ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE O EMPREGO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
COM O TRATAMENTO TÉRMICO NO CONTROLE DA ATIVIDADE
DA POLIFENOL OXIDASE EM FRUTAS E HORTALICAS

MARIA EUGENIA MARQUES DE ALMEIDA

Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. JOÃO NUNES NOGUEIRA

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Almeida, Maria Eugenia Marques de
A447e Estudo de interações entre o emprego de compostos
químicos com o tratamento térmico no controle da ati-
vidade da polifenol oxidase em frutas e hortaliças.
Piracicaba, 1991.
112p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fruta - Bioquímica 2. Fruta - Escurecimento
enzímico - Controle 3. Hortaliça - Bioquímica 4. Hor-
taliça - Escurecimento enzimico - Controle 5. Polife-
nol oxidase I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 634

ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE O EMPREGO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
COM O TRATAMENTO TÉRMICO NO CONTROLE DA ATIVIDADE
DA POLIFENOL OXIDASE EM FRUTAS E HORTALICAS

MARIA EUGENIA MARQUES DE ALMEIDA

Aprovada em: 15.04.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Nunes Nogueira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Roberto Cantarelli

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Edurardo Gutierrez

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Nunes Nogueira
Orientador

Aos meus pais

ODILA e ANTONIO FRANCISCO

pelo estímulo e incentivo

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos as seguintes pessoas e entidades:

Ao Prof. Dr. João Nunes Nogueira pela dedicada orientação e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão do auxílio pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão das bolsas de estudo.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

À Sra. Vera Bononi, pesquisadora do Instituto de Botânica pela doação de amostras de cogumelos.

À Estação Experimental de Pariqueraçu, do Instituto Agronômico de Campinas e ao pesquisador Edson Furtado do Instituto Biológico pelo auxílio na obtenção dos palmitos.

A Dra. Sônia Dedeca da Silva de Campos pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo incentivo e orientação na obtenção das matérias primas.

- Aos colegas do curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e em especial à Engenheira de Alimentos Shirley Berbari pelo auxílio na realização das análises do palmito.

- As bibliotecárias Beatriz Helena Giongo e Eliana Maria Garcia Sabino da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelo auxílio na correção das referências bibliográficas.

- Ao Sr. Jorge Luiz Diorio, pelo serviço de datilografia.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
 1. INTRODUÇÃO	 01
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 05
2.1. Considerações gerais	05
2.2. Métodos de controle do escurecimento enzimico	18
2.2.1. Inativação pelo calor	20
2.2.2. Inativação por compostos químicos ..	22
2.2.2.1. Anidrido sulfuroso	22
2.2.2.2. Ácidos	27
2.2.2.3. Outros compostos químicos ..	30
2.2.2.4. Outros meios de inativação.	38
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 41
3.1. Matéria prima	41
3.2. Análise para caracterização da matéria - prima	42
3.3. Determinação da atividade da PFO	42
3.4. Condições em que foi estudada a atividade da PFO	44
3.5. Análise Estatística.....	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Análises da matéria-prima	49
4.2. Atividade da polifenol oxidase nas frutas e hortaliças "in natura"	49
4.3. Comportamento da atividade das enzimas	52
4.4. Efeito dos métodos de inativação enzimica .	54
4.4.1. Polifenol oxidase em frutas	54
4.4.2. Polifenol oxidase em hortaliças	66
4.5. Efeito comparativo dos métodos de inativa- ção enzimica por tipo de fruta	79
4.6. Efeito comparativo dos métodos de inativa- ção enzimica por tipo de hortaliça	90
5. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%) na atividade da polifenol oxidase em frutas	55
02	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) ácido cítrico (0,2%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas	56
03	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em frutas	57
04	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), EDTA (30 pm) e calor (70°C/2 minutos), na atividade da polifenol oxidase em frutas ..	58
05	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em frutas .	59
06	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) , EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas	60
07	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em frutas	61

08	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas	62
09	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em frutas	63
10	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas	64
11	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), e ácido cítrico (0,2%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	67
12	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	68
13	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	69
14	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	70

15	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças .	71
16	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	72
17	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças ...	73
18	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	74
19	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	75
20	Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças	76
21	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em abacate	81

FIGURA Nº

Página

22	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em banana	82
23	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Ana	83
24	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Fuji	84
25	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Gala	85
26	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Golden	86
27	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em pêra .	87
28	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em pêssego	88
29	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em batata	90
30	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em berinjela	91

FIGURA N°

Página

31	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em cogumelo	92
32	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em palmito (base)	93
33	Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em palmito (ponta)	94

LISTA DE TABELAS

TABELA N°		Página
01	pH e sólidos solúveis das frutas "in natura"	50
02	pH e sólidos solúveis das hortaliças "in natura"	50
03	Atividade da polifenol oxidase nas frutas e hortaliças "in natura"	51
04	Caracterização do comportamento da polifenol oxidase em frutas	52
05	Caracterização do comportamento da polifenol oxidase em hortaliças	53

ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE O EMPREGO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
COM O TRATAMENTO TÉRMICO NO CONTROLE DA ATIVIDADE DA
POLIFENOL OXIDASE EM FRUTAS E HORTALIÇAS

Autora: Maria Eugenia Marques de Almeida
Orientador: Prof. Dr. João Nunes Nogueira

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo encontrar métodos alternativos mais eficientes para o controle da atividade da polifenol oxidase (PFO) visando especialmente a substituição ou redução do nível de SO_2 em frutas e hortaliças quando empregado para aquela finalidade. Com este propósito foi estudado o efeito de interações entre o emprego de compostos químicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA e metabissulfito de sódio) e destes com o calor ($70^\circ C/2$ minutos) no controle da atividade da PFO nas seguintes frutas e hortaliças em que o escurecimento enzimico constitui sério problema no processamento: abacate (*Persea americana* Mill.) var. Fortuna; banana (*Musa cavendishi*) var. Nanica; maçã (*Mallus sylvestris* Mill.), variedades Ana, Fuji, Gala e Golden; pêra (*Pyrus betulaefolia*), var. d'água; pêssago (*Prunus persica* cv. *vulgaris*), var. Real; batata (*Solanum tuberosum* L.), var. Bintje; berinjela (*Solanum melongena* L.), var. Super F100 ; cogumelo (*Agaricus*

bisborus); palmito (*Euterpe edulis* Mart.) (Juçara).

A PFO do abacate e berinjela foi mais resistente aos métodos de inibição empregados. De um modo geral a PFO proveniente das frutas apresentou maior resistência à inativação que a PFO das hortaliças.

Tanto para a PFO de frutas, quanto para a de hortaliças o método de inativação enzimica menos eficaz foi a adição de ácido ascórbico e EDTA. O método mais eficaz incluiu a adição de ácido ascórbico, ácido cítrico, metabisulfito de sódio e calor.

Os resultados mostraram que o método alternativo mais adequado para substituir o SO₂ na inativação da PFO das frutas (exceto abacate) e hortaliças foi o que empregou a combinação de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70 °C/2 minutos).

