

Minerais e enzimas oxidativas em brócolos (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica) minimamente processado

Aline Soriano Lopes e Edmar Clemente*

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. Objetivou-se determinar a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, bem como o teor de minerais, nos brócolos, *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae), *in natura* e branqueado, os quais sofreram um tratamento térmico à 95,0°C por um período de 10 a 12 minutos. Extratos contendo peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) foram preparados, utilizando solução-tampão, fosfato de sódio 100mmol/L em diferentes valores de pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5). O procedimento foi realizado para a extração das frações solúvel e ionicamente ligada à parede celular. Os resultados demonstraram que o pH 6,0 foi o melhor para a extração das enzimas. Entre as frações extraídas, tanto do brócolos *in natura* quanto do brócolos branqueado, observou-se uma acentuada diferença entre as frações solúveis, sendo a atividade da POD e da PPO maior no brócolos *in natura*. Nas frações ionicamente ligadas não foi observada a mesma variação. O tratamento térmico aplicado durante o processo de branqueamento não afetou o teor de minerais: Fe (152,3ppm e 149,0ppm); Cu (15,5ppm e 9,6ppm); Zn (104,3ppm e 104,3ppm); Mn (59,8ppm e 59,6ppm); Ca (0,69% e 0,59%); Mg (0,29% e 0,29%); K (2,58% e 3,04%) para os brócolos fresco e branqueado, respectivamente.

Palavras-chave: peroxidase, polifenoloxidase, teor de minerais.

ABSTRACT. Mineral and oxidative enzymes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica) minimally processed. The aim of this research was to determine the action of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) as well as mineral contents into natural and blanched broccoli, *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae), - the latter was submitted to thermal treatment at 95,0°C during 10 to 12 minutes. Extracts containing POD and PPO were prepared using sodium phosphate buffer 100mmol/L in different pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5). The procedure was followed in order to extract the soluble fraction and the fraction ionically linked to the cellular wall. Among the extracted fractions from both natural and blanched broccoli a strong distinction on the soluble fraction was noticed, being POD and PPO activity more intense on natural broccoli. The same variation, however, was not detected in ionically linked fractions. The thermal treatment used in the blanching process did not affect mineral contents: Fe (152.3ppm e 149.0ppm); Cu (15.5ppm e 9.6ppm); Zn (104.3ppm e 104.3ppm); Mn (59.8ppm e 59.6ppm); Ca (0.69% e 0.59%); Mg (0.29% e 0.29%); K (2.58% e 3.04%) - for natural and blanched broccoli, respectively.

Key words: peroxidase, polyphenoloxidase, mineral content.

Introdução

A peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) e a polifenoloxidase (PPO; EC 1.10.3.1) têm sido consideradas as principais enzimas responsáveis pela qualidade e deterioração de muitos frutos e hortaliças, influenciando com reações oxidativas e de biodegradação. No processamento de frutas e de vegetais, a ação dessas enzimas estão diretamente relacionadas ao escurecimento e à geração de “*off-flavours*” em enlatados e em congelados (Vamos-Vigyazo, 1981). Em extratos de plantas, a atividade

da peroxidase tem sido encontrada na forma solúvel e também ionicamente ligada à parede celular (Clemente, 1998). Além disso, há um aumento em sua solubilidade durante o período de maturação e, consequentemente, um aumento na atividade dessa enzima no pós-climatério (Valderrama *et al.*, 2001). Técnicas de conservação para os brócolos são de grande importância, por serem vegetais altamente perecíveis. A atenção ao vegetal redobra quando este é submetido a processos industriais, como por exemplo, o branqueamento. Até uma década atrás, tratamentos térmicos eram predominantemente

usados para reduzir ou controlar a atividade enzimática em alimentos. Entretanto, eles podem resultar em consideráveis perdas sensoriais (gosto, cheiro, coloração) ou nutricionais (vitaminas, minerais) (Ludikhuyze *et al.*, 1999). Os tratamentos térmicos comercialmente usados nos processamentos de frutos e de vegetais são pouco efetivos para uma inativação irreversível da peroxidase. A resistência ao calor e a tendência à regeneração da enzima sugerem à indústria de alimentos aplicar severo branqueamento e pasteurização, condições que podem debilitar a qualidade do produto (Roling *et al.*, 2000). O objetivo do trabalho foi determinar a atividade enzimática da POD, da PPO e do teor de minerais nos brócolos *in natura* e branqueado.

