

PAULA ACÁCIA SILVA RAMOS

**PAPEL DAS ENZIMAS OXIDATIVAS NA
DETERIORAÇÃO FISIOLÓGICA DE MANDIOCA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

PAULA ACÁCIA SILVA RAMOS

**PAPEL DAS ENZIMAS OXIDATIVAS NA
DETERIORAÇÃO FISIOLÓGICA DE MANDIOCA**

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

Aprovada: 24 de maio de 2011

Prof. Fernando Luiz Finger
(Coorientador)

Prof. Valterley Soares Rocha
(Coorientador)

Prof. Anselmo Eloy Silveira Viana

Pesquisador Dr. Sanzio Mollica Vidigal

Prof. Tocio Sedyama
(Orientador)

Aos meus amados pais, Paulo Antônio e Lúcia Ramos,

Aos meus queridos irmãos Elza e Lúcio Paulo,

Aos meus lindos sobrinhos Bruna Acácia e Bruno,

Ao grande amigo Fernando Luiz Finger

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as graças alcançadas.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste Curso.

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

Ao professor Tocio Sedyama, pela amizade construída, paciência, pelos sorrisos e carinho em me apoiar nos momentos em que mais precisei, e competente orientação.

Ao grande amigo e Professor Fernando Luiz Finger, por me ensinar que enquanto aluna só existem duas formas de resolver um problema, a certa e a errada, e ele sempre estava certo. Assim fui capaz de buscar sempre as verdades nos trabalhos que conduzi. Aprendi a cobrar e ser cobrada, e principalmente a compreender um pouco de cada área. Agradeço por nossa amizade construída que levarei por toda minha vida e principalmente pelos dias que passamos juntos, com todo meu carinho e admiração obrigada por ter existido em minha vida.

Ao professor Anselmo Eloy Silveira Viana, que me inspirou a iniciar essa jornada e sempre me atendeu quando solicitado.

Ao professor e amigo Valterley Rocha, que sempre me atendeu com simpatia, e força.

Aos professores João Galvão, Paulo Roberto Cecon, Mário Puatti e Sanzio Mollica Vidigal, que colaboraram com meu aprendizado e aperfeiçoamento e, com simpatia, estiveram sempre dispostos a me ajudar, e pela amizade construída.

Aos amigos pelo apoio durante as dificuldades do curso: Andrea Tomas, Leandro Nascimento, Vandinho, Maura, Tatiane, Carlinha, Juliane, Danilo, Marialva, Tania, Ana Paula, Teresa, Nanci, Armindo, Geraldo e a todos os colegas do Laboratório Pós-colheita.

Ao meu grande amigo Sebastião Peluzio, que sempre me amparou e esteve ao meu lado em todos os momentos, com sua alegria e invenções, obrigada por ter sido tão prestativo em todos os momentos e a qualquer hora, nunca negando em ajudar. Devo a você uma parte dessa conquista.

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

BIOGRAFIA

Paula Acácia Silva Ramos, filha de Paulo Antônio Ramos e Lúcia Maria da Silva Ramos, nasceu em Ituaçu- Bahia, no dia 08 de julho de 1978.

Lecionou para os níveis de 1º, 2º e 3º anos do ensino médio, no Colégio Municipal de Belo Campo-BA, durante os meses de março a dezembro de 2001.

Em agosto de 2004, diplomou-se Engenheira Agrônoma, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, Bahia.

Em setembro de 2004, ingressou no Curso de Mestrado da mesma instituição como aluna especial.

Em março de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2007.

Em março de 2007 ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em maio de 2011.

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1- Danos e Deterioração.....	1
1.2- Peroxidase (POD).....	2
1.3- Polifenoloxidase (POD).....	3
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
ARTIGO 1	10
PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PEROXIDASE NA RAIZ TUBEROSA DE MANDIOCA	
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1- Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da peroxidase (POD).....	13
2.2- Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	15
2.3- Efeito da temperatura sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	15
2.4- Análise Estatística.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1- Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da peroxidase (POD).....	16
3.2- Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	18
3.3- Efeito da temperatura sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	22

4. CONCLUSÕES.....	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ARTIGO 2	34
ATIVIDADE DA PEROXIDASE NA RESISTÊNCIA DA MANDIOCA <i>IN NATURA</i> A DETERIORAÇÃO FISIOLÓGICA	
RESUMO.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1- Tratamentos pós-colheita.....	37
2.2- Análise visual e vida de prateleira.....	37
2.3- Extração e determinação da atividade enzimática tratadas com inibidores da PPO.....	38
2.4- Análise Estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3. 1- Análise visual e vida de prateleira.....	39
3. 1.1. Ácido Ascórbico.....	40
3. 1.2. Azida sódica.....	42
3. 1.3. Bissulfito de sódio.....	43
3. 1.4. EDTA.....	43
3. 1.5. L-cisteína.....	44
3. 1.6. SDS.....	46
4. CONCLUSÕES.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ARTIGO 3	
PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA POLIFENOLOXIDASE NA RAIZ TUBEROSA DE MANDIOCA	
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1- Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da polifenoloxidase (PPO).....	58
2.2- Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes	59

de mandioca.....	
2.3- Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	60
2.4- Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	61
2.5- Análise Estatística.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1- Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da polifenoloxidase (PPO).....	62
3.2- Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	64
3.3- Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	67
3.4- Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.....	75
4. CONCLUSÕES.....	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

RESUMO

RAMOS, Paula Acácia Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Papel das enzimas oxidativas na deterioração fisiológica de mandioca.** Orientador: Tocio Sedyama. Coorientadores: Fernando Luiz Finger e Valterley Soares Rocha.

A alta perecibilidade das raízes de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) *in natura* faz com que as mesmas tenham que ser consumidas dentro de um período muito curto após a colheita. A principal causa deve-se a deterioração fisiológica, caracterizada por estrias azuladas e pigmentos escuros na polpa que progride ao longo dos parênquimas, atribuído a reações das enzimas peroxidase E.C. 1.11.1.7. (POD) e Polifenoloxidase E.C. 1.10.3.1. (PPO). Este trabalho foi realizado com objetivos de purificar parcialmente e caracterizar cineticamente essas enzimas, avaliando condições ótimas de suas atividades, e verificar o efeito de diferentes inibidores da atividade da POD como tratamento pós-colheita, visando reduzir o escurecimento enzimático. As raízes utilizadas para purificação cinética foram cortadas para induzir a atividade da POD e PPO. A cinética da atividade foi determinada em condições de pHs variando de 2,5 a 9,0 em condições de ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), e diferentes temperaturas. A POD e PPO extraídas de raízes de mandioca foram parcialmente purificadas por fracionamento em sulfato de amônio de 0 a 80% e diálise, com intervalos de 20%. Foram testados diferentes substratos da PPO: ácido caféico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, catecol, 4-metil-catecol, DL-dopa, pirogalol à concentração de 15 mM. Para avaliar diferentes inibidores da POD, raízes inteiras e isentas de danos foram tratadas por uma hora em soluções contendo produtos como o ácido ascórbico, azida sódica, bissulfito de sódio, Na₂EDTA, L-cisteína e SDS nas concentrações de 1, 5 e 10 mM, e deixadas à temperatura ambiente por seis dias. A cada dois dias foi realizada análise visual e retiradas amostras de 2 cm de espessura para avaliar a atividade enzimática. A otimização do ensaio enzimático para a POD e PPO de raízes de mandioca *in natura* foi conseguida quando os extratos foram saturados de 60-80% e a reação processou-se em pHs 6,0 e 6,5, em temperaturas de 40 °C e 30 °C, respectivamente, sendo o substrato de maior afinidade com a PPO o ácido clorogênico. A inativação completa da POD e

PPO ocorreram em pH 2,5 a temperatura ambiente (25 °C) após 60 minutos e 30 minutos respectivamente. Em pH 9,0 não houve inativação total da atividade das enzimas POD e PPO. Portanto, a atividade da peroxidase não foi inativada em pH alcalino, sendo menos estável em pH ácido, que mostrou ser efetivo na redução da atividade enzimática, causando danos rápidos ao sítio ativo. Nos extratos da POD pré-incubados a 50 °C e 60 °C tiveram redução na atividade de 30,7% aos 70 minutos, e 40,7% aos 60 minutos sem inativação total. Em temperaturas mais elevadas (70 e 80 °C) não foi constatada inativação total da atividade. Nos extratos pré-incubados da polifenoloxidase a 50 °C, 60 °C e 70 °C durante o período de 10 min resultaram em inativação parcial de 60%, 77% e 81,7%, respectivamente, sem inativação total por mais tempo de pré-incubação (180 minutos). Houve inativação total com 80 °C aos 50 minutos. Houve relação entre atividade da peroxidase e o escurecimento, todos tratamentos foram eficientes em aumentar a vida de prateleira das raízes de mandioca *in natura* em até 4 dias. No segundo dia houve 100% de raízes sem escurecimento, em relação ao controle, nas três concentrações. O pH ácido mostrou ser mais eficiente em reduzir a atividade enzimática da POD e PPO, mostrando que o tratamento com pré-incubação em pHs ácidos são eficazes em reduzir a atividade destas enzimas. E tratamentos com temperaturas de 80 °C por um período superior a 50 minutos, também mostrou ser eficiente em reduzir a atividade enzimática da PPO. Foi possível aumentar a vida de prateleira de raízes de mandioca tratadas com ácido ascórbico, bissulfito de sódio e L-cisteína. O escurecimento das raízes de mandioca *in natura* foi reduzido, aplicando-se diferentes inibidores nas concentrações de 1mM, 5 mM ou 10mM.

ABSTRACT

RAMOS, Paula Acácia Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2011. **Role of oxidative enzymes on physiological deterioration of cassava.** Adviser: Tocio Sedyama. Co-Advisers: Fernando Luiz Finger and Valterley Soares Rocha.

The high perishability of cassava roots (*Manihot esculenta* Crantz) in nature make them to be consumed within a very short period after harvest. The main cause of loss is due to physiological deterioration, characterized by bluish streaks and dark pigments in the pulp, which progresses through the parenchyma. These changes are attributed to the action of peroxidase EC 1.11.1.7. (POD) and polyphenoloxidase E.C. 1.10.3.1. (PPO). This work was conducted in order to partially purify and characterize these enzymes kinetically, evaluating optimal conditions for their activities, and to determine the effect of different inhibitors on the activity of POD in order to reduce the enzymatic browning. The roots used for purification were cut to induce the activity of POD and PPO. The kinetic activity was determined under conditions of pH ranging from 2.5 to 9.0 at room temperature (25 °C) and ice (4 °C), and different temperatures. The POD and PPO extracted from cassava roots were partially purified by ammonium sulfate fractionation from 0 to 80% at intervals of 20%, followed by dialysis. We tested the following PPO substrates: caffeic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, catechol, 4-methyl-catechol, DL-dopa, pyrogallol at a concentration of 15 mM. To evaluate the effect of different POD inhibitors, whole roots and free of damage were treated for one hour in solutions containing products such as ascorbic acid, sodium azide, sodium bisulfite, Na₂EDTA, L-cysteine and SDS concentrations of 1, 5 and 10 mM and left at room temperature for six days. At every two days it was performed visual analysis and removed samples of 2 cm thick to evaluate the enzyme activity. Optimization of the enzymatic assay for POD and PPO of fresh cassava roots was achieved when the extracts were saturated with 60-80% and the reaction proceeded at pH 6.0 and 6.5, at temperatures of 40 °C and 30 °C, respectively containing the higher affinity PPO substrate, chlorogenic acid. The complete inactivation of POD and PPO occurred at pH 2.5 at room temperature (25 °C) after 60 minutes and 30 minutes respectively. At pH 9.0 there was total

inactivation of POD and PPO activities. The POD activity was not inactivated at alkaline pH, being less stable at acid pH, which proved to be effective in reducing enzyme activity, causing rapid damage to the active site. In the POD extracts, pre-incubated at 50 and 60 °C, had a reduction in activity of 30,7% at 70 minutes, and 40.7% at 60 minutes without total inactivation. At higher temperatures (70 and 80 °C) were not observed total inactivation of the enzyme. In extracts pre-incubated to PPO at 50, 60 and 70 °C for 10 min resulted in partial inactivation of 60, 77 and 81.7%, respectively, without total inactivation in longer pre-incubation (180 minutes). There was total inactivation at 80 °C for 50 minutes. There was a relationship between peroxidase activity and browning, and all treatments were effective in increasing the shelf life of fresh cassava roots up to 4 days. On the second day there was 100% of root browning, in the control. The acidic pH was more effective in reducing the enzymatic activity of POD and PPO, showing that treatment with pre-incubation in acidic pHs are effective in reducing the activity of these enzymes. Treatment with temperatures of 80 °C for a period longer than 50 minutes, also proved to be effective in reducing the enzymatic activity of PPO. It was possible to increase the shelf life of cassava roots by treating with ascorbic acid, sodium bisulfite and L-cysteine. The browning of fresh cassava roots was reduced by applying different concentrations of the above inhibitors at concentrations of 1 mM, 5 mM or 10 mM.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma heliófila perene, pertencente à família das Euforbiáceas. É extensivamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, sendo a principal fonte de carboidratos diária nos países da América Central, Ásia e África (6). Diferentemente da maioria das espécies amiláceas, como taro (*Colocasia esculenta*), cará (*Dioscorea alata*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*), a mandioca tem capacidade de aproveitar os eventuais períodos de chuvas abundantes, conseguindo sobreviver junto a plantas daninhas e pragas (3). As melhores condições de desenvolvimento são em climas quentes e úmidos, com temperatura média anual entre 25 °C a 29 °C (19), entretanto tolera faixas de 16 °C a 38 °C; e altitudes que variam desde o nível do mar até cerca de 2.300 m (5).

No Brasil o cultivo é caracterizado por plantações em pequena escala, basicamente de subsistência nas regiões Nordeste e Norte, e de grande escala nas regiões Sul e Centro-oeste. A comercialização é feita na forma de raízes inteira com casca (*in natura*), apenas descascada e lavada, congelada, cozida ou pré-cozida (3; 26), e de produtos derivados como farinha, polvilho entre outros.

1.1- Danos e Deterioração

A dificuldade em manter raízes frescas por alguns dias após a colheita tem sido um dos maiores problemas para a comercialização *in natura* e processamento da raiz (22). Isto porque as raízes são vulneráveis a diversos estresses de natureza abiótica, como danos mecânicos causados pela colheita, transporte, armazenagem e processamento (como corte e abrasões) que está relacionada à perecibilidade das raízes (3; 26).

O processo deteriorativo é fator limitante ao armazenamento, o qual se inicia logo após as primeiras 48 horas depois da colheita. Este processo desencadeia formação de estrias azuladas, descoloração vascular e escurecimento dos tecidos ao longo do parênquima de armazenamento, o qual confere a raiz aspecto indesejável ao consumidor (1), o que leva a perdas qualitativas e quantitativas (4; 16). Assim, são identificados dois processos de

deterioração, denominados primário (fisiológica) e secundário (patológica) (4; 18; 23) e o primário está estreitamente relacionado a reações oxidativas de substâncias fenólicas, próximo ao local da descompartimentalização celular, preferencialmente pela atividade das enzimas peroxidase (E.C. 1.11.1.7.) e polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1.) (4; 8).

1.2- Peroxidases (POD)

As peroxidases (POD) são enzimas que foram descritas em 1855, e sua purificação algumas décadas mais tarde (29). Estas isoenzimas contêm átomos de ferro como grupo prostético e diferentes quantidades de resíduos de carboidratos (33). A peroxidase de plantas é subdividida em três classes baseada nas diferenças da estrutura primária (15; 21): classe I incluem enzimas intracelulares de plantas (parede celular); classe II são peroxidases extracelulares, incluindo a lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14); classe III são peroxidases (E.C. 1.11.1.7) de plantas, secretadas fora das células (extracelulares) ou transportada para os vacúolos (7; 15; 30).

Existem elevado número de isoenzimas com versatilidade catalítica que estão envolvidas em distintos processos fisiológicos ao longo do ciclo de vida das plantas (1), como regulação hormonal (14), controle do alongamento celular (9), com degradação do ácido indolacético (AIA) durante a maturação e senescência (17). As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) têm como uma das principais funções a defesa das plantas. Catalisam reações de grande número de estruturas aromáticas usando elétrons de substrato orgânico como o guaiacol, e reduz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para formação de H_2O (20), formado pelo metabolismo celular protegendo tecidos danificados contra os radicais livres (27) e contra patógenos (25; 28). Esta reação de oxidação aumenta a resistência a doenças pela formação de lignina e suberina via processo de catalisação e polimerização (condensação) dos polifenóis na parede celular (24). Por outro lado, contribui para mudanças negativas no sabor e cor de frutos e vegetais, promovendo o escurecimento dos tecidos danificados.

Tecidos de mandioca quando danificados, apresenta a região escurecida, isto se deve a pouca formação de lignina resultando na rápida deterioração fisiológica. Já as raízes de reserva de batata-doce e taro quando

danificadas, o tecido é cicatrizado pela formação de uma camada de lignina nas células muito próximo à superfície, demonstrando assim sua capacidade de cicatrização. Esta situação foi relatada por Uritani (32), onde demonstrou que pode existir correlação entre a deposição de lignina e a capacidade de cicatrização de órgãos subterrâneos.

1.3- Polifenoloxidase (PPO)

Desde a sua descoberta no século passado, a polifenoloxidase (PPO) tem sido objeto de extensas pesquisas científicas. Dessa forma, considerável número de estudos tem sido acumulado sobre as propriedades moleculares e catalíticas, além do importante papel no ciclo da vida das plantas (17). A PPO é uma proteína que faz parte do grupo das oxiredutases. Contém cobre como grupo prostético (estrutura molecular), e é diferente da maioria das enzimas por catalisar dois tipos de reações (2). Estas reações incluem a hidroxilação de monofenóis produzindo o-difenóis e a remoção de hidrogênios dos o-difenóis para produzir quinonas. As quinonas formadas nessa reação polimerizam-se formando melaninas, que são pigmentos escuros (4).

A atividade da PPO é de grande importância na determinação da qualidade de produtos vegetais frescos, processados e ou congelados, porque através de reações podem produzir mudanças de cor, variações de aroma, sabor, alterações nos teores de vitaminas e até modificações na textura (31). Também está relacionada ao escurecimento enzimático em raiz de mandioca *in natura*, (6), resultando na maioria dos casos em produtos com aparência ruim, os quais são rejeitados pelos consumidores (20).

A mandioca, quando destinada à mesa, apresenta variações relacionadas à sua forma final e também de acordo com o mercado no qual é distribuída. Feiras, sacolões, mercados municipais, comércio informal e afins comercializam as raízes *in natura*, ou seja, com casca ou mesmo descascadas. Já redes varejistas como supermercados apresentam as raízes sob formas diferenciadas: pré-cozidas, em tiras ou na forma de gomos, acondicionadas em embalagens plásticas e mantidas sob refrigeração ou congelamento. No entanto, para que se possa aplicar um tratamento pós-colheita adequado e eficiente, onde se consiga ter produtos que conservem características

sensoriais desejáveis, é necessário desenvolver estudos sobre fatores que afetam a conservação, para isto, é importante investigar as condições ótimas de atividade das enzimas relacionadas a deterioração (13).

A cinética enzimática da POD e PPO em diferentes culturas demonstrou que o pH ótimo da atividade *in vitro* da POD varia de 5,5 a 7,5, e o pH ótimo de atividade da PPO varia numa de faixa de 6,0 a 7,5, dependete do substrato e do tecido vegetal. A peroxidase é uma enzima resistente a elevadas temperaturas, assim a melhor temperatura para determinar a máxima atividade é variável conforme a espécie (10). Já a temperatura ótima de atividade da polifenoloxidase varia de 30 a 40 °C (9). Assim, visando reduzir a atividade da PPO é utilizado o controle do pH (6,0 a 7,5) e da temperatura (31), abaixo desse pH a enzima é menos ativa e acima desse pH ocorre à auto-oxidação do substrato.

A enzima peroxidase pode ter sua atividade regenerada após ter sido inativada por altas temperaturas (11), daí a necessidade em se testar outras maneiras de reduzir a atividade, como inibidores aplicados nas raízes em tratamentos pós-colheita. Portanto, objetivou-se com este trabalho purificar parcialmente e caracterizar cineticamente as enzimas peroxidase (E.C. 1.11.1.7.) e Polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1.), avaliando condições ótimas de suas atividades; verificar o efeito de diferentes inibidores (aqueles não nocivos a saúde) da atividade da POD como alternativas de tratamentos pós-colheita, visando reduzir o escurecimento enzimático e prolongar a vida de prateleira das raízes comercializadas na forma *in natura*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- 1- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R. Ros Barceló, A. Pedreño, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p.377-390.
- 2- Araújo, J. M. A. 1999. **Química de alimentos**: teoria e prática. 2. ed. Viçosa: UFV, 416 p.

- 3- Bezerra, V. S., Pereira, R. G. F. A., Carvalho, V. D., Vilela, E. R. 2002. Raízes de Mandioca Minimamente Processadas: Efeito do Branqueamento na Qualidade e na Conservação; **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 3, p. 564-575.
- 4- Booth, R. H. 1978. **A review on root diseases in cassava**. In: CASSAVA PROTECTION WORKSHOP. Proceedings. Cali, CIAT, p.121-23, 1978. (Séries CE-14).
- 5- Borges, M. de F., Fukuda, W. M. G.; Caldas, R. C. 1993. Avaliação de três métodos para determinação de cianeto em mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 12, n. 1/2, p. 75-83.
- 6- Carvalho, V. D. de, Chalfoun, S. M., Juste Júnior, E. S. G. 1985. Métodos de armazenamento na conservação de raízes de mandioca: I. efeito da embalagem de polietileno e serragem úmida associada a tratamentos químicos na deterioração pós-colheita e qualidade das raízes. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 4, n. 1, p. 79-85.
- 7- Castillo, L., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I., Csoregi, E., Sakharov, I. 2002. Purification and substrate of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science**, n. 163, p. 1011-1019.
- 8- Clemente, E., Robinson, D. S. 1995. The thermostability of Purified Oranges Isoperoxidases. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Campinas, v. 38, p.1109-1118.
- 9- De Gara, L. 2004 .Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p. 195-205.
- 10- Freitas, A. A., Francelin, M. A., Hirata, G. F., Clemente, E., Schmidt, F. L. 2008. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares Benitaka e Rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p.172-177.

- 11- Gaspar, T. H., Penel, C., Thorpe, T., Greppin, H. 1982. **Peroxidases 1970-1980**. (1st edn.). Geneva: Universidade de Geneva, Center de Botanique.
- 12- Geerlings, A.; Ibañez, M. M-L.; Memelink, J.; Heijden, R. V. D.; Verpoorte, R. 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine β -d-Glucosidase, an enzyme in terpenoid Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 5, p. 3051-3056.
- 13- Guida, V., Criscuolo, G., Tamburino, R., Malorni, L., Parente, A., Di Maro, A. 2011. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). **BMB Rep.**, v. 44, n.1, p. 64-9.
- 14- Gutiérrez, J., Núñez-Flores, M. J. L., Gómez-Ros, L. V., Uzal, E. N., Carrasco, A. E. , Díaz, J., Sottomaor, M., Cuello, J. , Barceló, A. R. 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinni elegans*. **Biomedical and Life Sciences: Planta**, v. 230, n.4, p. 767-778.
- 15- Heidrich, E., Lorenz, G., Schreier, P. 1983. Ultrathin – layer isoelectric focusing of partially purified peroxidase from tomato fruit. **Food Chemistry**, v.10, p. 285-296.
- 16- Kato, M. do S., Souza, S. M. C. 1987. Conservação de raízes após colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 9-14.
- 17-Koksal, E. 2011. Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): partial purification and some biochemical properties. **Intenational Journal of Pharmacology**, v.7, n. 1, p. 135-139.
- 18- Laurente, C., Clemente, E. 2005. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertrhoa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 159-163.