INVESTIGATIONS INTO THE INTERACTION EFFECTS OF CHEMICAL
COMPOUNDS AND HEAT TREATMENT ON POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY
OF SOME FRUITS AND VEGETABLES

Author: Maria Eugenia Marques de Almeida

Adviser: Prof. Dr. João Nunes Nogueira

SUMMARY

The objective of this work was to study the effects of alternative methods on polyphenol oxidase (PPO) activity aiming to substitute or to reduce the level of SO₂ when used to control the enzymic browning in fruits and vegetables. With this purpose the interaction effects of chemical compounds (ascorbic acid, citric acid, EDTA and sodium metabissulfite) and heat treatment (70°C/2 minutes) on PPO activity were studied in the following fruits and vegetables, in which the enzymic browning represents a great problem: avocado (*Persea americana* Mill) var. Fortuna, banana (*Musa cavendishi*) var. Nanica, apple (*Malus sylvestris* Mill.), var. Ana, Fuji, Gala and Golden-, pear (*Pyrus betulaefolia* var. D'Água, peach (*Prunus persica* cv. *vulgaris*), var. Real, potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Bintje, egg plant (*Solanum melongena* L.) var. Super F100, mushroom (*Agaricus bisporus*) and heart-of-palm (*Euterpe edulis* Mart.) (Juçara).

The PPO of avocado and egg plant showed more resistance to inactivation than the other fruits and vegetables. In general fruits PPO showed more resistance to inactivation than the vegetables PPO.

The less efficient method to inactivate the fruits and vegetables PPO was the addition of ascorbic acid and EDTA. The most efficient method included the combination of ascorbic acid, citric acid, sodium metabisulfite and heat treatment.

The results showed that the alternative method most suitable to substitute the use of SO_2 to inactivate fruits (except avocado) and vegetables PPO was the one which employed the combination of ascorbic acid (0,1%), citric acid (0,2%) and heat treatment (70 °C/minutes).

1. INTRODUÇÃO

As características organolépticas de um alimento são a princípio o que determina a aceitação deste pelo consumidor. O primeiro fator que faz com que aceitemos ou rejeitemos um alimento é o seu aspecto, sua aparência, e aqui a cor exerce um papel fundamental. Preservar a cor original de frutas e hortaliças após processamento é portanto de fundamental importância para a aceitabilidade do produto.

O escurecimento enzimático é a principal alteração de cor que ocorre em frutas e hortaliças durante o processamento. De acordo com PONTING (1960) e REED & UNDERKOFER (1966) a polifenol oxidase é uma das principais enzimas responsáveis por aquele escurecimento. Vários métodos tem sido utilizados para controlar a atividade da polifenol oxidase e atualmente um dos métodos de menor custo e maior eficácia é o uso de anidrido sulfuroso (dióxido de enxofre).

O dióxido de enxofre quando adicionado ao alimento, dependendo de uma série de variáveis como pH, temperatura e presença de compostos ativos, sofre diversas

reações que o mudam da forma livre para a forma combinada, que não tem efeito sobre a enzima. No alimento quando é adicionado este aditivo, para controle do escurecimento enzimático ou outro fim, ocorre um equilíbrio entre as formas livres e as formas combinadas dissociáveis (TAYLOR et alii, 1986b).

O sulfito ingerido com o alimento pelo organismo humano tem como via de metabolismo principal, a sua oxidação pela enzima sulfito oxidase à sulfato, o qual é então eliminado por via urinária. Com relação à toxidez do sulfito, estudos demonstraram que a níveis normais de consumo, a maioria da população está livre de qualquer reação adversa. Entretanto, recentemente, a segurança do uso contínuo de sulfitos em alimentos tem sido questionada baseada em fatos que indicam a ocorrência de reações alérgicas em indivíduos sensíveis, principalmente em pessoas asmáticas (TAYLOR & BUSH, 1986).

Numerosos casos de crise asmática têm sido relatados na literatura médica desde 1977. Estas reações que ocorrem em indivíduos portadores de asma e com sensibilidade a sulfitos podem ser suficientemente severas para implicar em riscos de vida (TAYLOR et alii, 1986b). A Academia Americana de Alergia e Imunologia registrou 13 casos de óbitos nos E.U.A. atribuídos a ingestão de sulfitos por asmáticos susceptíveis a estes compostos. Sulfitos também tem sido implicados em uma variedade de outras

reações adversas como a urticária e a diarreia. Segundo TAYLOR et alii (1986a), a população em risco nos E.U.A. soma a 180.000 indivíduos.

Devido a ocorrência destas reações adversas, seis agentes sulfitantes: dióxido de enxofre, sulfito de sódio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio, que possuíam "status" GRAS (Generally Recognised as Safe) desde 1959, foram reestudados pelo FDA, que em julho de 1986 estabeleceu um novo regulamento para uso destes compostos. O uso de agentes sulfitantes ficou proibido para frutas e hortaliças "in natura", embaladas ou não. Para alimentos processados contendo acima de 10 ppm de SO₂ total, a presença do aditivo deve ser declarada nos dizeres da rotulagem do produto. Esta nova regulamentação entrou em vigor a partir de agosto de 1986 (TAYLOR et alii, 1986a).

Um substituto completo para os agentes sulfitantes que possua todas as propriedades e características desejáveis deste grupo de aditivos, seria difícil de encontrar. Até o presente nenhum dos substitutos estudados, tem se mostrado tecnologicamente tão eficiente quanto os sulfitos numa ampla faixa de aplicação. O que os pesquisadores tem realizado é identificar substitutos para cada aplicação individual exercida pelos agentes sulfitan- tes.

Os estudos à respeito da toxidez dos agentes sulfitantes prosseguem e especula-se que tal classe de aditivos será provavelmente proibida para uso em alimentos num futuro próximo.

O objetivo deste trabalho é fornecer métodos alternativos mais eficientes para controlar a atividade da polifenol oxidase, visando especialmente a substituição ou redução do nível de concentração do SO_2 em frutas e hortaliças, quando empregado para aquela finalidade.

Para tanto foi estudado o efeito de interações entre o emprego de compostos químicos e destes com o calor, no controle da atividade da polifenol oxidase em frutas e hortaliças em que a enzima representa maior problema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

Quando as frutas e hortaliças são sujeitas à desorganização na sua estrutura natural, tais como descasamento, corte, trituração e injúrias diversas, o produto sofre mudanças, incluindo o desenvolvimento de uma cor escura não natural. Estas alterações na cor são em sua maioria devido a reações catalizadas por enzimas.

O rompimento das células do vegetal permite que as enzimas, naturalmente presentes, entrem em contato com diversos substratos que, na presença de oxigênio, desenvolvem no produto uma coloração escura. Esta reação em geral ocorre rápida e intensamente e consiste na oxidação de compostos fenólicos à ortoquinonas pela ação de uma ou múltiplas enzimas (MATHEW & PARPIA, 1971).

De acordo com PONTING (1960) e REED & UNDERKOFER (1966), a maioria das reações enzimáticas, que causam o escurecimento em frutas e hortaliças, é catalizada pela polifenol oxidase (PFO), embora, segundo VOIROL (1972) -

WHITAKER (1976), também possa ocorrer a participação de outras enzimas como a peroxidase.

