

# Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores

Cristine Elizabeth Alvarenga Carneiro<sup>1</sup>, Henriqueta Merçon Vieira Rolim<sup>1</sup> e Kátia Flávia Fernandes<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Química de Proteínas, Universidade Federal de Goiás, C.P.131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: katia@icb2.ufg.br

**RESUMO.** Neste trabalho a guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) foi submetida a tratamento com soluções contendo inibidores da peroxidase (POX) e da polifenoloxidase (PPO). Fatias de guariroba foram imersas em soluções de ácido cítrico, ácido láctico e bissulfito de sódio nas concentrações de 0,5, 0,8 e 1,0 % (p/v), por intervalos de tempo de 10, 15 e 20 min. As atividades de POX e PPO foram monitoradas antes e após o tratamento com as soluções de inibidores, bem como a concentração de fenóis e o pH das soluções. O ácido láctico, quando utilizado na concentração de 1,0 % por 10 min apresentou os melhores resultados, tanto para a inibição das enzimas quanto para a análise dos teores de fenóis.

**Palavras-chave:** Peroxidase, polifenoloxidase, guariroba, ácido láctico, escurecimento, processamento.

**ABSTRACT.** Study of guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) peroxidase and polyphenoloxidase activity under different inhibitors action. In this work the guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) was submitted to treatment with solutions containing peroxidase (POX) and polyphenoloxidase (PPO) inhibitors. Guariroba slices were immersed in 0.5, 0.8 and 1.0 % (p/v) citric acid, lactic acid and sodium bisulfite solutions, for 10, 15 and 20 minutes. The phenol contents and the enzymatic activities of POX and PPO were measured before and after treatment with the inhibitor solutions, as well as solution pH. The best results for both enzymatic inhibition and phenol content were obtained when the guariroba slices were treated with 1.0 % lactic acid solution for 10 minutes.

**Key words:** Peroxidase, polyphenoloxidase, guariroba, lactic acid, darkness, processing.

## Introdução

A guariroba (*Syagrus oleracea*, Becc) é uma palmeira típica da região de cerrado, distribuída nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e São Paulo, cujo palmito de sabor amargo é muito apreciado (Nogueira, 1977; Lorenz, 1992). Devido à falta de técnicas específicas para exploração, o palmito sofre grande depreciação, diminuindo seu valor comercial e a qualidade do produto industrializado. Um dos principais fatores na desvalorização do produto é o escurecimento da parte comestível, que ocorre após o corte da haste.

Dentre os compostos que causam o escurecimento estão as enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) (Vigyázo-Vámos, 1981; Arslan *et al.*, 1997) e a presença de compostos fenólicos, que são, ao mesmo tempo, substratos dessas enzimas e responsáveis pelo sabor adstringente e amargo característico da guariroba

(Shimokomaki *et al.*, 1975; Uzelac *et al.*, 1976). A polifenoloxidase e a peroxidase atuam sobre uma variedade de substratos, tais como: fenóis, amins aromáticas, naftóis, metoxibenzenos (Chen e Nobe, 1993). Estas enzimas, na presença do oxigênio, atuam sobre os compostos fenólicos oxidando-os e levando ao aparecimento de substâncias coloridas, num processo denominado escurecimento enzimático (Goy *et al.*, 1992; Flurkey e Jen, 1978; Vigyázo-Vámos, 1981). Uma característica dessas enzimas, em particular a POX, é sua alta resistência à desnaturação térmica (Hemeda e Klein, 1991; Weng *et al.*, 1991). Tal característica faz com que a inativação dessas enzimas por processos térmicos convencionais seja ineficaz, uma vez que o tratamento na temperatura de desnaturação das enzimas levaria ao comprometimento da textura e do sabor do produto.

O objetivo deste trabalho foi determinar as atividades das enzimas PPO e POX e os fenóis totais presentes nas plantas de guariroba recém-colhidas, bem como propor uma rota de processamento para a guariroba em escala industrial, em que se efetive a inibição do escurecimento enzimático, o que possibilitaria a melhor comercialização e utilização do produto pelo consumidor.

## Material e métodos

### Reagentes

Polifenoloxidase, peroxidase, catecol, guaiacol, ácido cítrico e BSA foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sacarose, bissulfito de sódio, ácido láctico e citrato monoidratado (Merck, Darmstadt, Germany). As guarirobas obtidas no Ceasa (Goiânia, Estado de Goiás), um dia após o corte, provinham de plantas com idade aproximada de 3 anos.