- 19- Mattos P, L, P de; Gomes, J. de C. (Coord). 2002. **O cultivo da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 122p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnico, 37).
- 20- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R. and Lüthje, S. 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 173-193.
- 21-Mellon, J. E. 1990. Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. **Plant Physiology**, v. 95, n.1, p.14-20.
- 22- Montaldo, A. 1973 .Vascular streaking of cassava root tubers. **Tropical Science**, London, v. 15, n. 1, p.39-46.
- 23- Morales, M. & Barceló, A. R. 1997. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v.45, n.2, p.229-232.
- 24- Pereira, L. F., Goodwin, P. H., Erickson, L. 2000. Peroxidase activity during susceptible and resistant interactions between cassava (*Manihot esculenta*) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassava*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, p. 575- 577.
- 25- Reilly, K., Gómez-Vásquez, R., Buschmann, H., Tohme, J., Beeching, J. R. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 625-641.
- 26- Ribeiro, R. A., Finger, F. L., Puiatti, M., Casali, V. W. D. 2005. Chilling injury sensitivity in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. **Tropical Science**, v. 45, p. 55-57.
- 27- Ricakrd, J. E., Coursey, D. G. 1981. Cassava storage. Part I: storage of fresh cassava. **Tropical Science**, v. 23, p.1-32.

- 28- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N. M., Neelwarne, B. 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v.105, p.1312-1320.
- 29- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M., Núñez-Delicado, E. 2008. Kinetic characterization and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**, v. 107, p. 193-199.
- 30- Tanaka, Y.; Data, Hirose, S.; Taniguchi, T. & Uritani, I. 1983. Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 47, n. 4, p. 693-700.
- 31- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan. G., Daeihassani, B., Movafegi, A., Samadi, A. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) Cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.5, p. 751-763.
- 32- Toralles, R. P., Vendruscolo, J. L., Vendruscolo, C. L., Del Pino , F. A. B., Antunes, P. L. 2010. Controle da atividade da polifenoloxidase de pêsegueo por interação do pH, da temperatura e da concentração de ácido ascórbico. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 120-127.
- 33-Uritani, I. 1999. Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.40, p.177-183.
- 34- Uritani, I. and Reys, E. D. 1984. (eds.) Tropical roots crops: postharvest physiology and processing. Tokyo: **Scientific Societie Press**. 328p.

35-Valderrama. P., Marangoni, F., Clemente, E. 2001. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 321-325.

ARTIGO 1

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA PEROXIDASE NA RAÍZ TUBREROSA DE MANDIOCA

RESUMO

A peroxidase E.C. 1.11.1.7 (POD) está relacionada com o escurecimento e perda da qualidade de produtos industrializados e *in natura*, por isso a importância em estudar a purificação parcial dessa enzima e determinar sua atividade em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade 'Cacau Amarela', sob ampla faixa de pH e temperatura, a fim de desenvolver técnicas de pós-colheita para reduzir o escurecimento enzimático. O material avaliado foi proveniente da Região de Vitória da Conquista- BA, e analisados no Laboratório de Pós-Colheita da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. As raízes foram injuriadas (corte) para iniciar o processo deteriorativo e assim induzir a atividade da peroxidase, a cinética da atividade foi determinada em diferentes condições de pHs variando de 2,5 a 9,0 em condições de ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), e diferentes temperatura. A POD extraída de raiz de mandioca, foi parcialmente purificada por fracionamento em sulfato de amônio de 0 a 80% e diálise, obtendo-se uma preparação semi purificada para a análise enzimática da fração mais ativa, que correspondeu a fração de 60-80%. A atividade da peroxidase foi maior quando a reação foi realizada no pH 6,0 e temperatura de 40 °C. A inativação completa da enzima ocorreu em pH 2,5 à temperatura ambiente após 60 minutos. Em pH 9,0 houve acentuada redução da atividade com 30 minutos de pré-incubação, tanto em 25 °C quanto a 4 °C. Não houve inativação neste pH, verificou-se redução da atividade que se manteve constante mesmo depois de 180 minutos de pré-incubação. Nos extratos pré-incubados a 50 °C, a redução na atividade da enzima foi ocorrendo gradualmente até 70 minutos de exposição, onde houve drástica queda de 30,7%. Já em temperatura de pré-incubação de 60 °C, a atividade reduziu 40,7% depois de 60 minutos. Não foi possível detectar a inativação total com as temperaturas de incubação avaliadas de 70 e 80 °C, entretanto foi possível conseguir um percentual elevado em sua redução, mostrando que o

tratamento térmico aplicado foi eficaz na redução da atividade da peroxidase nessas temperaturas. Embora não foram suficientes para a total inativação enzimática, essas operações reduziram-nas consideravelmente. O pH ácido mostrou ser mais eficiente em reduzir a atividade enzimática da peroxidase, em relação ao pH alcalino, mostrando que o tratamento com pré-incubação em pHs ácidos são eficazes na redução da atividade da peroxidase.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é nativa do Brasil que (11) diferentemente da maioria das espécies amiláceas como taro (*Colocasia esculenta*), cará (*Dioscorea alata*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*), tem capacidade de aproveitar os eventuais períodos de chuvas abundantes, conseguindo sobreviver junto a plantas daninhas e pragas (3). As raízes tuberosas são vulneráveis a diversos estresses de natureza abiótica, principalmente aos danos mecânicos causados pela colheita, transporte e armazenagem, que está relacionada à sua perecibilidade (43).

A dificuldade em manter raízes de mandioca frescas por alguns dias depois de colhida tem sido um dos maiores problemas para comercialização *in natura* para o processamento. São identificados dois processos de deterioração, denominados primário (fisiológica) e secundário (patológica) (20). A deterioração fisiológica ocorre logo após as primeiras 48 horas depois da colheita, e tem sido estreitamente relacionada com reações oxidativas das substâncias fenólicas, preferencialmente pela atividade das enzimas peroxidase (E.C. 1.11.1.7.) e polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1.) (6; 24).

As peroxidases pertencem a uma família de glicoproteínas que contêm átomos de ferro como grupo prostético e diferentes quantidades de resíduos de carboidratos (44). São divididas em três superfamílias com base em suas propriedades estruturais e catalíticas (26), a primeira consiste de enzimas presente em animais, tais como: lactoperoxidase (E.C. 1.11.1.7) e glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9) (encontrada em plantas) (45); a segunda é composta por catalase (E.C. 1.11.1.6) presente em animais, plantas, bactérias, fungos e leveduras; a terceira superfamília consiste em peroxidases encontradas em plantas, fungos, bactérias e leveduras (25).

A superfamília da peroxidase de plantas é subdividida em três classes, baseada nas diferenças da estrutura primária (16): classe I inclui enzimas intracelulares de plantas (parede celular), bactérias e leveduras; classe II são peroxidases extracelulares secretadas por fungos incluindo a lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14); classe III são peroxidases (E.C. 1.11.1.7) de plantas secretadas fora das células (extracelulares) ou transportada para os vacúolos (7; 13; 16; 40).

As enzimas peroxidases (E.C. 1.11.1.7) catalisam reações de oxidação de grande número de estruturas aromáticas usando elétrons de substrato orgânico como o guaiacol e o aceptor de elétrons, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando água (35; 18). Tem como uma das principais funções a defesa das plantas, protegendo tecidos danificados contra os efeitos tóxicos dos radicais livres (36) e do H_2O_2 formado pelo metabolismo celular (1; 10). Também está envolvida na formação de lignina e suberina via processo de catalisação e polimerização dos polifenóis na parede celular, aumentando desta forma a resistência a doenças (17). Por outro lado, a POD contribui para mudanças negativas no sabor e cor de frutos e vegetais, além de estar envolvida na regulação hormonal de plantas, com degradação do ácido indolacético (AIA) durante a maturação e senescência (21).

Numa revisão sobre a deterioração fisiológica de raízes tropicais tuberosas, Uritani (41) demonstrou que pode existir correlação entre a deposição de lignina e a capacidade de cicatrização do órgão subterrâneo. Quando raízes de reserva de batata-doce e taro são danificados, o tecido é cicatrizado pela formação de uma camada de lignina nas células muito próximo à superfície (33). Por outro lado, em tecidos de mandioca, na região danificada, que corresponde à região descolorida tem pouca formação de lignina resultando na rápida deterioração fisiológica primária (34; 42).

A caracterização da peroxidase pode ser de interesse, não só por seus efeitos negativos sobre valores de cor, sabor e nutricionais, mas também por seus efeitos positivos em defesa das plantas (14). A cinética enzimática da peroxidase em diferentes culturas demonstrou que o pH ótimo para a atividade *in vitro* (5,5 a 7,5), depende do substrato e do tecido vegetal. É uma enzima resistente a elevadas temperaturas e sua inativação tem sido usada como indicador de adequação de branqueamento em processamentos vegetais (12),

assim a melhor temperatura para determinar a máxima atividade é variável conforme a espécie. E sua atividade pode se regenerar depois de ter sido inativada por altas temperaturas (13).

Em raízes de mandioca “mansa” (Cacau Amarela), não é conhecida qualquer uma das propriedades cinéticas da peroxidase e também o tratamento com pH (raízes embebidas em soluções ácidas) e temperatura, que pode ser melhor utilizado para inativar a atividade. Assim, objetivou-se purificar parcialmente e determinar a atividade da peroxidase em ampla faixa de pH e temperatura, a fim de desenvolver técnicas de pós-colheita para reduzir o escurecimento enzimático em raízes de mandioca *in natura*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Raízes de mandioca “mansa” da variedade 'Cacau Amarela' foram colhidas no campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia em Vitória da Conquista – BA, quando as plantas estavam com um ano e quatro meses de idade. Em seguida foram transportadas para Universidade Federal de Viçosa – MG (UFV) em caixas plásticas, por um período de 10 horas. No Laboratório de Pós-colheita – Departamento de Fitotecnia/UFV, as raízes foram cortadas para iniciar o escurecimento indicativo de deterioração fisiológica e de imediato, foram lavadas em água corrente, descascadas e despelculadas manualmente. A parte mediana das raízes foi cortada em cilindros de aproximadamente 10 cm de comprimento, para serem embaladas em papel alumínio e colocadas em nitrogênio líquido, posteriormente foram armazenadas sob congelamento em freezer a -20 °C até sua utilização (25; 32).

2.1 - Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da peroxidase (POD)

Para extração da peroxidase, 30 g da polpa de mandioca foi triturada e homogeneizada em polítron com 150 mL de tampão de extração (Tabela 1). O macerado foi filtrado em quatro camadas de gazes em banho de gelo (24). A suspensão resultante foi centrifugada a 15.000 g em temperatura de 4 °C por 30 minutos; do material centrifugado, 2 mL do sobrenadante foi guardado em

membranas de celulose modelo D-0405 da Sigma por 12 h a 4 °C num tampão de diálise (Tabela 1) sob agitação, sendo considerado extrato bruto, o pellet foi descartado. O restante do sobrenadante foi sequencialmente saturado com sulfato de amônio sólido $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ variando de 0 a 80%, com intervalos de 20% e posterior centrifugação em cada etapa.

O sobrenadante final de cada fração saturada foi descartado e os sedimentos resultantes foi ressuspenso em 2 mL de tampão de diálise (Tabela 1) e armazenados em membranas de celulose, seguido por diálise no mesmo tampão durante 12 horas a 4 °C (29). Após este período, os extratos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C, para separar resíduo, deixando-o mais limpo para análise.

A determinação da atividade enzimática da peroxidase foi baseada no método modificado de Neves (29), uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo: 1,5 mL de tampão fosfato de reação (0,1 M; pH 6,5); 0,5 mL de guaiacol (1,7%) e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (1,8%), totalizando 3 mL da reação (Tabela 1). Na prova em branco, usaram-se todos os reagentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático que foi substituído por água destilada.

A reação iniciou-se pela adição do extrato enzimático, medindo a alteração na absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm, a 25 °C, ao longo de três minutos, sendo a atividade expressa em Unidades de Absorbância (UA) $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína (22). A quantificação da proteína total dos extratos enzimáticos foi determinada segundo metodologia descrita por Bradford (4), utilizando como padrão a Albumina de Soro Bovino (BSA). Após a determinação da fração de purificação em que a enzima teve maior atividade, as análises seguintes ocorreram somente nesta faixa.

Tabela 1- Composição dos tampões utilizados na extração e diálise da POD.

	Tampão de extração	Tampão de diálise
Peroxidase	Tampão fosfato 0,1 M [fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) + dibásico (K_2HPO_4)], pH 6,5; bissulfito de sódio (0,1%) e cloreto de sódio (0,15 M)	Tampão fosfato 0,01 M e pH 6,0 (regular o pH com o monobásico ou dibásico)

2.2 - Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Para determinar o efeito do pH na atividade da peroxidase, foram preparados diferentes soluções-tampão de reação: 0,2 M de ácido cítrico (pH 2,5 a 5,5); 0,2 M de tampão fosfato (pH 6,0 a 7,5) e 0,2 M de ácido bórico (pH 8,0 a 9,0), para correção dos pHs utilizou-se 1N de NaOH ou 1N de HCl (29). Nos ensaios subsequentes, utilizou-se o pH onde a enzima apresentou maior atividade específica (considerada 100%).

Após determinar o pH ótimo para peroxidase, verificou também se os pHs onde a enzima teve menor atividade poderiam inativar a enzima, para isto, foi realizada a pré-incubação do extrato enzimático em solução tampão (1:1) dos pHs ácido (2,5) e alcalino (9,0) pelo período de 0 a 180 minutos, com retirada das amostras a cada 30 minutos. Utilizou-se a solução tampão em que a peroxidase teve maior atividade, e a reação foi realizada a temperatura de 25°C.

2.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Na determinação da temperatura ótima para a atividade da peroxidase, os extratos enzimáticos e os meios de reação foram pré-incubados em temperaturas variando de 10 a 80 °C por 10 minutos, sendo a reação realizada à mesma temperatura da pré-incubação, à atividade foi lida em espectrofotômetro a 470 nm ao longo de três minutos.

Para determinar a temperatura versus tempo para a inativação enzimática e capacidade de recuperação de sua atividade, os extratos foram pré-incubados com o 0,1M tampão, pH 6,0 em banho-maria em temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90 °C por um intervalo que variou de 0 a 60 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo a 4 °C por 30 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 470 nm a 25 °C por três minutos, após à adição do substrato no meio de reação (29). Atividade relativa de 100% foi considerada para amostras sem pré-incubação. Na prova em branco, usaram-se reagentes e água destilada, em vez do extrato enzimático.

2.4 - Análise Estatística

Os dados da atividade enzimática nos diferentes pHs e temperaturas foram submetidos a estatística descritiva. As médias, com os respectivos erros-padrões, obtidas das quatro repetições de cada extração, foram utilizadas para avaliar as diferenças da atividade cinética de acordo com Menolli *et al.*, (26).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Fracionamentos com sulfato de amônio e purificação parcial da peroxidase (POD)

Com a purificação parcial da peroxidase, utilizando sulfato de amônio, houve aumento na atividade específica com razão de 2,89 em relação ao extrato bruto, na fração de 60-80%. A atividade específica foi de 45,98 a 132,88 UA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Figura 1). Nas saturações de 20 a 60% de sulfato de amônio, a peroxidase mostrou ter elevada solubilidade, uma vez que houve pouca precipitação nestas frações (Figura 1) e que esta classe de enzimas exige completa saturação para ser precipitada (30).

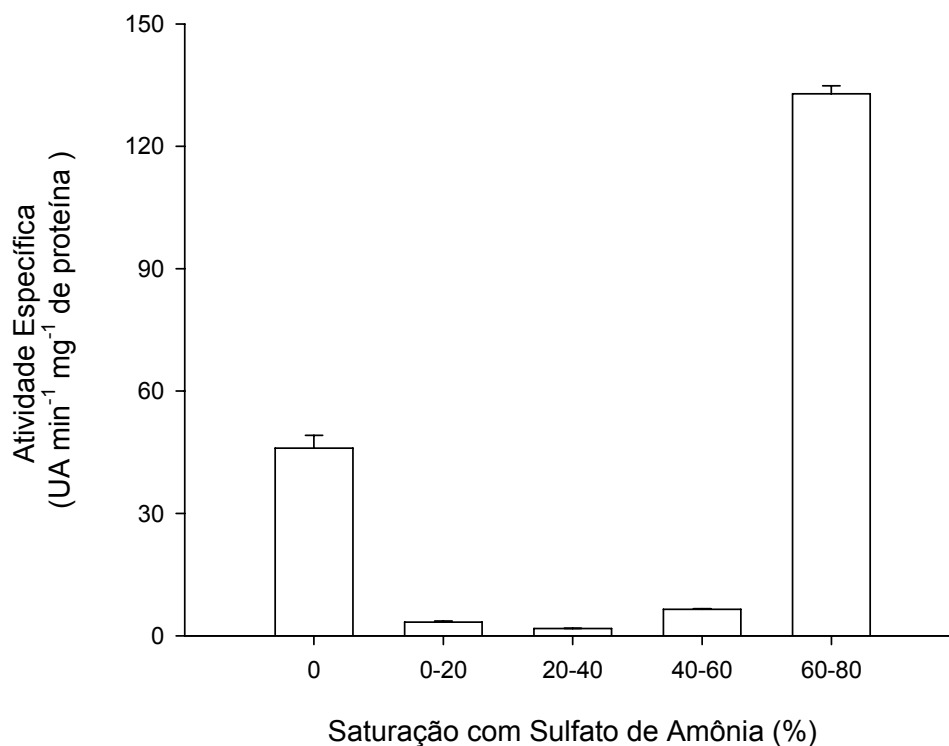


Figura 1- Fracionamento da atividade específica da POD extraída de raízes de mandioca com diferentes porcentagens de Sulfato de Amônio. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A finalidade de precipitar o extrato utilizando o sulfato de amônio é concentrar mais a solução do extrato bruto para assim reduzir a concentração de proteínas total em solução, eliminar ácidos nucleicos e outras substâncias e purificar parcialmente a enzima de interesse. Segundo Nelson e Cox (28), a solubilidade de determinadas proteínas vai decrescendo a medida que se acrescenta altas concentrações de sal à solução. Sendo assim, proteínas são melhores selecionadas quando se adiciona uma grande quantidade de um sal. Isso pode ser verificado com relação à atividade específica da ativa da peroxidase no extrato parcialmente purificado de mandioca, quanto à purificação, comparada com as outras frações de precipitação (Figura 1).

O ganho de purificação na atividade da peroxidase da mandioca, variedade 'Cacau Amarela' foi inferior ao da batata-baroa que teve um aumento 3,6 vezes de purificação (26). Já à atividade do pimentão vermelho, saturado com sulfato de amônio 30 a 80%, teve menor atividade em relação à mandioca,

aumentando 2,3 vezes (37). Entretanto, estas culturas também tiveram maiores atividades de peroxidase na fração 60-80% de saturação, assim como o verificado em frutos de quiabo (29), em raízes de beterraba (36) e em hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*) (19).

Com a purificação parcial da peroxidase, seguida de diálise, usando a fração de 60-80%, foi possível a caracterização enzimática, analisando os efeitos do pH e temperatura sobre o comportamento da enzima.

3.2 - Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Na variedade Cacau Amarela a atividade da peroxidase foi encontrada em pH variando de 2,5 a 9,0. O perfil do pH mostra um pico ótimo da atividade relativa (100%) quando a reação foi realizada com pH 6,0 (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados em morango (8), beterraba e casca de soja (23). Uma grande variação no pH ótimo é encontrada entre diferentes espécies, como em *Solanum melongena* e *Ipomoea sp.*, com pH 5,5; banana nanica (*Musa acuminata*) com pH 6,3 (30); folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) pH 5,2 (21) e polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.) com pH ótimo principalmente na região de 6,3 (46).

A atividade da enzima POD foi crescendo a partir do pH 2,5, alcançando sua máxima atividade em pH 6,0 e decrescendo até o pH 9,0 (Figura 2). As menores atividades ocorreram nos pHs extremos, 2,5 e 9,0, o mesmo aconteceu com milho, batata-baroa (26) e pimenta vermelha (37). Ficou evidente que o pH da peroxidase varia com a espécie, com a expressão de várias isoenzimas que formam a família peroxidases, bem como sua localização na célula (30), que pode ser na parede celular (27), nos espaços livres da parede e vacúolos, entretanto a maioria delas tem seu pH ideal variando de 4,0 a 7,0 (36), como o verificado em raízes de mandioca (31).

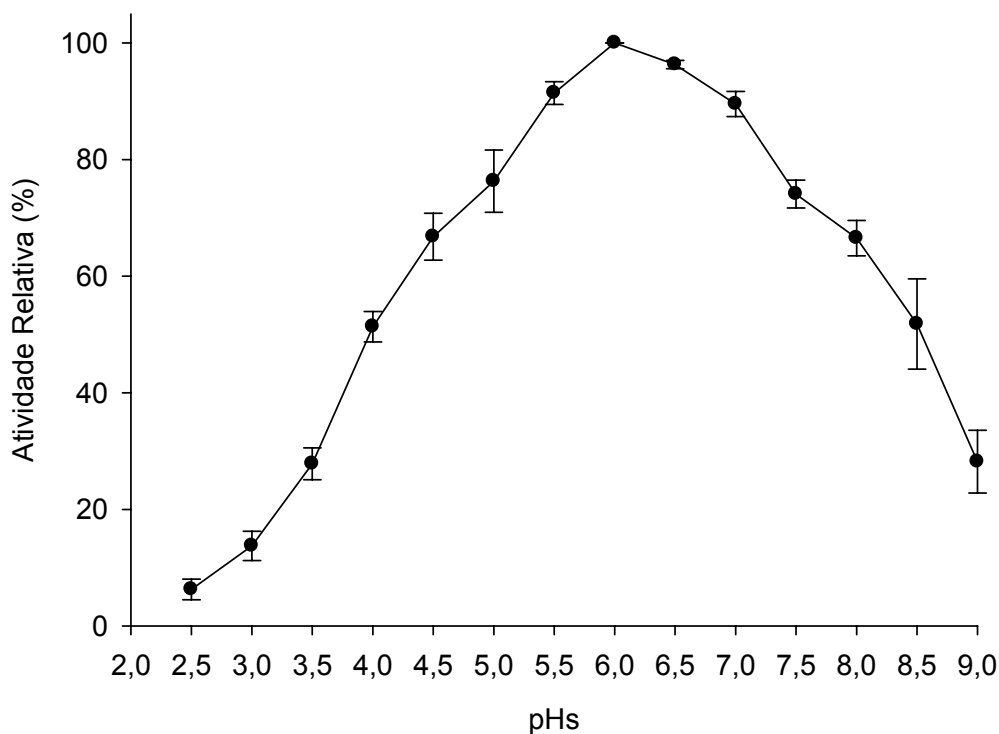


Figura 2 - Influência do pH sobre a atividade relativa da POD em mandioca variedade 'Cacau Amarela'. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Conforme sugerido por De Marco *et al.*, (9), variações de pHs ótimo para uma atividade enzimática indica a presença de isoenzimas distintas, como o verificado em extratos de folhas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.cv.) tolerantes ao estresse salino, apresentou pH 4,6; 6,5 e 8; já cártamo sensível ao extrato teve dois picos de pH 4,5 e 6,5 (38). Outro exemplo é a POD extraída de raízes de absorção em beterraba vermelha, que apresentou atividade máxima em pH variando de 5 a 6 enquanto em rabanete (horseradish peroxidase- HRP) a maior atividade foi em pH com variação de 4 a 5 (36); e no tomate a faixa ótimo do pH foi de 5,3 a 5,5 (15). A variação no pH pode alterar a contribuição relativa das diferentes isoperoxidasas ao total de atividade e isso se manifesta com o surgimento de pHs ótimos diferentes em curvas de atividade de pH (38).

A pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5 em temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos (Figura 3), reduziu em 98% a atividade da enzima peroxidase em relação à atividade máxima em pH 6,0; e após 60 minutos de pré-incubação, houve inativação enzimática completa. Não foi verificado o mesmo comportamento da enzima quando pré-incubada em pH 2,5 no gelo, onde a redução foi de 83% da atividade, sem inativação total, mas houve tendência de queda em sua atividade e permanência da mesma (Figura 3). Porém a maior queda também ocorreu com 30 minutos de pré-incubação.

Segundo Burnette (5), a redução da atividade da peroxidase em pH baixo é atribuída à perda do grupo prostético heme, que é o responsável por sua atividade catalítica. Tem sido sugerido, que a liberação do grupo heme do sítio ativo é pH-dependente e ocorre mais rapidamente em pHs abaixo de 4,0, o que proporciona a perda da atividade da POD (40).

