

(S5-P72)

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE SUBERINA EM MINICENOURA, DURANTE A CONSERVAÇÃO REFRIGERADA

ADRIANO DO N. SIMÕES, MARÍLIA C. VENTRELLA, FELIPE F. F. MORAIS, LEONARDO T. DINIZ, VÂNIA M. M. VALENTE e ROLF PUSCHMANN

Universidade Federal de Viçosa, UFV. Departamento de Biologia Vegetal, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. Email: adrianosimoesufv@yahoo.com.br

Palavras chave: perda de água – suberização – histoquímica

RESUMO

Objetivou-se avaliar histoquimicamente a formação de periderme em minicenoura submetida à imersão em suspensão utilizada para revestimento comestível à base de amido e quitosana. Cenouras cv. Esplanada colhidas aos 90 dias, processadas na forma de minicenouras, foram imersas em suspensão contendo 3 % de amido de milho (m/v), 1,5 % de quitosana (m/v), 2 % de glicerol (v/v) e 0,4 % de ácido acético glacial (v/v). Foram mantidas sob ventilação por três horas, embaladas em bandejas de polipropileno envoltas com filme de polivinilcloreto e mantidas a 5 ± 1 °C. Aos 0; 10; 25 e 30 dias, amostras foram fixadas, desidratadas, incluídas em historresina ou não, cortadas em micrótomo manual, coradas com sudan Red B, montadas em lâminas e fotografadas. Minicenouras que não foram imersas em suspensão e cenouras com periderme, serviram como controle. Nas minicenouras não imersas em suspensão, foi nítido o esbranquecimento na superfície a partir do terceiro dia de conservação. Todavia, pouca diferença foi observada na perda de massa fresca entre minicenouras imersas em suspensão e não imersas. Nas avaliações microscópicas, observou-se acúmulo de paredes celulares oriundas de células colapsadas e desidratadas na superfície de minicenoura com ou sem revestimento. Em minicenouras imersas na suspensão, foi observado, aos 30 dias, uma leve coloração avermelhada característica de reação positiva com sudan Red B. Todavia, isso parece estar relacionado com componentes do revestimento, uma vez que não se observou reação positiva na região das paredes celulares, onde é característico a presença de suberina, como foi evidenciado em cenouras intactas, com periderme. Portanto, não houve evidências para formação de suberina em minicenouras, com ou sem revestimento, durante o período de conservação estudado. *Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPEMIG.*

EVALUATION OF THE SUBERIN PRESENCE IN BABY CARROT, DURING THE COOLED CONSERVATION

Key words: Water loss – suberization - histoquimic

ABSTRACT

Aimed to evaluate histoquimicamentley the presence of the periderm in baby carrot treated with edible antimicrobial coating base on a starch- chitosan matrix. Carrots of, Esplanada cultivar were harvested at 90 days after planting, were minimally processed in form of baby carrots and immersed in the suspension coating with on 3 % maiz starch (w/v) + 2 % glycerol (v/v) + chitosan (1,5 %, w/v) and 0,4 % glacial acetic acid (v/v). All the samples

were placed in extended polystyrene trays, wrapped in polyvinylchloride film and stored at 5 ± 1 °C for 12 or 15 days. At 0; 25 and 30 days, the sample were fixed, desidrated, historresin included our not, manual microtomo cuted, cored with red B sudan, monted in lamines and photographed. Baby carrot no immersed in suspension presented simptoms of white blush surface with 3 days of the conservation. Little difference was observed in the mass loss between immersed in suspension and not immersed baby carrots. In the microscopical evaluations, accumulation of cellular walls of colapsadas and dehydrated cells in the surface of baby carrot with or without coating was observed. In immersed baby carrots in the suspension, it was observed, to the 30 days, a light colored coloration characteristic of positive reaction with sudan. This seems to be related with components of the coating, a time that did not observe positive reaction in the region of the cellular walls, where is characteristic the presence of suberina, as it was evidenced in unbroken carrots, with periderme. Therefore, it did not have evidences for formation of suberina in baby carrots, with or without coating, during the studied period of conservation.

