casca de pinha, a inativação foi observada a 80 e 90 °C, em 49 e 33 segundos, respectivamente, contudo na polpa foram necessários 8 minutos até inativar 90% da PPO (VASCONCELOS, 1993). Em morango, a enzima foi inativada após 30 minutos de exposição à temperatura de 65 °C (SERRADELL *et al.*, 2000), em polpa e casca de maçãs das cultivares Fuji e Gala, a PPO foi inativada após 10 minutos de exposição, à temperatura de 75 °C (VALDERRAMA *et al.*, 2001) e em rizomas de taro e tubérculos de batata, foram necessários 10 minutos à 70 °C (DUANGMAL e APENTEN, 1999). Em manga, o extrato enzimático exposto por 60 minutos a 50, 60, 70 e 80 °C conservou 90, 80, 22 e 0% de atividade, respectivamente (PRABHA e PATWARDHAN, 1982), enquanto que em cenoura (SODERHALL, 1995) a PPO foi inativada após 50 minutos a 50 °C.



**Figura 6.** Efeito do tempo da pré-incubação à 50 e 60 °C sobre a atividade da polifenoloxidase de manjericão da cv. Genovese, avaliada a pH 6,5 e a temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A mudança na estrutura terciária da enzima ocasiona a queda na sua atividade em temperaturas altas. Um aumento na temperatura de incubação aumenta a velocidade da reação, mas simultaneamente leva à desnaturação da enzima, assim a temperatura influencia na atividade enzimática de duas maneiras (SUN *et al.*, 2008).

Segundo Vamos-Vigyazo (1981) a 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. Resultados semelhantes ao obtidos com a PPO de manjericão.

### 3.3.7 Efeito de inibidores na atividade da polifenoloxidase

Na avaliação do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade da PPO de manjeriço da cv. Genovese, utilizou-se os inibidores EDTA, sulfato de sódio, ácido ascórbico, DTT, L-cisteína e tropolone, na concentração de 1mM.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da polifenoloxidase de manjeriço cv. Genovese.

<b>Inibidor ( 1mM)</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
Controle	100
Bissulfito de Sódio	109,91
EDTA	98,02
Sulfato de Sódio	94,14
Tropolone	2,42
Ácido Ascórbico	0
DTT	0
L-cisteína	0

Ácido ascórbico, DTT e L-cisteína foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição, seguido pelo tropolone, agente inibidor específico, com cerca de 98% de inibição. O EDTA, bissulfito de sódio e o sulfato de sódio apesar de serem classificados como inibidores, não mostraram esse efeito sobre a atividade da PPO de manjeriço (Tabela 2).

Em strelitzia 1 mM de EDTA e sulfato de sódio mostraram resultados semelhantes ao desse trabalho (KARSTEN, 2009). Também foi observada a tolerância ao EDTA em PPO na cereja de Barbados (KUMAR *et al.*, 2008). 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).

O metabissulfito de sódio, ácido ascórbico e a L-cisteína tem sido relatados como sendo os inibidores mais eficazes de PPO em ameixa Stanley (SIDDIQ *et al.*, 1992) e nespereira (DINCER *et al.*, 2002), enquanto que na PPO de maçã Monroe, tioureia foi o inibidor mais eficaz, seguido pela L-cisteína e de dietilditiocarbamato de sódio. A este

respeito, a L-cisteína pode formar facilmente complexos com quinonas, inibe a PPO através da formação de produtos secundários, com o-quinona e 4-metilcatecol (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990). Dietilditiocarbamato de sódio e derivados de tioureia inibem a atividade da PPO devido aos seus efeitos sobre o cobre (MAYER e HAREL, 1978) de uma maneira semelhante ao fenol (FAN *et al.*, 2009). A PPO de banana é inibida por dietilditiocarbamato de sódio, cianeto de potássio, L-cisteína e ácido ascórbico, em contraste, EDTA, ácido acético, ácido cítrico e cloreto de sódio não tem nenhum efeito (YANG *et al.*, 2000).

Existem dois tipos principais de inibidores de polifenoloxidase reconhecidos, (a) reagentes que interagem com o cobre na enzima (agentes complexantes que interagem com o cobre do sítio ativo da enzima) e (b) compostos que afetam o local de ligação do substrato fenólico (MAYER, 2006). Além desses, segundo Vamos-Vigyazo (1981) também existe os que atuam sobre os produtos da reação (ácido ascórbico e os tióis). Eles geralmente inibem a formação de melanina, impedindo a acumulação de o-quinonas, ou por formação de produtos estáveis incolores (NICOLAS *et al.*, 1994). Entre estes inibidores, o inibidor mais potente do escurecimento enzimático é o metabissulfito de sódio (KIM *et al.*, 2000). O ácido ascórbico, é normalmente utilizado como um agente antiescurecimento, é um agente de redução preferido ao invés de metabissulfito de sódio (G. PALMA-OROZCO *et al.*, 2011), por meio da sua reatividade dirigida ao sítio para resíduos de histidina é capaz de funcionar com um inibidor da PPO (YORUK e MARSHALL, 2003).