As polifenol oxidases (o-difenol:oxigênio oxidoreductase; EC 1.10.3.1) pertencem ao grupo das oxido redutases. Esta classe de enzimas possui uma série de nomes triviais provenientes de seu substrato preferencial, como tirosinase, cresolase, fenolase, ortodifenol oxidase e catecolase (REED & UNDERKOFER, 1966; ESKIN et alii, 1971 e WHITAKER, 1972).

A enzima polifenol oxidase está amplamente distribuída na natureza, sendo provavelmente encontrada na maioria das plantas, estando presente particularmente em altas concentrações em batatas, pêssegos, maçãs, bananas, abacate e cogumelos (ESKIN et alii, 1971 e VAMOS-VIGYAZÓ, 1981). A localização da enzima na célula vegetal depende da espécie, idade e grau de maturidade. Nas folhas verdes a enzima encontra-se principalmente nos cloroplastos. Em maçãs a enzima foi localizada quase que exclusivamente nos cloroplastos e mitocôndrias. Espinafre e ervilha apresentaram elevado teor da enzima em seus cloroplastos (JOSLYN, 1970 e VAMOS-VIGYAZÓ, 1981).

A distribuição da atividade da polifenol oxidase em diferentes partes das frutas e hortaliças tem sido objeto de pesquisa por diversos autores. Ao realizarem estudo sobre a atividade da polifenol oxidase, VAMOS-VIGYAZÓ & NADUVARI-MARKUS (1982) verificaram que a distribuição da

atividade enzimica nos tecidos se dá de forma não homogênea em vários cultivares de pêra. O mesmo foi verificado em pêssago e os autores afirmaram que tal desuniformidade deve-se à estrutura fibrosa do mesocarpo.

Segundo MONTGOMERY & SGARBIERI (1975), a atividade da polifenol oxidase de banana é mais concentrada no interior da polpa e no tecido adjacente às sementes imaturas. Verificaram também que, durante o período de maturação, de um modo geral, a atividade enzimica decresce na polpa e aumenta na casca.

WEAVER (1978), verificou que a atividade enzimica em batatas das variedades White Rose, Norchip, Kennebec e Red La Soda foi mais elevada nas extremidades inferior e superior do tubérculo e menor no centro deste. A variedade Lenampe, por sua vez, apresentou atividade enzimica semelhante em todas as partes do tubérculo.

O grupo prostético da polifenol oxidase é o cobre, estando presente na proporção de um átomo de cobre por molécula. A hidroxilação de monofenóis ocorre pela combinação do cobre, no estado cuproso, com o oxigênio molecular e sua conversão para o estado cúprico e formação do difenol. O cobre pode ser removido e a enzima, deste modo será inativada. Porém sua reativação poderá ocorrer com a adição de cobre (REED & UNDERKOFER, 1966 e JOSLIN, 1970).

A polifenol oxidase pode catalizar dois tipos diferentes de reações, ambas envolvendo compostos fenólicos

e oxigênio molecular: (a) hidroxilação dos monofenóis a ortodihidroxfenóis correspondentes e (b) oxidação de ortodihidroxfenóis a ortoquinonas (ESKIN *et alii*, 1971; WHITAKER, 1972 e VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981)

As enzimas provenientes de diferentes fontes possuem estas duas formas de atividades em diferentes proporções, que estão sujeitas a mudanças durante isolamento e purificação das enzimas. Todas as polifenol oxidases possuem atividade sobre ortodifenóis. A maioria dos extratos enzimáticos, como, por exemplo, de batatas, maçãs e cogumelos possuem ambas as atividades. Por outro lado, as enzimas provenientes de manga, banana, pêra e cereja doce têm sido registradas como não atuantes em monoidroxifenóis (WHITAKER, 1972 e VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A reação de hidroxilação pode ser ilustrada pela oxidação da L-tirosina a 3,4 dihidroxifenilalanina (ESKIN *et alii*, 1971):

O segundo tipo de reação catalizada pela polifenol oxidase é a oxidação de um ortodifenol a uma orto-quinona, como se vê na ilustração. O mecanismo desta reação ainda não é completamente conhecido. Sabe-se que o oxigênio liga-se primeiro à enzima, ocorrendo em seguida a formação do o-difenol. Como exemplo, podemos citar a oxidação do catecol à o-benzoquinona (WHITAKER, 1972):

Uma vez formada a quinona, as reações subsequentes ocorrem espontaneamente e não mais dependem da presença da enzima e do oxigênio. Embora as ortoquinonas já sejam compostos coloridos (vermelho a marrom-avermelhado), a reação de escurecimento não pára neste ponto. Estes compostos participam de reações secundárias, gerando a formação de compostos com coloração mais escura (ESKIN *et alii*, 1971).

As reações secundárias, considerando-se especificamente o escurecimento enzimático são, segundo MATHEW & PARPIA (1971): (a) reações acopladas de outros substratos; as quinonas podem promover a oxidação de substratos, cujo potencial de oxidação-redução é pequeno, de modo que estes compostos não são oxidados diretamente pela polifenol oxi-

dase e, dentre eles, temos as antocianinas, os glicosídeos de flavonas, os compostos polifenólicos com aminoácidos ou proteínas. (b) complexação com aminoácidos e proteínas; esta é a reação secundária mais importante, pois na maioria dos produtos alimentícios a intensificação da cor durante o escurecimento ocorre após esta complexação. (c) condensação e polimerização das quinonas; ocorre a formação de polímeros amorfos, insolúveis e altamente estáveis.

Frutas e hortaliças possuem uma ampla variedade de compostos fenólicos. Entretanto, apenas uma parte relativamente pequena destes fenóis serve como substrato para a polifenol oxidase. Os compostos mais abundantes e que são usados como substrato são os monofenóis e o-difenóis. Os substratos naturais mais importantes da polifenol oxidase em frutas e hortaliças são as catequinas, os ésteres do ácido cinâmico, 3,4 diidroxifenilalanina (DOPA) e tirosina (ESKIN *et alii*, 1971 e VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A extensão na qual os substratos fenólicos, naturalmente presentes, contribuem para o escurecimento enzimico de frutas e hortaliças, depende da localização e concentração do substrato, assim como da intensidade de cor dos pigmentos macromoleculares obtidos das quinonas. Uma diferença fundamental na composição em fenóis de frutas e hortaliças é o fato de que, enquanto as catequinas, protoantocianidinas e leucoantocianidinas são constituintes comuns da maioria das frutas, elas somente ocorrem excepcio-

nalmente em hortaliças. Em cogumelos, nenhum dos compostos fenólicos presentes em plantas superiores pode ser detectado, sendo seus substratos principais a tirosina e L-DOPA (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A contribuição de um dado substrato endógeno, para o escurecimento enzimático, depende da sua concentração e da natureza dos outros substratos presentes no tecido. A presença de traços de substrato não tem consequências, enquanto concentrações de 100 mg/kg podem resultar em sérias alterações. A polifenol oxidase possui substratos específicos dependendo de sua origem. A especificidade pelo substrato depende não apenas do gênero e do cultivar, mas também da localização da enzima dentro da própria fruta ou hortaliça. O pH em que a atividade é determinada afeta na preferência pelo substrato. A seletividade da enzima para monoidroxifenóis parece ser maior que para ortoidroxifenóis (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

PRABHA & PATWARDHAN (1980), estudando a concentração de substratos oxidáveis em abacate, verificaram que a catequina foi o substrato principal da polifenol oxidase, proveniente da casca, polpa e semente. Observaram que a epicatequina também contribui grandemente para o escurecimento, embora não se apresente em concentração elevada. Por outro lado IADEROZA *et alii* (1980), verificaram que a polifenol oxidase da polpa de abacate das va-

riedades Wagner e Quintal, apresenta maior atividade tendo como substrato o catecol.