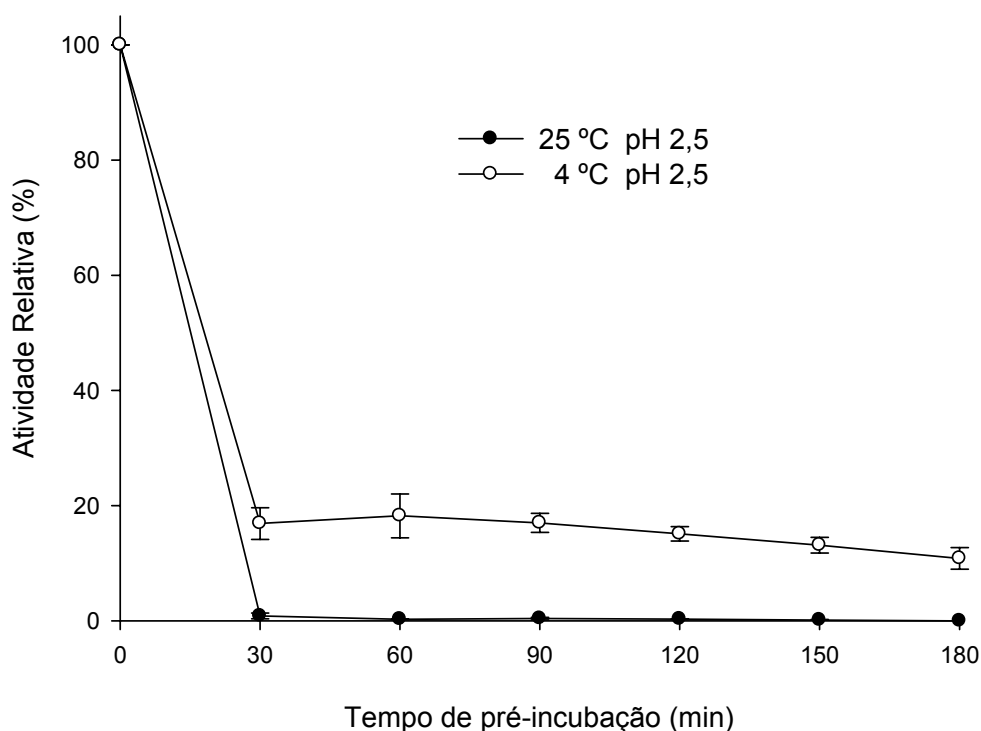


Figura 3- Influência do tempo de pré-incubação em pH 2,5 sob temperatura ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), sobre atividade relativa da POD em raízes de mandioca com pH 6,0. As barras verticais representam o erro padrão da média.

O comportamento da peroxidase com pH 9,0 sob incubação em temperatura ambiente e gelo (Figura 4), foi diferente do verificado em pH 2,5. Isto porque, não houve inativação da enzima. Nas duas condições de pré-incubação, verificou-se menor redução da atividade. A diminuição da atividade em pH 9,0, tanto em temperatura ambiente quanto em gelo, foi acentuada com 30 minutos de pré-incubação, e a estabilidade ocorreu após este período (Figura 4).

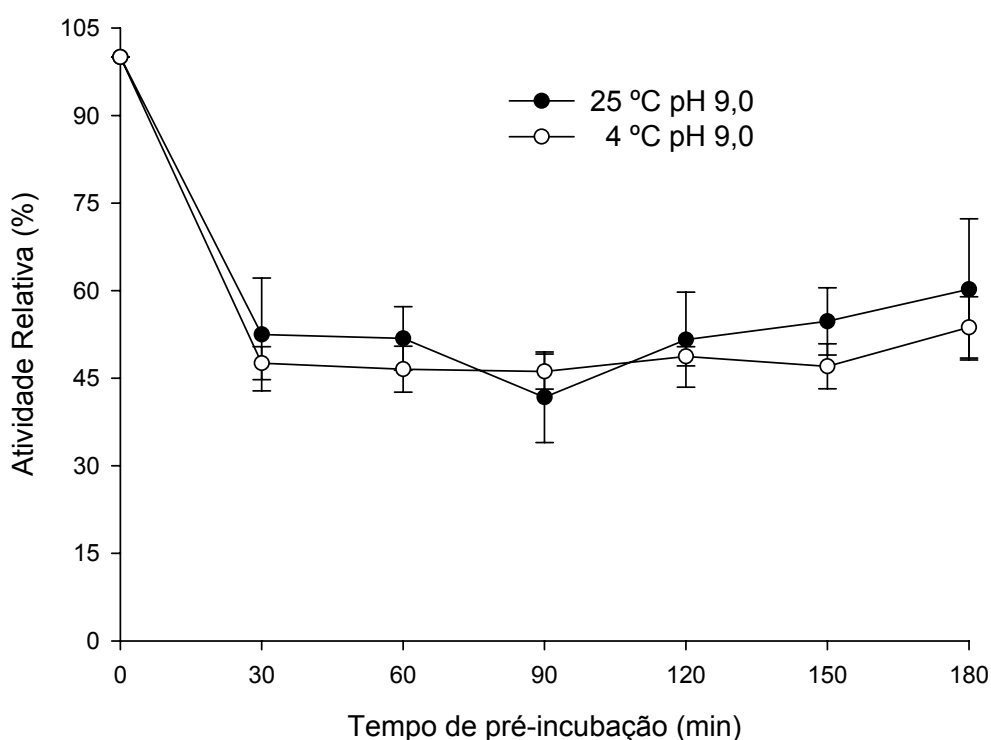


Figura 4- Influência do tempo de pré-incubação em pH 9,0 sob temperatura ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), sobre atividade relativa da POD em raízes de mandioca com pH 6,0. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Comparando os valores de atividade da enzima no pH ótimo (6,0) com os pHs 2,5 e 9,0, a atividade em pH 2,5 foi de apenas 6,75 % da atividade máxima e quando a reação foi feita em pH 9,0, a enzima aumentou para 31,5% de sua atividade (Figura 3 e 4). A atividade da peroxidase em pH 2,5 sob condições de temperatura ambiente (25 °C) e em gelo (4 °C), teve melhor

resultado para inativar a atividade da peroxidase em mandioca, o mesmo foi verificado com a batata-baroa utilizando também guaiacol como substrato (16). Portanto, a atividade da peroxidase não foi inativada em pH alcalino, sendo menos estável em pH ácido, que mostrou ser efetivo na redução da atividade enzimática, causando danos rápidos ao sítio ativo. Estes resultados sugerem que os tratamentos pós-colheita com substâncias ácidas (ácido ascórbico) seriam mais eficaz para inativar a enzima e reduzir em parte o escurecimento enzimático (31) em raízes de mandioca.

3.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade da peroxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

A peroxidase apresentou atividade máxima na temperatura de 40 °C, representando aumento de 29,3% em relação a sua atividade a 10 °C (Figura 5). Em tomate, a temperatura ótima para a atividade máxima foi de 55 °C (15). O mesmo não foi verificado em batata-baroa que teve sua atividade máxima em 30 °C, mostrando ser menos resistente a temperaturas elevadas (26). Em folhas de espinafre, verificou-se atividade da POD em temperatura variando de 0 a 90 °C, sendo a máxima atividade em 60 °C (21), tendo pequeno decréscimo após esta temperatura, mas não houve inativação da enzima, mostrando maior resistência a temperaturas elevadas.

O tratamento térmico para a peroxidase em raízes de mandioca *in natura* mostrou ser um processo não linear (Figura 5), o que está em concordância com trabalho realizado com maçãs (43), assim como o verificado em variedades de uva com decréscimo quase contínuo em sua atividade, sem proporcionar a inativação total (12). Algumas isoenzimas da peroxidase são resistentes a elevadas temperaturas (46), este fato condiz com os resultados deste trabalho.

O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de um número de fatores que incluem pH, força iônica do meio e a presença ou ausência de agentes ligantes como os substratos (protegem as enzimas de desnaturação pelo calor). Assim enzimas de baixo peso molecular compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alto peso

molecular. Uma enzima será mais estável ao calor, ou termoresistente em preparações brutas, livres de células que contenham concentração alta de outras proteínas (15; 28; 39).

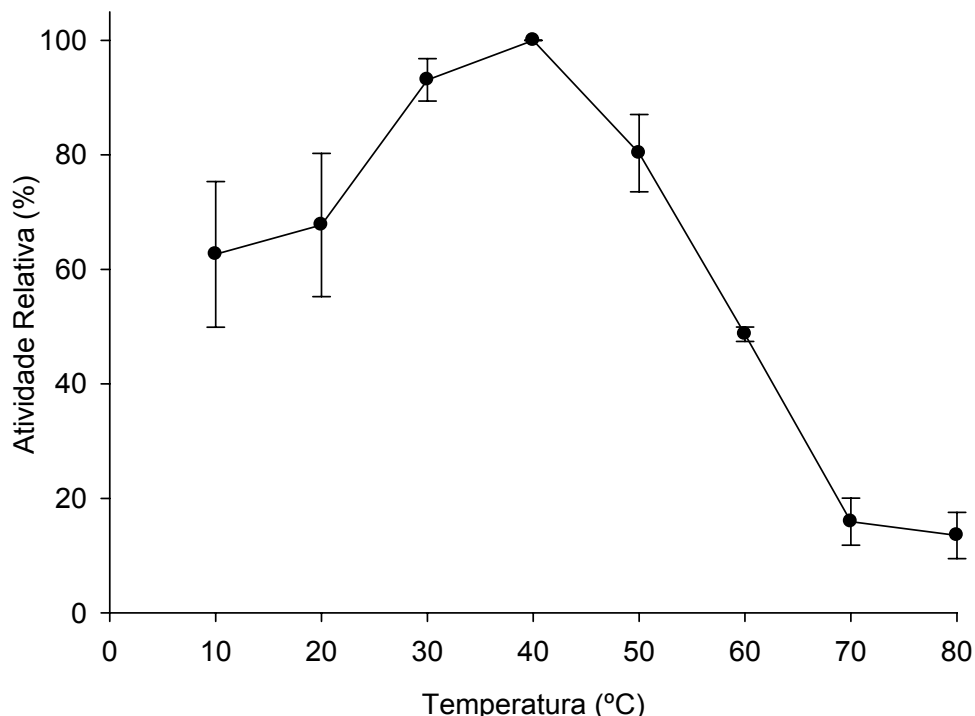


Figura 5- Influência da temperatura sobre a atividade relativa da POD de raízes de mandioca variedade 'Cacau Amarela', avaliadas em pH 6,0. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Durante o tratamento térmico dos extratos enzimáticos nas temperaturas de 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C foram observadas redução drástica na atividade da POD e tendência da mesma em se manter baixa e constante ao longo do tempo. As peroxidases de raízes de mandioca se mostraram resistentes a altas temperaturas. Os resultados encontrados (Figura 6 e 7) são semelhantes aos observados em estudo com beterraba (36). Nos extratos pré-incubados a 50°C, a redução na atividade da enzima foi ocorrendo gradualmente até 70 minutos de exposição, onde houve queda de 30,7%; nas temperaturas seguintes a redução se manteve quase constante, perdendo em torno de 20% da atividade em relação à inicial (Figura 6).

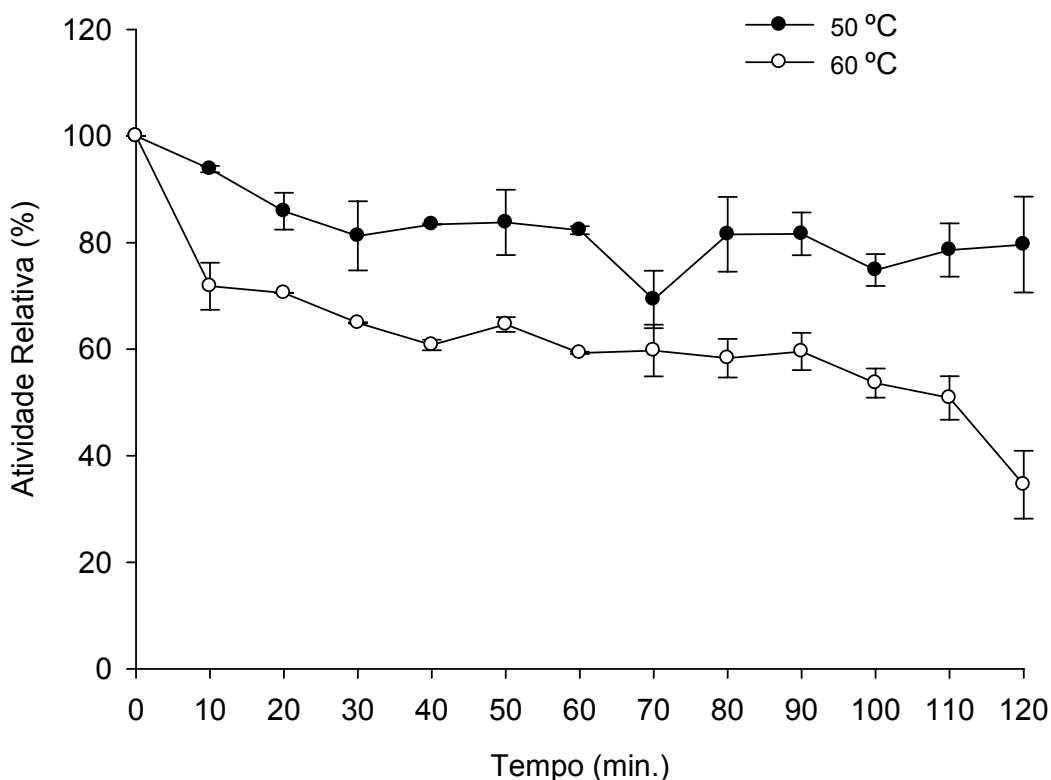


Figura 6- Atividade relativa da POD após pré-incubação a 50 °C e 60 °C, analisadas em pH 6,0 a 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em raízes de mandioca, a temperatura de 50 °C reduziu a atividade da POD, mostrando ser menos resistente ao calor quando comparada com folhas de *Phytolaca díóica* L. (Ombú tree) (14) e frutos de quiabo (29), que tiveram suas temperaturas ótimas em 50 °C e 54 °C respectivamente. Ao passo que a temperatura de 50 °C aos 10 minutos de incubação teve queda na atividade de 6,2%, a 60 °C no mesmo tempo a queda foi de 28,2%, mostrando a eficiência dessa temperatura em reduzir a atividade da POD numa velocidade maior. A 60 °C de pré-incubação houve redução de 40,7% na atividade da peroxidase depois de 60 minutos (Figura 6).

A velocidade de uma reação química está relacionada com a temperatura, sendo na maioria dos casos aumentada de acordo com o aumento da temperatura. No caso das enzimas a atividade catalítica se processa de maneira diferente, devido a sua estrutura terciária precisa, e

altamente ordenada, que é mantida principalmente por um grande número de ligações covalentes fracas. Sendo assim, se a molécula absorve energia a mais, a estrutura terciária romper-se-á e a enzima ficará desnaturada e perderá a atividade catalítica (28). Entretanto, diferenças na formação das enzimas conferem a peroxidase, como a verificada em mandioca, isoenzimas diferentes capazes de não serem desnaturadas completamente quando submetidas a altas temperaturas.

O tempo de cozimento da raiz de mandioca varia com a idade, teor de massa seca entre outras características. Portanto, de um modo geral o tempo de cozimento leva em torno de 30 minutos. Neste trabalho um dos objetivos, foi avaliar cineticamente a peroxidase, o que levou a avaliar o tempo necessário para inativar a enzima nas temperaturas de 70 e 80 °C, ao longo de 120 minutos (Figura 7). A atividade da peroxidase reduziu em 81% aos 20 minutos de pré-incubação, em temperatura de 70 °C; já a temperatura de 80°C, aos 10 minutos de pré-incubação, a inativação da atividade foi de 87 %.

A inativação enzimática, através da exposição do extrato a altas temperaturas foi utilizada em trabalhos com polpa e casca de maçã (43), o mesmo autor verificou que a enzima peroxidase é muito instável quando exposta a temperaturas de 60, 65, 70 e 75 °C durante 10 minutos, obtendo-se apenas a inativação máxima de 85% de sua atividade após 5 minutos de tratamento com 75 °C. Resultado diferente foi encontrado com mandioca, a temperatura de pré-incubação a 70 °C, que em mais tempo, 110 minutos, atingiu a inativação máxima de 97% em relação à atividade máxima, e aos 10 minutos de incubação só reduziu 11% de sua atividade (Figura 7).

Fazendo tratamento com temperatura de 70 °C, não houve inativação da enzima em raízes de absorção de beterraba, retendo mais de 70% da atividade mesmo depois de 20 minutos, o mesmo não ocorreu com HRP (horseradish peroxidase), que perdeu a maioria da atividade aos 11 minutos de inativação na mesma temperatura (36), mostrando ser menos termoestável do que a peroxidase em raízes de mandioca (Figura 7). Estas diferenças podem ser atribuídas à presença de isoenzimas que apresentam termoestabilidade diferente (2).

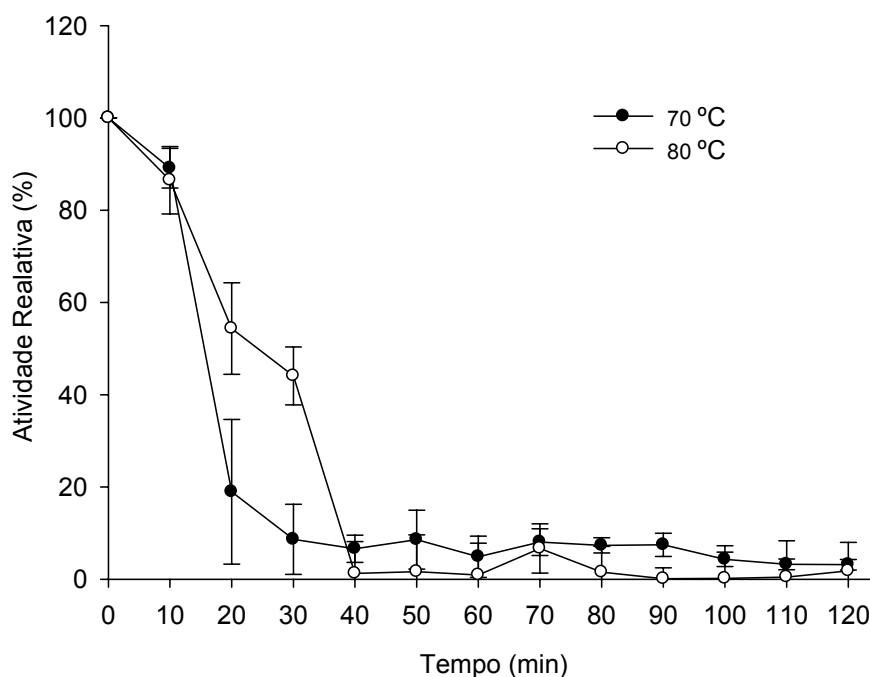


Figura 7- Atividade relativa da POD após pré-incubação a 70 °C e 80 °C, analisadas em pH 6,0 a 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

As atividades da POD, nos extratos enzimáticos, diminuíram com o tempo de exposição do extrato e com o aumento da temperatura, alcançando inativação de 99,1% aos 40 minutos de incubação na temperatura de 80°C (Figura 7). Em variedades da uva Benitaka e Rubi, houve inativação enzimática a uma temperatura de 85 °C, com tempo de exposição de 10 minutos (12), já na mandioca neste mesmo tempo, a redução foi de 13,5%, entretanto houve inativação de mais da metade (55,9%) aos 30 minutos de incubação do extrato (Figura 7). As enzimas podem se tornar novamente ativas após a inativação térmica, fenômeno conhecido por renaturação, o qual ocorre com algumas enzimas depois de cessado o agente causador da desnaturação, no caso o tratamento térmico. É fato conhecido que essa tendência é maior quando o resfriamento que segue o tratamento térmico é lento (27). Entretanto não foi verificado a renaturação da POD em raízes de mandioca submetidas a temperaturas de 70 e 80 °C neste trabalho (Figura 7).

Não foi possível detectar a inativação total com as temperaturas de incubação avaliadas (70 e 80 °C), entretanto foi possível conseguir percentual elevado em sua redução, mostrando que o tratamento térmico aplicado foi eficaz em reduzir à atividade da peroxidase nessas temperaturas.

4. CONCLUSÕES

A peroxidase de raízes de mandioca *in natura* da variedade 'Cacau Amarela' teve maior atividade na fração de 60-80% de sulfato de amônio.

A máxima atividade da POD ocorreu em pH 6,0 e temperatura de 40 °C. A inativação total da atividade enzimática ocorreu em pH 2,5 a 25 °C após 60 minutos de pré-incubação. Não houve inativação total em pH 2,5 a 4°C. Não houve inativação total em pH 9,0 a temperatura de 25 °C ou 4 °C. A utilização do pH ácido é uma alternativa no controle da atividade da peroxidase.

As temperaturas de pré-incubação a 50 °C e 60 °C, não promoveu redução na atividade da POD. A inativação parcial foi conseguida após 30 minutos de incubação a 70 °C, com 91% de sua atividade reduzida. A temperatura de pré-incubação de 80 °C reduziu 99,1% a atividade aos 40 minutos.

O aumento da temperatura e do tempo influenciou a atividade da enzima, embora estes fatores não tenham sido suficientes para a inativação total da POD, que mostrou ter relativamente alta tolerância térmica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- 1- Araújo, J. M. A. 1999. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, 416 p.
- 2- Berbicz, F., Clemente, E. 2001. Avaliação da termoestabilidade e da regeneração da atividade da peroxidase extraída de laranja (*Citrus ssp*). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 5, p. 1239-1242.

- 3- Bezerra, V. S., Pereira, R. G. F. A., Carvalho, V. D., Vilela, E. R. 2002. Raízes de Mandioca Minimamente Processadas: Efeito do Branqueamento na Qualidade e na Conservação; **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 26, n. 3, p. 564-575.
- 4- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- 5- Burnette, F. S. 1977. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: A review. **Journal of Food Science**, v.42, n.1, p.1-6.
- 6- Carvalho, V. D. de, Chalfoun, S. M., Juste Júnior, E. S. G. 1985. Métodos de armazenamento na conservação de raízes de mandioca: I. Efeito da embalagem de polietileno e serragem úmida associada a tratamentos químicos na deterioração pós-colheita e qualidade das raízes. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 4, n. 1, p. 79-85.
- 7- Castillo, L., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I., Csoregi, E., Sakharov, I. 2002. Purification and substrate of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science**, n. 163, p. 1011-1019.
- 8- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2596-2601.
- 9- De Marco, A., Guzzardi, A. and Jamet, E. 1999. Isolation of Tobacco Isoperoxidases Accumulated in Cell-Suspension Culture Medium and Characterization of Activities Related to Cell Wall Metabolism. **Plant Physiology**, v. 120, p. 371-381.
- 10- Duarte-Vazquez, M. A., Garcia-Almendarez, B. E., Regalado, C., Whitaker, J. R. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from

turnip (*Brassica napus* L. var. purple top white globe) roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4450-4455.

- 11- Fagundes, L. K., Streck, N. A., Lopes, S. J., Rosa, H. T. da Walter, L., Zanoni, A. J. 2009. Desenvolvimento vegetativo em diferentes hastas da planta de mandioca em função da época de plantio. **Ciência Rural**, v. 39, n.3.
- 12- Freitas, A. A., Francelin, M. A., Hirata, G. F., Clemente, E., Schmidt, F. L. 2008. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p.172-177.
- 13- Gaspar, T. H., Penel, C., Thorpe, T., Greppin, H. 1982. **Peroxidases 1970-1980**. (1st edn.). Geneva: Universidade de Geneva, Center de Botanique.
- 14- Guida, V., Criscuolo, G., Tamburino, R., Malorni, L., Parente, A., Di Maro, A. 2011. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). **BMB Rep.** v. 44, n.1, p. 64-9.
- 15- Heidrich, E., Lorenz, G., Schreier, P. 1983. Ultrathin – layer isoelectric focusing of partially purified peroxidase from tomato fruit. **Food Chemistry**, v.10, p. 285-296.
- 16- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. 2001. A large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant & Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468.
- 17- Janssen, W. and Wheatley, C. 1985. Urban cassava markets: the impact of fresh root storage. **Food Policy**, v. 10, p. 265-277.
- 18- Kader, R., Irmoulj, M., Nicolas, J. P., Metche, M. 2002. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanism of anthocyanin degradation in blueberry juice. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 911-915.

