

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO PH SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE EM DOIS GENÓTIPOS DE MANJERICÃO (*Ocimum* sp).

Pahlevi Augusto de Souza

Engº. Agr. D. Sc. em Fitotecnia pela UFV-MG: Fisiologia pós-colheita
E-mail: pahlevi10@hotmail.com

Sandra Oliveira de Souza

Eng. Agrª. Doutoranda em Fitotecnia pela UFV-MG
E-mail: sandraosouza@yahoo.com.br

Rosana Gonçalves RodriguesDas Dores

Farmacêutica D.Sc em Fitotecnia pela UFV-MG
E-mail: rogonalves@yahoo.com.br

Claudia Martellet Fogaça

D. Sc. em Genética pela UFV-MG
E-mail: Claudia_fogaca@yahoo.com.br

Fernando Luiz Finger

D. Sc. Prof. Adjunto do departamento de Fitotecnia da UFV-MG
E-mail: flfinger@yahoo.com

RESUMO O experimento foi conduzido a fim de avaliar a influência da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) em genótipos de manjericão (*Ocimum* sp), cultivados no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os genótipos utilizados foram: manjericão de folha larga (basilicão) e manjericão roxo. Foram realizados dois ensaios, com três repetições, em sete níveis de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e em temperatura de 80°C durante 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. O genótipo roxo teve maior atividade específica da POD. A maior e menor atividade enzimática nos dois genótipos foram detectadas na faixa de pH variando de 5 a 7 e 3 a 9, respectivamente. O aquecimento a 80°C por 20 minutos proporcionou redução da atividade enzimática de 86,28% e 100% nos genótipos roxo e folha larga, simultaneamente.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum* L., POD, inativação enzimática

TEMPERATURE AND PH INFLUENCE ON PEROXIDASE ACTIVITY IN TWO SWEET BASIL GENOTYPES

ABSTRACT The experiment was executed to evaluate the temperature and pH influence on activity of peroxidase (POD) in two sweet basil (*Ocimum* sp.) genotypes, grown in Viçosa, MG, Brazil, the 'Large Leaf' or 'Basilicão' and 'Purple'. It was evaluated the peroxidase activity at pH's 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9, and the remaining activity at 80 °C treated for 0, 5, 10, 15 and 20 minutes. Each experiment was repeated three times. The 'Purple' genotype had higher POD specific activity. Higher and lower activities, for both genotypes, were present at pH 5 to 7 and pH 3 and 9, respectively. The heat treatment at 80 °C for 20 minutes reduced the enzyme activity by 86.28% and 100% for the genotype 'Purple' and 'Large Leaf', respectively.

Keywords: *Ocimum basilicum* L., POD, enzyme inactivation

INTRODUÇÃO

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.), Lamiaceae, é uma planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado. Nos Estados Unidos da América é

cultivado em média escala visando fins culinários, ornamentais e extração de óleo essencial. O óleo essencial constituído por linalol, cineol, estragol, é utilizado na indústria farmacêutica, em perfumaria e bebidas (Marotti *et al*, 1996), além de repelente e

inseticida (Urmerie *et al*, 1998) e antimicrobiano (Montes-Belmont & Carvajal, 1998). No Brasil, o manjeriço é cultivado principalmente por pequenos produtores rurais visando à comercialização da planta como condimento (Teixeira *et al*, 2002) ou com fins terapêuticos. É comum encontrar-se, no comércio, folhas verdes ou desidratadas, usadas em chás ou em preparados culinários. (Blank *et al*, 2004).

A perda de grande parte da produção de frutas e hortaliças pode ser atribuída à ação de enzimas durante a pós-colheita (Laurente & Clemente, 2005). O escurecimento enzimático ou descoloração em tecidos vegetais pode causar mudanças indesejáveis na qualidade durante o manuseio, processamento e armazenamento. Essa descoloração é oriunda de reações catalisadas pela enzima genericamente conhecida como peroxidase (Vamos-Vigyazo, 1981; Nicoli *et al*, 1991 e Araújo, 2001). As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas pertencentes ao grupo das oxiredutases e são encontradas em múltiplas formas moleculares e estão presentes na maioria das frutas e legumes na forma solúvel e acoplada (forma iônica e covalente) onde propriedades catalíticas são influenciadas pela cultivar, crescimento e fases fisiológicas (Neves, 2002). A POD é encontrada na forma solúvel e iônica ligada à parede das células (Clemente, 1998).