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 capacidade de formar um complexo com o  $\text{Cu}^{2+}$  da PPO levando à redução na atividade. Segundo Luh e Phithakpol (1972) o pH da mistura de reação pode afetar a afinidade do EDTA para com o cobre. Vários são os relatos que demonstraram 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 e PATWARDHAN, 1982). Debowska e Podstolski (2001) encontraram que

baixas concentrações de EDTA estimularam a atividade da difenolase de raízes de *Vanilla planifolia*.

O metabissulfito de sódio pode atuar como um agente redutor para 0-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 e 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 consequente inativação (GOLAN-GOLDHIRSH e WHITAKER, 1984), e 3) pela redução dos intermediários quinonas.

Metabissulfito foi o inibidor que houve maior poder de redução da atividade em *Mentha piperita* (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001), raízes de banana (WUYTS *et al.*, 2006), taro, batata (DUANGMAL e 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).

Agentes redutores fortes, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e ácido ascórbico, inibiram completamente a atividade da PPO, na concentração de 10 mM, em folhas de acelga vermelho (GAO *et al.*, 2009). Os compostos contendo enxofre são conhecidos por serem inibidores potentes específicos de PPO por remoção de quinonas e por sua vez, impedindo-os de participar em reações de melanização e/ou reagir diretamente com a enzima (KONG *et al.*, 2000). Em um estudo recente (AYAZ *et al.*, 2008) a Nêspera foi submetida a um teste com quatro inibidores (metabissulfito de sódio, azida sódica, ácido ascórbico e tiouréia), dentre estes, o metabissulfito foi o mais efetivo, seguido pelo ácido ascórbico; o mesmo resultado foi encontrado na PPO de yacon (NEVES; DA SILVA, 2007) e raiz de bananeira (WUYTS; WAELE; SWENNEN, 2006), onde o metabissulfito demonstrou ser um inibidor eficaz.

O 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 e 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 cisteína, um tiól, é conhecido como um efetivo inibidor do escurecimento enzimático, porém o seu mecanismo de ação sobre a PPO não é completamente elucidado. Efeito de inibição significativa de compostos tiol sobre a atividade da PPO pode ser devido a uma reação adicional com as quinonas na formação de produtos estáveis incolores (IKEDIABI e OBASUYI, 1982), ou devido a uma reação direta dos compostos com a própria PPO, que resultou numa estrutura e/ou mudança de conformação da enzima. A L-cisteína foi proposto para ligar os grupos SH da cisteína com o cobre da PPO na formação de complexos estáveis e, assim, inibir diretamente a atividade da enzima (KIM *et al.*, 2000; ROBERT *et al.*, 1996; FRIEDMAN, 1996). Essa última hipótese foi confirmada por Ding *et al.* (2002) que relataram uma forte afinidade entre grupos SH da cisteína e o cobre. Vários estudos têm demonstrado a sua eficiência na inibição de PPO em suco de maçã (İYIDOĞAN e BAYINDIRLI, 2004), palmito (ROBERT *et al.*, 1996), maçã cultivar Red Delicious (EISSA *et al.*, 2006; RICHARD-FORGET *et al.*, 1992), purê de manga (GUERRERO-BELTRÁN *et al.*, 2005) e outros.

Em manga, 10  $\mu$ M de L-cisteína levou a 100% de inibição (PRABHA e 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-LOPEZ, 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 mecanismo de inibição do ácido ascórbico envolve a redução de quinonas geradas pela PPO. O ácido ascórbico reduz a formação inicial antes da quinona sofrer reações secundárias que conduzem ao escurecimento (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2008), portanto, ele age como um antioxidante e não como um inibidor da enzima, apesar de uma inibição irreversível da PPO foi também observada (GOLAN-GOLDHIRSH e WHITAKER, 1984). A PPO catalisa a oxidação de substâncias fenólicas para o-quinonas enquanto o ácido ascórbico converte as quinonas para compostos fenólicos. Outros dois mecanismos de inibição envolvem a interação direta com a enzima: quelação do cobre do sítio ativo e redução do  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  (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 10mM levou a 96,6% de inibição em alface (GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2008). Em manga, 0,1mM de ácido ascórbico levou a 100% de inibição da atividade da PPO (PRABHA e PATWARDHAN, 1982), enquanto em uva Victoria foram necessários 5mM (RAPEANU *et al.*, 2006), feijão 3mM (NAGAI e SUZUKI, 2003), batata 5 mM e taro 10 mM, na obtenção do mesmo resultado (DUANGMAL e APENTEN, 1999).

O uso de agentes redutores é um método de controle efetivo do escurecimento pela PPO (OSUGA *et al.*, 1994). O ácido ascórbico (vitamina C) e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes no uso em frutas e hortaliças e seus sucos visando prevenir o escurecimento e outras reações oxidativas (WILEY, 1994; RAMALHO e JORGE, 2006). Ele atua sequestrando o cobre, grupo prostético da polifenoloxidase, e reduzindo quinonas, formadas enzimaticamente, a difenóis incolores antes de formarem pigmentos escuros (SAPERS e MILLER, 1998). Também podem reagir irreversivelmente com as o-quinonas formando compostos incolores estáveis; porém o efeito dos agentes redutores é temporal, pois os difenóis são consumidos na reação (LOZANO-DEGONZÁLEZ e DRUDIS-BISCARRI e IBARZ-RIBAS, 1994).