O ácido clorogênico e o catecol foram os substratos que proporcionaram maior atividade para a polifenol oxidase, proveniente de manga, segundo PARK et alii (1980). De acordo com PRABHA & PATWARDHAN (1986a), na casca e polpa de banana da variedade Robusta, o único substrato endógeno sujeito à oxidação foi a dopamina. GALEAZZI (1979) também cita a dopamina como substrato preferencial para a polifenol oxidase da banana.

Recentemente, WESCHE-EBELING & MONTGOMERY (1990), estudando a ação da polifenol oxidase de morango, verificaram que a maior atividade enzimática ocorreu para o substrato catequina.

VAMOS-VIGYÁZÓ (1981), cita as seguintes frutas e hortaliças e seus respectivos substratos preferenciais: pêra, ácido clorogênico, catecol e ácido cafeico; batata, ácido clorogênico e catecol; berinjela, ácido clorogênico; cogumelo, catecol, DOPA e dopamina.

A polifenol oxidase da fava de baunilha possui como substrato preferencial o catecol, seguido do pirogalol, segundo WILD-ALTAMIRANO (1969). De acordo com PRABHA & PATWARDHAN (1985a), a enzima proveniente de maçã oxida preferencialmente a epicatequina, seguida do ácido cis-clorogênico e da catequina. A especificidade da polifenol oxidase de pêssego varia segundo a variedade em

estudo. De acordo com VAMOS-VIGYAZÓ & MIHÁLYI (1976), as variedades Halford, Fay Elberta e Redhaven possuem os seguintes substratos: D-catequina, catecol e pirogalol respectivamente.

VAMOS-VIGYAZÓ & GAJZAGÓ (1978), estudando a especificidade pelo substrato da polifenol oxidase de duas variedades de maçãs encontraram, para as variedades Starking e Jonatham, atividade máxima para o 4-metilcatecol, embora a primeira variedade tenha apresentado uma velocidade de reação 1,6 vezes mais elevada. O catecol apresentou-se como segundo substrato preferencial para ambas variedades.

A ocorrência de múltiplas formas de polifenol oxidase tem sido citada por vários autores. Estas formas múltiplas denominadas isoenzimas apresentam diferenças em suas propriedades físicas, químicas e cinéticas como, por exemplo, mobilidade eletroforética, especificidade pelo substrato, pH ótimo, temperatura ótima, efeito inibidor de diversos agentes (CONSTANTINIDES & BEDFORD, 1967; GOODENOUGH, 1978 e GALEAZZI, 1984)

Alguns pesquisadores questionaram se estas múltiplas formas enzimicas representam uma família de diferentes enzimas com funções similares, ou múltiplas formas da mesma enzima que diferem entre si, formando subunidades (CONSTANTINIDES & BEDFORD, 1967 e MATHEW & PARPIA, 1971).

MONTGOMERY & SGARBIERI (1975), estudando a polifenol oxidase de banana, encontraram 9 isoenzimas na parte interior da polpa, 8 isoenzimas na parte exterior da polpa e 10 isoenzimas na casca.

FLURKEY & JEN (1978), estudando formas múltiplas de polifenol oxidase de pêssegos, verificaram que as isoenzimas apresentaram rápido grau de interconversão, dependendo do grau de maturação da fruta. BENJAMIN & MONTGOMERY (1973) mostraram a presença de duas formas de polifenol oxidase em cerejas da variedade Royal Ann. A fração denominada DE1 continha 45% da atividade enzimica total e a fração DE2 era responsável por 33% da atividade.

O sistema da polifenol oxidase em tecidos de cogumelos, batatas e maçãs foi estudado por CONSTANTINIDES & BEDFORD (1967). O cogumelo apresentou 9 isoenzimas, a batata exibiu 11 formas enzimicas, enquanto que a maçã (var. Golden Delicious) mostrou 3 isoenzimas. GOODNOUGH (1978), por outro lado, ao estudar a polifenol oxidase proveniente de cogumelo, encontrou apenas 3 isoenzimas, todas possuindo diferença na especificidade pelo substrato que variava entre DOPA, catecol e tirosina.

O pH para a atividade ótima da polifenol oxidase varia com a fonte enzimica (espécie e variedade), grau de maturação, substrato doador, composição de isoenzimas, pureza da enzima e solução tampão utilizada. Na maioria dos casos, este valor situa-se entre pH 4,0 e 7,0. As isoenzimas

podem ter pH de atividade ótima bem distintos. A faixa de pH ótimo, observada para a polifenol oxidase de algumas fontes, deve-se à presença de isoenzimas com valores diferentes de pH ótimo (AYLWARD & HAISMAN, 1969; MIHÁLYI *et alii*, 1978 e VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Segundo McCORD & KILARA (1983), o pH ótimo para a polifenol oxidase proveniente do cogumelo é 7,0. O mesmo valor foi encontrado para a polifenol oxidase de cereja (var. Royal Ann), de acordo com BENJAMIN & MONTGOMERY (1973). IADEROZA *et alii* (1980), estudando a atividade da polifenol oxidase de abacate das variedades Wagner e Quintal, encontraram os seguintes valores para a atividade ótima: pH 6,5 a 7,0 e pH 4,0 a 4,5 respectivamente. A polifenol oxidase extraída de manga possui atividade máxima na faixa de pH 5,6 a 6,0 (PARK *et alii*, 1980).

KAHN (1975) encontrou para o extrato enzimico bruto de abacate das variedades Fuerte, Horeshim e Lerman pH ótimo entre 5,3 e 6,7 para os substratos 4-metil-catecol e DOPA. De acordo com MIHÁLYI *et alii* (1978), a polifenol oxidase de maçã, da variedade Starking, exibiu um valor bem definido de atividade máxima a pH 6,1, enquanto, a variedade Jonathan apresentou pH ótimo de 6,2. As batatas apresentaram atividade enzimica máxima na faixa de pH 6,0 a 6,5 e os pêssegos, na faixa de pH 6,0 a 6,4.

A berinjela apresenta polifenol oxidase com atividade máxima na faixa de pH 5,0 a 5,2 para o substrato catecol, de acordo com estudos realizados por KNAPP (1965). A pêra da variedade Bartlett, segundo VAMOS-VIGYÁZÓ (1981), tem pH ótimo igual a 6,2.