INTRODUÇÃO

A descrição do desenvolvimento anatômico em raízes de cenouras é conhecido desde 1940 em trabalhos publicados por Esau, como também a composição, estrutura e características qualitativas e quantitativas da suberina em periderme de cenoura (Kolattukudy, et al., 1975; Knowles e Flore, 1983).

Suberina é um polímero de natureza lipídica presente em paredes celulares da periderme de cenoura (Kolattukudy, 1977). Composta também por compostos fenólicos (Riley e Kolattukudy, 1975, Hahlbrock e Scheel, 1989), uma de suas principais funções é manter elevada resistência à difusão de vapor de água (Soliday et al., 1979), e assim minimizar a desidratação (Simões et al., 2006).

Na confecção de minicenouras, o torneamento remove a periderme natural, facilitando a desidratação e o esbranquecimento durante sua conservação. Em batata, a retirada da periderme natural, por cortes, induz a suberização nas paredes de células parenquimáticas mais superficiais (Walter e Schadel, 1983), enquanto que em cenoura, alguns trabalhos relatam a deposição de lignina (Bolin e Huxoll, 1991; Howard e Griffin, 1993).

Em general, recobrimentos comestíveis são utilizados para reduzir a perda de água, minimizar movimentos de solutos, como caroteno e retardar o esbranquecimento superficial em cenoura minimamente processada durante o armazenamento (Li e Barth, 1998; Avena-Bustillos et al., 1994), reduzir o escurecimento oxidativo em maçã cortada (Krochta, 1990), dentre outros benefícios.

Ácidos fenólicos como ácido p-cumárico e ferrúlico estão presentes em suberina de cenoura (Kiley e Kolattukudy, 1975). Todos os fenilpropanóides são derivados de ácidos cinâmicos, que são formados a partir da fenilalanina pela ação da fenilalanina amônia-liase (PAL) (Harbone, 1988; Hahlbrock and Scheel, 1989). A atividade da PAL foi alterada transitoriamente durante a conservação de minicenouras submetidas à imersão em suspensão de recobrimento comestível à base de amido e quitosana (dados não publicados). É possível que o recobrimento utilizado resulte em indução do metabolismo dos fenilpropanóides e, conseqüentemente, impregnação de suberina na superfície de minicenoura.

Técnicas fitoquímicas são geralmente utilizadas para determinação da composição e estrutura da suberina em tecidos peridérmicos (Kolattukudy, et al., 1975; Walter e Schadel, 1983). Por outro lado, a histoquímica, é uma ferramenta da anatomia que possibilita a identificação de suberina, localizando-a espacialmente no tecido vegetal, como tem sido utilizada para identificação de periderme em cenouras (O'Rear e Flore, 1983), batata (Walter e Schadel, 1983), dentre outros tipos de vegetais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi

avaliar com o uso da histoquímica, a formação de periderme de cicatrização em minicenoura com revestimento comestível à base de amido e quitosana.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da Matéria-Prima

Raízes de cenoura (*Daucus carota* L. cv. Esplanada) foram cultivadas na Horta da Universidade Federal de Viçosa e colhidas aos 90 dias após o plantio. As cenouras foram lavadas em água corrente, selecionadas e mantidas por 24 horas a 5 °C.

Processamento Mínimo

Cenouras foram cortadas em pedaços de 6,0 cm de comprimento e selecionadas aquelas com diâmetro na região mediana de até 2,0 cm. Foram torneadas em forma de cenouretes[®] (Lana et al., 2001) com auxílio de duas torneadoras PCE SKYMSSEN[®] ETERNA[®], a primeira com lixas abrasivas, e a segunda com lixas finas, ambas por 1,0 minuto.