Alguns antioxidantes denominados agentes quelantes estão sendo usados como inibidores da PPO; eles atuam formando um complexo com o  $\text{Cu}^{2+}$  e bloqueando o sítio ativo da enzima (SAPERS *et al.*, 1989; MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, 1990; MCEVILY; IYENGAR, 1992a). A PPO pode ser inibida por vários agentes quelantes tais como cianeto, monóxido de carbono, tropolone, 2-mercaptobenzotiazol, azida, ácido cítrico e ácido etileno diamino tetra cético (EDTA) (WALKER, 1975). Tropolone é estruturalmente análogo a um substrato o-difenol, que é um quelante de cobre eficaz, reagindo como um inibidor competitivo e um potente inibidor da dopamina  $\beta$  hidroxilase e da PPO do cogumelo (ESPIN e WICHERS, 1999). Em estudos de inibição, tropolone a 1 mM mostrou 85% de inibição na PPO de uva Dominga (NUNEZ-DELICADO *et al.*, 2005), assim como 80% de inibição em PPO de bananas com a mesma condições (SOJO *et al.*, 1998). PPO de caqui também foi inibida 100% por ácido ascórbico e tropolone a 1 mM (NUNEZ-DELICADO *et al.*, 2003).

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).

Do ponto de vista prático a aplicação de L-cisteína e o ácido ascórbico são úteis na prevenção e/ou controle do escurecimento enzimático de manjeriço da cv. Genovese, já que não é somente um forte inibidor de PPO, como também nutritivo e não tóxico.

### 3.4 CONCLUSÕES

A otimização do ensaio enzimático na PPO de folha de manjeriço foi conseguida quando o extrato foi saturado entre 60 e 80% com sulfato de amônio e a reação se processou em pH 6,5, a 30 °C, utilizando-se catecol como substrato.

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

A pré-incubação em altas temperaturas foram capazes de reduzir ou inativar completamente a atividade da enzima.

Ácido ascórbico, DTT, L-cisteína levaram à inibição completa da PPO de manjeriço comercial, enquanto o tropolone levou a 98% de inibição na atividade da enzima.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. **Ethylene in plant biology**. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, 1992.

AHARONI, N.; DVIR, O.; CHALUPOWICZ, D.; AHARON, Z. Coping with postharvest physiology of fresh culinary herbs. **Acta Hort.** v. 344, p.69–78, 1993.

AHARONI, N. Postharvest physiology and technology of fresh culinary herbs. **Israel Agrisearch**. v.7, p. 35–59 (In Hebrew, English summary), 1994.

AHARONI, N.; KENIGSBUCH, D.; CHALUPOWICZ, FAURA-MLINSKI, M.; AHARON, Z.; MAURER, D.; OVADIA, A.; LERS, A. Reducing chilling injury and decay in stored sweet basil. **Israel Journal of Plant Sciences**. v.58, p. 167–181, 2010.

ANTUNES, L. E. C.; FILHO, J. D.; SOUZA, C. M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.38, n. 3, p. 413-419, 2003

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. In: Catalase e peroxidase. UFV, cap.13, p. 313 –318, 2001.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 477, 2008.

ARNNOK P.; RUANGVIRIYACHAI C.; MAHACHAI R.; TECHAWONGSTIEN S.; CHANTHAI S. Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarb. Int. **Food Res. J.** v.17, p. 385-392, 2010.

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

ASADA K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p. 601-639, 1999.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, p.114, 1993.

AYAZ, F. A.; DEMIR, O.; TORUN, H.; KOLCUOGLU, Y.; COLAK, A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. **Food Chemistry**. v.106, p. 291-298, 2008.

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

BARBAGALLO, R. N.; CHISARI, M.; PATANÉ, C. Polyphenol oxidase, total phenolics and ascorbic acid changes during storage of minimally processed “California Wonder” and “Quadrato d’Asti” sweet peppers. **LWT -Food Science and Technology** v.49, p. 192–196, 2012.

BARITAUX, O.; AMIOT, M.J.; NICOLAS, J. Enzymatic browning of basil (*Ocimum basilicum* L.): studies on phenolic compounds and polyphenol oxidase. **Science Aliment**. v.11, p. 49–62, 1991.

BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acesos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n. 1, p. 113-116, 2004.

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

CANDAN, A. P.; GRAELL, J.; LARRIGAUDI’ERE, C., Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p.107–112. 2008.

CANO, P.; MARIN, M.A.; FUSTER, C. Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana (*Musa cavendishii*, var enana). **Journal Science Food Agric.**, v.51, p. 223-231, 1990.

CANTWELL, M.I.; REID, M.S. Postharvest handling systems: fresh herbs. In: Kader, A.A. (Ed.), **Postharvest Technology for Horticultural Crops**. University of California Press, California, p. 327–331, 2002.

CANTWELL, M.I.; REID, M.S. Postharvest physiology and handling of fresh culinary herbs. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**. v.1, p. 93–127, 1993.

CANTWELL, M.I.; REID, M.S. Postharvest physiology and handling of fresh culinary herbs. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.1, p.93-127, 1994.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**. v.93, p. 223-226, 2005.

CHAZARRA, S.; CABANES, J.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-*tert*-butylcatechol in the presence of SDS. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1339, p. 297-303,1997.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 785 p, 2005.

CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, Kidlington/ Oxon, v.49, p.29-36, 1998.

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

COOPER, T.G. **The tools of biochemistry**. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 423, 1977.

COSTA, A. S. **Conservação pós-colheita, sintomas e respostas fisiológicas da senescência e injúria por frio em hastes florais de *Heliconia bihai* (L.)**. 83 p. Tese (Doutorado em Botânica)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.2009

COUEY, H.M. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. **Hort Science** v.17, p. 162–165, 1982.

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

DELLA-JUSTINA, M. E. **Conservação pós-colheita do quiabo influenciada por idade, dano mecânico, filme de PVC e temperatura.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

DELLA-JUSTINA, M.E.; FINGER, F.L.; PUIATTI, M. Perda pós-colheita da matéria fresca e da água em quiabo influenciada pelo tamanho do fruto e dano mecânico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.1, n.23, p.37- 40, 1998.

DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). **Food Chemistry**. v.77, p. 1-7. 2002.

DING, C.K.; WANG, C.Y.; GROSS, K.C.; SMITH, D.L. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta**. v.214, p. 895–901, 2002.

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

EISSA, H. A.; FADEL, H. H. M.; IBRAHIM, G. E.; HASSAN, I. M.; ELRASHID, A. A. Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. **Food Research International**, Ottawa, v.39, n.8, p.855-863, 2006.

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

EMBS, R.J. AND MARKAKIS, P. The mechanism of sulphite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. **Journal Food Science**. v.30, p. 753-758, 1965.

ERAT, M., SAKIROGLU, H., KUFREVIOGLU, O. I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**. v.95, p. 503-508, 2006.

ESPIN, J. C.; VAN LEEUWEN, J.; WICHERS, H. J. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.47, p.3509-3517. 1999

FAN, T.; ZHANG, Y.; YANG, L.; YANG, X.; JIANG, G.; YU, M.; CONG, R. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. **Comp. Biochem. Physiol., Part B** 152, p.144–149, 2009.

FLURKEY, W. H.; JEN, J. J. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. **Journal of Food Science**. v.43, p. 1828-1831, 1978.

FLURKEY, W.H.; JEN, J.J. Hydrophobic adsorption chromatography of peach polyphenol oxidase. **Journal Food Science**. v.45, p.1622-1624, 1980.

FRIEDMAN, H., Rot, I. Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camara* cuttings. **Postharvest Biology and Technology**. v.40, p. 244–249. 2006

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: An overview. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.44, p.631–653, 1996.

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

GAO, H.-J.; YANG, H.-Q.; WANG, J.-X. Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. **Sci. Hortic**. v.119, p. 147–152, 2009.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F. Polyphenoloxidases from Williams pears (*Pyrus communis* L., cv Williams): activation, purification and some properties. **Journal of the Science of Food Agriculture**. v.74, p.49-56, 1997.

GAWLIK-DZIKI, U.; SZYMANOWSKA, U.; BARANIAK, B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food Chemistry**. v.105, p. 1047-1053, 2007.

GAWLIK-DZIKI, U.; ZLOTEK, U.; SWIECA, M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). **Food Chemistry**. v.107, p. 129-135, 2008.

GOLAN- GOLDHIRSH, A.; WHITAKER, J. R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfate and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.32, p. 1003- 1009, 1984.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 69-72, 2001.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical proprieties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**, v. 77, p. 163-169, 2002.

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

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. **LWT**, v. 38, p. 625-630, 2005.

GROSS, M. Flavonoids and cardiovascular disease. **Pharmaceutical Biology**, 42(supplement), p. 21–35, 2004.

HAMMER, F.E. Oxidoreductases. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes in food processing**. San Diego, Academic Press, 1993.;

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends Food Science Technology**. v.7, p. 8-15, 1996.

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

HOLTMAN, W. L.; HEISTEK, J. C.; MATTERN, K. A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A. C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**. v.99, p. 43–53. 1994.

HUANG, S.; HART, H.; LEE, H.; WICKER, L. Enzymatic and colour changes during post-harvest storage of lychee fruit. **J. Food Sci.**, v.55, p.1762-1763, 1990.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**. v.60, p. 651-674. 2002.

IKEDI OBI, C. O AND OBASUYI, H. N. Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. **Phytochemistry**. v.21, p. 2815-2820, 1982.

INIBAP, Internation Network for the Improvement of Banana and Plantain. Medición del color de frutas y vegetales. In: **Oferta tecnológica de banano y plátano para América latina y el Caribe: una contribución de MUSALAC a La investigación y desarrollo de las Musáceas**. Turrialba, p. 103, 2002.

INSKEEP, W.P.; BLOOM, P.R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone. **Plant Physiology**. v.77, p. 483-5, 1985.

İYIDOĞAN, N. F.; BAYINDIRLI, A. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.3, p.299-304, 2004.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; MARANGONI, A.; PARKIN, K.L.; STANLEY, D.W. Chilling injury. A review of quality aspects. **Journal of Food Quality**, n.11, p.253-278, 1988.

JANOVITZ-KLAPP, A.H.; RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; NICOLAS, J.J. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. **J. Agric. Food. Chem.** v.38, p. 926–931, 1990.