A temperatura ótima de atividade tem sido bem menos investigada que o pH ótimo para a enzima polifenol oxidase. Os dados até então obtidos indicam que a temperatura ótima depende essencialmente dos mesmos fatores que o pH (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A atividade da polifenol oxidase do pêssego (var. Redhaven) aumenta na faixa de temperatura de 3°C a 37°C e diminui até 45°C. A 3°C a atividade é cerca de 50% do valor máximo. Para abricós, a enzima atinge sua atividade máxima a 25°C. As maçãs dos cultivares Jonathan e Starking apresentaram atividade enzimica máxima para o ácido clorogênico a 30°C e 25°C respectivamente. Para a variedade Red Delicious, a temperatura ótima encontrada foi 30°C, segundo SATJAWATCHARAHONG *et alii* (1983).

A polifenol oxidase de batata, utilizando catecol como substrato, tem sua atividade máxima a 22°C (MIHALYI *et alii*, 1978).

A susceptibilidade ao escurecimento, ou a tendência ao escurecimento enzimico em frutas e hortaliças tem sido relacionada diretamente ao teor de polifenol oxidase presente, à concentração de compostos fenólicos endó-

genos no tecido, ou a uma combinação específica destes dois fatores. Os dados publicados em literatura divergem em relação a qual dos dois fatores, enzima ou substrato, exerce papel fundamental na determinação da taxa de escurecimento do produto (KAHN, 1975; GÄJZÄGO et alii, 1977; GOLAN et alii, 1977; VAMOS-VIGYÁZÓ et alii, 1977; WALTER & PURCELL, 1980 e JAYARAMAN et alii, 1982).

Diferentes taxas de escurecimento apresentadas por diferentes variedades de maçã foram correlacionadas ao teor de compostos fenólicos (PRABHA & PATWADHAN, 1985b). Dentre as variedades estudadas, a Aumburi apresentou maior taxa de escurecimento e maior teor de compostos fenólicos totais.

De acordo com COSETENG & LEE (1987), dos sete cultivares de maçã estudados nem todos apresentaram a mesma relação entre o grau de escurecimento e a atividade enzimática. Em alguns cultivares (Classic Delicious, R.I. Greening, McIntosh e Cortland) a atividade da polifenol oxidase estava diretamente relacionada ao grau de escurecimento. Entretanto, para outros cultivares (Empire, Rome, Golden Delicious), o grau de escurecimento foi relacionado ao teor de compostos fenólicos presentes.

Recentemente, SAPERS et alii (1989a) verificaram que o baixo grau de escurecimento em batatas, da variedade Atlantic em relação à variedade Russet Burbank, está grandemente relacionado a seu baixo conteúdo de fenóis

totais e tirosina e, em menor extensão, à baixa atividade da enzima polifenol oxidase.

A tendência ao escurecimento enzimico em pêras pode ser relacionada ao teor de polifenóis, especialmente à concentração de ácido clorogênico e catequina, de acordo com RANADIVE & HAAR (1971).

A diferença na taxa de escurecimento de diferentes cultivares de abacate foi diretamente relacionada à atividade da polifenol oxidase, segundo KAHN (1975). Porém, de acordo com VAMOS-VIGYÁZÓ *et alii* (1977), a relação entre a atividade enzimica e o teor de substratos é que determina se a taxa de escurecimento de um determinado cultivar está relacionada à atividade enzimica ou ao teor de polifenóis.

2.2. Métodos de controle do escurecimento enzimico

A inibição do escurecimento enzimico, envolvendo a enzima polifenol oxidase, é obtida principalmente com aplicação do calor ou o emprego de certos compostos químicos. Já que o escurecimento em questão envolve uma reação enzimica, fatores como concentração de substrato, pH do meio e disponibilidade de oxigênio têm influência na taxa de inibição. Entretanto, na prática, alguns destes fatores são de difícil controle durante processamento e estocagem dos alimentos (MATHEW & PARPIA, 1971).

O escurecimento enzimico pode ser prevenido, não só pela inativação enzimica, mas também pela eliminação de um dos dois fatores necessários para a reação (O_2 e polifenóis), ou pela reação com os produtos primários formados, visando a inibição dos compostos coloridos secundários produzidos na etapa não enzimica do escurecimento. Na maioria dos casos, não é fácil a distinção dos diferentes mecanismos de ação de um inibidor do escurecimento enzimico, uma vez que, alguns inibidores agem simultaneamente sobre a enzima, o substrato ou produtos da reação (VAMOS-VIGYAZÓ, 1981).

A seleção de variedades de matéria prima com menor tendência ao escurecimento é um processo também viável, embora só seja eficaz a longo prazo. Para frutas, este processo envolveria a seleção de variedades, contendo menor teor de substrato fenólico, em vez de atividade enzimica reduzida, uma vez que, para a maioria dos casos, o nível de atividade enzimica tem menor influência sobre a taxa de escurecimento (MATHEW & PARPIA, 1971).

2.2.1. Inativação pelo calor

A aplicação do calor tem sido um dos métodos mais utilizados para inativar a polifenol oxidase. O calor é comumente aplicado em processos como branqueamento e pasteurização, como pré-tratamento de vegetais que vão ser conservados por apertização, congelação ou desidratação.

A temperatura e o tempo de exposição necessários para a inativação enzimica depende do pH e do teor de enzima presente, variando para cada fonte enzimica em particular. Sabe-se que uma diminuição no valor do pH resulta em decréscimo da atividade enzimica e que a polifenol oxidase pode ser inativada, irreversivelmente, a valores de pH abaixo de 3 (REED & UNDERKOFER, 1966).

É necessário ter um controle cuidadoso do tempo de aquecimento quando se aplicam altas temperaturas, de modo a se obter a inativação enzimica, evitando-se alterações significativas no sabor e textura do alimento. Entretanto, é importante enfatizar a necessidade de se efetuar uma rápida inativação térmica da enzima, principalmente se a faixa de temperatura não for muito elevada, pois, em alguns casos, o aquecimento lento pode resultar em ativação enzimica (MATHEW & PARPIA, 1971).

A polifenol oxidase não pertence à classe de enzimas extremamente estáveis ao calor. Ao contrário, um pequeno período de exposição na faixa de 70°C a 90°C, na

maioria dos casos é suficiente para destruição parcial ou total de sua função catalítica (VAMOS-VIGYAZÓ, 1981).

MCCORD & KILARA (1983), investigando a estabilidade da polifenol oxidase de cogumelo, verificaram que, após 10 minutos de exposição a diferentes temperaturas, a enzima permaneceu ativa até 45°C a pH 6,5. Entre 45°C e 70°C houve um declínio gradual na atividade e, acima de 70°C, não foi detectada atividade enzimica. Entretanto, para pH 3,5, a enzima foi inativada rapidamente a 40°C.