- 19- Karsten, J. 2009. **Envolvimento da Peroxidase e Polifenoloxidase no Bloqueio Xilemático se Hastes de Ave-do-Paraíso (*Strelitzia reginae*).** 121 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 20- Kato, M. do S., Souza, S. M. C. 1987. Conservação de raízes após colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 9-14.
- 21- Koksai, E. 2011. Peroxidase from Leaves of Spinach (*Spinacia oleracea*): Partial Purification and Some Biochemical Properties. **International Journal of Pharmacology**, v.7, n. 1, p. 135-139.
- 22- Lagrimini, L.M., Gingas V., Finger F., Rothstein, S., Liu T.-T.Y. 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1187-1196.
- 23- Lakshmi, M. C.; Raghavarao, K. S. M. S. 2010. Downstream Processing of Soy Hull Peroxidase Employing Reverse Micellar Extraction. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 937-945.
- 24- Lorenzi, J. O. 2003. **Mandioca**. 1ª ed. Campinas, CATI. 116p. (Boletim Técnico, 245).
- 25- Mellon, J. E. 1990. Purification and Characterization of Isoperoxidases Elicited by *Aspergillus flavus* in Cotton Ovule Cultures. **Plant Physiology**, v. 95, n.1, p.14-20.
- 26- Menolli, L. N., Finger, F. L., Puiatti, M., Barbosa, J. M., Rarros, R. S. 2008. Atuação das enzimas oxidativas no escurecimento causado pela injúria por frio em raízes de batata-baroa. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p. 57-63.

- 27- Morales, M. & Barceló, A. R. 1997. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v.45, n.2, p.229-232.
- 28- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2006. Lehninger. Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier. 1202 p.
- 29- Neves, L. L. de M. 2003. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]**. 72 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 30- Perone, Cássia, A. S., Queiroz A. S., Dalosso, V. M., Moreira, M. E. M. 2007. Purificação parcial e caracterização cinética da enzima Polifenol oxidase de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 3, p. 239- 246.
- 31- 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.
- 32- Ribeiro, R. A., Finger, F. L., Puiatti, M., Casali, V. W. D. 2005. Chilling injury sensitivity in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. **Tropical Science**, v. 45, p. 55-57.
- 33- Ricakrd, J. E. 1985. **Physiological deterioration of cassava roots**. **Journal of the Science Food and Agricultural**, London, University of London, v.36, n.3, p.167-168.
- 34- Ricakrd, J. E., Coursey, D. G. 1981. Cassava storage. Part I: storage of fresh cassava. **Journal of Tropical Science**, v. 23, p.1-32.

- 35- Reilly, K., Gómez-Vásquez, R., Buschmann, H., Tohme, J., Beeching, J. R. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological Deterioration. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 625-641.
- 36- Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N. M., Neelwarne, B. 2007. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v.105, p.1312-1320.
- 37- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., Del Amor, F.M., Núñez-Delicado, E. 2008. Kinetic characterization and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**, v. 107, p. 193-199.
- 38- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan. G., Daeihassani, B., Movafegi, A., Samadi, A. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) Cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.5, p. 751-763.
- 39- Theorell, H. 1951. **In The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action**. Edited by Sumner, J.B and Myrback, K. p. 397-427. Academic Press, NY.
- 40- Thongsook, T., Barrett, M. 2005. Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica) Peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3206-3214.
- 41- Uritani, I. 1999. Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.40, p.177-183.

- 42- Uritani, I. and Reys, E. D. 1984. (eds.) Tropical roots crops: Postharvest Physiology and Processing. Tokyo: **Scientific Societiy Societiy Press**. 328p.
- 43- Valderrama. P., Marangoni, F., Clemente, E. 2001. Efeito do Tratamento Térmico sobre a atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 321-325.
- 44- Van Huystee, R. B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 205-217.
- 45- Welinder, K. G. 1991. *In* **Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. Edited by Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. and Gasper, Th. p. 3-13. University of Genève, Switzerland.
- 46- Zanatta, C. L., Zotarelli, M. F., Clemente, E. 2006. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p.705-708.

Artigo 2

ATIVIDADE DA PEROXIDASE NA RESISTÊNCIA DE MANDIOCA IN NATURA A DETERIORAÇÃO FISIOLÓGICA

RESUMO

A alta perecibilidade da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) *in natura* faz com que a mesma tenha que ser consumida dentro de um período muito curto após a colheita. A principal causa deve-se a deterioração fisiológica, caracterizada por estrias azuladas na polpa, que progride ao longo dos parênquimas, sendo seu rápido desenvolvimento atribuído a reações oxidativas das substâncias fenólica, pela atividade da enzima peroxidase E.C.1.11.1.7. (POD). Esta tem papel de defesa das plantas, protegendo tecidos danificados contra efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio formadas pelo metabolismo celular. Neste trabalho, objetivou-se avaliar diferentes inibidores da peroxidase (não nocivos), e assim prolongar a vida Pós-Colheita e reduzir o escurecimento enzimático em raízes de mandioca. O material avaliado proveniente da Região de Viçosa-MG foi analisado no Laboratório de pós-colheita da UFV. As raízes foram tratadas por uma hora em soluções contendo diferentes produtos: ácido ascórbico, azida sódica, bissulfito de sódio, Na₂EDTA, L-cisteína e SDS nas concentrações de 1, 5 e 10 mM, e deixadas à temperatura ambiente (25 °C) por seis dias. A cada dois dias foi realizada análise visual e retiradas amostras de 2 cm de espessura para posterior avaliação da peroxidase. Todos os tratamentos foram eficientes em aumentar a vida de prateleira das raízes de mandioca *in natura* em 80%, até 4 dias. O ácido ascórbico, bissulfito e L-cisteína foram eficientes em aumentar a vida de prateleira em até 6 dias, nas respectivas concentrações, C10 mM, C 5-C10 mM e C5 mM. Houve relação positiva entre atividade da peroxidase e escurecimento enzimático. No segundo dia houve redução na atividade da peroxidase de 97%, 96% e 98%, em relação ao controle, nas concentrações C1, C5 e C10 mM respectivamente. O escurecimento enzimático em raízes de mandioca tem como um dos catalisadores a enzima peroxidase.

1. INTRODUÇÃO

A Mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) pertence à família das Euforbiaceas. É planta nativa do Brasil e foi disseminada para áreas tropicais e sub-tropicais da América Central, Ásia e da África (1; 8). Diferentemente da maioria das espécies amiláceas como taro (*Colocasia esculenta*), cará (*Dioscorea alata*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*), tem capacidade de aproveitar os eventuais períodos de chuvas abundantes, e consegue sobreviver junto a plantas daninhas e pragas (3; 4). Suas raízes são fonte de carbono, principalmente na forma de amido. No Brasil o cultivo é caracterizado por plantações em pequena escala, basicamente de subsistência, nas regiões Nordeste e Norte, e de grande escala nas regiões Sul e Centro-oeste.

A comercialização da mandioca é principalmente nas formas: inteira com casca (*in natura*), apenas descascada e lavada, congelada, cozida ou pré-cozida. No Brasil o consumo é feito na forma de raízes *in natura* e de produtos derivados como, farinha, polvilho entre outros. A dificuldade em manter raízes frescas por alguns dias após a colheita tem sido um dos maiores problemas para a comercialização *in natura* e para o processamento; isto por que órgãos tuberosos são vulneráveis a diversos estresses como danos mecânicos causados pela colheita, transporte e armazenagem (9; 20; 29).

Uma das principais causas da alta perecibilidade dos alimentos é a evaporação da água; a disponibilidade de oxigênio no tecido; reações oxidativas que envolvem a síntese de compostos fenólicos e enzimas como a PAL (fenilalanina amônia liase), a PPO (polifenoloxidase) e a POD (peroxidase). Assim, são identificados dois processos de deterioração, a primária (fisiológica) causa inicial da perda da qualidade e aceitabilidade no mercado, e a deterioração secundária ou microbiológica, que envolve a presença de microorganismos como fungos e bactérias que atuam logo após as injúrias, responsável pela decomposição do produto (1; 4; 15; 16).

A deterioração fisiológica é atribuída a reações oxidativas que envolve a síntese de compostos fenólicos, quando o tecido sofre danos mecânicos, e é caracterizada por estrias azuladas e escurecimento na polpa que progride ao longo dos parênquimas. As reações são catalisadas pela POD (EC.1.11.1.7.) que oxida a escopoletina (23) formando essas estrias; e pela PPO

(EC.1.10.3.1.) (8; 18) que fazem a hidroxilação de monofenóis produzindo o-difenóis e removem hidrogênios dos o-difenóis para produzir quinonas, que se polimerizam formando melaninas, que são pigmentos escuros (4).

A POD e PPO são enzimas resistentes a temperaturas elevadas e sua inativação tem sido usada como indicador de adequação de branqueamento em processamentos vegetais (11), e sua atividade pode se regenerar depois de ter sido inativada por altas temperaturas (11). A alta perecibilidade da mandioca *in natura* faz com que a mesma tenha que ser consumida dentro de um período muito curto após a colheita, e como as regiões produtoras estão distantes dos centros consumidores, observa-se a necessidade de se desenvolver tecnologia pós-colheita visando aumentar a vida útil. Assim sendo, objetivou-se avaliar diferentes inibidores (não nocivos) da peroxidase para reduzir o escurecimento enzimático e prolongar a qualidade pós-colheita das raízes de mandioca *in natura* da variedade Cacau Amarela.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Raízes de mandioca mansa da variedade 'Cacau Amarela' foram colhidas na região de Viçosa- MG, quando as plantas estavam com um ano de idade. Foram selecionadas raízes isentas de doença e dano aparente, em seguida foram transportadas para o laboratório de Pós-Colheita da Universidade Federal de Viçosa-MG (UFV). As raízes foram limpas (lavadas em água corrente) e tratadas com diferentes inibidores da peroxidase.

2.1. Tratamentos pós-colheita

As raízes de mandioca, sem ferimentos aparentes, foram tratadas com inibidores da peroxidase, permanecendo embebidas por 1 hora nas soluções a 1 mM, 5 mM e 10 mM dos compostos: ácido ascórbico, bissulfito de sódio, EDTA, L-cisteína, azida sódica, sódio dodecil sulfato (SDS). Em seguida foram retiradas e deixadas sob a bancada no laboratório por seis dias à temperatura ambiente (25 °C).

2.2- Análise visual e vida de prateleira

A cada dois dias foram realizadas análise visual da deterioração fisiológica (escurecimento) (Tabela 1). A longevidade das raízes de mandioca nos diferentes tratamentos foi determinada de acordo com o escurecimento e o número de círculos de deterioração da polpa das raízes. Esta análise foi realizada a cada dois dias compreendidos entre o início do tratamento ao dia em que as raízes estavam impróprias para o consumo (Figura 1).

Tabela 1. Descrição da escala de pontuação adotada para avaliar o processo evolutivo da deterioração fisiológica.

NOTA	DESCRIÇÃO VISUAL
1	Sem anel deteriorativo - Ponto ideal de consumo
3	Um anel deteriorativo - Início de estrias deteriorativos, mas ainda consumível
5	Dois anéis deteriorativos- mudança no sabor quando processada
7	Imprópria para consumo ou processamento, números de anel deteriorativo ≥ 3

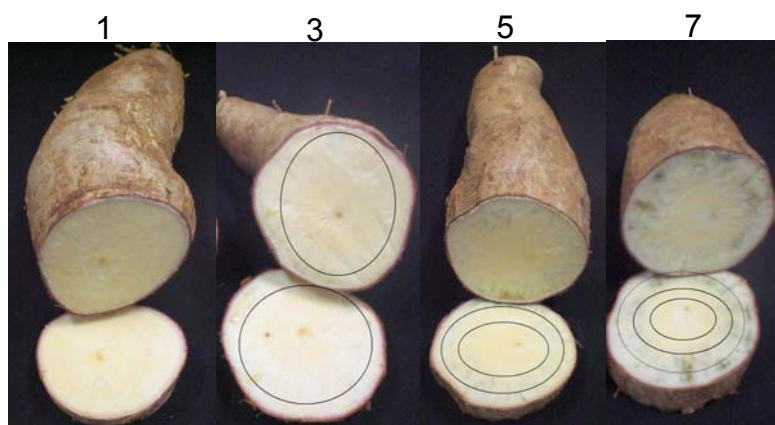


Figura 1. Notas da análise visual da deterioração fisiológica em raízes de mandioca *in natura* pela peroxidase (1) (3) (5) (7). Fonte: Ramos (2011).

2.3- Extração e determinação da atividade enzimática tratadas com inibidores da POD

A cada dois dias foram retiradas amostras de 2 cm de espessura da base cortada. As amostras foram embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido, em seguida foram armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C até sua utilização. O extrato enzimático da polpa da raiz de mandioca foi obtido, utilizando-se 30 g de amostra em 150 mL de tampão de extração (Tabela 2), triturada e homogeneizada em politron a 4 °C. A solução foi filtrada em quatro camadas de gazes e recolhida em béquer, em banho de gelo, e a suspensão resultante foi centrifugada a 11.000 g a 4 °C por 30 min. Do sobrenadante denominado fração enzimática solúvel, foram realizadas análises de atividade da enzima e teor de proteínas. Na ausência de inibidores a atividade relativa foi considerada como 100% e as demais foram calculadas com base nesta.

A atividade da peroxidase presente na raiz de mandioca foi determinada em espectrofotômetro pela medida de absorbância a 470 nm a 25 °C, seguindo o método descrito por Neves (23), com algumas modificações. Em 1,5 mL do tampão de reação fosfato de potássio adicionou-se 0,5 mL de peróxido de hidrogênio, o qual foi preparado no momento, em seguida foi adicionado 0,5 mL do guaiacol (Tabela 2). A reação iniciou-se pela adição do extrato enzimático que variou com a amostra, totalizando volume de reação de 3 mL. A alteração na absorbância foi medida ao longo de três minutos.

O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água. A atividade enzimática foi expressa em UA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade enzimática específica de cada extrato está relacionada às dosagens de proteína total. Para as dosagens, é necessária a construção de uma curva de calibração utilizando a proteína albumina de soro bovino como padrão, segundo a metodologia descrita por Bradford (6).

Tabela 2- Composição dos tampões utilizados na extração e reação da POD.

	Tampão de extração	Tampão de Reação
Peroxidase	Tampão fosfato [fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) + dibásico (K_2HPO_4)] 0,1 M e pH 6,5; bissulfito de sódio (0,1%) e cloreto de sódio (0,15 M)	Tampão fosfato 0,1 M e pH 6,5 (regular o pH com o monobásico ou dibásico) + guaiacol (1,7%) + peróxido de hidrogênio (1,8 %)

2.4- Análise Estatística

Os dados das concentrações de cada inibidores foram submetidos à análise estatística usando o delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 tratamentos (inibidores) e 4 repetições compostas por raízes *in natura*. As médias foram comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade através do programa estatístico SAEG.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Análise visual e vida de prateleira

No segundo dia de análise, 100% das raízes tratadas com diferentes inibidores da peroxidase nas concentrações de 1, 5 e 10 mM, tiveram nota 1, ou seja, permaneceram com aparência ideal para comercialização (Tabela 3). O escurecimento das raízes de mandioca *in natura* foi reduzido, aplicando-se diferentes inibidores nas concentrações de 1 mM, 5 mM ou 10 mM. Os tratamentos que proporcionaram maiores conservação pós-colheita foram ácido ascórbico (6 dias, concentração 10 mM, nota 3), bissulfito de sódio (6 dias, concentração 5 e 10 mM, nota 3), e L-cisteína (6 dias, concentração 5 mM, nota 3) (Tabela 3).

O escurecimento enzimático que promove a perda de qualidade do produto envolve presença de enzimas, substrato e oxigênio e pode ser controlado modificando-se um destes fatores. Se qualquer um dos fatores

citados estiver ausente ou incapaz de participar da reação, não haverá a oxidação dos substratos. Como consequência não ocorrerá o escurecimento enzimático do produto (28). Alguns fatores aumentam esse processo deteriorativo como: disponibilidade de oxigênio no tecido; evaporação de água; oxidação de compostos fenólicos e atividade enzimática da PAL (fenilalaninaamonialase), PPO (polifenoloxidase) e POD (peroxidase), desencadeadas pelos danos pós-colheita.

Tabela 3. Notas da avaliação visual de raízes de mandioca tratadas com inibidores da deterioração fisiológica, nas concentrações: 1 mM (C1), 5 mM (C5), 10 mM (C10), no período de seis dias de armazenamento.

Tratamentos	2 Dia			4 Dia			6 Dia		
	Concentração			Concentração			Concentração		
	C1	C5	C10	C1	C5	C10	C1	C5	C10
Controle	1	1	1	7	7	7	7	7	7
Acido Ascórbico	1	1	1	5	7	1	7	7	3
Azida Sodica	1	1	1	3	5	7	3	7	7
Bissulfito de sódio	1	1	1	7	1	1	7	3	3
EDTA	1	1	1	3	3	3	5	5	5
L-cisteína	1	1	1	3	3	3	5	3	5
SDS	1	1	1	7	5	3	7	5	5

* Os número correspondem as notas de 1, 3, 5 e 7, de acordo com o grau de deterioração fisiológica, com 80% das raízes com nota 3.

3.1.1- Ácido ascórbico

O tratamento com ácido ascórbico proporcionou maior longevidade das raízes na concentração de 10 mM no período de armazenamento (Tabela 3). No segundo dia todas as concentrações testadas foram eficientes em reduzir o escurecimento enzimático em raízes de mandioca, com aproveitamento de 100% (Figura 2). As raízes estavam boas para o consumo, com boa qualidade. Resultado semelhante foi encontrado em batata e taro, com inibição de 100% usando o ácido ascórbico, nas concentrações de 5 e 10 mM, respectivamente (10).

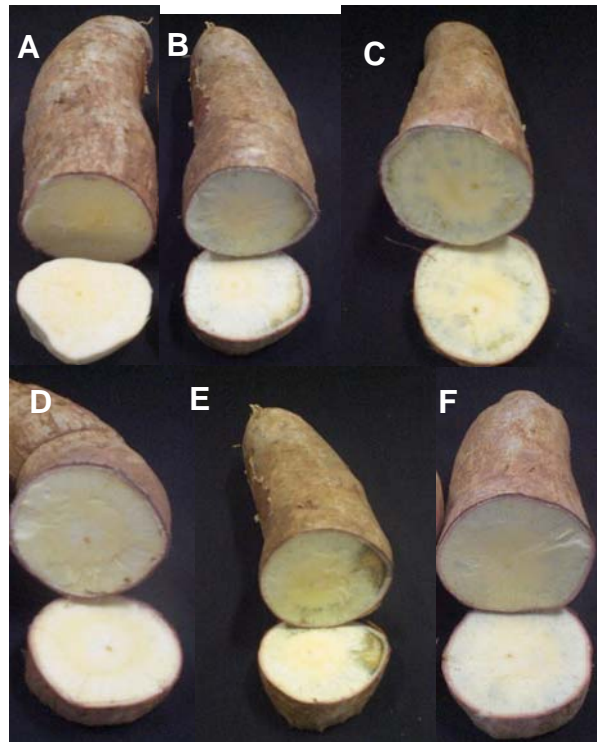


Figura 2. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com ácido ascórbico: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4, concentrações 1 mM nota 5, (C) 5 mM nota 7, (D) 10 mM nota 1; (E) dia 6, concentrações 1 mM e 5 mM nota 7, (F) 10 mM nota 3.

Dentre os antioxidantes mais pesquisados destacam-se os ácidos cítrico, ascórbico e eritórbito. O ácido ascórbico (AA) é uma das mais importantes vitaminas (vitamina C) que podem manter as funções normais do corpo humano e participa em diversos processos do metabolismo celular. É usado no comércio devido sua habilidade em reduzir quininos novamente a compostos fenólicos, prevenido a formação do escurecimento.

Também é usado na indústria de batatas minimamente processadas (25); na avaliação de nutrientes; como antioxidantes para uso em frutas, hortaliças e seus sucos (11). Tratamentos químicos à base de cisteína e ácido ascórbico têm sido apontados como efetivos na prevenção do escurecimento de produtos minimamente processados (26), como em banana, que escurece poucos minutos após seu descascamento e corte, sendo tal processo

associado à elevação da atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase (19).

3.1.2- Azida sódica

Raízes de mandioca da variedade Cacau Amarela, foram tratadas com diferentes concentrações de azida sódica, para verificar sua eficiência em inativar a atividade da peroxidase, e assim reduzir o escurecimento enzimático. Na tabela 3 estão os resultados das notas visuais referentes aos tratamentos aplicados, avaliado ao longo de 6 dias. Nota-se que, 100% das raízes tratadas com esse sal tiveram nota 1 no segundo dia em todas as concentrações, e 33,33% tiveram nota 3 a 1 mM nos dias 4 e 6. Entretanto maiores concentrações podem ter promovido intoxicação das raízes pelo sal, porque nas concentrações de 5 e 10 mM as notas foram 5 e 7, respectivamente (Figura 3).

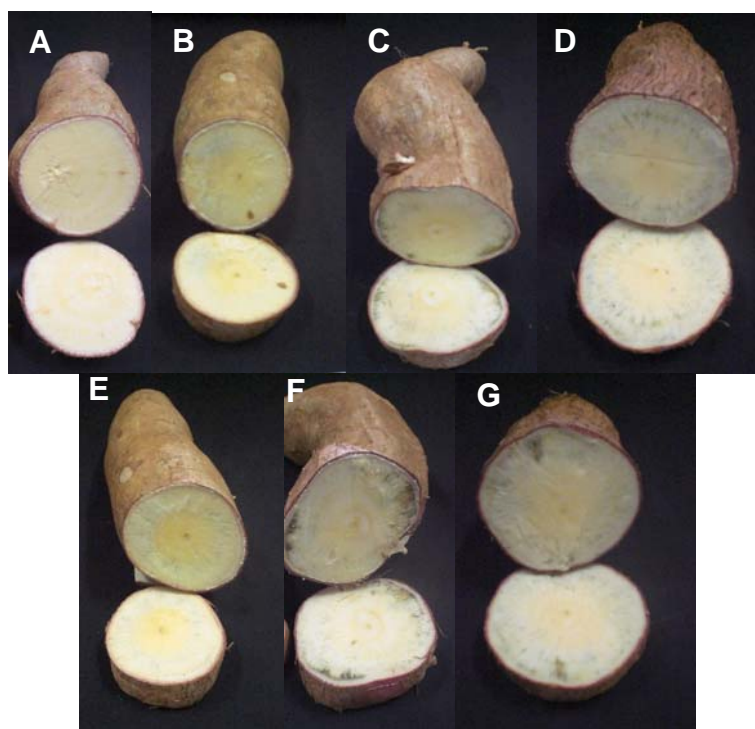


Figura 3. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com azida sódica: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4 concentração 1mM nota 3, (C) 5 mM nota 5, (D) 10 mM nota 7; (E) dia 6 concentração 1 mM nota 3, (F) 5 Mm e (G) 10 mM nota 7.

A azida sódica é um produto não recomendado para ingestão, por ser prejudicial à saúde afetando órgãos como o coração. Entretanto é bastante utilizado como agente de teste em laboratório e em hospitais como bactericida. Portanto trabalhos com esse sal é realizado devido sua eficiência como inibidor de formação dos compostos O-H-LSD (2-oxo-3-hidroxi-LSD) (13), como inibidor de enzimas que degradam ATP e ADP (11), além de ser conhecida como inibidor clássico de mieloperoxidase (MPO) (13).