JEN, J. J., & KAHLER, K. R. Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the Southeast. **Hortscience**. v.9, p.590–591, 1974.

JIANG, Y.; DUAN, X.; JOYCE, D.; ZHANG, Z.; LI, J. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. **Food Chem**. v.88, p. 443–446, 2004.

JOYCE, D. C.; REID, M.S. AND P. KATZ. **Postharvest technology of fresh horticultural crops**. Cooperative Extension, Univ. of California, Issue 58, 1986.

KADER, F.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. **Journal of Science of Food and Agriculture**. v.73, p.513-516, 1997.

KADER, A.A.; ZAGORY, D.; KERBEL, E.L Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.28, n. 1, p.1-30, 1989.

KAHN, V. Effect of proteins, protein hydrolysates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. **J. Food Sci.**, v.55, p.111-115, 1985.

KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiol.**, v.57, p.315-319, 1976.

KARSTEN, J. 2009. **Envolvimento da Peroxidase e Polifenoloxidase no Bloqueio Xilemático de Hastes de Ave-do- Paraíso (*Strelitzia reginae*)**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

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

KAWAKAMI, S. *et al.* Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. **Plant Science**. v.163, n.1, p.829-836. 2002

KAYS, S. J. **Postharvest physiology of perishable products**. New York: AVI, p. 532, 1991.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Polyphenoloxidase. In: Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.), **Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality**. Marcel Dekker, New York, p. 271–315, 2000.

KONG, K. H.; HONG, M. P.; CHOI, S. S.; KIM, Y. T. Purification and characterisation of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.31, p. 113–118, 2000.

KOSUGE, T. The rate of phenolics in host response to infection. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 7, p. 195-222, 1969.

KUDREV, T. G. **Água: vida das plantas**. São Paulo: Ícone, p. 178, 1994.

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

KUMAR, V. B. A.; MOHAN, T. C. K.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) **Food chemistry**. v.110, p. 328-333, 2008.

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

LAGRIMINI, L. M.; GINGAS, V.; FINGER, F.; ROTHSTEIN, S.; LIU T, T. Y. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. **Plant Physiology**. v.114, p. 1187-1196, 1997.

LAGRIMINI, L.M.; ROTHSTEIN, S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**. v.84, p. 438-442, 1987.

LAMIKANRA, O. Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables. In: LAMIKANRA, O. (Ed.), **Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market**. CRC Press, Florida, p. 125–185, 2002.

LANA, M.M.; FINGER, F.L. **Atmosfera modificada e controlada: aplicação na conservação de produtos hortícolas**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 34, 2000.

LANGE, D.L.; CAMERON, A.C. Postharvest shelf life of sweet basil (*Ocimum basilicum*). **HortScience**. v.29, p.102–103, 1994.

LANGE, D.L.; CAMERON, A.C. Pre and postharvest temperature conditioning of greenhouse-grown sweet basil. **HortScience**. v.32, p. 114–116, 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Carlos: RIMA, p. 531, 2006.

LAURENTE, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertrhoa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v.27, p. 159-163, 2005.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**. v.159, p. 75–85, 2000.

LEE, J.; SCAGEL, C. F. Chicoric acid found in Basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, v.115, p. 650–656, 2009.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v.56, p. 21-26, 1999.

LIMA, M. A.; DURIGAN, J. F. Conservação de goiaba ‘Pedro Sato’ associando-se refrigeração com diferentes embalagens plásticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 232-236, 2000.

LOZANO-DE-GONZÁLEZ, P. G.; DRUDIS-BISCARRI, R.; IBARZ-RIBAS, A. Enzymatic browning in apple pulps. **Journa of Food Science**. v.59, p. 564-567, 1994.

LUH, B. S.; PHITHAKPOL, B. Characterization of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. **Journal of Food Science**. v.37, p. 264-268, 1972.

MACRAE, E.A.; FERGUSON, I.B. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. **Physiology Plant**. v.65, p. 51–56, 1985.

MAGEE, J. B. Storage quality evaluation of Southern highbush blueberry cultivars Jubilee, Magnolia and Pearl River. **Fruit Varieties Journal**, University Park, 53, n. 1, p. 10-15, 1999.

MAKRI, O.; KINTZIOS, S. *Ocimum sp.* (basil): Botany cultivation, pharmaceutical properties and biotechnology. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v.13, p. 123–150, 2007.

MARQUES, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. **Plant Physiol. Biochem**. v.33, p. 193-200, 1995.

MARQUES, L.; FLEURIET, A.; CLEYET-MAREL, J. C.; MACHEIX, J. J. Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion. **Phytochemistry**, v.36, p. 1117-1121, 1994.

MARSHALL, R.M.; KIM, J.; WEI, C-I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. **FAO**, 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/enzimatic%20browning.html>. Acesso em: 06 Nov. 2014.

MARTÍNEZ, M.V.; WHITAKER, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Sci. Technol.**, v.6, p.195-200, 1995.

MATSUMURA, T.; TABAYASHI, N.; KAMAGATA, Y.; SOUMA, C.; SARUYAMA, H. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. **Physiologia Plantarum**. v.116, p. 317–327, 2002.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**. v.18, p. 193–215, 1978.