Material e métodos

Material

Os brócolos, *Brassica oleracea* L. var. Italica (Brassicaceae) foram obtidos da região de Medianeira, Estado do Paraná. Os reagentes químicos utilizados são de grau analítico.

Obtenção do extrato em diferentes valores de pH

Os brócolos foram lavados com água destilada e, em seguida, picados. Porções de 30,0 g de brócolos foram trituradas com 80,0 mL de solução-tampão, fosfato de sódio 100mmol/L nos seguintes valores de pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 (Valderrama *et al.*, 2001). As soluções resultantes foram filtradas com tecido de algodão, sendo o filtrado recebido em banho de gelo. Os filtrados foram centrifugados a 10.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram congelados a -18°C.

Obtenção dos extratos enzimáticos da POD e da PPO nos brócolos *in natura* e branqueado

Porções de 250,0 g de brócolos foram picados e homogeneizados com 250,0 mL de solução-tampão, fosfato de sódio 100 mmol/L pH 6,0, por um minuto, utilizando um liquidificador. Durante o processo, foi acrescentado polivinilpirrolidona (PVP) e CaCl_2 , evitando a ação de compostos fenólicos. A solução foi filtrada com tecido de algodão em banho de gelo. O filtrado foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi congelado a -18°C. O precipitado foi homogeneizado com 100,0 mL de NaCl 1 mol/L, em solução-tampão, fosfato pH 6,0. A solução foi centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente. O precipitado obtido foi descartado, e o sobrenadante estocado a -18°C.

Determinação da atividade enzimática da peroxidase

A atividade da POD foi determinada seguindo o método descrito por Clemente (1998). Misturaram-se 0,2 mL do extrato enzimático com 2,7 mL de peróxido de hidrogênio 0,1%, em solução-tampão, fosfato (100 mmol/L pH 6,0), e, posteriormente adicionou-se 0,1 mL de solução de o-dianisidina 1% em metanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VISmini1240 (Shimadzu), a 460nm. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto/g de amostra.

Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase

A atividade da PPO foi determinada de acordo com o método descrito por Lima *et al.* (2001), com modificações. Após a mistura de 0,5 mL do extrato enzimático com 0,8 mL de solução-tampão, fosfato de sódio 100 mmol/L pH 6,0 e, finalmente, 0,05 mL de solução de catecol 0,01 mol/L, a solução resultante foi incubada e mantida a 30°C, por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 0,8 mL de ácido perclórico 2 mol/L. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VISmini1240 (Shimadzu), a 395 nm. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto/mL de amostra.

Determinação do teor de minerais

O teor de minerais foi determinado segundo a metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997). Os brócolos foram submetidos à secagem em estufa a 70°C, por aproximadamente dois dias. As amostras foram trituradas e pesadas (em torno de 5,0 g). Em seguida, acrescentou-se 6 mL de ácido nítrico/ácido perclórico na proporção 2:1 (v/v). Foi realizada uma digestão, na qual se aumentou gradativamente a temperatura até atingir 160°C, e deixou-se nessa temperatura até o volume ser reduzido à metade (cerca de 20 minutos). A temperatura foi aumentada para 210°C, e assim permaneceu até obterem fumos brancos de HClO_4 e o extrato apresentar-se incolor (cerca de 20 minutos). Posteriormente, a amostra foi dissolvida e diluída para 50,0 mL. Na determinação do teor de cálcio, magnésio e potássio, as amostras foram tratadas com solução de lantânio 0,1% na proporção: 0,5 mL de amostra para 25,0 mL de solução de lantânio. Mediu-se o teor de minerais com um espectrômetro de absorção atômica por chama SEPECTR AA - 10 PLUS (VARIAN).

Resultados e discussão

Para a determinação do melhor valor de pH para a extração das enzimas PPO e POD dos brócolos *in natura* e branqueado, foram preparados extratos em solução-tampão fosfato de sódio 100mmol/L, em diferentes valores de pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. Os resultados das atividades de PPO e de POD podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade enzimática média de PPO e de POD em diferentes valores de pH (n=3)

pH	POD Δ OD/min. ml	Sd	PPO Δ OD/min. ml	Sd
5,0	1,54	0,03	0,92	0,01
5,5	2,04	0,01	1,01	0,02
6,0	2,20	0,02	1,21	0,01
6,5	2,16	0,03	0,78	0,01
7,0	1,90	0,01	0,80	0,01
7,5	1,99	0,01	0,76	0,02

Δ OD - mudança na atividade ótica; n - número de repetições; Sd - desvio padrão

De acordo com os resultados, a maior atividade enzimática observada foram nos extratos obtidos em pH 6,0. Após essa determinação uma maior quantidade de extratos foi preparada, obtendo-se duas frações: uma fração solúvel e uma de enzimas ionicamente ligadas extraídas do brócolos *in natura* e do brócolos minimamente processado.