3.1.3- Bissulfito de sódio:

O Bissulfito de sódio mostrou ser eficiente em reduzir o escurecimento causado pela peroxidase em raiz de mandioca *in natura*, sendo possível em concentrações de 10 mM aumento em 6 dias de vida de prateleira (Tabela 3 e Figura 4). Com esses resultados, mostra a influência benéfica dos tratamentos aplicados, e na técnica em deixar por uma hora as raízes embebidas nas soluções em concentrações de 1, 5 e 10 mM, aumentando o tempo de qualidade das raízes. Assim, mais da metade das raízes tiveram características indicada para o consumo, devido a conservação e qualidade, evidenciando a eficiência em reduzir o escurecimento em raízes de mandioca *in natura*.



Figura 4. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com bissulfito de sódio: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4 concentração 1 mM nota 7, (C) 5 mM e 10 mM nota 1; (D) dia 6 concentração 1 mM nota 7, (E) 5 mM e 10 mM nota 3.

3.1.4- Na₂EDTA

O tratamento feito com solução de EDTA foi eficiente em aumentar a vida de prateleira em até quatro dias, tendo aproximadamente 80% das raízes em boas condições para comercialização, com notas 1 e 3 (Tabela 3 e Figura 5). Das raízes tratadas somente 33,33% tiveram nota 5 no sexto dia, em todas as concentrações.

O ácido etilenodiaminotetracético ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) está entre os agentes quelantes mais comumente utilizados na indústria de alimentos, se ligando a íons metálicos, como o cobre, que é fundamental para a ativação da polifenoloxidase, retardando o efeito dessa enzima (33). É sugerido que tenha a capacidade de mobilizar metais pesados dos sedimentos do rio ou aquíferos (17). Também é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e aplicações agrícolas (3), e fabricação de pães e derivados na indústria alimentícia (24).



Figura 5. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4- concentrações 1, 5 e 10 mM nota 3; (C) dia 6- concentrações 1, 5 e 10mM nota 5.

3.1.5- L-cisteína

Raízes de mandioca *in natura* da variedade Cacau Amarela, tratadas com L-cisteína tiveram no segundo dia um aproveitamento de 100%, em todas as concentrações, mostrando sua eficiência em reduzir o escurecimento enzimático (Tabela 3 e Figura 6). O tratamento com L-cisteína proporcionou maior longevidade na concentração de 5 mM nos três dias de avaliação (Tabela 3 e Figura 6), tendo 44,4% das raízes com nota 3 e 33,3 % com nota 1.

Portanto o aproveitamento das raízes tratadas com esse aminoácido foi de mais de 50%, aumentando a vida de prateleira em 6 dias na concentração de 5 mM.

Dentre as substâncias com efeito antioxidante, podem-se citar ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, L-cisteína, ditioneitol, tiuréia, água de coco e albumina de soro bovino. Essas substâncias podem atuar inibindo a síntese ou a ação de enzimas ligadas à oxidação dos polifenóis ou agir como adsorventes dessas substâncias (14), anulando o efeito tóxico de muitas substâncias (30), como o verificado em raízes de mandioca.

Soluções de N-acetil-L-cisteína (1%) foram utilizados em tratamentos com batata 'Ágata' minimamente processada e submetida a diferentes tratamentos com antioxidantes (25), e se mostraram eficazes no retardamento do escurecimento enzimático, condizendo com este trabalho. Estudos realizado com maçãs indiana, usando a L-cisteína como inibidor da peroxidase, verificou-se que 57% da atividade da variedade Kali foi inibida a 5,0 mM; 17% da variedade Devi e Kinnaur a 5,0 mM e 21% da atividade da Chocklaty a 2,5 mM foi inibida (27). Assim, fica evidente sua utilização em diferentes espécies vegetais.

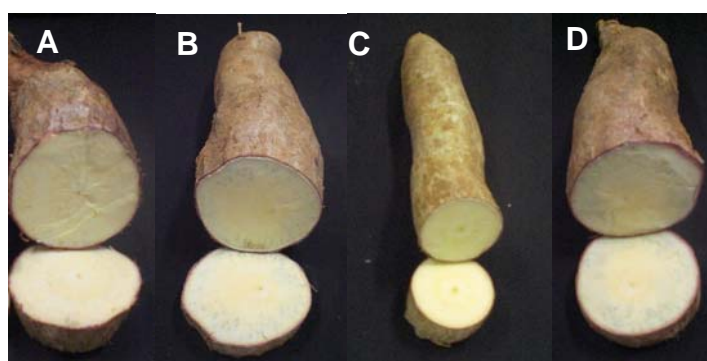


Figura 6. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com L-cisteína: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4- concentrações 1, 5 e 10 mM nota 3; (C) dia 6- concentração 5 mM nota 3, (D) 1 mM e 10 mM nota 5.

3.1.6- Dodecil sulfato de sódio- (SDS)

O tratamento feito com solução de SDS foi eficiente em aumentar a vida de prateleira em dois dias, tendo aproximadamente 80% das raízes em boas condições para comercialização, com notas 1 (Tabela 3 e Figura 7). Das raízes tratadas somente 33,33% tiveram nota 3 no quarto dia a 10 mM.

Os surfactantes caracterizam-se por possuir duas regiões distintas na mesma molécula: uma região polar (hidrofílica) e outra região não-polar (hidrofóbica). O Dodecil sulfato de sódio (SDS) é exemplo desta natureza ambígua dos compostos tenso-ativos, que apresenta uma longa cadeia alquílica, praticamente insolúvel em água, ligada covalentemente a um grupo iônico, o sulfato de sódio. Eles auxiliam desde a solubilização das membranas celulares até a desnaturação de proteínas (3; 22). É utilizado em métodos de isolamento de DNA, na elaboração do tampão de lise.

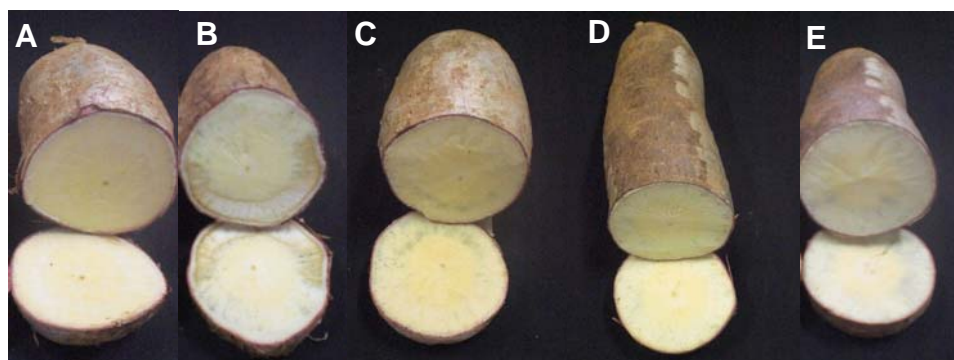


Figura 7. Aspecto do corte em raízes de mandioca 2, 4 e 6 dias após o tratamento com SDS: (A) dia 2- concentrações 1, 5 e 10 mM, nota 1; (B) dia 4 concentração 1 mM nota 7, (C) 5mM nota 5, (D) 10 mM nota 3; (E) dia 6 concentração 1mM nota 7, (E) 5mM e 10 mM nota 5.

3.2- Extração e determinação da atividade enzimática tratadas com inibidores da POD.

Os tratamentos causaram redução significativa da atividade da peroxidase em todas as concentrações no segundo dia de avaliação ($P < 0,05$) (Tabela 4). A redução foi maior em raízes de mandioca, tratadas com a azida sódica, bissulfito de sódio e SDS a 10 mM, quando comparadas as concentrações de 1 e 5 mM. As plantas ricas em fenolases quando sofrem dano, resulta em aumento na atividade das enzimas oxidativas tais como peroxidase (EC 1.11.1.7) (35) e fenoloxidase. Assim a vida pós-colheita de mandioca *in natura* varia entre 1 – 3 dias. Essa diferença reflete em parte a idade da planta; as diferentes condições de colheita, armazenamento transporte; tratamentos aplicados nas raízes para aumentar sua conservação.

No segundo dia, todos os tratamentos foram eficientes em aumentar à vida de prateleira das raízes *in natura*, armazenadas a temperatura ambiente e tratadas com diferentes inibidores da peroxidase (Tabela 3), mostrando existir relação entre o escurecimento enzimático e redução da peroxidase. Estatisticamente todas foram iguais e diferentes do controle (Tabela 4), assim todas as raízes tratadas com os seis inibidores da peroxidase foram eficientes em reduzir o escurecimento, e reduzir a atividade enzimática.

De acordo com Voet *et al.*, (31), inibidores enzimáticos atuam por diferentes mecanismos. Alguns são substâncias que se assemelham aos próprios substratos das enzimas, que reagem lentamente, outros inibidores interferem na atividade catalítica sem influenciar a ligação do substrato, e existem aqueles que fazem os dois processos. A capacidade de diferentes compostos em inibir a POD depende da natureza e concentração do inibidor, fonte da peroxidase, disponibilidade de substrato (O_2 , fenóis), pH e temperatura (3). A adição de solventes orgânicos a uma solução aquosa de enzima pode diminuir o substrato de ligação e o efeito catalítico, reduzindo assim as taxas de reação. Moléculas de solvente pode interagir diretamente com o centro ativo das enzimas, alterando assim a sua estrutura e causando a inativação (reversível ou irreversível). Mas, o efeito desses solventes orgânicos sobre a estabilidade e atividade catalítica de peroxidases também depende do material, da enzima, das suas condições de cultivo, do processo de purificação, e concentração dos solventes (7).

Tabela 4. Valores médios de deterioração fisiológica de raízes de mandioca, tratadas com diferentes concentrações (1 mM, 5 mM e 10mM) de inibidores da POD, ao longo dos dias de armazenamento.

Tratamentos	Dia 2			Dia 4			Dia 6		
	Concentração (mM)			Concentração (mM)			Concentração (mM)		
	C1	C 5	C 10	C1	C 5	C 10	C1	C 5	C 10
Controle	120,978a	120,978a	120,978a	212,691a	212,691a	212,691a	226,463a	226,463a	226,463a
Acido ascórbico	3,196 b	6,128 b	3,890 b	13,051 b	24,151 b	22,982b	17,366 b	40,143 b	134,017 b
Azida sodica	3,820 b	3,497 b	1,310 b	20,959 b	19,655 b	4,479b	56,008 b	50,390 b	60,273 b
Bissulfito de Sódio	3,590 b	2,094 b	1,645 b	15,666 b	7,644 b	12,997b	114,843 b	24,780 b	43,508b
Na ₂ -EDTA	3,588 b	4,400 b	3,164 b	24,793 b	17,330 b	6,658 b	138,574 b	27,362 b	45,404 b
L-cisteína	4,336 b	4,418 b	3,278 b	13,676 b	7,068 b	16,505 b	43,594 b	46,952 b	179,027a
SDS	3,095 b	3,852 b	1,741 b	16,241 b	16,071 b	12,793 b	103,778 b	60,728 b	91,996 b
CV (%)	11,9	12,7	12,1	4,7	8,0	4,9	17,4	7,4	27,9

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Ducan a 5% de probabilidade

No quarto dia de tratamento, houve melhor resultado do ácido ascórbico na concentração de 10 mM em reduzir o escurecimento das raízes. Entretanto, comparando com a atividade da peroxidase neste mesmo dia (Tabela 4), verificou-se que a menor atividade foi conseguida na concentração 1 mM. Portanto, mesmo o ácido ascórbico reduzindo o escurecimento das raízes, não necessariamente se deve a inativação da POD, pode ter ocorrido a inativação de outra enzima como a polifenoloxidase. Isto porque o ácido ascórbico atua mais como antioxidante do que como inibidor enzimático, reduzindo as quinonas (PPO) antes que elas sofram as reações secundárias que levam ao escurecimento.

A azida sódica na concentração de 1mM, teve melhor resultado visual em qualidade de raízes, entretanto teve maior atividade da peroxidase nessa concentração, e menor quando a concentração foi de 10 mM. Mostrando, não ter relação inversa entre o escurecimento e a atividade da peroxidase. Por outro lado, o bissulfito de sódio se mostrou coerente, uma vez que em concentrações com melhores notas (Figura 4), corresponderam as menores atividades enzimáticas da peroxidase. Na concentração de 1 mM teve raízes impróprias para o consumo, menor qualidade das raízes e maior atividade da POD (Tabela 4).

O EDTA e L-cisteína também mostraram relação com o escurecimento enzimático, sendo eficientes em reduzir a atividade da peroxidase em relação ao controle (Tabela 4). O mesmo comportamento, foi encontrado com SDS, que teve a melhor nota em 10 mM, apresentou também a menor atividade. Os tratamentos foram eficientes em aumentar a vida de prateleira das raízes de mandioca em até 4 dias. No sexto dia os tratamentos com azida sódica, EDTA e SDS, nas concentrações de 5 e 10 mM, não foram capazes de aumentar a vida de prateleira das raízes de mandioca *in natura*. A atividade da peroxidase mostrou relação inversa, uma vez que nestas concentrações foi verificada menor atividade da enzima (Tabela 4).

No sexto dia de avaliação, todos os tratamentos com exceção da L-cisteína, foram estatisticamente diferentes do controle, e menor atividade da POD (Tabela 4). Entretanto, para aumentar a vida de prateleira, esses tratamentos se mostraram diferentes. Mesmo, a L-cisteína tendo apresentado atividade enzimática da POD estatisticamente igual ao controle, a nota do

escurecimento foi 5, a mesma alcançada quando tratada a 1 mM com os inibidores.

4. CONCLUSÕES

Os tratamentos foram eficientes em aumentar a vida de prateleira das raízes de mandioca *in natura* em 80% em até 4 dias.

O ácido ascórbico, bissulfito e L-cisteína foram eficientes em aumentar a vida de prateleira em até 6 dias, nas respectivas concentrações, C10 mM, C 5-C10 mM e C5 mM.

Houve relação entre atividade da peroxidase e escurecimento enzimático.

O escurecimento enzimático em raízes de mandioca tem como um dos catalisadores a enzima peroxidase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- 1- Araújo, J. M. A. 1999. **Química de alimentos**: teoria e prática. 2. ed. Viçosa : UFV, 416 p.
- 2- Araújo, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1985. 355p.
- 3- Booth, R. H. 1978. **A review on root root diseases in cassava**. In: CASSAVA PROTECTION WORKSHOP. Proceedings. Cali, CIAT, p.121-23, 1978. (Séries CE-14).
- 4- Bezerra, V. S., Pereira, R. G. F. A., Carvalho, V. D., Vilela, E. R. 2002. Raízes de mandioca minimamente processadas: efeito do branqueamento na qualidade e na conservação; **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 26, n. 3, p. 564-575.

- 5- Bo Tang, B., Wang, Y. Du, M., Ge, J.-C., Chen, Z-Z. 2003. Catalytic spectrophotometric determination of ascorbic acid in tea drink with 1,5-bis (*p*-Hydroxybenzaldene) thiocarbohydrazone as the substrate for horseradish peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 4198-4201.
- 6- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- 7- Carneiro, A. P., Rodríguez, O., Mota, F. L., Tavares, A. P. M., Macedo, E. A. 2009. Kinetic and stability study of the peroxidase inhibition in ionic liquids, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 24, p. 10810-10815.
- 8- Carvalho, V. D. de, Chalfoun, S. M., Juste Júnior, E. S. G. 1985. Métodos de armazenamento na conservação de raízes de mandioca: I. efeito da embalagem de polietileno e serragem úmida associada a tratamentos químicos na deterioração pós-colheita e qualidade das raízes. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 4, n. 1, p. 79-85.
- 9- Cereda, M. P., Vilpoux, O. **Conservação de raízes**. In: Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americana. Botucatu, SP, cap. 1 v.32, p.13-29.
- 10- Duangmal, K., Owusu Apenten, R. K. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p. 351- 359.
- 11- Freitas, A. A., Francelin, M. A., Hirata, G. F., Clemente, E., Schmidt, F. L. 2008. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p.172-177.

- 13- Gomes, M, M. 2008. Dietilamida do ácido ascórbico lisérgico (LSD) e N,N-dimetiltriptamina (DMT) como substrato de peroxidase: uma possível rota de metabolização. 102 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas- SP.
- 14- Goulart, P. B., Xavier, A., Dias, J. M. M. 2010. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de Clones de *Eucalyptus Grandis* X *E. Urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.6, p.961-972.
- 15- Kato, M. do S., Souza, S. M. C. 1987. Conservação de raízes após colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 9-14.
- 16- Kavrayan, D. and Aydemir, T. 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, v.74, p. 147-154.
- 17- Kari, F. G., Giger, W. 1996. Speciation and fate of EDTA in municipal wastewater treatment. **Water Research**, v. 30, p.122.
- 18- Lorenzi, José Osmar. 2003. **Mandioca**. 1a ed. Campinas, CATI. 116p. (Boletim Técnico, 245).
- 19- Melo, A. A. M., Vilas Boas, E. V. de B. 2006. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n.1, p.110-115,
- 20- Montaldo, A. 1973. Vascular streaking of cassava root tubers. **Tropical Science**, London, v. 15, n. 1, p.39-46.
- 21- Nakano, Y., Asada, K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. **Plant and Cell Physiology**, v. 21, p. 1295-1307.
- 22- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaei, M. J., Rahbarizadeh, F. 2005. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction

from whole blood using laundry detergent. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, p. 229-232.

- 23- Neves, L. L. de M. 2003. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]**. 72 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 24- Nowack, B. 2002. Environmental Chemistry of Aminopolycarboxylate Chelating Agents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, p. 4009.
- 25- Pineli, L. L. O., Moretti, C. L., Almeida, G. C., Nascimento, A. B. G., Onuki, A. C. A. 2005. Associação de atmosfera modificada e antioxidantes reduz o escurecimento de batatas 'Ágata' minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.993-999.
- 26- REIS, C.M.F.; VILAS BOAS, E.V. de B.; BOARI, C.A.; PÍCCOLI, R.H. Qualidade e vida de prateleira de banana prata minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 702-708, 2004.
- 27- Singh, J., Dubey, A., Diwakar, S. K., Rawat, S. K., Batra, N., and Joshi, A. 2010. Biochemical characterization of peroxidases from the fruits of *Mallus pumilus*, novembro. **International Research Journal of Biotechnology**, v.1, n. p. 50-58.
- 28- Sillanpaa, M., Orma, M., Ramo, J. Oikair. 2001. The importance of ligand speciation in environmental research: a case study. **Science of the Total Environment**, v. 267, p. 23.
- 29- Valderrama. P., Marangoni, F., Clemente, E. 2001. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 321-325.

- 30- Vieira, H. J., Fatibello-Filho, O. 2005. Determinação indireta de N-acetil-L-cisteína por injeção em fluxo empregando Ce(IV) e ferroína. **Quimica Nova**, v. 28, n. 5, p. 797-800.
- 31- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. 2002. Enzimas. In: Basso, L. A. (ed.) **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, p. 279-349.
- 32- Wiley, R.C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**, London, CHAPMAN e HALL, 357 p., 1994.
- 33- Dziezak, J.D. 1986. Antioxidants. **Food Technology**, p. 94-102.
- 34- Zaalishvili, T. M., Dzhaparidze, N. S., Sabelashvili, D. M., Michilashvili, R. D. 1990. The effect of Cu^{2+} , Zn^{2+} cations and biogenic amines on the poly (ADP-ribose) polymerase activities of brain nuclei and on the NAD content in nerve tissues. **Biokhimiia**. v. 55, n. 4, p. 695-64.

ARTIGO 3

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA POLIFENOLOXIDASE NA RAÍZ TUBEROSA DE MANDIOCA

RESUMO

A polifenoloxidase E.C. 1.10.3.1. (PPO) está relacionada com o escurecimento e perda da qualidade de produtos industrializados e *in natura*. Daí, a importância em estudar a purificação parcial dessa enzima e determinar sua atividade em raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), sob ampla faixa de pH e temperatura, caracterizando assim, cineticamente sua atividade. O material avaliado foi proveniente da Região de Vitória da Conquista- BA, e analisados no Laboratório de pós-colheita da UFV. As raízes da variedade 'Cacau Amarela', foram injuriadas (corte) para induzir a atividade da PPO. Para obter o extrato enzimático, utilizou-se 30 g da amostra (raízes cortadas) em solução de 150 mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5), acrescido de polivinilpirrolidona PVP (1%) e Triton x-100 (0,1%). A PPO extraída da raiz de mandioca foi parcialmente purificada, por fracionamento com sulfato de amônio de 0 a 80% e diálise, com intervalos de 20% e posterior centrifugação em cada etapa. A otimização do ensaio ocorreu na fração de 60-80% de saturação. Avaliaram-se diferentes substratos para determinar maior afinidade com a enzima: ácido caféico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, catecol, 4-metil-catecol, DL-dopa, pirogalol à concentração de 15 mM. A cinética da atividade foi determinada em diferentes condições de pHs variando de 2,5 a 9,0 em condições de ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), e diferentes temperatura. A atividade da PPO foi maior em tampão de reação pH 6,5 e temperatura de 30 °C, tendo como substrato o ácido clorogênico. A inativação completa ocorreu aos 30 minutos de pré-incubação em pH 2,5 à temperatura ambiente. Já à 4 °C (gelo) houve redução de 81%, e não foi verificado inativação total ao longo dos 180 minutos. Em pH 9,0 não houve inativação total da enzima, entretanto verificou acentuada redução da atividade aos 30 minutos de pré-incubação, que se manteve constante mesmo depois de 180 minutos, tanto em 25 °C quanto à 4 °C. Nos extratos pré-incubados à 50, 60 e

70 °C durante o período de 10 min resultaram em inativação parcial de 60, 77 e 81,7% respectivamente. Não houve inativação total mesmo depois de 180 minutos. Foi verificada inativação total à temperatura de 80 °C aos 50 minutos. Assim, tratamentos com produtos ácidos e temperaturas de 80 °C por um período superior a 50 minutos são eficiente em reduzir a atividade enzimática da enzima PPO em raízes de mandioca *in natura*.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é nativa do Brasil e (1) tem capacidade de aproveitar os eventuais períodos de chuvas abundantes e consegue sobreviver junto a plantas daninhas e pragas (2). Entretanto, as raízes são vulneráveis a diversos estresses de natureza abiótica, principalmente aos danos mecânicos causados pela colheita, transporte e armazenagem, que estão relacionados à perecibilidade das raízes (8; 30; 51).

A dificuldade em manter as raízes de mandioca frescas por alguns dias depois de colhida tem sido um dos maiores problemas para comercialização *in natura* e para o processamento (3; 18). Um dos principais problemas encontrados nestes produtos que contém fenolases é a formação ou o desenvolvimento de escurecimento dos tecidos, o qual lhes confere aspecto indesejável ao consumidor (1). Assim, são identificados dois processos de deterioração denominados primário (fisiológica) e secundário (patológica) (3; 27). A deterioração fisiológica ocorre logo após as primeiras 48 horas depois da colheita, e tem sido estreitamente relacionada com reações oxidativas das substâncias fenólicas próximo ao local da descompartimentalização celular, preferencialmente pela atividade das enzimas peroxidase (E.C. 1.11.1.7.) e polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1.) (3; 7; 23).

Desde a sua descoberta, a polifenoloxidase (PPO) tem sido objeto de extensas pesquisas científicas. Dessa forma, considerável número de estudos tem sido acumulado sobre as propriedades moleculares e catalíticas, além do importante papel no ciclo da vida das plantas (21). A PPO é uma proteína que faz parte do grupo das oxiredutases, contém cobre como grupo prostético (estrutura molecular), e é diferente da maioria das enzimas por catalisar dois tipos de reações (1). Estas reações incluem a hidroxilação de monofenóis

produzindo o-difenóis e a remoção de hidrogênios dos o-difenóis para produzir quinonas. As quinonas formadas nessa reação polimerizam-se formando melaninas, que são pigmentos escuros (3).

A atividade da PPO é de grande importância na determinação da qualidade de produtos vegetais frescos, processados e ou congelados, porque através de reações podem produzir mudanças de cor, variações de aroma, sabor, alterações no teor de vitaminas e até modificações na textura (50). Também está relacionada ao escurecimento enzimático em raiz de mandioca *in natura*, (3; 51; 7), resultando, na maioria dos casos, em produtos com aparência ruim, os quais são rejeitados pelos consumidores (20).