As minicenouras foram submetidas ao enxágüe inicial (imersão rápida em água a 5°C), seguido de imersão em água contendo 200 mg L⁻¹ de cloro ativo (Sumaveg[®] Diversey Lever), por 10 minutos. O enxágüe final foi realizado imergindo as minicenouras em água contendo 3 mg L⁻¹ de cloro ativo, a 5 °C, por 10 minutos.

Em seguida, as minicenouras foram centrifugadas por 15 segundos, a 800 g (Simões et al., 2005), imersas em suspensão contendo 3% de amido de milho (m/v), 1,5% de quitosana (m/v) (Durango, et al., 2006), 2% de glicerol (v/v) (Mali et al., 2002) e 0,4% de ácido acético glacial (v/v) e mantidas sob ventilação por três horas. Minicenouras que não foram imersas em suspensão e cenouras intactas (com periderme) serviram como controle.

Cerca de 200g de minicenouras foram embalados em bandejas de polipropileno envoltas com filme de polivinilcloro (12 micras) e mantidas a 5±1 °C, por 21 dias.

Massa Fresca

Foi determinado por gravimetria.

Microscopia de luz

Para os estudos em microscopia de luz, foram retiradas porções superficiais de cenouras inteiras e minicenouras, com ou sem revestimento, aos 0, 10, 25 e 30 dias após o processamento mínimo, em condições de 5±1 °C e 90±2 % UR. Todo material foi fixado em FAA₅₀ por 48h e estocado em etanol 70% (Johansen, 1940) até o processamento das amostras, com ou sem inclusão em metacrilato.

Amostras (1cm³) de cenouras inteiras e minicenouras aos 0 e 30 dias após o processamento mínimo foram utilizadas sem inclusão, enquanto que amostras (0,125cm³) de minicenouras aos 0, 10, 25 e 30 dias após o processamento mínimo foram utilizadas após inclusão em metacrilato (Hitoresin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante.

O material sem inclusão foi seccionado em micrótomo de mesa e o material incluído em metacrilato foi seccionado em micrótomo rotativo com 8µm de espessura. O processamento das amostras sem inclusão em metacrilato visa a obtenção de reações mais intensas com o Sudan Red B, enquanto que a inclusão em metacrilato possibilita melhor análise estrutural das células, que não sofrem alterações ou colapsos devido ao seccionamento. Todos os cortes foram submetidos ao Sudan Red B (Brundrett et al., 1991), montados em gelatina glicerinada (Sass, 1958) e as imagens obtidas em fotomicroscópio (Olympus AX 70) com sistema U-Photo.

Análise Estatísticas

Foi realizada estatística descritiva e ajustadas equações de regressão com auxílio do programa 'Tabel Curve' (Jandel Cientific, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSAO

Massa Fresca

Pouca diferença foi observada na perda de massa fresca entre minicenouras imersas na suspensão (com revestimento) e não imersas, com valores próximos a 3,2 % no final de 21 dias (Figura 1).

As declividades das curvas que representam a perda de massa fresca foram praticamente semelhantes em ambos os tratamentos, como observado pelos coeficientes angulares das equações de 0,16 nas duas curvas (Figura 1). Revestimento comestível, em geral, funciona como barreira para umidade (Emmambux e Minnaar, 2003), podendo substituir a periderme que é a barreira natural. Nesse trabalho, pouca diferença foi observada na perda de massa fresca entre os tratamentos. Simões et al. (2006) observaram que, em minicenoura, a declividade da curva que representa a perda de massa fresca foi ligeiramente maior nas primeiras duas horas, em relação à cenoura com periderme natural, acentuando a diferença após várias horas. Isso demonstra que a periderme funciona como uma nítida barreira à perda de água (Soliday et al., 1979). Neste trabalho, porém, o revestimento não contribuiu, nitidamente, na redução da perda de massa fresca, mas foi eficiente em manter a coloração alaranjada natural na superfície das minicenouras.