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

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in fruits- Changes during ripening. In: Friend, J. & Rhodes, M.J.C. (eds). **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables**. London, Academic Press Inc. Ltd., p.161-180, 1981.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**. v.67, p. 2318-2331, 2006.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.32, p.253-273, 1992.

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

MDLULI, K. M. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**. v.92, p. 311-323, 2005.

MEIR, S.; TWITO, L.; PHILOSOPH-HADAS, S. Correlation studies between chilling sensitivity of stored basil leaves and their composition of membrane lipids. In: J.C. Kader, and P. Mazliak (Editors), **Plant Lipid Metabolism**. Kluwer, Dordrecht, p. 381-383, 1995

MEIR, S.; RONEN, R.; LURIE, S.; PHILOSOPH-HADAS, S. Assessment of chilling injury during storage: chlorophyll fluorescence characteristics of chilling-susceptible and triazole-induced chilling tolerant basil leaves. **Postharvest Biology and Technology**, v.10, p. 213-220, 1997.

MENOLLI, L. N. 2006. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 63p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MESSIAS, U. **Resposta pós-colheita a injúria por frio de três cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MESSIAS, U.; GALVÃO, H.L.; FINGER, F.L.; OLIVEIRA, J.A. de; CORRÊA, P.C. Resposta pós-colheita do manjeriço à indução da injúria por frio. *Revista Bras. Armaz.* v.31, p. 103-108, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** v.7, p.405–410, 2002.

MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.52, p. 561–591, 2001.

MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino-acids. Apples and tomatoes. **J. Agric. Food Chem.**, v.38, p.1652-1656,1990.

MONTAVON, P.; KUKIC, K. R.; BORTILIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**. v.360, p. 207-215, 2006.

MORRIS, L.L. Chilling injury of horticultural crops: an overview. **HortScience**, Alexandria, v.17, n.2, p. 157-158, 1982.

NAGAI, T., SUZUKI, N. Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine Max* L.). **Journal of Food Science**. v.68, p. 16-20, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier. 120 p, 2006.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**. v.50, p. 1–7, 2004.

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

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

NEVES, V. A.; DA SILVA, M. A. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 2424-2430, 2007.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 34, p. 109-157, 1994.

NICOLI, M. C.; ELIZALDE, B. E.; PIOTTI, A.; LERICI, C. R. Effect of sugars and Maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. **J Biochem** v. 15, p. 169–84, 1991.

NKYA, E., KOUNO, C., LI, Y-J., YANG, C. P., HAYASHI, N., FUJITA, S. Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemisrty**. v.51, p. 5467-5471, 2003.

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

NUNEZ-DELICADO, E., SERRANO-MEGIAS, M., PEREZ-LOPEZ, A.J., LOPEZ-NICOLAS, J.M. Polyphenol oxidase from Dominga table grape. **J. Agric. Food. Chem.** v.53, p. 6087– 6093, 2005.

NÚÑEZ-DELICADO, E.; SOJO, M. M; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A., Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2058-2063, 2003.

OKTAY, M.; KÜÇAÇALISKAN, I.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **J. Food Sci.**, v.60, n.3, p. 494-496,1995.

OSE, K., CHACHIN, K., IMAHORI, Y. Browning mechanism of water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) stored at low temperature. In: CHANG, Y.L., WHITAKER, J.R. (Eds.), **Enzymatic Browning and its Prevention**. ACS Symposium Series 600, Washington, DC, p. 178–187, 1995.

OSUGA, D.; VAN DER SCHAAF, A.; WHITAKER, J. R. In: YADA, R. Y., JACKMAN, R. L., SMITH, J. L. (Ed.). **Protein structure – function relationships in foods**, New York: Champman and Hall, p. 62-88, 1994.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. **Fisiologia e produção vegetal**. Lavras: UFLA, p. 104, 2006.

PALMA-OROZCO, G., ORTIZ-MORENO, A., DORANTES-ALVAREZ, L., SAMPEDRO, J. G., & NAJERA, H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). **Phytochemistry**, v.72, p. 82–88, 2011.

PALOU, E. et al. Polyphenoloxidase activity and calow of blanched and high hydrostatic pressure treafed banana puree. **Journal Food Science**, v.64, n. 1, p. 42-45, 1999.

PARK KW; KANG HM; YANG EM; JUNG JC. Effects of film package and storage temperature on the quality of parsley in modified atmosphere storage. **Acta Horticulturae**. v.483, p. 291-298, 1999.

PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C., DUNAND, C. Peroxidase have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**. v.24, p. 255-265, 2005

PATIL, S. S., ZUCKER, M. Potato phenolases: Purification and properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n.10, p. 3.938-3.943, 1965.

PATON, A., HARLEY, R. M., HARLEY, M. M. ***Ocimum: an overview of relationships and classification.*** IN: HOLM, Y., HILTUNEN, R. *Ocimum* medicinal and aromatic plants: Industrial Profiles. (Series Ed. Harman), Amsterdam: Harwood Academic, p. 1-389, 1999.

PHILOSOPH-HADAS, S.; MEIR, S.; AKIRI, B.; KANNER, J. Oxidative defense systems in leaves of three edible herbs species in relation to their senescence rates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.42, p.2376-2381, 1994.