As polifenoloxidasas são citadas como uma das enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático em pêssegos (*Prunus persica*) (50), taro (*Colocasia esculenta*) e batata (*Solanum tuberosum* var. Romano) (11). Por outro lado, é responsável pelo desenvolvimento do sabor e cor do chá preto, diminuição do amargor e adstringência dos produtos do cacau (*Theobroma cacao*) e formação de aldeídos de aminoácidos (25; 43). Em tecidos infectados por doenças há maior atividade dessa enzima, sendo importante para as plantas por estar envolvida nos mecanismos de defesa e senescência (6).

A caracterização destas enzimas pode ser de interesse, não só por seus efeitos negativos sobre valores de cor, sabor e nutricionais, mas também por seus efeitos positivos em defesa das plantas. Para reduzir a atividade da polifenoloxidase é utilizado controle do pH e da temperatura (49). A cinética enzimática da PPO em diferentes culturas demonstrou que o pH ótimo para a atividade varia numa faixa de 6,0 a 7,5, dependendo do substrato e tecido vegetal utilizado. Abaixo desse pH a enzima é menos ativa e acima desse pH ocorre à auto-oxidação do substrato.

Em se tratando da temperatura, a maioria das enzimas PPO apresenta atividades ótimas em temperatura variando de 30 a 40°C (4). Uma enzima será mais estável ao calor, ou termo-resistente, em preparações brutas, livres de células que contenham uma concentração alta de outras proteínas (45). O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de diversos fatores que incluem pH, força iônica do meio, e presença ou ausência de agentes ligantes como os substratos (protegem as enzimas de desnaturação pelo calor).

Em raízes de mandioca “mansa” (Cacau Amarela), não são conhecidas as propriedades cinéticas da polifenoloxidase e também o tratamento com pH e temperatura, que pode ser melhor utilizado para inativar sua atividade enzimática. Assim, objetivo-se purificar parcialmente e determinar a atividade da polifenoloxidase em raízes de mandioca *in natura* (*Manihot esculenta* Crantz), sob ampla faixa de pH e temperatura, caracterizando assim, cineticamente sua atividade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Raízes de mandioca “mansa” da variedade 'Cacau Amarela' foram colhidas no campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia em Vitória da Conquista – BA, quando as plantas estavam com um ano e quatro meses de idade. Em seguida, foram transportadas para Universidade Federal de Viçosa- MG (UFV) em caixas plásticas, por um período de 10 horas. No Laboratório de Pós-colheita – Departamento de Fitotecnia/UFV, as raízes foram selecionadas de acordo com o escurecimento indicativo de deterioração fisiológica e de imediato, foram lavadas em água corrente, descascadas e despelculadas manualmente. A parte mediana foi cortada em cilindros de aproximadamente 10 cm de comprimento, para serem embaladas em papel alumínio e colocadas em nitrogênio líquido, em seguida foram armazenadas sob congelamento em freezer a -20 °C até sua utilização (32; 41). (25; 32).

2.1 - Fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial da polifenoloxidase (PPO)

O extrato enzimático de raiz de mandioca foi obtido, utilizando-se 30 g da amostra em solução de 150 mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5), acrescido de PVP (1%) e Triton x-100 (0,1%), para evitar a ação de fenóis e dissolver as membranas (9). Este material foi homogeneizado e triturado em politron, em seguida filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 15.000 g durante 30 minutos a 4 °C (33). Do material centrifugado, 2 mL do sobrenadante foi guardado em saco de diálise por 12 horas a 4 °C num tampão de diálise (tampão fosfato 0,01M; pH 6,0) sob

agitação, sendo considerado extrato bruto. O pellet foi descartado. O restante do sobrenadante foi sequencialmente saturado com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ variando de 0 a 80%, com intervalos de 20% e posterior centrifugação em cada etapa.

O sobrenadante final foi descartado e os sedimentos resultantes de cada fração saturada foi ressuspenso em 2 mL de tampão de diálise, seguido por diálise no mesmo tampão durante 12 horas a 4 °C, e armazenados em membranas de celulose modelo D-0405 da Sigma (33). Em seguida, os extratos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm a 4 °C, para separar algum resíduo, deixando-o mais limpo para análise. O extrato resultante foi armazenado em refrigerador a 4 °C e utilizado como fonte enzimática para medida de atividade da polifenoloxidase e proteína total. Após a determinação da fração de purificação em que a enzima teve maior atividade, as análises seguintes ocorreram somente nesta faixa.

Na tentativa de purificar a polifenoloxidase, a utilização de acetona resfriada como extrator foi testada e a atividade enzimática foi determinada (17), entretanto, os resultados foram insatisfatórios quando comparados com os de sulfato de amônio.

2.2 - Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Foram realizados testes preliminares com diferentes substratos em pH 5,0 e pH 7,0, com a finalidade de determinar o de maior afinidade com a enzima, e assim maior atividade. Os seguintes substratos foram utilizados: ácido caféico (420 nm), ácido clorogênico (420 nm), ácido p-cumárico (420 nm), catecol (420 nm), 4-metil-catecol (420 nm), DL-dopa (480 nm), pirogalol (420 nm) em concentração de 15 mM. Os substratos foram preparados no momento da análise para prevenir a auto-oxidação dos mesmos. Aquele que proporcionou maior atividade foi considerado como 100% de atividade relativa e foi utilizado nos ensaios subsequentes.

A atividade da polifenoloxidase solúvel presente na raiz de mandioca foi determinada em espectrofotômetro pela medida de absorvância dos referidos

substratos a 25 °C, através da melanina resultante da quinona formada após reação entre 0,5 mL de ácido clorogênico (15 mM) e 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 5,0 e 7,0). A quantidade de extrato enzimático utilizada variou com a amostra, totalizando um volume de reação de 1,5 mL. O branco apresentou todos os componentes do meio de reação, exceto o extrato enzimático que foi substituído por água.

A atividade enzimática foi expressa em UA (unidade de absorvância) $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína (47). A reação foi monitorada durante 3 minutos, tempo necessário para atingir o ΔA (absorvância inicial – absorvância final), diferença entre o maior e o menor pico de atividade da absorvância. A atividade enzimática específica de cada extrato está relacionada às dosagens de proteína total. Para essas dosagens, é necessária a construção de uma curva de calibração utilizando a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão, segundo a metodologia descrita por Bradford (5).

2.3 - Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Para determinar o efeito do pH na atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada, foram preparadas diferentes soluções-tampão de reação em concentração de 0,2 M de ácido cítrico (pH 2,5 a 5,5); 0,2 M de tampão fosfato (pH 6,0 a 7,5) e 0,2 M de ácido bórico (pH 8,0 a 9,0), para correção dos pHs utilizou-se 1N de NaOH ou 1N de HCl (32). O pH ótimo de atividade foi determinado usando-se uma alíquota da enzima ao meio contendo 0,5 mL de ácido clorogênico (15 mM) e 0,5 mL dos diferentes tampões de reação. Também foram testados os substratos catecol, 4-metil-catecol e pirogalol, nos diferentes pHs. Assim, a atividade enzimática foi determinada e conseqüentemente o pH ótimo. Para os ensaios posteriores utilizou-se o pH onde a enzima apresentou maior atividade relativa, que foi considerado 100%.

Verificou também se os pHs onde a enzima teve menor atividade poderiam inativar a enzima, para isto, foi realizada a pré-incubação do extrato enzimático em solução tampão (1:1) dos pHs ácidos (2,5) e alcalinos (9,0) por um período de 0 a 180 minutos em duas temperaturas, 4 e 25 °C, as amostras foram retiradas a cada 30 minutos. Utilizou-se a solução tampão em que a

polifenoloxidase teve maior atividade, e a reação foi realizada sob temperatura de 25 °C.

2.4 - Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

Uma vez determinado o substrato e o pH de maior afinidade com a enzima, avaliou-se a temperatura ótima sobre a atividade da PPO parcialmente purificada com sulfato de amônio (60-80%), incubando-se uma alíquota do extrato enzimático e os meios de reação a diferentes temperaturas por 10 minutos. A faixa de temperatura estudada foi de 10 a 80 °C. A seguir, a atividade enzimática foi determinada para cada valor de temperatura, sendo a reação realizada à mesma temperatura da pré-incubação, a atividade foi lida em espectrofotômetro a 420 nm ao longo de três minutos.

Para determinar a temperatura versus tempo para a inativação enzimática e capacidade de recuperação de sua atividade, os extratos foram pré-incubados com tampão fosfato 0,1M e pH 6,5 em banho-maria em temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C por um intervalo que variou de 0 a 60 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo a 4 °C por 30 minutos. A leitura foi realizada após a adição do substrato, feita em espectrofotômetro à 25°C por três minutos (33). Atividade relativa de 100% foi considerada para amostras sem pré-incubação. Para análise da enzima, utilizou-se como branco a mistura de todos os reagentes, substituindo-se o extrato por água destilada.

2.5 - Análise Estatística

Os dados da atividade enzimática nos diferentes pHs e temperaturas foram submetidos à estatística descritiva. As médias, com os respectivos erros-padrões, obtidas das quatro repetições de cada extração, foram utilizadas para avaliar as diferenças da atividade cinética de acordo com Menolli *et al.*, (27). Para verificar a diferença entre os substratos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições sendo submetidos às análises de variância e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5% de

probabilidade utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Fracionamentos com sulfato de amônio e purificação parcial da polifenoloxidase (PPO)

Com a purificação parcial da polifenoloxidase, com sulfato de amônio, o melhor resultado foi à fração de 60-80% (Figura 1). Nesta fração, houve razão na atividade específica de 1,7 vezes em relação ao extrato bruto. A atividade específica foi de 0,17 a 0,29 UA. min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. A finalidade de precipitar o substrato utilizando sulfato de amônio é concentrar mais a solução do extrato bruto para assim reduzir a concentração de proteínas total em solução, eliminar ácidos nucleicos e outras substâncias, e assim purificar parcialmente a enzima de interesse.

Foi testada acetona fria para precipitação de proteína no extrato bruto, entretanto esta promoveu redução na concentração da proteína em solução, os dados foram insatisfatórios (dados não mostrados) comparados com o sulfato de amônio. Este resultado foi semelhante ao trabalho realizado com banana nanica (37) utilizando acetona, etanol e sulfato de amônio, sendo este último o que apresentou maior atividade com a purificação enzimática, na concentração de 40%. Isto ocorre porque a acetona possui uma constante dielétrica (ϵ) menor que a da água, aumentando assim a atração entre as moléculas protéicas, precipitando-as. Já trabalho realizado com haste de strelítzia (*Strelitzia reginae*) utilizando acetona, levou a aumento de 2,2 vezes na atividade específica (17). A técnica de purificação com sulfato de amônio é utilizada para frutas como pinha (*Annona squamosa* L.), dentre outras (21). Esta diferença entre as substâncias usadas para a purificação da PPO sugere que tal resultado depende da espécie que se está trabalhando.

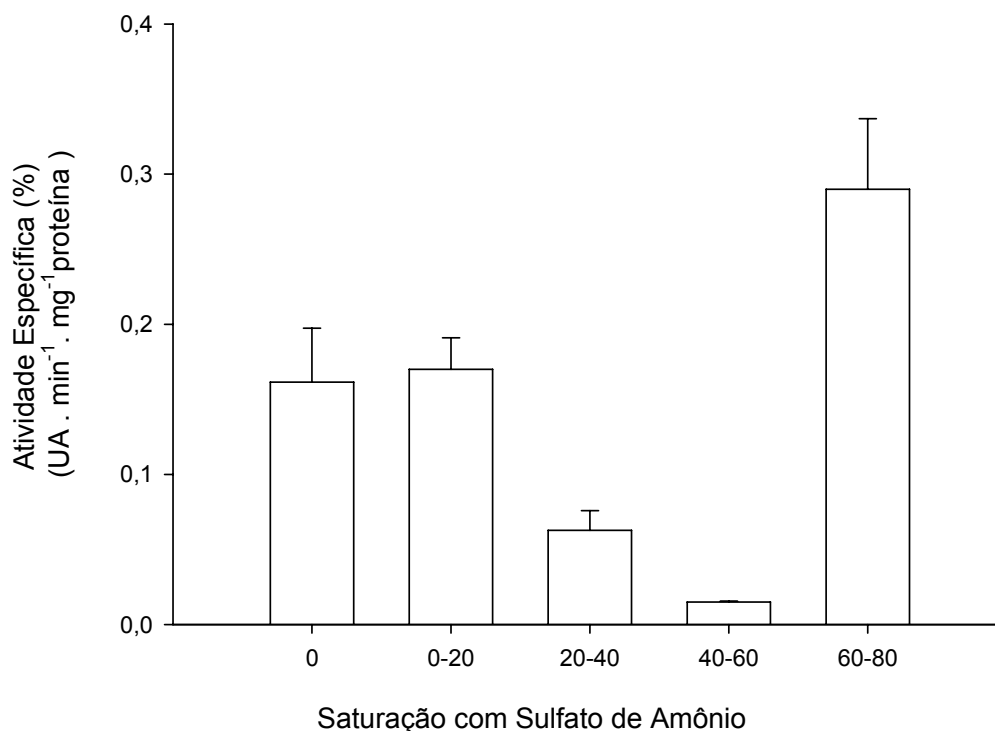


Figura 1- Fracionamento da atividade específica da PPO extraída de raízes de mandioca *in natura*, com diferentes porcentagens de Sulfato de amônio. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Diversos trabalhos realizados com diferentes frutas, hortaliças e raízes, como pêra (*Pyrus* sp.) (42), inhame (*Alocasia macrorrhiza*) (46), batata (*Solanum tuberosum*) (35) e batata-doce (*Ipomoea batatas*) (48), têm demonstrado evidências que plantas contêm várias fenolases (PPO) diferentes, sendo usadas diversas técnicas são usadas para purificação. A extração feita em tubérculos de batata separada por cromatografia e eletroforese em dois componentes de fenolases, evidencia a sua parcial purificação (35). A mesma técnica foi usada na purificação dessa enzima no extrato bruto de inhame (46).

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

3.2 - Determinação do substrato ótimo para a polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

A maior afinidade da PPO pelo substrato depende do tipo de planta. No caso de raízes de mandioca *in natura*, a utilização do ácido p-cumárico (420 nm), catecol (420 nm), 4-metil-catecol (420 nm) e DL-dopa (480 nm) foi ineficiente, proporcionando uma atividade muito baixa quando comparada aos substratos, ácido clorogênico, seguido do pirogalol e ácido caféico (Figura 2 e 3). Um dos pré-requisitos para escolha do substrato foi a alteração da cor da solução, no momento da reação e logo após, assim pode-se verificar a estabilidade dos mesmos. Entretanto, o que se observou foi instabilidade de alguns substratos em relação à coloração, variando de amarelo claro ao laranja intenso, tanto no pH 5,0 quanto no pH 7,0. Assim o substrato de maior afinidade e estabilidade com a PPO, foi o ácido clorogênico.

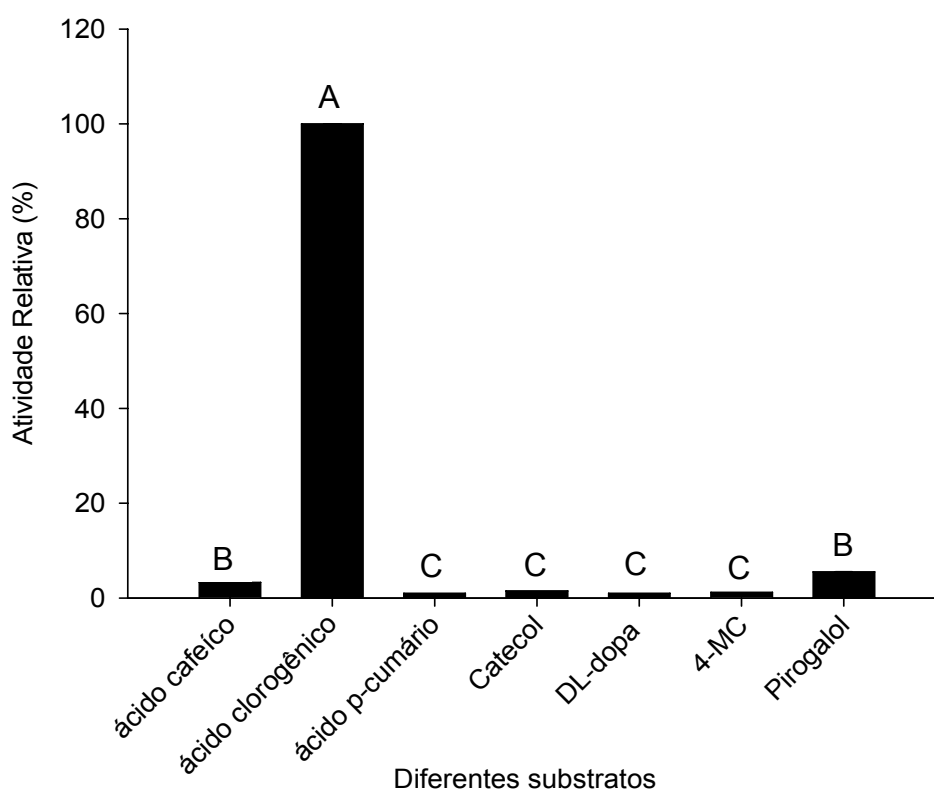


Figura 2- Efeito de diferentes substratos sobre atividade relativa da PPO em pH 5,0. Tratamentos com letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foram testados diferentes substratos para determinar PPO em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A atividade da enzima teve aumento crescente quando em solução com pH 6,0, na leitura houve mudança da cor do catecol do incolor para amarelo claro após 30 minutos de leitura (15). O ácido gálico e DL-dopa, tiveram maior oxidação e menor afinidade com a PPO. Segundo estes autores, essas mudanças podem ser explicadas pela formação de quinonas, e pela oxidação das hidroxilas fenólicas do catecol (15). Portanto, a atividade da PPO sofre influência do substrato e do pH, que para raiz de mandioca *in natura* da variedade Cacau Amarela, o catecol e DL-dopa não apresentaram afinidade em avaliar a atividade dessa enzima parcialmente purificada com 60-80% de sulfato de amônio, nos pHs 5,0 e 7,0 (Figura 2 e 3).

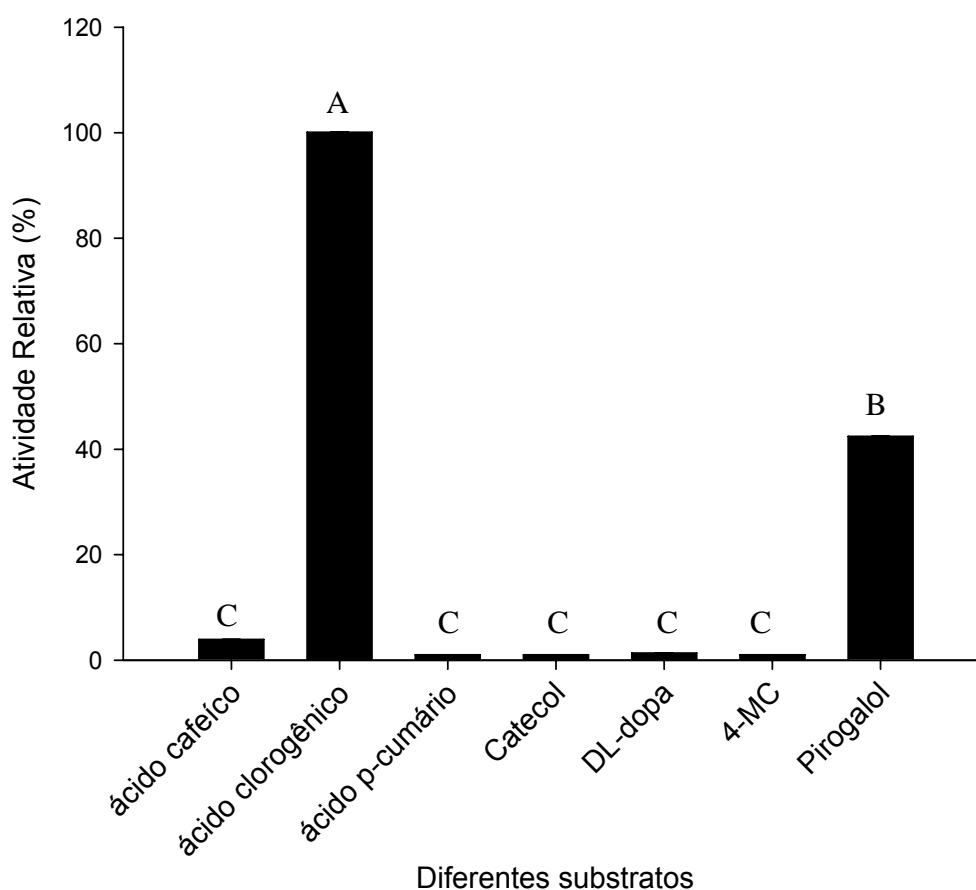


Figura 3- Efeito de diferentes substratos sobre atividade relativa da PPO em pH 7,0. Tratamentos com letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Mesmo o pirogalol apresentando alta afinidade com a enzima, sua instabilidade em relação à mudança de cor durante a reação, comprometeu a seguridade dos dados. Isso porque há crescente aumento da oxidação deste substrato com o aumento do tempo e do pH (15) (Figura 2 e 3).

Muitos fatores afetam a cinética da reação catalisada por enzimas: concentração do substrato, concentração da enzima, ativadores, inibidores, temperatura, pH e força iônica (38). A enzima PPO catalisa duas reações distintas (26): na primeira, há transformação de monofenóis (ex. tirosina, fenol, p-cresol) para o-difenóis (catecol, DL-dopa, pirocatequina, ácido clorogênico, pirogalol, etc.) (atividade de cresolase) e, destes, para as respectivas o-quinonas (atividade de catecolase) (52). A PPO presente em raiz de mandioca apresentou especificidade distinta por ácido clorogênico, demonstrando atividade para substrato o-difenóis e nenhuma atividade para monofenóis, caracterizando-se, portanto, como uma catecolase. Por via de regra a atividade de catecolase é significativamente superior à de cresolase (Figura 4).

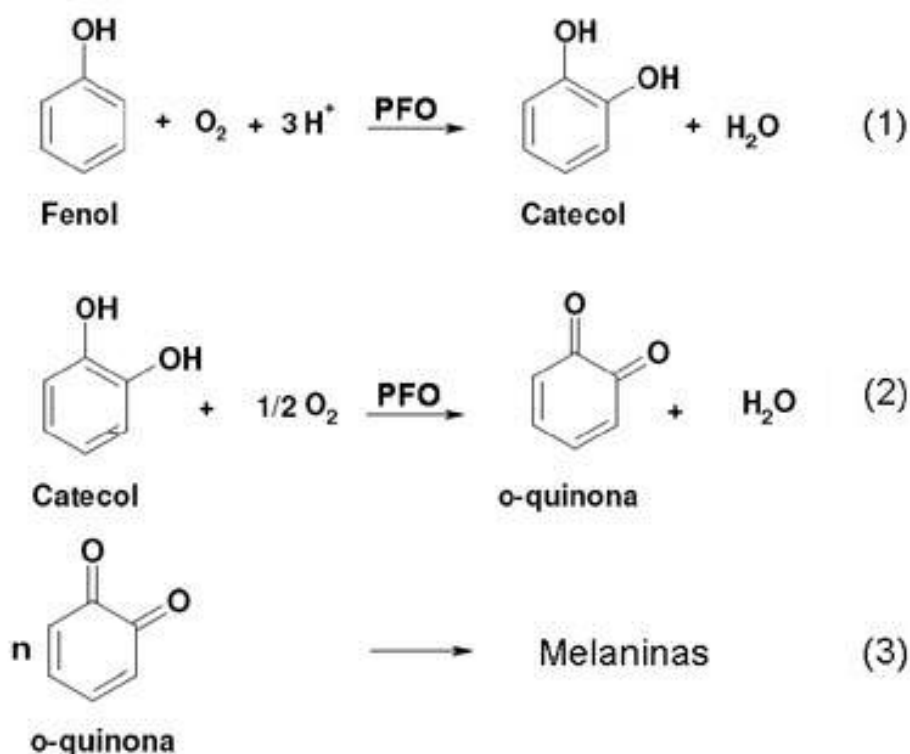


Figura 4- Reações de oxidação de compostos fenólicos pela polifenoloxidase (1) atividade cresolase; (2) atividade catecolase. Fonte: Polesel *et al.*, (2010).