### Metodologia

**Tratamento das Hastes.** As hastes foram descascadas e subdivididas em cabeça e coração, sendo denominada cabeça a parte macia que sucede a raiz, e coração toda a parte afilada da haste. Alíquotas de 20 g foram retiradas para preparação dos extratos brutos. O restante das hastes foi submetido à imersão em diferentes soluções de espera ácido cítrico, ácido láctico e bissulfito nas concentrações de 0,5%, 0,8% e 1% com os tempos de imersão variando entre 10, 15 e 20 minutos, para cada substância, obedecendo à proporção de 1,0 g de guariroba para cada 10 mL de solução. O pH das soluções de espera foi monitorado durante os tratamentos com potenciômetro, marca Nova Técnica (eletrodo Digimed).

**Preparo de Extratos.** Alíquotas de 20 g de guariroba (cabeça ou coração) *in natura* e aquelas submetidas a tratamento com as soluções foram maceradas manualmente com 100 mL de tampão fosfato 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ / sacarose 400 mmol  $\text{L}^{-1}$ , (pH 6,5) gelado, seguido por 40min de agitação a 4°C e centrifugação (2.800 x g, 20min, a 4°C).

**Medida de Atividade.** As atividades de POX e de PPO foram determinadas seguindo metodologia de Halpin e Lee (1987). Em ensaio típico para POX, 0,1 mL de extrato obtido era adicionado a 2,9 mL de solução contendo 0,5% de guaiacol (v/v), 0,008% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 6,0. O ensaio se iniciava pela adição da amostra e procedia por um minuto, quando se processava a leitura a 470 nm em espectrofotômetro Pharmacia modelo Ultrospec 2000. A atividade foi definida como

aumento de 0,1 unidade de absorvância por minuto. Para PPO, um ensaio padrão foi feito adicionando-se 0,1 mL de extrato a 2,9 mL de solução contendo 46 mmol  $\text{L}^{-1}$  de catecol preparado em tampão Mellvaine's, deixando estabilizar durante 40 minutos. O ensaio se iniciava pela adição da amostra e procedia por um minuto, quando se processava a leitura a 420 nm. A atividade foi definida como aumento de 0,1 unidade de absorvância por minuto.

**Determinação de Proteínas.** A determinação de proteínas foi feita segundo Bradford (1976), usando BSA como padrão protéico. A atividade específica de cada amostra foi definida como unidade de enzima por miligrama de proteína.

**Determinação de Fenóis.** Para medida de fenóis totais foi utilizada metodologia de Price e Butler (1977), usando catecol como padrão. Os extratos obtidos pela maceração de 200 mg de amostra com 5 mL de metanol, deixando-se sob agitação por 15 minutos e seguido por centrifugação (1.400 x g, 15 min). O reagente de cor foi utilizado na proporção de 1mL de cada para 100  $\mu\text{L}$  da amostra extraída e a leitura foi feita após 10min de reação em 720 nm. Os resultados foram expressos em mg de fenóis totais por mg de guariroba.

**Análise dos Resultados.** Todos os ensaios foram feitos em triplicata usando extratos brutos independentes e os resultados, após análise de variância e a comparação das média pelo teste de Tukey (5%), foram expressos em média e desvio padrão.

## Resultados e discussão

Na Tabela 1 são exibidos os resultados de atividade enzimática e o conteúdo protéico das porções cabeça e coração de guariroba antes do processamento. Como pode ser visto, há diferenças significativas na atividade de POX e PPO, sendo a atividade de POX aproximadamente duas vezes maior que a de PPO, em ambas as porções estudadas.

**Tabela 1.** Atividade enzimática (UE  $\text{g}^{-1}$ ) e teor de proteína de guariroba *in natura*. A atividade específica (A.E) foi calculada como unidades de enzima por mg de proteína

Parte	Proteína mg $\text{g}^{-1}$	Peroxidase		Polifenoloxidase	
		UE $\text{g}^{-1}$	A.E.	UE $\text{g}^{-1}$	A.E.
Cabeça	2,4 ± 0,4B	730,3 ± 6,3	249,2 ± 7,4A	372,3 ± 8,3	122,7 ± 10,87A
Coração	3,5 ± 0,5A	464 ± 8,8	164,7 ± 8,1B	266,3 ± 8,2	93,5 ± 9,25B
D.M.S.	0,08		40,12		24,74

Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Na Tabela 2 são apresentados os efeitos da imersão das guarirobas (cabeça) em diferentes soluções sobre as atividades da POX e da PPO.