A peroxidase (POD) está envolvida com inúmeros processos fisiológicos na planta, principalmente, no que se concerne o seu desenvolvimento e amadurecimento. Destacam-se a atividade catalítica na redução do H₂O₂ e doação de elétrons a várias moléculas como compostos fenólicos, precursores de lignina, auxina e outros compostos do metabolismo secundário e na prevenção biológica frente a ataques de patógenos e a herbivoria (Passardi *et al*, 2005).

A atividade da peroxidase pode levar à destruição da vitamina C e descoloração de carotenóides e antocianinas, além de catalisar a degradação não-enzimática de ácidos graxos insaturados, com a conseqüente formação de compostos voláteis, levando a alteração de sabor. Sua atividade diminui em pH's extremos devido a mudanças no estado nativo na condição desnaturada, ocasionada pela liberação do grupo heme da proteína (Araújo, 2001).

A perda da sua atividade enzimática num produto branqueado indica perda da atividade para outras enzimas de deterioração (Eskin, 1990). Segundo alguns autores, sob certas condições de tratamento térmico, a peroxidase pode ter sua atividade regenerada, podendo com isto causar perda de sabor ou desenvolver sabores desagradáveis através de reações oxidativas (Clemente e Pastore, 1998).

Além disso, a peroxidase (POD) é uma enzima altamente estável ao tratamento térmico (Clemente, 1996) e sua inativação tem sido freqüentemente usada como índice da efetividade do branqueamento.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia da temperatura e do pH sobre a atividade da enzima peroxidase em dois genótipos de manjeriço.

MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos de manjeriço, basilicão ou manjeriço de folha larga (*Ocimum basilicum* L.) e roxo (*Ocimum* sp.), foram obtidos na horta do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil. O manjeriço de folha larga ou basilicão possui folhas verde-escuras, com superfície ligeiramente ondulada; inflorescência com cerca de 35 cm, flores brancas, caule ereto, com até 60 cm de altura e produz sementes férteis. O manjeriço roxo com folhas verdes, na epiderme adaxial e com pigmentação roxa na epiderme abaxial, inflorescência de até 20 cm, flores arroxeadas, caule ereto com coloração roxa e cerca de 60 cm de altura (Kamada, 1998).

Avaliou-se a atividade da peroxidase em dois ensaios. O primeiro analisou a atividade da peroxidase em sete níveis de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e o segundo mediu-se a atividade enzimática em temperatura de 80°C durante 0, 5, 10, 15 e 20 minutos.

Selecionou-se e triturou-se folhas (1 g) dos dois genótipos de manjeriço em gral de porcelana em presença de tampão de extração formado por 100 mM de tampão fosfato pH 6,0, 0,1% de bisulfato de sódio e 150 mM de NaCl (Lagrimini *et al*, 1990) sob temperatura variando entre 0 e 4°C. Após homogeneização, o material foi filtrado em gaze e posteriormente centrifugado a 10.000 r.p.m, por 15 minutos. A atividade total da enzima peroxidase nos diferentes níveis de pH foi determinada incubando-se 0,5 mL do extrato centrifugado, 5 mL do tampão fosfato a 0,05M (pH 3 a 9), 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 0,5 mL de guaiacol.