Microscopia de luz

Minicenouras sem revestimento, imediatamente após o processamento mínimo, apresentam as camadas mais superficiais com células ainda túrgidas (Figuras 2A, 3B, G), pois a desidratação e o colapso das células ainda não ocorreu. Quando submetidas ao armazenamento, observa-se acúmulo de camadas de células desidratadas e colapsadas, na região mais superficial (Figuras 2 B-D e 3D, I). Em nenhum período de armazenamento avaliado é observado reação positiva para suberina com o Sudan Red B nas minicenouras sem revestimento, caracterizado pela coloração avermelhada das paredes celulares.

Morris e Man (1955) em exame microscópica em tecidos de batata cortados e expostos ao ambiente, observaram que as primeiras mudanças que ocorrem são a dissecação de diversas camadas de células parenquimáticas mais externas após o corte, seguido de uma progressiva suberização das células parenquimáticas adjacentes às células dissecadas.

Nas minicenouras imersas em suspensão, observa-se o acúmulo de resíduos (Figuras 2E-H e 3C, H), resultante da deposição dos componentes do revestimento sobre as camadas mais superficiais, também com células colapsadas. Não se observa também, reação positiva que evidencie a presença de suberina nas paredes celulares. Aos 30 dias de armazenamento, uma coloração avermelhada é visualizada na superfície (Figura 2D, H e 3E, J). Todavia, essa coloração parece estar relacionada a uma reação com os componentes do revestimento, uma vez que não se observa a coloração avermelhada nas paredes celulares, onde é característico a impregnação de suberina, mas apenas no interior das células colapsadas. Isso pode induzir a conclusões errôneas quando se trata de avaliações qualitativas, como no caso da histoquímica, em que a cor define a presença ou ausência de um determinado grupo de compostos.

Em minicenouras com revestimento após 30 dias de armazenamento (Figura 3E, J), embora se observe uma faixa avermelhada na superfície semelhante a uma periderme, numa avaliação mais acurada, verifica-se que as paredes celulares mantêm-se claras, sem impregnação de suberina. Diferentemente, em tecidos de batata cortados foi verificado a ocorrência de suberização (Walter e Schadel, 1983). É possível que as condições de temperatura de conservação de 5 °C retardem as taxas de reações bioquímicas que resultam na

impregnação de suberina, pois em batata o processo de suberização ocorre em 5 a 7 dias em temperaturas de 27,5 a 29,5 °C e 10 a 14 dias entre 17 a 18,2 °C (Walter e Schadel, 1982). Porém essa hipótese pode ser refutada em consequência da rápida deposição de lignina, em apenas sete dias, em minicenouras mantidas a 2 °C (Bolin e Huxoll, 1991).

Em cenouras intactas, com periderme característica, a reação positiva com sudan red B ocorre com a coloração avermelhada característica das paredes celulares, indicando a deposição de suberina (Figura 3 A e F). Resultados semelhantes foram observados por O'Rear e Flore (1983) em que a reação positiva com sudan III e IV foi observada nas paredes das células mais superficiais.

Portanto, observa-se apenas alterações de turgescência das células, chegando ao colapso das camadas de células mais superficiais, não ocorrendo mudanças químicas dessas paredes celulares, como o suposto depósito de suberina. No entanto, pode ocorrer a deposição de outros compostos nas referidas paredes como por exemplo lignina (Bolin e Huxoll, 1991). Porém, ensaios histoquímicos deverão ser continuados para avaliar a ocorrência de mudanças químicas nas paredes de células parenquimáticas superficiais em minicenouras.

Esses resultados indicam que não há a formação de periderme de cicatrização em minicenoura, com ou sem revestimento, durante sua conservação.