3.3 - Efeito do pH sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de mandioca.

A determinação da atividade enzimática dos extratos parcialmente purificados de raízes de mandioca para PPO em diferentes pHs, permitiu encontrar o ótimo para atividade dessa enzima. O perfil dessa enzima mostrou que a atividade foi obtida em um único pico, em tampão fosfato de potássio pH 6,5 (Figura 5). O mesmo resultado foi encontrado em banana nanica com extrato parcialmente purificado com maior atividade em pH 6,5 (36). Já Zanatta *et al.*, (55), trabalhando com extrato bruto de goiaba (*Psidium guajava* R.), encontraram pH ótimo de 6,8. Nkya *et al.*, (31) trabalhando com dois substratos, ácido clorogênico e (-) epicatequina, em crisântemo (*Chrysanthemum coronarium* L.), verificou que o pH ótimo varia conforme o substrato, sendo 4,0 para ácido clorogênico e 8,0 para (-) epicatequina.

Em geral, as plantas apresentam atividade máxima da PPO em pH próximo ao neutro (17). Como a polifenoloxidase extraída do pericarpo de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), que apresentou dois picos de atividade máxima que ocorreram nos pHs 6,5 e 7,0, diferente do verificado em mandioca *in natura* (Figura 5). A redução na atividade ocorreu quando o pH foi aumentado ou reduzido (29), sendo mais acentuada em pH maior que 7,0, e não foi detectada atividade em pHs 2,5 e 9,0. Esta variação em relação às atividades máximas dos pHs, mostrou existir isoenzimas diferentes com distintas propriedades cinéticas, semelhante ao verificado em raízes de mandioca, que usando diferentes substratos apresentou pHs ótimos em diferentes faixas.

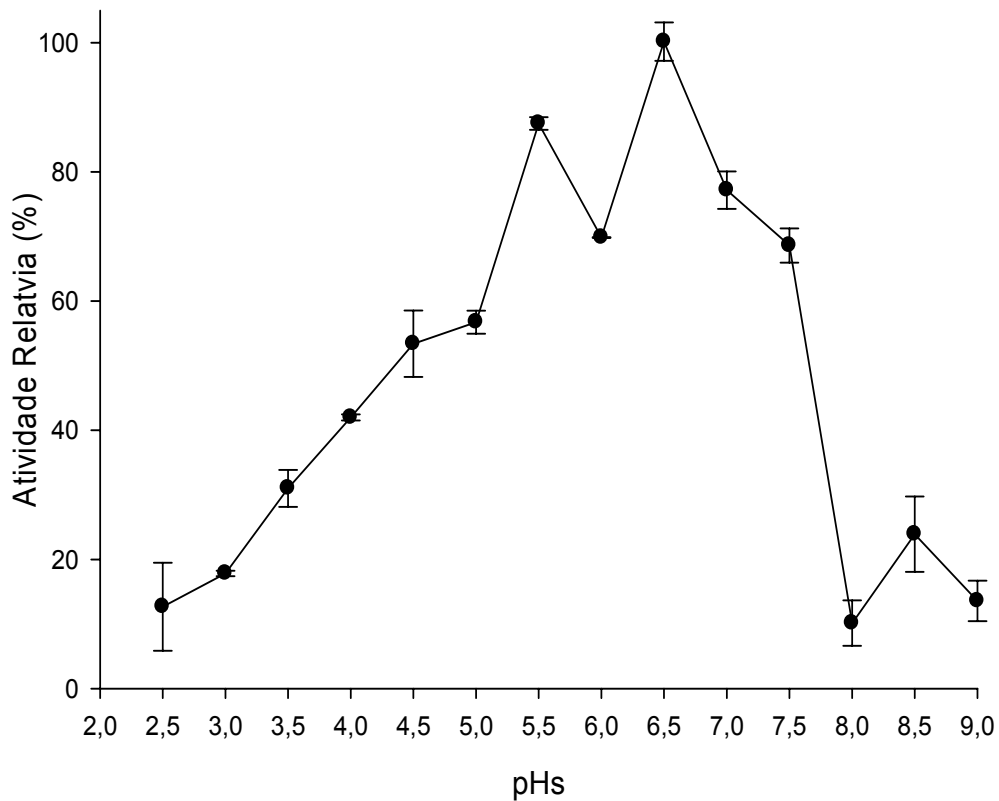


Figura 5- Influência do pH sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca variedade Cacau Amarela com substrato ácido clorogênico. As barras verticais representam o erro padrão da média.

As variações existentes no pH de maior atividade da PPO, podem ocorrer devido a sua localização subcelular (28), ao tipo de substrato fenólico e solução-tampão utilizado no ensaio (54), ao método de extração (11) a pureza do extrato e forma da isoenzima (56), também pode variar de acordo com a planta (28; 44) e estágio de maturidade (11).

Para investigar a estabilidade do pH da PPO em mandioca *in natura*, a enzima foi pré-incubada em solução-tampão de menor atividade, pH 2,5 e 9,0 a 4 °C e 25 °C, a atividade residual da PPO foi determinada a cada 30 minutos até 180 minutos, usando o ácido clorogênico como substrato (Figura 6 e 7). O mesmo aconteceu com ave-do-paráíso (17), feijão (15), banana nanica (37) e lichia (29) que as menores atividades foram nos pHs mais alcalino e mais ácido. A pré-incubação do extrato em tampão com pH 2,5 em temperatura ambiente por 30 minutos, promoveu inativação completa da enzima

polifenoloxidase em relação à atividade máxima em pH 6,5 (Figura 6 A1). Não foi verificado o mesmo comportamento da enzima quando pré-incubada em pH 2,5 no gelo, quando houve maior redução da atividade aos 30 minutos de pré-incubação com 81%, sem inativação total, mas houve tendência de queda em sua atividade e permanência da mesma até os 180 minutos (Figura 6 A).

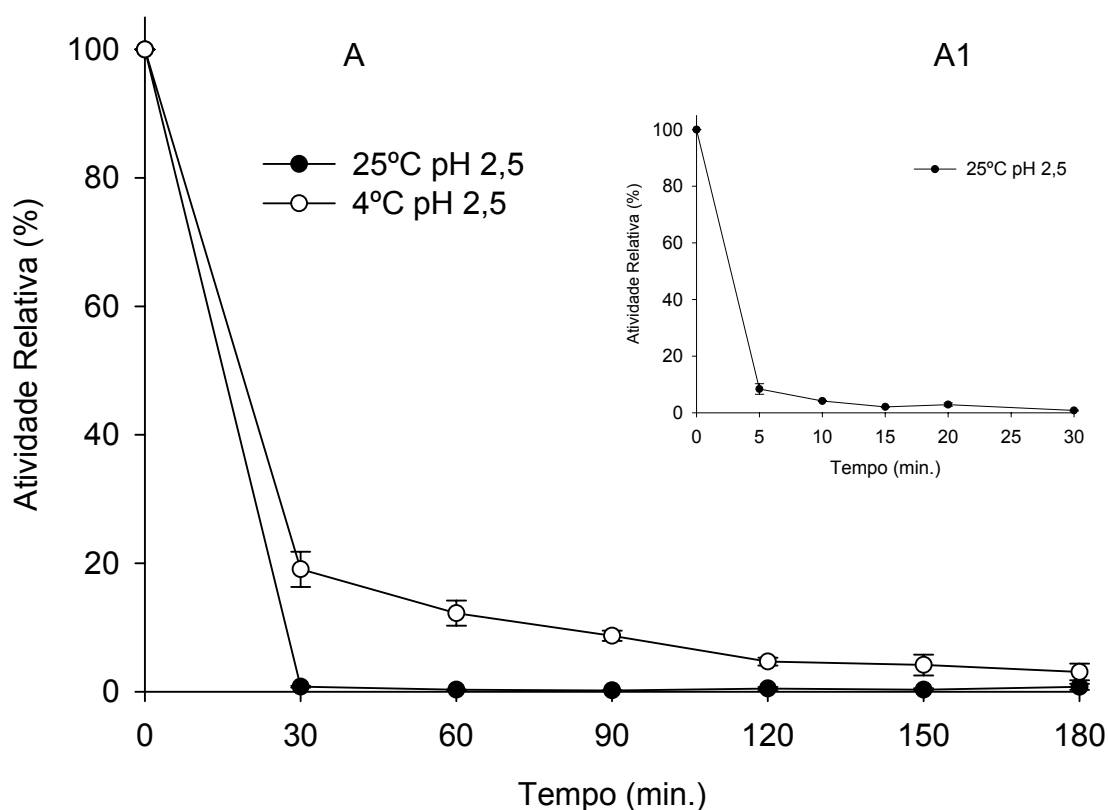


Figura 6- Influência do tempo de pré-incubação em pH 2,5 sob temperatura ambiente (25 °C) e gelo (4 °C) (A), e temperatura ambiente (25 °C) aos 30 minutos, sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca com pH 6,5. As barras verticais representam o erro padrão da média.

A pré-incubação do extrato em pH 2,5 ou 9,0 por um período de 45 min causou redução da PPO em relação ao pH ótimo 6,5, em pericarpo de lichia, resultado semelhante ao desse trabalho. Assim, a inativação da polifenoloxidase em pericarpo de lichia e mandioca *in natura*, pode ser facilmente alcançada através da redução do pH. Em lichia essa redução é ainda maior sob pH 9,0 com queda de 94,3% da atividade (29).

O comportamento da polifenoloxidase com pH 9,0 sob incubação em temperatura ambiente ou gelo, foi diferente do verificado em pH 2,5. Isto porque, não houve inativação completa na atividade da enzima nas duas condições de pré-incubação. A atividade enzimática em pH 9,0 na temperatura de 4 °C, mesmo com 180 minutos de pré-incubação, manteve-se praticamente constante, apresentando redução de apenas 3,39% em relação a 30 minutos da pré-incubação (Figura 7). Já em temperatura ambiente houve aumento de 11% na atividade em relação a 30 minutos de pré-incubação. A queda da atividade em pH 9,0 nas duas temperaturas foi acentuada com 30 minutos de pré-incubação, e a estabilidade ocorreu após este período. Resultado similar foi encontrado em ave-do-paráíso onde, em pH 9,0 foi verificada leve redução da atividade da PPO (17).

Não foi verificada inativação da atividade da PPO em pH alcalino (9,0). Como a polifenoloxidase da raiz de mandioca é menos estável em pH ácido do que em pH alcalino, os tratamentos com substâncias ácidas (ácido ascórbico) seriam mais eficazes para inativar a enzima e reduzir o escurecimento enzimático. Não foi testado o efeito do pH superior a 9,0 sobre a atividade da PPO porque segundo Soderhall (47), há ocorrência de oxidação espontânea do substrato enzimático em pHs elevados, assim os resultados em pH superior a 9,0 não seriam confiáveis.

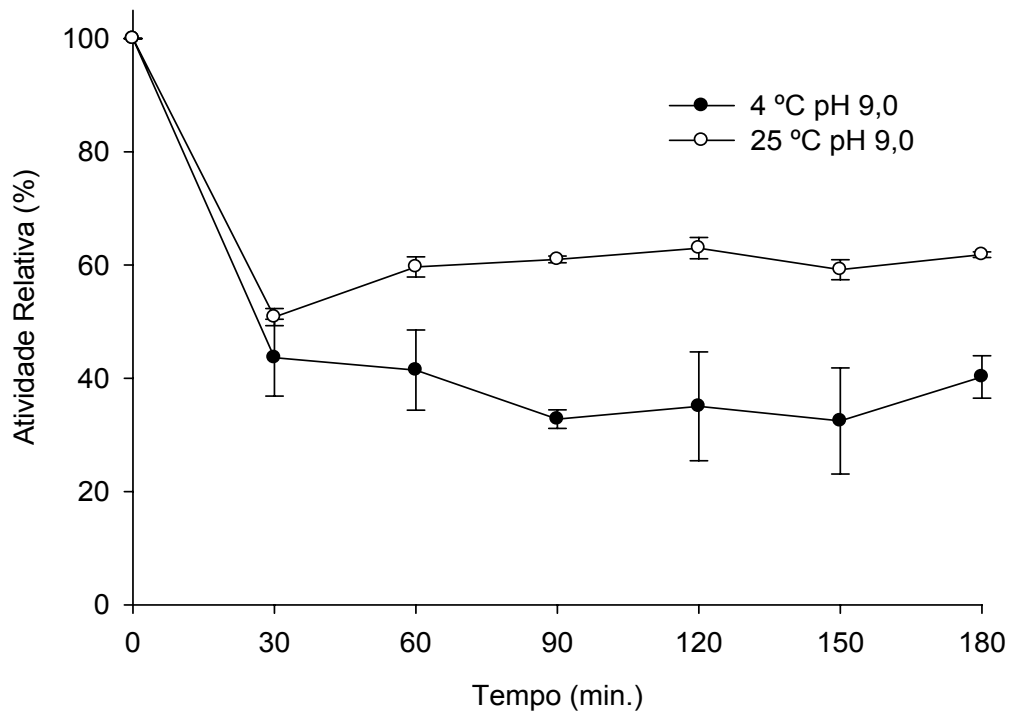


Figura 7- Influência do tempo de pré-incubação em pH 9,0 sob temperatura ambiente (25 °C) e gelo (4 °C), sobre atividade relativa da PPO em raízes de mandioca com pH 6,5. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Diferenças no pH ótimo para PPO com substratos distintos têm sido relatadas para a enzima a partir de várias fontes (10; 16; 19; 34; 40). Em maçãs foram identificados, (+) catequina, (-) epicatequina e ácido clorogênico como substratos da enzima PPO (43). Portanto, como se relaciona variação do pH ótimo da atividade da PPO em função de diferentes substratos, foram testados substratos mais recomendados pela afinidade com essa enzima, o catecol, 4-metil-catecol e o pirogallol em diferentes pHs, variando de 2,5 a 9,0 (Figura 8, 9 e 10).

A atividade da PPO tendo o catecol como substrato, apresentou maior atividade de reação quando o meio continha tampão ácido cítrico com pH 3,5 (Figura 8). Gomes *et al.*, (15) trabalhando com nove cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), verificaram que PPO apresentou 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 (35). Trabalho realizado com pêsego, para determinar atividade da PPO mostrou maior

afinidade com o catecol em pH 6,2 (49), resultado diferente ao encontrado em raízes de mandioca *in natura* da variedade Cacau Amarela, que o pH foi mais ácido do que esses citados (Figura 8).

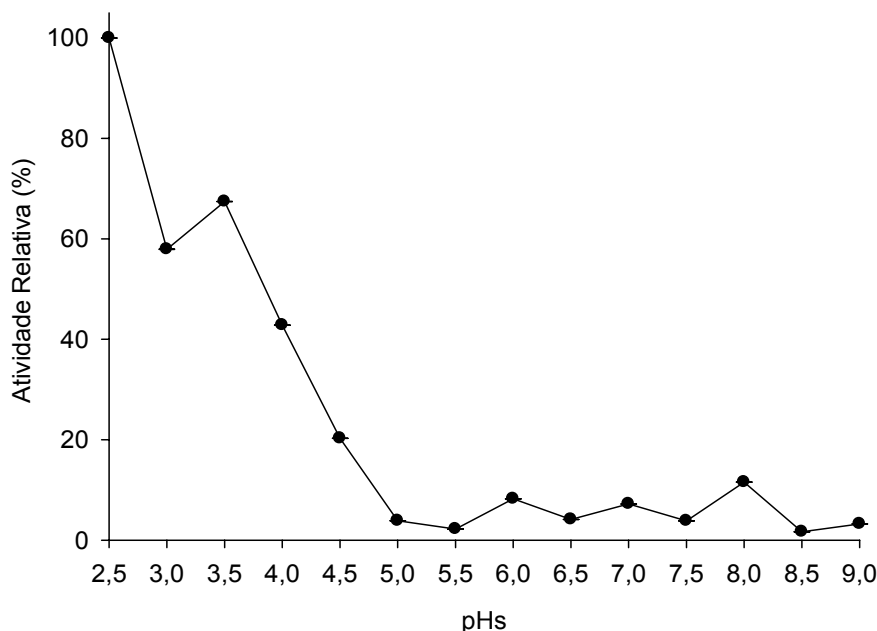


Figura 8- Influência do pH sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca com substrato catecol. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Esses resultados diferentes sugerem que o catecol se mostrou instável para atividade da PPO em raízes de mandioca, os dados foram insatisfatórios. Provavelmente houve rápida oxidação do catecol, com a mudança da cor, o que está de acordo com trabalho feito com feijão, que segundo o autor, essa mudança na coloração pode ser explicada pela formação de quinonas devido a oxidação das hidroxilas fenólicas do catecol (15). Sendo assim, mesmo esse substrato sendo utilizado em outras plantas, para a mandioca *in natura* da variedade Cacau Amarela não mostrou ser eficiente em detectar atividade da PPO.

A atividade da PPO usando o 4-metil-catecol como substrato foi maior quando no meio de reação utilizou tampão ácido cítrico com pH 4,0 (Figura 9). A maior atividade está numa faixa ácida, semelhante aos resultados encontrados em frutos de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) (33), em haste de

strelitzia o pH ótimo 5,0 (17), brócolis 5,72 (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) (14) e castanha 5,0 (*Castanea henryi*) (53).

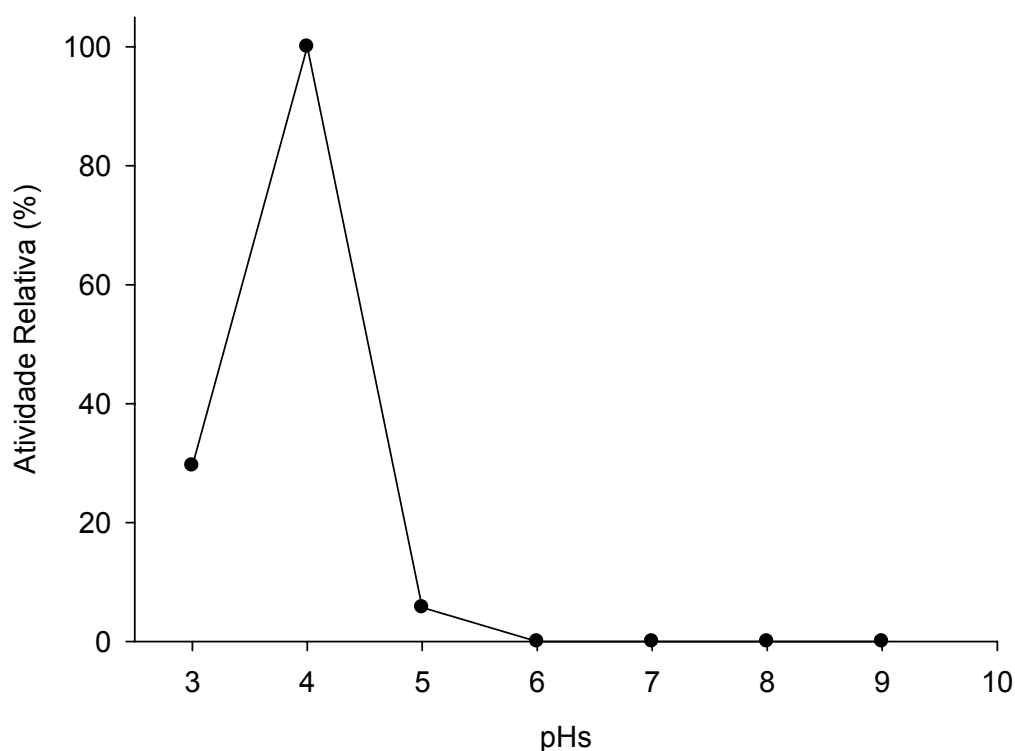


Figura 9- Influência do pH sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca com substrato 4-metil-catecol. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em trabalho realizado com hortelã (*Mentha arvensis*) avaliando diferentes substratos em intervalos de pHs 5,5 a 7,0, verificou que o pH ótimo para a atividade da PPO com o ácido caféico, 4-metil-catecol e catecol foram: pH 4,5; 5,0 e 6,5, respectivamente. Quando usou 4- metil-catecol em pH 3,5 e 8,0, a enzima ainda manteve 15 e 30% da atividade ótima (32). Já em outros trabalhos como em batata-doce (24) e berinjela (*Solanum melongena* L.) (9), usando 4-metil-catecol como substrato, o pH ótimo foi de 4,0 e 5,7 respectivamente.

Trabalhos realizados com feijão, utilizando diferentes substratos para determinar maior atividade da PPO, demonstraram que a atividade esta relacionada com a variação do pH (15). Assim, sugere-se que o aumento da atividade do pirogalol neste pH 7,0, pode ser atribuído ao fato dessa enzima aparentar maior afinidade com este substrato, quando comparado ao DL-dopa,

semelhante ao resultado encontrado neste trabalho em raízes de mandioca que teve o pico de atividade em pH 7,0 (Figura 10). Ainda segundo esse mesmo autor, aumentando o tempo e o pH da solução de pré-incubação, aumenta a oxidação do substrato. Após 30 minutos de leitura, a solução apresentou coloração amarela, já em pH mais elevado (8,0) a cor ficou alaranjada logo após seu preparo, aumentando a intensidade da cor com o tempo. Este resultado confere com os resultados neste trabalho. Um dos motivos do pirogalol não ter sido escolhido como substrato para avaliar a atividade da PPO em raiz de mandioca, foi essa instabilidade na cor devido a rápida oxidação, mostrando ter sido ineficiente para detectar a atividade correta (Figura 10).

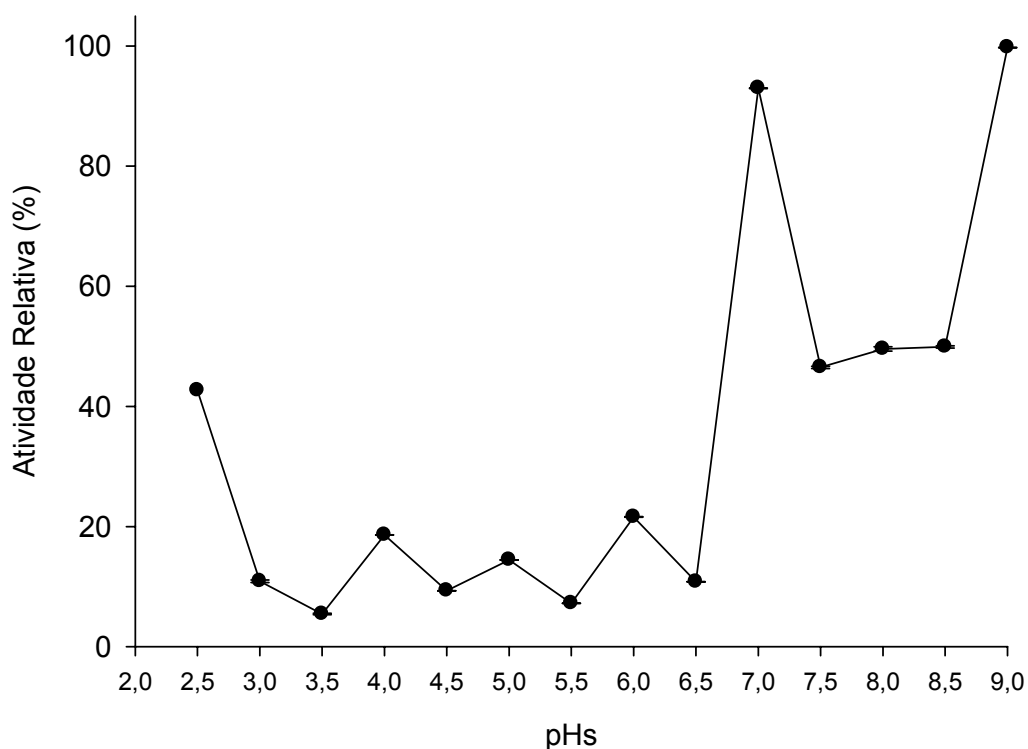


Figura 10- Influência do pH sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca com substrato Pirogalol. As barras verticais representam o erro padrão da média.

3.4 - Efeito da temperatura sobre a atividade da polifenoloxidase parcialmente purificada (60-80% de sulfato de amônio) de raízes de mandioca.