Colocou-se, no segundo ensaio (temperatura), os extratos dos dois genótipos de manjeriço em banho-maria a 80°C por 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida procedeu-se a preparação, utilizando-se 0,5 mL de extrato, com os mesmos reagentes citados, com três repetições por tratamento. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 470 nm e expressas em $\Delta A / \text{min} / 500\mu\text{L}$ de extrato. A concentração de proteína foi determinada no extrato pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão. O comprimento de onda usado no espectrofotômetro foi de 595 nm. A atividade específica da enzima peroxidase foi calculada pela fórmula: $AE = \Delta A / \text{min} / \text{mg}$ proteína.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo os resultados submetidos à análise de variância e regressão utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG - UFV). Utilizou-se o teste "t" adotando o nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois genótipos de manjeriço em estudo, comprovaram-se diferença na atividade enzimática nos diferentes pHs (Figuras 1 e 2). O genótipo roxo possui

maior atividade específica da enzima peroxidase (POD) que o basilicão, chegando a ser 65,33% superior em pH 6.

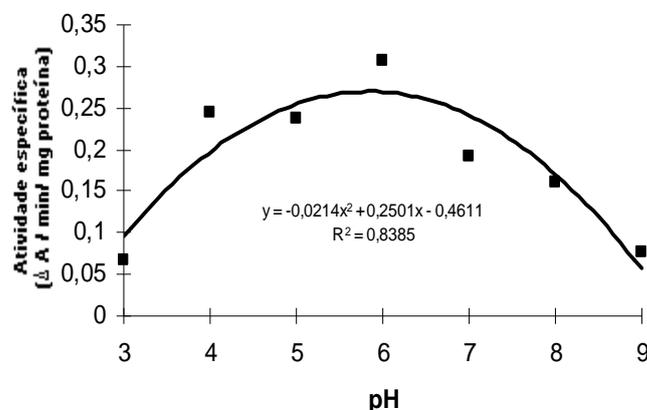


Figura 1- Influência do pH sobre a atividade da peroxidase em manjeriço basilicão (*Ocimum basilicum* L). Viçosa-MG, UFV, 2004.

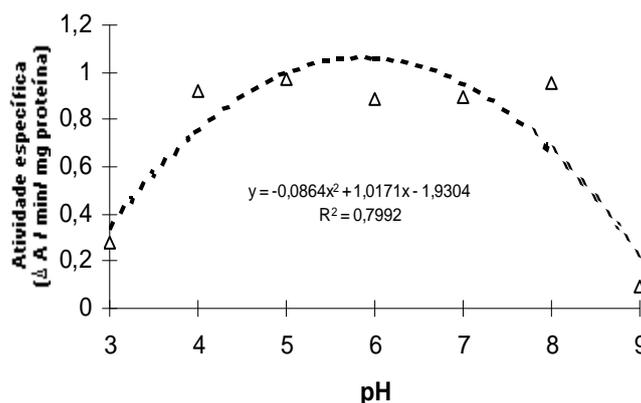


Figura 2- Influência do pH sobre a atividade da peroxidase em manjeriço roxo (*Ocimum* sp.). Viçosa-MG, UFV, 2004.

A peroxidase é a principal enzima responsável pela formação de “flavor” estranho durante o armazenamento de frutos e hortaliças processados, principalmente em vegetais não-ácidos (Burnette, 1977). A atividade enzimática da POD nos diferentes pHs teve o mesmo comportamento nos dois cultivares de manjeriço, alcançando valores máximos nos pHs 5, 6 e 7 e valores mínimos nos pHs 3 e 9. Tal alteração da atividade enzimática com o pH, está relacionado com a mudança estrutural na molécula da enzima, sendo que a atividade diminui em pHs extremos (Araújo, 2001).

Na trituração da planta fresca ocorre à destruição da superfície celular, como consequência, há acréscimo na atividade enzimática devido ao aumento da permeabilidade resultante da destruição dos tecidos e ligação/ junção das enzimas e substratos que, por outro lado, são liberados dos vacúolos (Lamikanra & Watson, 2001). O aumento da atividade da peroxidase, em pH próximos a neutralidade (5 a 7), pode indicar novos tratamento de pós colheita de manjeriço a fim de

proporcionar maior vida útil do produto. Os pHs mais ácidos e básicos (3 e 9 respectivamente) proporcionam menor atividade, uma vez que a grande maioria das enzimas não possuem atividade em extremos de pH. O aumento da atividade de peroxidase (POD) em pH 6, pode estar relacionado a maior liberação de compostos fenólicos, principalmente os óleos essenciais, presentes em abundância e manjeriço (Passardi *et al*, 2005).