CONCLUSOES

O revestimento comestível utilizado não alterou a perda de massa fresca de minicenoura. Não houve evidências de formação de suberina em minicenouras, com ou sem recobrimento, durante as condições de conservação estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao prof. Ricardo Henrique Silva Santos e estudantes pelo fornecimento da matéria-prima. À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

BIBLIOGRAFÍA

- Avena-Bustillos; R. J., Cisneros-Zevallos, L. A.; Krochta, J. M.; Saltveit, M. E., 1994. Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots. *Postharvest Biology and Technology*, v.4, p.319-329.
- Bolin, H.R.; Huxoll, C.C., 1991 Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *J. of Food Sci.*, v.56, p.416-418.
- Brundrett, M.C.; Kendrick, B.; Peterson, C.A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B ou Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*. v.66, p.111-116.
- Durango, A. M.; Soares, N. F. F.; Andrade, N. J. 2006 Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, v.17, p.336-341,.
- Emmambux, N. e Minnaar, A., 2003 The effect of edible coatings and polymeric packaging on the quality of minimally processed carrots. *J. of the Sci. of Food and Agric.* v.83, p.1065-1071.
- Harbone, J. B. 1988. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. (New York: Chapman and Hall).
- Hahlbrock., and Scheel, D. 1989 Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40, 347-369.
- Howard, L. R. and Griffin, L. E., 1993 Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks. *J. Food Sci.*, v.58, n.5, p.1065-1068.

- Jandel Cientific, 1991. Table Curve. v. 2.0.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 423p.
- Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; García, M. A.; Martins, M. N.; e Zaritzky, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379 – 386, 2002.
- Knowles, L. O'R. E Flore, J. A., 1983 Quantitative and qualitative characterization of carrot root periderm during development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* v.108, n.6, p.923-928.
- Kolattukudy, P. E.; Kromman, K.; Poulouse, A. J., 1975 Determiation of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnp, red beet and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.*, v.55 p.567-573.
- Kolattukudy, P. E., 1977 Lipid polymers and associated phenols, their chemistry, biosynthesis, and role in pathogenesis. *Recent Adv. Phytochem.*, v.11, p.185-246.
- Krochta, J. M. Pavlath, A. E. e Goodman, N., 1990. Edible films from casein-lipid emulsions for lightly-processed fruits and vegetables. In W. E. L. Spiess and H. Schubert (Editors), *Engineering and Food*, v. 2. Preservation processes and Related Techniques. Elsevier, Amsterdam, pp. 329-340.
- Lana, M. M.; Veira, J. V. V.; Silva, J. B. C.; Lima, D. B., 2001 Cenourete e catetinho: mini cenouras brasileiras. *Horticultura Brasileira*, v.19, n.3, p. 376-379.
- Li, P.; Barth, M M, 1998. Impact of coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. *Postharvest Biology and Technology*, v.14, p.51-60.
- Morris, L. L. e Mann, L. L. 1955. Wound healing, keeping quality and compositional changes during curing and storage of sweet potatoes. *Hilgardia* v. 24, p. 143-183.
- O'Rear, L. e Flore, J. A. 1983. Quantitative and qualitative characterization of carrot root periderm during development. *J. Soc. Hort. Sci.* v. 108, n. 6, p.923-928.
- Riley, R. G. e Kolattukudy, P. E,1975. Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferrulic acid in cutins and suberins. *Plant. Physiol.*, v.56, p.650-654.
- Sass, J.E. 1958. Botanical microtechnique. Ames, Iowa: The Iowa State University Press.
- Simões, A. N.; Moreira, S. I.; Santos, R. H. S.; Puschmann, R.; Fialho, C. A.; Barbosa, Rogério L.; Barrella, T. P.; Siqueira, R. G., 2005. Centrifugação de minicenouras em centrífuga doméstica. In: Congresso Brasileiro de Olericultura. Fortaleza, CE.
- Simões, A. N.; Costa, F. B.; Moreira, S. I.; Oliveira, F. C.; Barrella, T. P.; Santos, R. H. S.; Diniz, T. L.; Puschman, R.,2006. Desidratação de cenouras mantidas sob refrigeração. In: IV Encontro Nacional sobre Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas. São Pedro, SP.
- Soliday, C. L., Kolattukudy, P. E. and Davis, R. W., 1979 Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the mayor diffusion barrier to water vapor potato tuber (*Sollanum tuberosum* L.) *Planta* v.166, p.207-214.
- Walter Jr., W. M.; Schadel, W. E., 1982. A rapid method for evaluating curing progress in sweet potatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v.107, n.6, p.1129-1133.
- Walter Jr., W. M.; Schadel, W. E., 1983. Structure and composition of normal skin (periderm) and wound tissue from cure sweet potatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v.108, n.6, p.909-914.