Segundo GALEAZZI & SGARBIERI (1981), a polifenol oxidase proveniente de banana foi completamente inativada a 95°C após 5 minutos de exposição. BERNHARDT *et alii* (1978), ao trabalharem com palmito, verificaram que, após 20 minutos de incubação a 75°C, a enzima polifenol oxidase teve apenas 48% de sua atividade perdida, mas para 100°C ela foi rápida e totalmente inativada.

A polifenol oxidase de pêssego possui menor estabilidade térmica que a de outras frutas e hortaliças. A variedade Cortez possui 3 isoenzimas com valores de meia vida a 55°C de 5,5, 14,1 e 14,6 minutos, enquanto uma quarta isoenzima mais resistente permaneceu estável a 55°C por 50 minutos mas foi rapidamente inativada a 76°C (VAMOS-VIGYAZÓ & MIHALYI, 1976).

SILVA & NOGUEIRA (1983a), estudando o efeito do calor na atividade da polifenol oxidase em diversas frutas e hortaliças constataram que a pêra (var. D'Água)

foi a fruta que demonstrou maior sensibilidade ao tratamento térmico. Após aquecimento a 70°C/2 minutos, 90,5% da atividade foi inibida, enquanto que a 80°C/2 minutos, houve 100% de inibição. A polifenol oxidase de banana também sofreu total inativação quando submetida a 90°C durante 2 minutos. A enzima extraída da maçã também foi sensível ao calor, sendo totalmente inibida a 80°C por 2 minutos.

2.2.2. Inativação por compostos químicos

A inativação da polifenol oxidase pode ser obtida com produtos químicos agindo na própria enzima, com um dos substratos ou produtos da reação. A escolha de um agente inibidor do escurecimento em alimentos é restrita e dependente de requisitos especiais como ausência de toxidez, ausência de efeitos negativos sobre sabor, odor e textura, viabilidade econômica e tecnológica (VAMOS-VIGYAZÓ, 1981).

2.2.2.1. Anidrido sulfuroso

O dióxido de enxofre e seus derivados são os compostos químicos mais frequentemente usados em práticas industriais. Pode ser empregado na forma gasosa, como dióxido de enxofre, ou na forma de soluções aquosas diluídas de sais de sulfito. O gás penetra com maior rapidez no

tecido de frutas e hortaliças, mas as soluções são mais facilmente manuseadas, podendo ser empregadas na forma de banho por imersão ou ser aplicados por pulverização (POTTER, 1973; ESKIN *et alii*, 1971).

Há vantagens e desvantagens no uso do SO_2 , ou sulfitos. Podem ser usados, especialmente, nos casos onde o emprego do calor resultaria em alterações desfavoráveis de textura e desenvolvimento de sabor estranho no produto. Também possui propriedades antissépticas e contribui na preservação do teor original de vitamina C do produto. Como desvantagem, pode conferir sabor estranho ao alimento, clarear a sua cor original e acelerar a corrosão das latas. Outra séria desvantagem está no aspecto nutricional, pois o SO_2 tem efeito destrutivo sobre a tiamina (Vit. B₁), restringindo seu uso a alimentos desprovidos desta vitamina. Apesar destas desvantagens, o SO_2 é amplamente usado no processamento de alimentos, devido principalmente à sua eficácia e baixo custo (ESKIN *et alii*, 1971; MATHEW & PARIPIA, 1971; WOODROOF & LUH, 1975).

Embora os sulfitos sejam eficientes no controle do escurecimento enzimico, seu modo de ação é complexo e o mecanismo exato da inibição da reação não está completamente elucidado. O SO_2 pode agir, reduzindo o oxigênio presente e tornando-o indisponível à oxidação; ou, então, pode reagir com as ortoquinonas, impedindo sua polimerização e consequente formação de pigmentos escuros

(EMBS & MARKAKIS, 1965; MATHEW & PARPIA, 1971). Uma terceira corrente propõe que a ação do SO_2 ocorre diretamente sobre a enzima (HAISMAN, 1974 e SAYAVEDRA-SOTO & MONTGOMERY, 1986).

Segundo EMBS & MARKAKIS (1965), os sulfitos inibem o escurecimento pela combinação irreversível com as ortoquinonas para formar produtos incolores. O agente inibidor neste tipo de reação é gradualmente consumido. Desta forma, a sua ação depende da sua concentração, assim como da natureza e concentração dos substratos fenólicos presentes. Se estiverem presentes apenas monofenóis, uma baixa concentração de sulfitos será eficiente, pois as quinonas serão formadas a uma velocidade relativamente baixa e grande parte do SO_2 está disponível para agir diretamente sobre a enzima (MUNETTA, 1966). Na presença de orto-diidroxifenóis, pode ocorrer total consumo do SO_2 , antes que haja completa inativação enzimica. Em tais casos, a formação da coloração escura é retardada e atenuada, mas não inteiramente eliminada (HAISMAN, 1974).

Recentemente, SAYAVEDRA-SOTO & MONTGOMERY (1986), utilizando a polifenol oxidase proveniente de cogumelo, pêra e banana, realizaram um estudo sobre o mecanismo de ação do SO_2 . Concluíram que o SO_2 age diretamente sobre a enzima e propuseram a seguinte reação:

onde: $[E]$ - concentração inicial da enzima ativa

$[E]_i - \text{SO}_3^{2-}$ - provável complexo formado entre enzima inativa e HSO_3^-

$[E]_i$ - concentração da enzima inativa.

O valor do pH exerce grande influência sobre esta reação, pois a concentração da espécie HSO_3^- , que é responsável pela inibição da polifenol oxidase, aumenta com a diminuição do pH. Para valores de pH acima de 7, a inibição enzimática só ocorreu quando a concentração de sulfitos foi superior a 2,0 mg/ml. Diminuindo-se o pH, aumenta-se a inibição enzimática e, ao chegar em pH 4, a inibição é praticamente instantânea e completa para a concentração de 0,04 mg/ml. Os autores citados ainda afirmam que esta inibição enzimática é irreversível.

A inibição direta da enzima pelo SO_2 é propiciada, utilizando-se conjuntamente o ácido ascórbico, especialmente se houver uma escolha adequada da concentração relativa destes dois inibidores. Na presença de ácido ascórbico não ocorre a formação do complexo sulfito-quinona; consequentemente, há uma maior concentração de sulfito

remanescente para inativar a enzima (EMBS & MARKAKIS, 1965 e HAISMAN, 1974).

O efeito do SO_2 , na inibição da polifenol oxidase de algumas frutas e hortaliças, foi estudado por SILVA & NOGUEIRA (1983b). Os autores observaram que a polifenol oxidase da banana, dentre outras frutas analisadas, apresentou maior resistência à inibição, sendo que o uso de metabissulfito de potássio a 0,2% inibiu apenas 91,1% da atividade desta enzima. Por outro lado, a polifenol oxidase proveniente do figo, maçã e pêssego foi completamente inibida com emprego de 0,05% do composto citado. Com relação às hortaliças, verificaram que a polifenol oxidase da couve-flor teve a sua atividade inibida em 100% com emprego de 0,05% de metabissulfito de potássio; porém, a polifenol oxidase do palmito mostrou-se mais resistente, não sendo inibida pelo composto citado na concentração de 0,2%.