A temperatura reduziu a atividade enzimática da POD em ambos os genótipos (Figuras 3 e 4). O manjeriço roxo teve uma redução na atividade da peroxidase de 86,28% enquanto que o basilicão teve uma redução de 100% aos 20 minutos a 80°C. Essa diferença na atividade enzimática pode estar relacionada ao aumento na atividade ou liberação de novas isoenzimas que ainda necessitam ser determinadas (Onsa *et al.*, 2003). A resistência térmica dessa enzima depende da origem e das características do produto, como pH e composição. O binômio tempo-temperatura deve ser determinado em cada caso (Araújo, 2001).

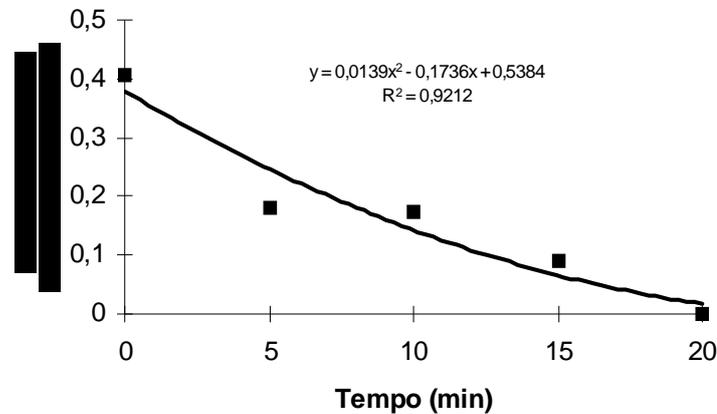


Figura 3- Influência do tempo e da temperatura a 80°C sobre a atividade da peroxidase em manjeriço basilicão (*Ocimum basilicum* L). Viçosa-MG, UFV, 2004.

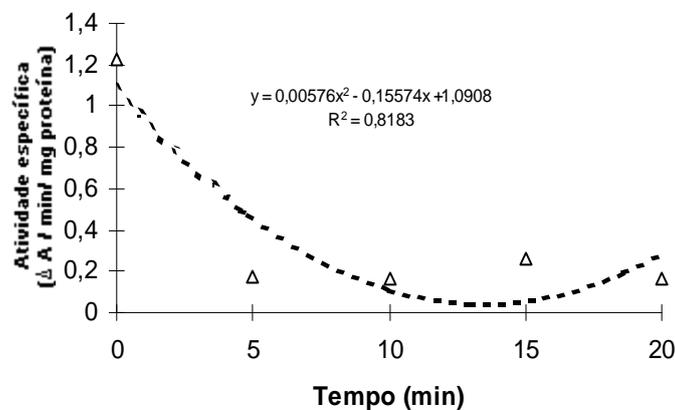


Figura 4- Influência do tempo e da temperatura a 80°C sobre a atividade da peroxidase em manjeriço roxo (*Ocimum* sp.). Viçosa-MG, UFV, 2004.

Laurenti & Clemente (2005), avaliando a atividade da peroxidase em carambolas, verificaram que a atividade enzimática diminuiu com o tempo em cada temperatura, e independente do grau de maturação da fruta, observou-se perda de aproximadamente 85% da atividade da enzima após 10 minutos de tratamento térmico a temperatura de 85°C. Estudando o efeito do tratamento térmico a 60, 65, 70 e 75°C por períodos que variaram de 1 a 10 minutos sobre a atividade da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) em maçã, Valderrama *et al.* (2001) verificaram diminuição da atividade da POD e da PPO com o aumento da

temperatura e tempo; no entanto a POD não chegou a ser inativada em nenhum dos tratamentos realizados.