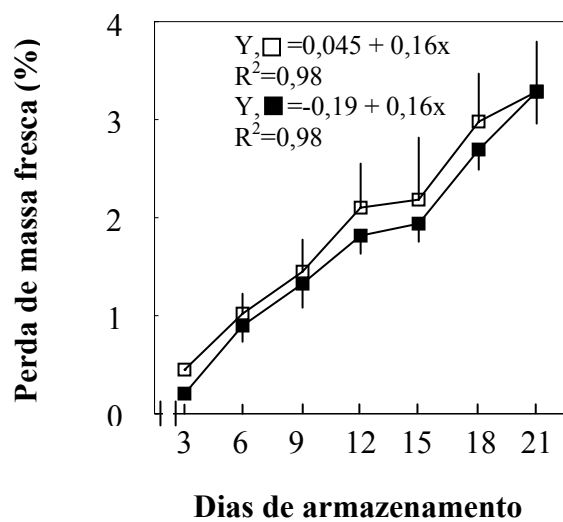


Figura 1: Perda de massa fresca em minicenouras imersas em suspensão (■) e controle (□), mantidas a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $90\pm 2\%$ UR., por 21 dias.

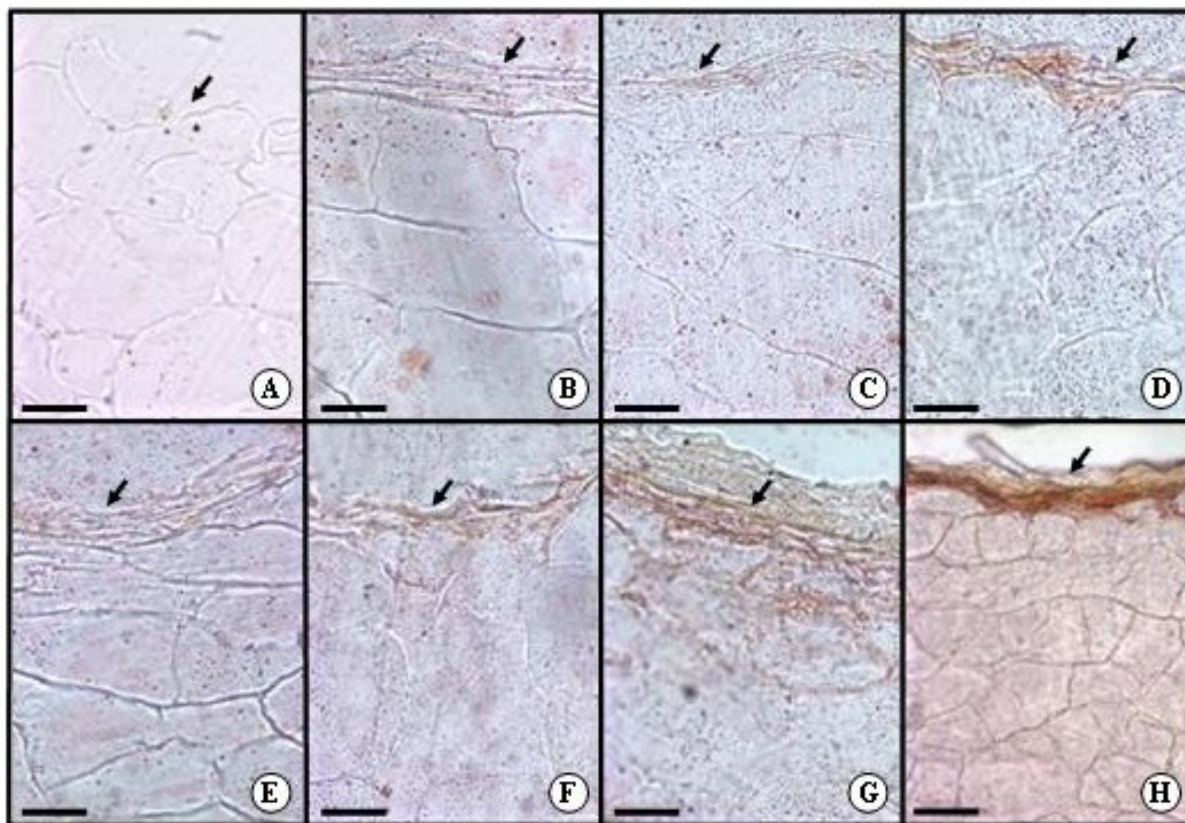


Figura 2: Fotomicrografias de seções transversais de minicenoura sem (A-D) e com revestimento (E-H) incluídas em metacrilato e submetidas ao Sudan Red B. A e E, imediatamente após o processamento mínimo; B e F, após 10 de armazenamento; C e G, 25 dias