BERNHARDT *et alii* (1978) verificaram que, para palmito, o metabissulfito de sódio empregado na concentração de 3,3 mM proporcionou 100% de inibição da polifenol oxidase. Ensaios com 200 ppm de SO_2 , na salmoura de espera, mostraram ser suficiente para a manutenção da cor natural até o enlatamento.

IADEROZA *et alii* (1980), ao estudarem as características da enzima polifenol oxidase de dois cultivares de abacate, observaram que, dentre vários inibidores

estudados, o metabissulfito de sódio foi o mais eficaz. Para os cultivares Wagner e Quintal foram necessários $5,8 \times 10^{-3}\%$ e $6,1 \times 10^{-3}\%$ de metabissulfito de sódio, respectivamente, para obtenção de 100% de inibição enzimica.

Maçã em fatias da variedade Golden Delicious foi tratada com SO_2 a 0,02%, obtendo-se melhor resultado para um tempo de imersão de 17 horas a pH 2,4, obtendo-se 30 ppm de SO_2 residual (PONTING & JACKSON, 1972).

PARK *et alii* (1980), estudando as características da polifenol oxidase de manga, verificaram que o emprego de metabissulfito de sódio, na concentração de 0,01 mM, promoveu 67% de inibição enzimica; porém, ao ser aplicado na concentração de 0,05 mM, ocorreu 100% de inibição.

2.2.2.2. Ácidos

O emprego de ácidos é um método amplamente utilizado para controle do escurecimento enzimico. Os ácidos empregados estão entre os que já existem naturalmente nos tecidos vegetais, como o ácido cítrico, ácido málico, ácido fosfórico e ácido tartárico. Em geral, o efeito inibidor é devido ao abaixamento do pH (ESKIN *et alii*, 1971).

O ácido cítrico possui um efeito inibidor duplo sobre a polifenol oxidase. Esta é inibida, não apenas

pelo abaixamento do pH do meio, mas também realizando a quelação do cobre do grupo prostético. Entretanto, parece que o ácido cítrico usado sozinho não é um inibidor muito eficaz da polifenol oxidase (ESKIN *et alii*, 1971). Porém, McCORD & KILARA (1983), ao pesquisarem métodos para controle do escurecimento enzimico em cogumelos processados verificaram que o emprego do ácido cítrico, reduzindo o pH a 3,5, proporcionou a inativação enzimica.

Recentemente, ZEMEL *et alii* (1990), utilizando ácido inorgânico (ácido clorídrico) testaram a inativação da polifenol oxidase em suco de maçã, pelo abaixamento do pH. Verificaram que a enzima foi inativada em 98%, 63% e 34%, após 20 minutos, a valores de pH de 2,0, 2,25 e 2,5, respectivamente. Em estudos realizados em planta piloto, o suco foi acidificado com HCl a pH 2,0 por 45 minutos e após receber adição de NaOH para elevar o pH ao seu valor original, observaram que a atividade da polifenol oxidase foi inibida em 88%. Embora o suco tenha apresentado uma coloração adequada, ele possuía um sabor salgado desagradável, resultante da formação de cloreto de sódio por ocasião do ajuste do pH. Outros compostos em substituição ao NaOH estão sendo pesquisados para prevenir a formação do sabor salgado.

O ácido ascórbico também é empregado para controlar o escurecimento enzimico. Segundo PONTING (1960), o mecanismo de inibição pelo ácido ascórbico é devido a

redução da ortoquinona ao substrato fenólico original, impedindo a polimerização posterior. Por esta razão, o alimento deve ser tratado com quantidade suficiente de ácido ascórbico, senão a reação de escurecimento será apenas retardada, até o ponto em que o ácido ascórbico seja oxidado (BAUERNFEIND & PINKERT, 1970). O ácido ascórbico tem a vantagem de não possuir sabor detectável, nas concentrações utilizadas, o qual possa interferir no produto acabado; não possui ação corrosiva sobre metais e é uma vitamina de valor nutricional bem conhecido (ESKIN et alii, 1971).

Estudos realizados por SILVA & NOGUEIRA (1983b) demonstraram que a polifenol oxidase de banana, dentre as frutas analisadas, é a mais resistente ao tratamento por ácido ascórbico, não tendo sido inibida nem na maior concentração utilizada (1,0%). Para a pêra, figo, maçã e pêssego, 0,5% de ácido ascórbico foi suficiente para promover inibição total da enzima. No caso das hortaliças, a polifenol oxidase da couve-flor foi inibida totalmente na menor concentração de ácido ascórbico (0,1%). Entretanto, a polifenol oxidase do palmito apresentou maior resistência, especialmente a base, que na maior concentração (1,0%) teve sua atividade reduzida em apenas 6,8%.

Ácido ascórbico na faixa de concentração de 0,05% a 0,2%, em xarope, mostrou-se eficaz para tratar maçãs e pêssegos destinados ao congelamento. Segundo POTTER

(1973), os pêssegos assim tratados não escurecem dentro do período de 2 anos se mantidos a -18°C .

NOGUEIRA (1973a,b) verificou que, maçãs em pedaços da variedade Brucker do Brasil e Ohio Beauty, recebendo tratamento prévio com ácido ascórbico, antes da congelação, apresentaram eficiente controle do escurecimento enzimico. A proporção de ácido ascórbico empregada foi de 360 mg/l de xarope de sacarose 50° Brix.

Estudando o processamento do palmito por apertização, NOGUEIRA (1979) verificou que o ácido ascórbico, empregado na proporção de 480 mg/kg de creme, foi o melhor agente inibidor do escurecimento enzimico.

2.2.2.3. Outros compostos químicos

A inibição do escurecimento enzimico também pode ser efetuada com o uso de outros agentes químicos, além dos ácidos e do anidrido sulfuroso.

O cloreto de sódio tem sido comumente usado em soluções de espera, antes da aplicação do branqueamento. A concentração da salmoura utilizada é tal, que se obtém apenas inativação enzimica parcial. Uma completa inativação enzimica requereria uma elevada concentração do sal e tornaria o produto impalatável, principalmente no caso de frutas, o que limita seu uso (ADAMS & BLUNDSTONE, 1971).

LUH & PHITHAKPOL (1972), estudando o efeito do NaCl na inibição da polifenol oxidase de pêssegos, descobriram que se pode obter até 30% de inibição, utilizando-se uma concentração de 3% do sal. Segundo BENJAMIN & MONTGOMERY (1973), 400 mM de NaCl produz apenas 18% de inibição enzimica da polifenol oxidase de cerejas da variedade Royal Ann.

A adição de agentes sequestrantes em alimentos permite a complexação com metais naturalmente presentes, prevenindo assim uma série de reações indesejáveis. O cobre, pertencente ao grupo prostético da polifenol oxidase, pode complexar-se com agentes sequestrantes, inibindo total ou parcialmente a atividade enzimica. Em muitos casos, a elevada temperatura da operação de branqueamento, permite que os metais, naturalmente presentes no alimento, sejam liberados para combinarem-se com compostos orgânicos. A adição de um agente sequestrante permite sua complexação com metais, prevenindo alterações indesejáveis na cor. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um agente sequestrante que pode ser usado em alimentos (FURIA, 1977).