Como pode ser observado, a imersão das guarirobas em ácido láctico levou a uma redução na atividade enzimática da POX de 730 UE g<sup>-1</sup> (Tabela 1) para valores que variaram de 172 ± 2 a 110 ± 1 UE g<sup>-1</sup> (Tabela 2), com um valor médio de 140 UE g<sup>-1</sup>, o que representa uma redução da ordem de 81% na atividade desta enzima. Já para a PPO, a imersão em solução de bissulfito de sódio teve ação inibitória crescente à medida que a concentração do sal aumentava de 0,5% até 1,0%, chegando a 98% de inativação no melhor tratamento (Tabela 2). Na concentração de 0,5% também foi possível observar que o tempo de tratamento foi um fator que interferiu positivamente no processo de inibição.

Apesar dos resultados bastante efetivos na inativação da PPO, o bissulfito de sódio tem seu uso limitado pela legislação por ser tóxico e seu resíduo causar vários problemas ambientais (Oga, 1996). Por isso sua utilização em processo de larga escala implicaria em maiores cuidados tanto no controle da concentração como no tratamento dos resíduos gerados, podendo elevar o custo do produto. Por outro lado, o ácido láctico, além de não apresentar restrições ao seu uso, foi a substância que promoveu a inativação mais acentuada da peroxidase (81% em média), tendo ainda reduzido a atividade de PPO em média 48% (Tabelas 1 e 2). O ácido láctico vem sendo empregado em vários segmentos industriais, tais como: na indústria de laticínios, nos produtos derivados de carne e nas indústrias de sucos, uma vez que sua utilização tem apresentado resultados bastante satisfatórios quanto ao custo, qualidades organolépticas e intensidade ácida (Mori *et al.*, 1986). De acordo com os resultados estatísticos, o melhor tratamento foi com ácido láctico a 1% durante 10

minutos para a PPO e 0,8% durante 15 minutos para a POX (Tabela 3).

Segundo Quast e Bernhardt (1976), o pH médio da guariroba *in natura* é 6,0, sendo que, aparentemente, o poder tampão da parte inferior do palmito, onde se localizam os tecidos mais jovens, é maior que o da parte superior. Este trabalho mostrou que o pH médio da guariroba *in natura* testada foi de 5,7. Após o tratamento com ácido láctico verificamos um aumento gradual no valor do pH da solução, que inicialmente era 1,75 (Figura 1). Este aumento se acentuou à medida que as hastes foram se sucedendo na solução, indicando que a quantidade de guariroba por volume de solução deve ser considerada no processamento, pois o aumento do pH pode resultar na ativação das enzimas, visto que para as enzimas estudadas o pH deve ficar abaixo de 4,0 para a inativação.

No que se refere aos fenóis totais (Tabela 4), observou-se que os tratamentos com ácido cítrico e ácido láctico não influenciam significativamente (ao nível de 5%) nos teores destes compostos. Diferentemente, o bissulfito influenciou no teor dos compostos fenólicos, já que o íon sulfito oxida-se a íon sulfato, o que aumenta a solubilidade de fenóis. Assim sendo, inicialmente o efeito do sulfito é de redução no teor de fenóis, o que diminui com o aumento da concentração de bissulfito (Waterman e Mole, 1994; Harris, 2000; Jeffery *et al.*, 2002). Este resultado representa um inconveniente adicional ao uso de bissulfito no processamento da guariroba. Considerando que o escurecimento é causado pela reação enzimática (Vigyázo-Vámos, 1981), observou-se no decorrer do manuseio da guariroba que existe um maior e mais rápido escurecimento da cabeça comparado ao coração.