POLESEL, D. N., SINHORINI, A. L. C., PERONE, C. A. S. Caracterização cinética da enzima catecolase (Polifenoxidase) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Journal of Health Sciences Institute**, v. 28, n. 2, p.175-80, 2010.

PONGPRASERT, N., SRILAONG, V. Effect of leaf maturity on chilling injury sensitivity of ready-to-cook sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) **Acta Hort.** v.746, p. 351–355, 2007.

POSMYK, M.M., BAILLY, C., SZAFRAN' SKA, K., JANAS, K.M., CORBINEAU, F. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. **J. Plant Physiol.** v.162, p. 403–412, 2005.

PRABHA, T.N., PATWARDHAN, M.V. Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). **J. Biosci.**, v.4, n.1, p.69-78, 1982.

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

PUTIEVSKY, E., GALAMBOSI, B. Production systems of sweet basil, vol. 10. In R. HILTUNEN., Y. HOLM (Eds.), **Basil: The genus *Ocimum***. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 39–65, 1999.

RAISON, J.K., ORR, G.R. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. In: Wang, C.Y. (Ed.), Influence of Chilling Stress on Ethylene Production. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, p. 146–164, 1990.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 7, p. 755-760, 2006.

RAMOS, P. A. S. 2011. **Papel das enzimas oxidativas na deterioração fisiológica de mandioca**. 87 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

RAPEANU, G.; LOEY, A. V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chemistry**. v.94, p.253-261, 2006.

REID, M. S. Effects of low temperatures on ornamental plants. **Acta Horticulturae, Leuven**, v.298, p. 215-223, 1991.

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

RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; NICOLAS, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.40, p. 2108-2113, 1992.

ROBERT, C.; RICHARD-FORGET, F.; ROUCH, C.; PABION, M.; CADET F. A Kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Pergamon, v.28, n.4, p.457-463, 1996

RODRIGUES CHAVES, I., DE SOUZA PEREIRA, E., APARECIDA DA SILVA, M., & AUGUSTO NEVES, V. Polyphenoloxidase from atemoya fruit (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v.35, p. 1583–1592, 2011.

SALA, J.M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarins fruits. **Posth. Biol. and Technol.**, v.13, p.255-261, 1998.

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

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B.; PHILLIPS, J. G.; GARZARELLA, L. G.; PONDISH, D. L.; MATULAITIS, R. M.; MCCORMAC, T. J.; SONDEY, S. M.; SEIB, P. A.; ELATAWY, Y. S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. **J. Food Sci.**, v. 54, p. 997- 1002, 1989.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **J. Food Sci.**, v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p. 7-12, 1993.

SEGEL, I.H. Enzimas. In: bioquímica teoria e problemas. **Livros técnicos científicos**, ed SA, p. 257-392, 1979.

SERRADELL, M. de los A., ROZENFELD, P.A., MARTÍNEZ, G.A., CIVELLO, P.M., CHAVES, A.R., AÑÓN, M.C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x Ananassa*, Duch., cv Selva): Characterization and partial purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.80, p. 1421-1427, 2000.

SHAFRAN, E., DUDAI, N., MAYER, A.M. Polyphenol oxidase in *Ocimum basilicum* during growth, development and following cold stress. **J. Food Agr. Environ**. v.5, p. 254–257, 2007.

SHAN, B., CAI, Y. Z., SUN, M., & CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p. 7749–7759, 2005.

SHARON, A., ELAD, Y., BARAKAT, A., TUDZYNSKI, P. **Phytohormones in Botrytis-plant interactions**. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delon, N., eds. Chapter 10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p. 163–179, 2004.

SHEWFELT, R.L., PURVIS, A.C. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. **Hortscience**. v.30, p. 213–218, 1995.

SHIN, R., FRODERMAN, T., FLURKEY, W.H. Isolation and characterization of a mungo bean leaf polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v.45, n.1, p.15-21, 1997.

SIDDIQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 1177-1179, 1992.

SINGH-SANGWAN, N. et al. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, London, v. 128, p. 173-179, 1994.

SODERHALL, I. Properties of carrot polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v.39, n.1, p.33-38, 1995.

SOJO, M. M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; GARCÍA-CARMONA, F. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 4924-4930, 1998.

STEWART, R.J., SAWYER, B.J.B., BUCHELE, C.S., ROBINSON, S.P. Polyphenoloxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.28, p.181-191, 2001.

SUN, J., SHIN, J., ZHAO, M., XUE, S. J., REN, J., JIANG, Y. A comparative analysis of property of lychee polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. **Food Chemistry**. v.108, p. 818-823, 2008.

SURVESWARAN, S., CAI, Y.-Z., CORKE, H., & SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v.102, p. 938–953, 2007.

TORALLES, R. P., VENDRUSCOLO, J. L., VENDRUSCO, C. L., DEL PINO, F. A. B., ANTUNES, P. L. Controle da atividade da polifenol oxidase de pêssego por interação do pH, da temperatura e da concentração de ácido ascórbico. **Brazilian Journal Food Technology**. Campinas. v.13, n.2, p.120-127, 2010.

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T.; DEL PINO, F. A. B.; ANTUNES, P. L. Properties of polyphenoloxidase and peroxidase from 'Granada' clingstone peaches. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.8, n.3, p.233-242, 2005.