A maioria das enzimas PPO apresentam maiores atividades em temperatura na faixa de 30 a 40 °C (4). Em raízes de mandioca *in natura* a PPO teve atividade máxima em temperatura de 30 °C, representando aumento de 45% em relação a sua atividade a 10 °C (Figura 11). A variação de temperatura influencia na atividade da PPO, como em taro (*Colocasia esculenta*) (11) e pêssago (49), que a temperatura ótima de atividade foi 30 °C; em quiabo foi 31 °C (33) e batata 25 °C (*Solanum tuberosum* var. Romano) (11). O mesmo foi verificado em graviola (*Annona muricata* L.), com atividade máxima entre 30 e 32 °C (4), entretanto a 40 °C ainda manteve quase 48% de sua máxima atividade. Já em polpa de berinjela e pericarpo de lichia as atividades máximas ocorreram em temperaturas de 40 °C (38) e 45 °C (22), respectivamente. Portanto, essas culturas mostram ser mais estáveis quando comparadas a raízes de mandioca da variedade Cacau Amarela, que a esta temperatura (40 °C) manteve 42% de sua máxima atividade, o que lhes confere menor resistência à maiores temperaturas (Figura 11).

O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de diversos fatores que incluem o pH, força iônica do meio e a presença ou ausência de agentes ligantes como os substratos (protegem as enzimas de desnaturação pelo calor). Assim, enzimas de baixo peso molecular compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alto peso molecular. Uma enzima será mais estável ao calor, ou termo-resistente, em preparações brutas, livres de células que contenham uma concentração alta de outras proteínas (45).

O tratamento térmico para a polifenoloxidase mostrou ser um processo não linear (Figura 11), o que está em concordância com Valderrama *et al.*, (51), trabalhando com maçãs e Freitas *et al.*, (12) trabalhando com cultivares de uva, benitaka e rubi. Eles observaram decréscimos quase contínuo em sua atividade. Nos extratos enzimáticos das uvas as atividades da PPO diminuíram com o tempo de exposição à temperatura e com seu aumento; entretanto, os

tratamentos térmicos utilizados não foram suficientes para total inativação das enzimas. Resultado semelhante foi encontrado com extratos de raiz de mandioca *in natura* (Figura 11).

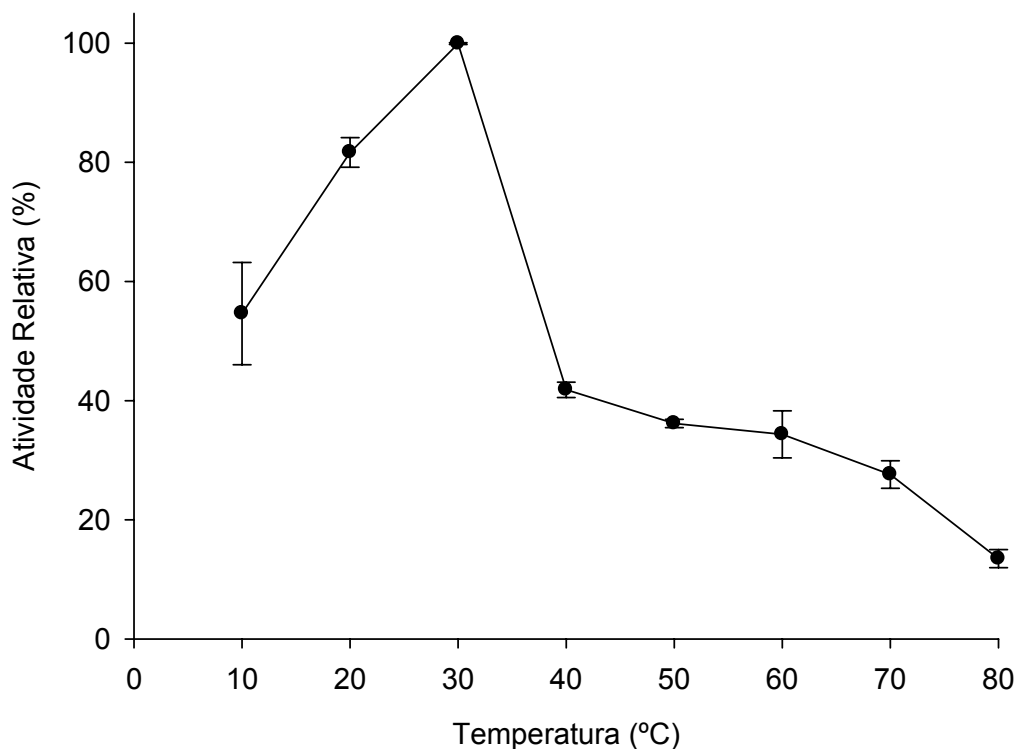


Figura 11. Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade relativa da enzima PPO de raízes de mandioca avaliadas em pH 6,0. As barras verticais representam o erro padrão da média.

As enzimas PPO estão amplamente distribuídas na natureza (fungos, bactérias, animais, plantas, etc.) e existem em múltiplas formas. Essas formas podem apresentar diferentes características cinéticas e termodinâmicas. Em trabalho realizado com termodesnaturação da PPO em pêssego, variedade Granada, usando o catecol como substrato, Toralles *et al.*, (50) demonstraram que a atividade diminui rapidamente com temperaturas superiores a 55 °C. Já em mandioca houve redução na atividade a 50 °C de 81% em relação à 30 °C (Figura 11).

Segundo Furtunato (13), as enzimas podem se tornar novamente ativas após a inativação térmica, fenômeno conhecido por renaturação, o qual ocorre

com algumas enzimas depois de cessado o agente causador da desnaturação, como o tratamento térmico. Visando verificar a estabilidade da PPO, os extratos foram pré-incubados em temperaturas de 50 e 60 °C (Figura 12). Durante o tratamento térmico dos extratos enzimáticos foram observadas redução drástica na atividade da PPO e tendência da mesma em se manter baixa e constante ao longo do tempo. A polifenoloxidase extraída do pericarpo de lichia cultivar Bengal, usando o 4-metil-catecol como substrato, manteve atividade até 50 °C por um período de 120 minutos, e com 10 min a 60 °C houve inativação da PPO (29).

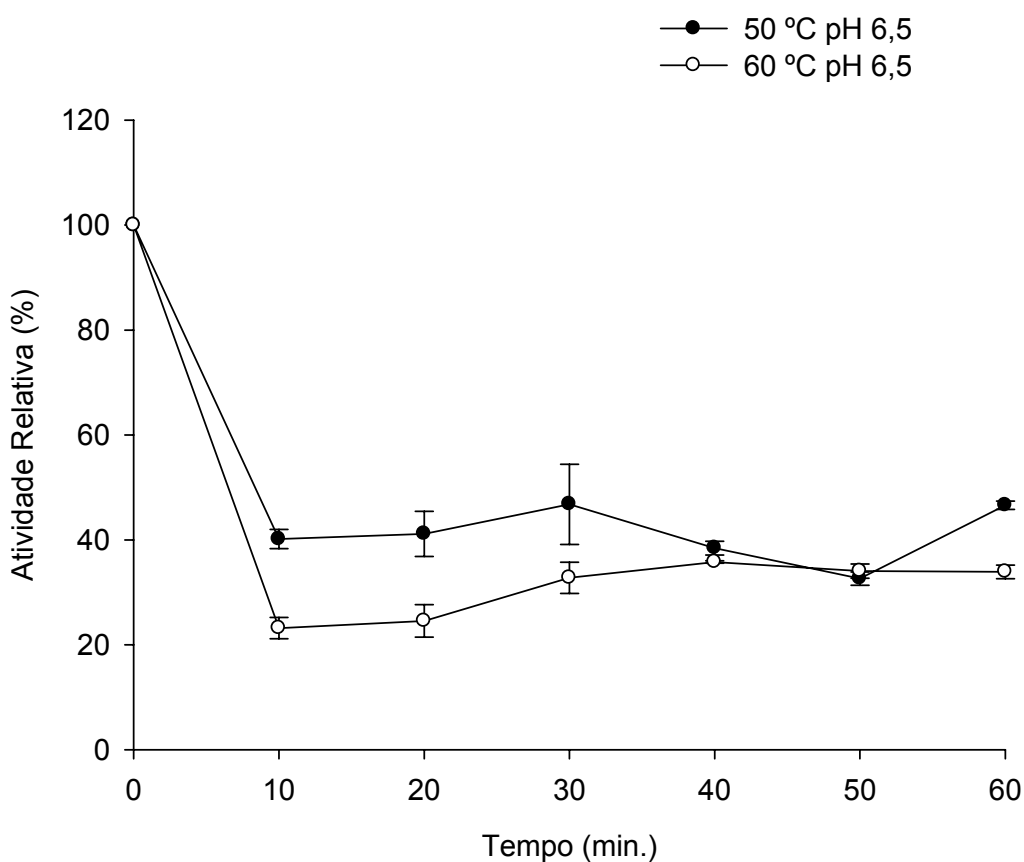


Figura 12. Efeito do tempo da pré-incubação a 50 e 60 °C sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca avaliadas em pH 6,5 e temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Uma queda considerável na atividade da PPO em alta temperatura é provavelmente o resultado de mudanças na estrutura terciária da enzima. O extrato enzimático submetido a temperaturas de 50 °C e 60 °C durante o

período de 10 min resultou em inativação parcial de 60 e 77%, respectivamente. O valor da atividade na temperatura de 60 °C indicou que a enzima foi menos estável em comparação a temperatura ótima de 30 °C, havendo redução de 76,8% (Figura 12). Resultados semelhantes foram verificados em extratos de taro e batata, que durante o mesmo período (10 min) a 60 °C promoveu a inativação parcial na atividade da PPO de 60 e 70% (11).

Temperaturas de 70 e 80 °C tiveram drástica redução na atividade aos 10 minutos de pré-incubação da PPO, que manteve somente 18,3 e 9,8% da atividade, respectivamente (Figura 13). Foi verificada inativação total a temperatura 80 °C aos 50 minutos. O mesmo resultado foi encontrado em quiabo (33). Já em extrato bruto de taro e batata a inativação total da atividade da PPO foi verificada a 70 °C por 10 min (11). A diferença foi provavelmente devido à diferença de substratos, cultivares e métodos de ensaio.

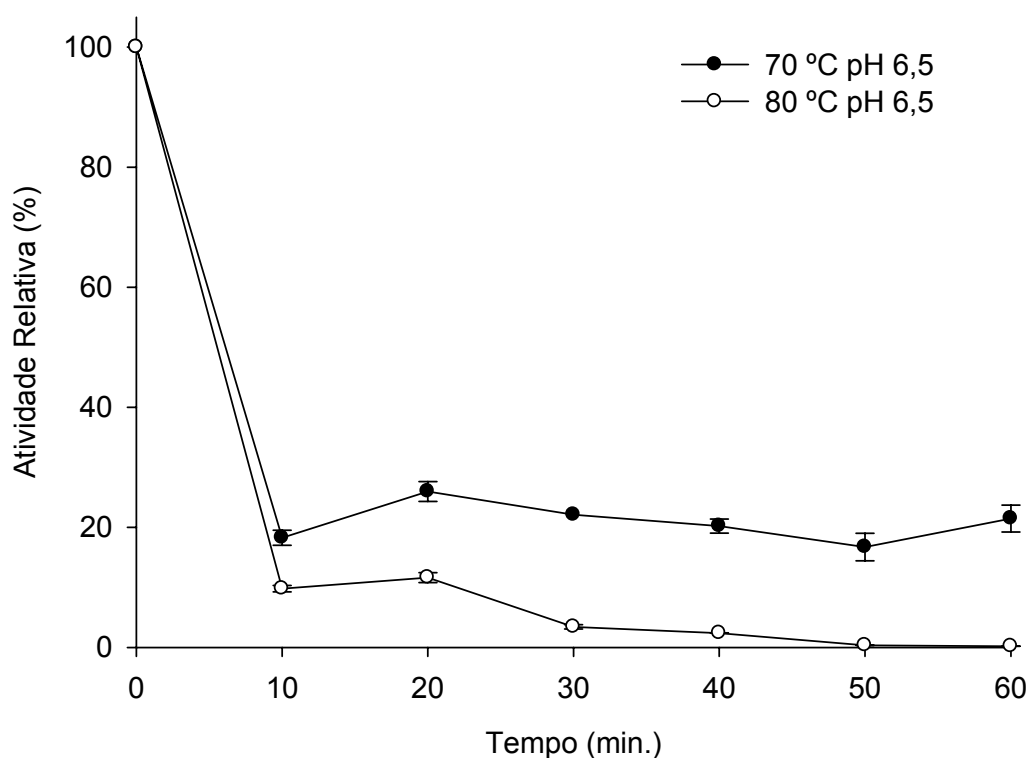


Figura 13. Efeito do tempo da pré-incubação a 70 °C e 80 °C sobre a atividade relativa da PPO em raízes de mandioca avaliadas em pH 6,5 e temperatura de 25 °C. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em ensaio com (-)epicatequina como substrato, o efeito da temperatura sobre a atividade da PPO em pericarpo de lichia, foi avaliada com temperaturas variando de 15 a 85 °C em pH 7,5. Para estudar a estabilidade térmica, a enzima foi incubada a diferentes temperaturas 55, 65, 70 e 80 °C. (22), o resultado indicou que a enzima foi menos estável a 80 °C, em comparação a 70 °C, mantendo apenas 17,93% da atividade após 40 min de incubação. Assim, fica claro que a PPO não é considerada uma enzima termoestável e que curtas exposições à temperaturas elevadas são suficientes para inativação parcial ou total sua atividade catalítica. No entanto, como o escurecimento parece resultar da ação combinada de peroxidase e polifenoloxidase, o tratamento térmico para ser eficaz deve considerar à alta estabilidade térmica da peroxidase nos tratamentos (39).

4. CONCLUSÕES

A polifenoloxidase de raízes de mandioca *in natura* da variedade 'Cacau Amarela' teve maior atividade na fração de 60-80% de sulfato de amônio.

A máxima atividade da PPO ocorreu em pH 6,5 e temperatura de 30 °C, tendo como substrato o ácido clorogênico.

Baixas atividades foram detectadas em pH 2,5 e 9,0, teve-se a inativação total em pH 2,5 a 25 °C, após 30 minutos de pré-incubação. Porém, não houve inativação total em pH 2,5 a 4 °C, nem em pH 9,0 a temperatura de 25 °C ou 4 °C. A utilização do pH ácido é uma boa alternativa no controle da atividade da polifenoloxidase que está relacionada ao escurecimento enzimático.

As temperaturas de pré-incubação a 50, 60 e 70 °C, durante o período de 10 min resultaram em inativação parcial de 60, 77 e 81,7%, respectivamente. Não houve inativação total mesmo depois de 180 minutos de pré-incubação. A temperatura de pré-incubação de 80 °C aos 50 minutos promoveu inativação total da PPO.

Tratamentos com produtos ácidos e temperaturas de 80 °C por um período superior a 50 minutos são eficiente em reduzir a atividade enzimática da enzima PPO em raízes de mandioca *in natura*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- 1- Araújo, J. M. A. 1999. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, 416 p.
- 2- Bezerra, V. S., Pereira, R. G. F. A., Carvalho, V. D., Vilela, E. R. 2002. raízes de mandioca minimamente processadas: efeito do branqueamento na qualidade e na conservação; **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 26, n. 3, p. 564-575.
- 3- Booth, R. H. 1978. **A review on root diseases in cassava**. In: CASSAVA PROTECTION WORKSHOP. Proceedings. Cali, CIAT, p.121-23, 1978. (Séries CE-14).
- 4- Bora, P. S., Holschuh, H. J., da Silva, Vasconcelos, M. A. 2004. characterization of polyphenol oxidase of soursop (*Annona muricata* L.) fruit and a comparative study of its inhibition in enzyme extract and in pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.4, n.4, p. 267-273.
- 5- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- 6- Campos, A. D., Ferreira, A. G., Hampe, M.M.V., Antunes, I. F., Brancão, N. Silveira, E. P. da., Osório, V. A., Augustin, E. 2004. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643.
- 7- Carvalho, V. D. de, Chalfoun, S. M., Juste Júnior, E. S. G. 1985. Métodos de armazenamento na conservação de raízes de mandioca: I. efeito da embalagem de polietileno e serragem úmida associada a tratamentos químicos na deterioração pós-colheita e qualidade das raízes. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 4, n. 1, p. 79-85.

- 8- Cereda, M. P., Vilpoux, O. **Conservação de raízes**. In: Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americana. Botucatu, SP., cap. 1 v.32, p.13-29.
- 9- Concellon, A.; Anon, M.; and Chaves, A. 2004. Characterization and changes in polyphenoloxidase from eggplant fruit (*Solanun melongena L.*) during storage at low temperature. **Food Chemistry**, v.88, p. 17- 24.
- 10- Dogan, S., Turan, Y., Ertürk, H. and Arslan, O. 2005. Characterization and purification of polyphenol oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus L.*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p. 776- 785.
- 11- Duangmal, K., Owusu Apenten, R. K. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p. 351- 359.
- 12- Freitas, A. A., Francelin, M. A., Hirata, G. F., Clemente, E., Schmidt, F. L. 2008. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p.172-177.
- 13- Furtunato, A. A. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectina esterase e peroxidase presente na polpa de cajá (*Spondias lutea*)**. Rio Grande do Norte, 74p. 2002. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
- 14- Gawlik-Dziki, U.; Szymanowska, U.; Baraniak, B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1047-1053.
- 15- Gomes, M. R. A., Oliveira, M. G. de A., Carneiro, G. E. S., Barros, E. G. de, Moreira, M. A., (2001). Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de

feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.1, n.1, p. 69-72.

- 16- Gonzalez, E. M., Ancos, B. and Cano, M. P. 2000. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in Blackberry fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p. 5459-5464.
- 17- 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.
- 18- Kato, M. do S., Souza, S. M. C. 1987. Conservação de raízes após colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 9-14.
- 19- Kavrayan, D. and Aydemir, T. 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, v.74, p. 147-154.
- 20- Laurente, C., Clemente, E. 2005. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia averrhoa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 159-163.
- 21- Lima, E. D. P. de A., Pastore, G. M., Lima, C. A. de A. 2001. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de Pinha (*Annona Squamosa* L.) madura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 98-104.
- 22- Liu, L., Cao, S., Xie, B., Sun, Z., Li, X., Miao, W. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from Litchi Pericarp Using (-)- Epicatechin as substrate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7140-7143.
- 23- Lorenzi, José Osmar. 2003. **Mandioca**. 1a ed. Campinas, CATI. 116p. (Boletim Técnico, 245).

- 24- Lourenço, E. J., Neves, V. A. and da Silva, M. A. 1992. Polyphenoloxidase from sweet potato: Purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2369-2373.
- 25- Mahanta, P. K., Boruah, S. K., Boruah, H. K., Kalita, J. N. 1993. Changes of polyphenol oxidase and peroxidase activities and pigment composition of some manufactured black teas (*Camellia sinensis* L.). **American Chemical Society**, v. 41, p.272-276.
- 26- Mayer A. M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v.67, p. 2318-2331.
- 27- Menolli, L. N., Finger, F .L., Puiatti, M., Barbosa, J. M., Rarros, R. S. 2008. Atuação das enzimas oxidativas no escurecimento causado pela injúria por frio em raízes de batata-baroa. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p. 57-63.
- 28- Mellon, J. E. 1990. Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. **Plant Physiology**, v.95, n.1, p.14-20.
- 29- Mizobutsi, G. P., Finger, F. L., Ribeiro, R. A., Puschmann, R., Neves, L. L. de M., Mota, W. F. da. 2010. Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. **Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)**, v.67, n.2, p.213-217.
- 30- Montaldo, A. 1973 .Vascular streaking of cassava root tubers. **Tropical Science**, London, v. 15, n. 1, p.39-46.
- 31- Nkya, E., Kouno, C., Li, Y-J., Yang, C. P., Hayashi, N., Fujita, S. 2003. Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.5467-5471.

- 32- Neves, V. A., Picchi, D. G., Laurente, M. A. da S. (2009). Some biochemical properties of polyphenoloxidase from spearmint (*Mentha arvensis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52 n.4, p. 1001-1010.
- 33- Neves, L. L. de M. 2003. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]**. 72 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 34- Nunez-Delicado, E., Mar Sojo, M., Garcia-Carmona, F. and Sanchez-Ferrer, A. 2003. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 2058-2063.
- 35- Patil, S. S., Zucker, M. 1965. Potato phenolases: Purification and properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n.10, p. 3.938-3.943.
- 36- Perone C. A. S. Queiroz, A. S., Dalosso, V. M., Moreira, M. E. M. 2005. Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos em urina humana, usando extrato parcialmente purificado de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.23, n.4, p.253-259.
- 37- Perone, C. A. S, Queiroz, A. S., Dalosso, V. M., Moreira, M. E. M. 2007. Purificação parcial e caracterização cinética da enzima *Polifenol oxidase* de banana nanica (*Musa acuminata*). **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n.3, p. 239-46.
- 38- Polesel, D. N., Senhorini, A. L. C., Perone, C. A. S. 2010. Caracterização cinética da enzima catecolase (Polifenol oxidase) 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.

- 39- Ramos, P. A. S. 2011. **Papel das enzimas oxidativas na deterioração fisiológica da mandioca.** 87 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 40- Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C. and Hendrickx, M. 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. Sativa). **Food Chemistry**, v. 94, p. 253-261.
- 41- Ribeiro, R. A., Finger, F. L., Puiatti, M., Casali, V. W. D. 2005. Chilling injury sensitivity in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. **Tropical Science**, v. 45, p. 55-57.
- 42- Rivas N, Whitaker J. R. 1973. Purification and some properties of two polyphenol oxidase from Bartlett pears. **Plant Physiology**, v.52, p.501-7.
- 43- Rizzi, G. P. 2006. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived. Quinones and r-Amino acids in a nonenzymic model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 1893-1897.
- 44- Rocha, A. M. C. N., Morais, A. M. M. B. **Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from “Jonagored” apple.** Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal, p.1-6.
- 45- Sellés-Marchart,S., Casado-Vela,J., Bru-martinez, R. 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 446, p. 175-185.
- 46- Signori, C. A., Fatibello-Filho, O. 1994. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Química Nova**, v.17, n.1, p. 38-42.

- 47- Soderhall, I. 1995. Properties of carrot polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v. 39, n.1, p.33-38.
- 48- Tanaka Y, Uritani I. 1977. Polarity of production of polyphenol and development of various enzyme activities in cutinjured sweet potato roots. **Plant Physiology**, v. 60, p. 563-6.
- 49- Toralles, R. P., Vendruscolo, J. L., Vendruscolo, C. L., Del Pino, F. A. B., Antunes, P. L. 2010. Controle da atividade da polifenoloxidase de pêssego por interação do pH, da temperatura e da concentração de ácido ascórbico. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 120-127.
- 50- Toralles, R. P., Vendruscolo, J. L., Haas, L. I. R., Ferri, N. L., Del Pino F. A. B., Antunes, P. L. 2005. Caracterização parcial do escurecimento enzimático pela polifenoloxidase em pêssegos das Cv. Granada, Jade, Esmeralda e Maciel. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.1, p. 241-244.
- 51- Valderrama. P., Marangoni, F., Clemente, E. 2001. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.2, n.3, p. 321-325.
- 52- Vieira, I. C., Fatibello-Filho, O., Granato, A. C., Lupetti, K. O. 2004. Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante. **Eclética Química sciELO**. São Paulo, v.29, n.2, p. 7-14.
- 53- Wisseman KW, Montgomery MW. 1985. Purification of d'Anjou pear (*Pirus communis*) polyphenol oxidase. **Plant Physiology**, v.78, p. 256-62.
- 53- Xu, J., Zheng, T., Meguro, S., Kawachi, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). **Journal Wood Society**, v. 50, p.260–265.

- 54- Yue-Ming, J., Zauberman; Fuchs, Y. 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 221- 228.
- 55- Zanatta, C. L., Zotarelli, M. F., Clemente, E. 2006. peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p.705-708.
- 56- Zawistowski, J. Billiaderis, C. G., and Murply, E. d. 1988. Purification and characterization of Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* L) polyphenol oxidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 12, p. 1-22.