**Tabela 2.** Atividade enzimática de POX e PPO de guariroba (cabeça) após tratamentos com diferentes soluções de inibidores

Tempo	Peroxidase (UE g <sup>-1</sup> )									Média
	Bissulfito de sódio (%)			Ácido Cítrico (%)			Ácido Láctico (%)			
	0,5	0,8	1,0	0,5	0,8	1,0	0,5	0,8	1,0	
10 min	387 ± 35	267 ± 37	200 ± 7	301 ± 50	327 ± 46	332 ± 5	132 ± 1	123 ± 20	154 ± 11	247,2C
15 min	375 ± 52	497 ± 82	227 ± 22	297 ± 2	352 ± 13	336 ± 7	153 ± 11	110 ± 1	127 ± 12	275,1B
20 min	449 ± 16	498 ± 43	252 ± 5	315 ± 6	369 ± 38	331 ± 1	172 ± 2	142 ± 1	149 ± 4	297,7A
Média Prod.		350,31a			329,09b			140,68c		
D.M.S.	6,40									
Tempo	Polifenoloxidase (UE g <sup>-1</sup> )									Média
	Bissulfito de sódio (%)			Ácido Cítrico (%)			Ácido Láctico (%)			
	0,5	0,8	1,0	0,5	0,8	1,0	0,5	0,8	1,0	
10 min	64,4 ± 6	1,6 ± 0	0,5 ± 0	316 ± 6	324 ± 21	322 ± 5	248 ± 19	166 ± 7	95,25 ± 1	171,5A
15 min	51,3 ± 2	2,5 ± 0	0,5 ± 0	296 ± 20	287 ± 1	283 ± 29	237 ± 4	186 ± 6	105 ± 7	161,8B
20 min	23,2 ± 0	1,2 ± 0	0,2 ± 0	253 ± 1	294 ± 15	257 ± 16	260 ± 3	198 ± 9	118 ± 8	161,5B
Média Prod.		16,55c			292,84a			179,30b		
D.M.S.	7,02									

Médias com letras distintas, minúsculas na linha, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

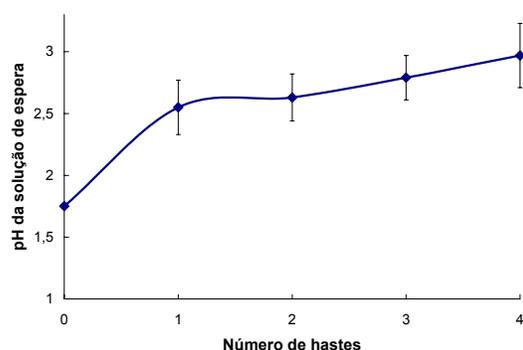
**Tabela 3.** Atividade remanescente de POX e PPO após tratamento com solução de ácido láctico

Tempo (min)	Atividade de Peroxidase (UE g <sup>-1</sup> )		
	Ácido Láctico (%)		
	0,5	0,8	1,0
10	132 ± 1Cb	123 ± 20Bc	154 ± 11Aa
15	153 ± 11Ba	110 ± 1Cc	127 ± 12Cb
20	172 ± 2Aa	142 ± 1Ac	149 ± 4Bb

Tempo (min)	Atividade de Polifenoloxidase (UE g <sup>-1</sup> )		
	Ácido Láctico (%)		
	0,5	0,8	1,0
10	248 ± 19Ba	166 ± 7Cb	95,25 ± 1Cc
15	237 ± 4Ca	186 ± 6Bb	105 ± 7Bc
20	260 ± 3Aa	198 ± 9Ab	118 ± 8Ac

Médias com letras distintas, minúsculas na linha, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

**Figura 1.** Variação no pH da solução de ácido láctico após imersão das hastes de guariroba fatiadas. Cada haste permaneceu na solução por 10 min, e a proporção de peso/volume observada foi de 1,0g de guariroba para cada 10 mL de solução**Tabela 4.** Análise de fenóis totais em guarirobas tratadas com solução de espera contendo ácido cítrico, ácido láctico e bissulfito de sódio. Cada grupo de três colunas corresponde a uma dada concentração de solução de espera, e em cada grupo estão apresentados os tempo de 10, 15 e 20 minutos de tratamento

Tempo (min)	Ácido Cítrico		
	Concentração (%)		
	0,5	0,8	1,0
10	1,04 ± 0,06	1,02 ± 0,06	0,96 ± 0,11
15	1,18 ± 0,01	0,96 ± 0,19	1,25 ± 0,02
20	1,03 ± 0,05	0,80 ± 0,13	1,06 ± 0,09

Tempo (min)	Ácido Láctico		
	Concentração (%)		
	0,5	0,8	1,0
10	1,24 ± 0,18	1,32 ± 0,12	1,45 ± 0,11
15	1,27 ± 0,03	1,38 ± 0,09	1,30 ± 0,03
20	1,30 ± 0,08	1,63 ± 0,03	1,39 ± 0,04