TREJO-GONZALES, A., SOTO-VALDEZ, H. Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from 'Anna' apple. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.116, n.4, p.672-675, 1991.

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

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.21, n. 3, p. 321-325, 2001.

VALERO, E., VARON, R., GARCIA-CARMONA, F. Characterization of polyphenoloxidase from airen grapes. **J. Food Sci.**, v.53, p.1482, 1988.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 15, p. 49-127, 1981.

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

VAUGHN, K. C.; LAX, S. O.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiol. Plant.**, v. 72, p. 659-665, 1988.

VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W. Enzimas. In: Basso, L. A. (ed.) **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, p. 279-349, 2002.

WALTER, W.M., PURCELL, A.E. Effect of substrate levels and polyphenoloxidase activity on darkening in sweet potato cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v.28, p.941, 1980.

WALKER, J. R. L. Enzymic browning in food. A review. **Enzyme Technol. Dig.**, v. 4, n. 3, p. 89-100, 1975.

WHITLOW, T.H., N.L. BASSUK, T.G. RANNEY., D.L. REICHERT. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. **Plant Physiol.** v.98, p.198–205, 1992.

WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**, London: Chapman & Hall, p. 357, 1994.

WONG, T. C., LUH, B. S., WHITAKER, J. R. Isolation and purification of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. **Plant Physiology.** v.48, p.19-23, 1971.

WONGSHEREE, T., KETSA, S., VAN DOORN, W. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum x citriodourum*) leaves. **Postharvest Biol. Technol.** v.51, p. 91–96, 2009.

WUYTS, N.; WAELE, D. D.; SWENNEN, R. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p. 308-314, 2006.

XU, J., ZHENG, T., MEGURO, S., KAWACHI, S. Purification and characterization polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). **Journal Wood Science**. v.50, p. 260-265, 2004.

YAMASHITA, F.; TONZAR, A. C.; FERNÁNDEZ, J. G.; MORIYA, S.; BENASSI, M. de T. Influencia de diferentes embalagens de atmosfera modificada sobre a aceitação de uvas finas de mesa variedade 'Itália' mantidas sob refrigeração. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v.20, n. 1, Campinas, 2000.

YAMAUCHI, N., WATADA, A. E. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** v.116, p. 58-62. 1991.

YANG, C. P., FUJITA, S., KOHNO, K., KUSUBAYASHI, A., ASHAFUZZAMAN, M., HAYASHI, N. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p. 1446-1449, 2001.

YANG, C.-P.; FUJITA, S.; ASHRAFUZZAMAN, M. D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. **J. Agric. Food Chem.** v.48, p. 2732-2735, 2000.

YANG, A., CAO, S., YANG, Z., CAI, Y., ZHENG, Y. Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. **Food Chemistry**. v.129, p. 1619–1622, 2011.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **J. Food Biochem.** v.27, p. 361-422, 2003.

ZAUBERMAN, G., FUCHS, Y., ROT, J., WEXLER, A. Chilling injury, peroxidase, and cellulase activities in the peel of mango fruit at low temperature. **HortScience**, v.23, n.4, 732-733, 1988.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol oxidase In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Oxidative Enzymes in Foods**. London: Elsevier Science Publishers, p. 217-273, 1991.

ZEMEL, G. P.; SIMS, C. A.; MARSHALL, M. R.; BALABAN, M. Low pH inactivation of polyphenol-oxidase in apple juice. **J. Food Sci.**, v. 55, p. 562-563, 1990.

ZGÓRKA, G., & GLOWNIAK, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.26, p. 79–87, 2001.

ZHANG, R., ZENG, O., DENG, Y., ZHANG, M., WEI, Z. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**. v.136, p. 1169-1176, 2013.

## CONCLUSÕES GERAIS

As folhas com maior qualidade durante o período de conservação foram refrigeradas a 10 °C, em relação às folhas refrigeradas a 5 °C com maior grau de escurecimento.

Houve maior extravasamento de eletrólitos em folhas de manjeriço refrigeradas a 5 °C coincidindo com o maior grau de injúria por frio e a 10°C não ocorreu essa relação.

Os teores de clorofilas totais, os parâmetros de cor a\*, b\* e Chroma foram semelhantes nas folhas refrigeradas a 5 e 10 °C. Houve perda de brilho (L) no segundo dia de avaliação nas folhas mantidas a 5 °C.

O aumento da atividade da catalase coincidiu com o aumento dos sintomas de injúria por frio e foi observada relação entre a atividade da polifenoloxidase com o escurecimento do manjeriço. Na peroxidase, esta relação, não foi observada.

A otimização do ensaio enzimático na polifenoloxidase da folha de manjeriço foi conseguida quando o extrato foi saturado de 60 a 80% com sulfato de amônio e a reação processou-se em pH 6,5 a 30 °C. O substrato que proporcionou maior oxidação pela enzima foi o catecol. Sua inativação ocorreu a partir dos 80 minutos de pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5 a 25 °C ou após 10 minutos de exposição à 60 °C.

Ácido ascórbico, ditioeitol e L-cisteína foram os inibidores mais efetivos, levando a 100% de inibição, seguido pelo tropolone, agente inibidor específico, com cerca de 98% de inibição.