As atividades de peroxidase e de polifenoloxidase na fração solúvel e na fração ionicamente ligada podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade enzimática solúvel e iônica nos extratos de brócolos fresco e de branqueado (n=3)

Amostra	Unid. PPO solúvel/100g	Unid. PPO iônica/100g	Unid. POD solúvel/100g	Unid. POD iônica/100g
Brócolos Fresco	511,64	210,92	1718,10	467,10
Brócolos Branqueado	103,08	109,00	192,00	581,70

n - número de repetições

A atividade da polifenoloxidase, tanto na forma solúvel quanto na forma iônica, foi maior nos extratos de brócolos fresco. A atividade da peroxidase solúvel no extrato de brócolos branqueado apresentou-se quase 1/9 da atividade da peroxidase encontrada nos brócolos fresco. Isso indica que o branqueamento aplicado foi parcialmente efetivo quanto à desnaturação dessas enzimas. Na atividade da peroxidase ligada ionicamente, não se observou uma diferença considerável entre os dois tipos de brócolos, o que está de acordo com o relatado por Wang e Luh (1983). A maior parte da atividade da peroxidase resistente ao tratamento térmico encontra-se na fração ionicamente ligada, demonstrando que o tratamento térmico industrial aplicado para desnaturar a peroxidase não obteve maiores resultados, principalmente para as enzimas ligadas

ionicamente. Para a polifenoloxidase, apesar de não ter sido totalmente desnaturada com o tratamento térmico, o efeito foi mais pronunciado do que para a peroxidase, quando se compara o brócolos minimamente processado ao brócolos *in natura*.

A composição de minerais pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do teor de minerais* (n=3)

Amostras	Fe $\pm$ Sd (ppm)	Cu $\pm$ Sd (ppm)	Zn $\pm$ Sd (ppm)	Mn $\pm$ Sd (ppm)	Ca $\pm$ Sd (%)	Mg $\pm$ Sd (%)	K $\pm$ Sd (%)
A	152,3 $\pm$ 0,10	15,5 $\pm$ 0,02	104,3 $\pm$ 0,8	59,8 $\pm$ 0,7	0,69 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,01	2,58 $\pm$ 0,09
B	149,0 $\pm$ 0,10	9,61 $\pm$ 0,01	104,3 $\pm$ 0,3	59,6 $\pm$ 0,7	0,59 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01	3,04 $\pm$ 0,01

*Determinação via úmida; A - Brócolos Fresco; B - Brócolos Branqueado; n - número de repetições

O teor de minerais permaneceu praticamente o mesmo quando comparado o brócolos *in natura* ao brócolos minimamente processado. Apesar de se manterem as qualidades nutricionais, a presença das enzimas peroxidase e polifenoloxidase vão diminuir o tempo de vida de prateleira do brócolos, mesmo no minimamente processado, devido ao alto grau de ação dessas enzimas e da disponibilidade de substratos com o avanço da senescência. Portanto, há a necessidade de se desenvolver métodos que efetivamente venham desnaturar tais enzimas, melhorando o período pós-colheita, e tendo um produto de boa qualidade para o consumidor.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CNPq, pelas bolsas de IC - Pibic/UEM/CNPq.

Referências

- CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, Kidlington/Oxon, v. 49, p.29-36, 1998.
- LIMA, E.D.P. *et al.* Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 21, p.98-104, 2001.
- LUDIKHUYZE, L. *et al.* Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica). *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC, v. 47, p.1794-1800, 1999.
- MALAVOLTA, E. *et al.* Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997.
- ROLING, M.S. *et al.* Termoestabilidade da peroxidase extraída da folha de repolho. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.22, p.1157-1160, 2000.
- VALDERRAMA, P. *et al.* Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase

(PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 21, p.321-325, 2001.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Food Sci. Nutr.*, Boca Raton, v. 49, p.127, 1981.

WANG, Z.; LUH, B. S. Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 48, p 1412-1417, 1983.

Received on August 06, 2002.

Accepted on October 07, 2002.