Tempo (min)	Bissulfito de Sódio		
	Concentração (%)		
	0,5	0,8	1,0
10	0,61 ± 0,03	1,06 ± 0,43	1,34 ± 0,16
15	0,87 ± 0,04	1,12 ± 0,01	1,22 ± 0,03
20	0,63 ± 0,07	1,28 ± 0,09	1,81 ± 0,18

	Ácido Láctico	Bissulfito de Sódio	Ácido Cítrico
MÉDIA	1,36a	1,2b	1,03c

Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

## Conclusão

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles que estabelecem um procedimento para as operações de processamento de palmito doce (Nogueira, 1977; Mori et al., 1986), e considerando a necessidade de inativação preferencial da POX, concluímos que, para que a perda e a depreciação do produto sejam evitadas, a guariroba deve ser submetida a tratamento com solução de espera contendo ácido láctico 1,0% (p/v), na proporção de 1,0g de material vegetal para cada 10 mL de solução, por um período de 10 minutos. Esta solução deverá ser substituída a cada quatro hastes, de modo que o pH não ultrapasse o valor de 3,0. Além disso, o tratamento com ácido láctico não interferiu na solubilidade dos compostos fenólicos, responsáveis pelo sabor amargo das guarirobas, sendo, portanto, um bom tratamento.

## Referências

### Referências

- ARSLAN, O. et al. Polyphenol-Oxidase from *Allium* sp. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 2861-2863, 1997.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHEN, J.K.; NOBE, K. Oxidation of dimethylaniline by horseradish peroxidase and electrogenerated peroxide. *J. Electrochem. Soc.*, Chicago, v. 140, p. 299-303, 1993.
- FLURKEY, W.H.; JEN, J.J. Peroxidase and polyphenoloxidase actives in developing peaches. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 43, p. 1826-1831, 1978.
- GOY, P. A. et al. Resistance to disease in the hibrid *Nicotina glutinosa* x *Nicotina debneyi* is associated with high constitutive levels of  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiol. Mol. Plant Path.*, v. 41, p. 11-21, 1992.
- HALPIN, B.E.; LEE, C.Y. Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 52, p. 1002-1005, 1987.
- HARRIS, D.C. Acid-base titrations. In: *Quantitative chemical analysis*. New York: W. H. Freeman and Company, 2000. cap. 12, p. 265-292.
- HEMEDA, H.M.; KLEIN, B.P. Inactivation and regeneration of peroxidase activity in vegetable extracts treated with antioxidants. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, n. 1, p. 68-71, 1991.
- JEFFERY, G.H. et al. Análise titrimétrica. In: *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 10, p. 213 - 339.

- LORENZ, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Plantarum, 1992.
- MORI, E.E.M. *et al.* Influência de diferentes acidulantes nas características do palmito enlatado. *Boletim Ital.*, Campinas, v. 23, n. 3, p.341-359, 1986.
- NOGUEIRA, J.N. Palmito: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial, *Série Extensão Agroindustrial*, v. 6, p. 66, 1977.
- OGA, S. Aditivos alimentares, *In: Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. parte 5, p. 405-440.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.
- QUAST, D.G. e BERNHARDT, L.W. Curvas de titulação do palmito de cinco espécies de palmeiras. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v. 7, p. 241-264, 1976.
- SHIMOKOMAKI, M. *et al.* Estudo comparativo entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - *Euterpe edulis* Mart. e açai - *Euterpe oleracea* Mart.) e de Sabor Amargo (guariroba - *Syagrus oleracea* Becc.). 1 Composição química, péptides e aminoácidos livres. *Coletânea do Ital.*, Campinas, v. 6, p. 69-80, 1975.
- UZELAC, M. *et al.* Estudos Comparativos entre os palmitos de sabor doce (palmito-juçara - *Euterpe edulis* Mart. e açai - *Euterpe oleracea* Mart.) e de sabor amargo (guariroba - *Syagrus oleracea* Becc.). 2 Compostos fenólicos. *Coletânea do Ital.*, Campinas, v. 7, p. 371-382, 1976.
- VIGYÁZO-VÁMOS, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Boca Raton, v. 20, p. 49-127, 1981.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites, analysis of phenolic plant metabolites. *In: Methods in Ecology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p. 238-239.
- WENG, Z. *et al.* Immobilized peroxidase: A potential bioindicator for evaluation of thermal processes. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, n. 2, p. 567- 570, 1991.

Received on August 28, 2002.

Accepted on March 21, 2003.