de armazenamento; D e H, após 30 dias de armazenamento. As setas indicam superfície do tecido. Barra=50 μm.

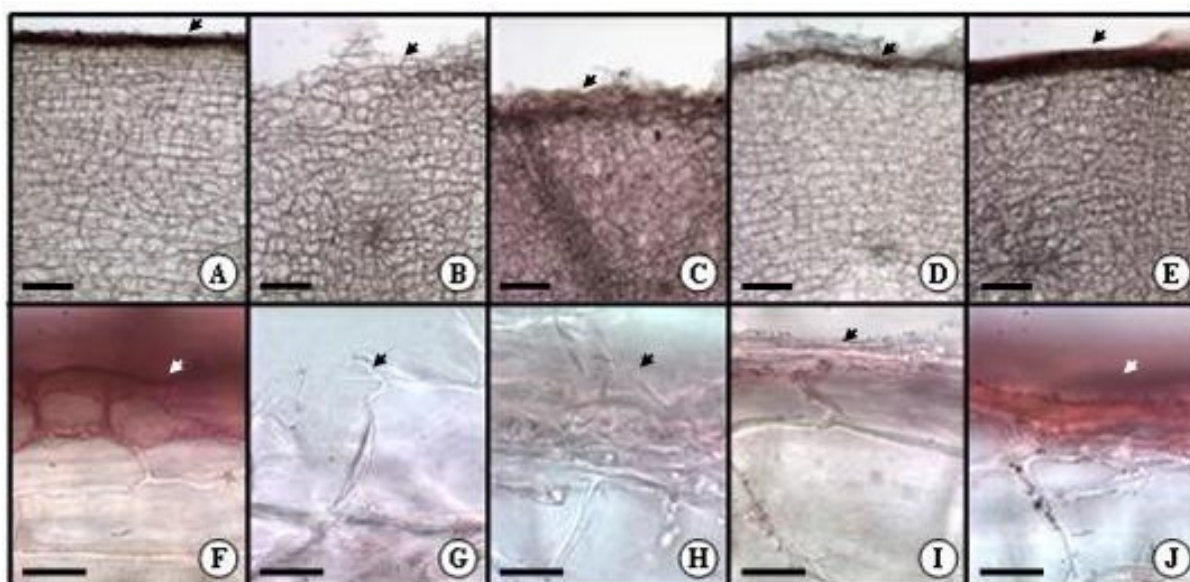


Figura 3: Fotomicrografias de seções transversais de cenoura inteira (A, F), minicenoura sem (B, G, D e I) e com revestimento (C, H, E e J) sem inclusão em metacrilato e submetidas ao Sudan Red B. B, G, C e H, imediatamente após o processamento mínimo; D, I, E e J, após 30 dias de armazenamento. As setas indicam superfície do tecido. A-E: barra=200μm; F-J: barra=25μm.