O conteúdo de clorofila em brócolis sem tratamento térmico decresceu de forma bastante acentuada após 4 dias armazenados a 15 °C, enquanto que em brócolis tratados por 2 h a 50°C praticamente não apresentou alteração durante o armazenamento. Além disso, a atividade da peroxidase que degrada a clorofila e da C₂ isoperoxidase foi suprimida pelo tratamento térmico. Os resultados indicam que o tratamento térmico pode ser efetivo em inibir a senescência em parte pela supressão do aumento da atividade da peroxidase que

degrada a clorofila nos microsomos e no citosol

A peroxidase é considerada uma das enzimas mais termorresistentes, de forma que, quando inativada, certamente as demais enzimas e os microrganismos patogênicos são destruídos. Na maioria dos casos, o branqueamento entre 90 e 100°C por 3 minutos é suficiente na sua inativação (Araújo, 2001). A importância desse processo está diretamente relacionada à qualidade agrônômica do manjeriço, uma vez que, por serem ricos em óleos essenciais, compostos poucos resistentes à temperatura é necessário que sejam coletados, armazenados e comercializados sob baixas temperaturas (Corrêa Junior *et al.*, 2004).

CONCLUSÕES

Houve maior atividade enzimática nos dois genótipos na faixa de pH variando de 5 a 7 e menor atividade nos extremos (3 e 9);

O aquecimento a 80 °C, por 20 minutos, levou a redução da atividade enzimática da peroxidase de 80,28% e 100% nos genótipos roxo e folha larga, respectivamente.

LITERATURA CITADA

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

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

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

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **J. Food Sci.** v. 42, n. 1, p. 1-6, 1977.

CORRÊA JÚNIOR, C, GRAÇA, L.R., SCHEEFFER M. C. **Complexo agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas e condimentares no Estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas**. Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER-PR, EMBRAPA Florestas, 2004. 272 p.

CLEMENTE, E. Isolamento, purificação e termoestabilidade da isoperoxidase do suco de laranja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.16, n. 1, p.1-5, 1996.

(Funamoto *et al.*, 2003).

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

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase: the importance for food technology. **Bol. SBCTA**, v. 32, n. 2, p.167-171, 1998.

ESKIN, N. A. M. **Biochemistry of foods**. 2 ed. Ottawa: Academic Press, 1990, 557p.

FUNAMOTO, Y.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) and inhibition of the activity by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 39-46, 2003

KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de majericão (*Ocimum spp*)**. 59 p, UFV 1998. (Tese de mestrado).

LAGRIMINI, L. H., BRADFORD, S., ROTHSTEIN, S. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. **The Plant Cell**, v.2, p.7-18, 1990.

LAMIKANRA, O.; WATSON, M. A. Effects of ascorbic acid on peroxidase and polyphenoloxidase activities in fresh-cut Cantaloupe melon. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 66, n. 9, p. 1283-1286, 2001.

LAURENTE, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avarrhoa*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 27, n. 1, p. 159-163, 2005.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 44, n. 12, p. 3926-3929, 1996.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

NEVES, V. A. Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.45, n.1 Curitiba Mar. 2002.

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

ONSA, G. H.; BIN SAARI, N.; OSMAN, A.; BAHRI, S. Membrane – bound polyphenol oxidases and peroxidases from *Metroxylon sagu*: changes in activity and isoenzyme

profiles during maturation. **Food, Agriculture & Environment**, v. 1 n. 2, p. 60-65, 2003.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Rep.** v. 24, p.255-256, 2005.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; FURLANI, P. R.; FACANALLI, R. Essential oil contents in two cultivars of basil cultivated on NFT-hydroponics. IN: Proceedings of the First Latin- American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants, **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 203-208, 2002.

URMERIE, S. C.; ANASO, H. U.; ANYASORO, L. J. C. Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf extracts. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 237-239, 1998.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 3, 2001.

VAMOS-VIGYAZO, L.. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 15, n.49, 1981.