IADEROZA *et alii* (1980) empregaram o EDTA, para prevenir o escurecimento enzimico em abacate das variedades Wagner e Quintal e verificaram que houve apenas 8% de inibição da polifenol oxidase, para a concentração de 0,03 mM. Para obtenção de 100% de inativação enzimica, utilizaram a concentração de 0,0656%.

O EDTA não surtiu efeito adequado sobre a polifenol oxidase de pêssego, quando empregado na concentração de 263 μ M. O pH do meio de reação afeta a afinidade do EDTA pelo cobre sendo os complexos de EDTA-cobre relativamente estáveis em meio ácido (LUH & PHITHAKPOL, 1972). Este mesmo efeito foi também verificado em pêssegos por VAMOS-VIGYÁZÓ & MIHÁLYI (1976).

BERNHARDT *et alii* (1978) verificaram que, utilizando EDTA na concentração de 8,3 mM, não houve inibição enzimica mensurável na atividade da pfo de palmito.

O EDTA foi considerado por TWIGG *et alii* (1974) como eficaz inibidor do escurecimento de batata doce, quando usado em concentrações de 0,05%, tendo sido mantida a estabilidade da cor do produto por até 1 ano após o processamento.

O dietilditiobicarbonato de sódio (DETEC) pode agir como complexante do cobre e também é capaz de formar com as quinonas um complexo incolor estável, inibindo o escurecimento enzimico (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Segundo BERNHARDT *et alii* (1978), a atividade da polifenol oxidase de palmito pode ser totalmente inibida, usando-se 3,3 mM de DETEC. A polifenol oxidase, proveniente de abacate das variedades Wagner e Quintal, necessitou de 0,0794% e 0,01%, respectivamente, de DETEC para ser totalmente inibida, de acordo com estudos realizados por IADEROZA *et alii* (1980).

Estudos realizados por KAHN (1977) sobre o uso do DETEC, para inibir a polifenol oxidase de abacate proveniente das variedades Fuerte e Lerman, mostraram que o uso deste composto na concentração de 0,6 mM promoveu 100% de inibição.

A cisteína também age diretamente sobre as quinonas, impedindo a continuidade da reação de escurecimento. Devido à ausência de odor e sabor desagradável, é um dos compostos sulfidrila mais adequado para esta finalidade (ADAMS & BLUNDSTONE, 1971).

Fatias de maçãs das variedades Stumer e Dougherty, consideradas como sendo muito susceptíveis ao escurecimento, foram tratadas com solução a 0,005 M de cisteína, e, somente sofreram escurecimento após 3 horas de exposição ao ar. Suco de maçã das mesmas variedades, contendo cisteína na proporção de 25 mg/100 ml, após 5 meses de armazenamento à temperatura ambiente, não apresentaram escurecimento enzimico. O uso de cisteína tem uma vantagem adicional sobre o ácido ascórbico, pois, embora seu custo seja elevado, ela pode ser usada em menores concentrações. Também o composto formado com as quinonas é relativamente estável, uma vez que os alimentos tratados com cisteína podem ter um tempo de espera de várias horas antes de serem processados, sem ocorrer o risco de escurecerem (WALKER & REDDISH, 1964).

Recentemente, KAHN (1985) afirmou que a cisteína pode formar complexos estáveis com o cobre, devido a

seu grupo tiol e verificou que foi eficaz na prevenção do escurecimento, mesmo quando usada em baixas concentrações como 0,32 mM e 5 mM, nos casos dos extratos enzimáticos de abacate e banana, respectivamente.

A polifenol oxidase do suco de pêra e da polpa de banana também foi inibida com adição de cisteína, sendo que a concentração de 1,0 mM foi suficiente para promover 100% de inibição enzimática em banana (MONTGOMERY & SGARBIERI, 1975 e MONTGOMERY, 1983).

Compostos fenólicos, como o ácido p-cumárico, ácido protocatechuico e p-cresol, podem agir como inibidor da ação da polifenol oxidase sobre o substrato 4-metilcatecol, impedindo a formação das ortoquinonas, como foi observado para a polifenol oxidase de abacate (KAHN, 1976).

WARMBIER *et alii* (1972) testaram o efeito inibidor do diclorofluormetano, que é um composto capaz de se ligar a proteínas e alterar sua estrutura. Verificaram uma diminuição da atividade enzimática em relação ao controle, concluindo que pode ter ocorrido uma associação entre a molécula do diclorofluormetano e as regiões hidrofóbicas da enzima, alterando sua conformação e reduzindo sua atividade.

O efeito inibidor de compostos fenólicos também é citado, mais recentemente, por PRABHA & PATWARDHAN (1986b), que observaram que a hidroquinona, pirogallol e α -naftol promoveram aproximadamente 80% de inibição na polifenol oxidase proveniente de abacate, banana e maçã, en-

quanto o ácido p-cumárico e ácido ferrúlico ocasionaram em média 30% de inibição.

WALKER (1976) investigou o efeito do ácido cinâmico, ácido p-cumárico e ácido ferrúlico sobre a polifenol oxidase de maçã, variedade Granny Smith, e obteve inibição enzimica para a concentração de 0,25 mM, 0,5 mM e 1,0 mM, respectivamente. Verificou, portanto, que o ácido cinâmico e p-cumárico foram mais eficazes que o ácido ferrúlico. Pequenas concentrações destes ácidos foram capazes de promover um controle do escurecimento enzimico por longo período de tempo, especialmente quando comparado com o controle tratado com ácido ascórbico.

Proteínas, peptídeos e aminoácidos podem afetar a atividade da polifenol oxidase por dois meios diferentes: pela reação com as ortoquinonas e pela quelação do cobre no sítio ativo da enzima. Segundo KAHN (1985), L-lisina, glicina, L-histidina e L-fenilalanina, na ordem crescente de eficácia, inibiram a atividade da polifenol oxidase de abacate, banana e cogumelo. Triglicina, diglicina e glicina, em ordem decrescente, foram eficazes em diminuir a intensidade da cor da melanina, formada pela ação da polifenol oxidase sobre DOPA.

IADEROZA et alii (1980) verificaram o efeito inibidor do 2-mercaptoetanol sobre a atividade da polifenol oxidase de abacate das variedades Wagner e Quintal e obtiveram 100% de inibição para as concentrações de 0,003% e

0,0063%, respectivamente. MONTGOMERY & SGARBIERI (1975), também utilizando este composto na concentração de 1,0 mM, conseguiram inibir a enzima proveniente de banana. Os mesmos autores testaram também o efeito do 1,2- ditiolpropa- no e verificaram 100% de inibição da polifenol oxidase da polpa de banana, quando empregado na concentração de 1,0 mM.

SAPERS *et alii* (1989b) propuseram que um substituto eficaz para os sulfitos deva ser baseado em formas estabilizadas do ácido ascórbico, usadas sozinhas ou em combinação com outros inibidores. Deste modo, realizaram um estudo para avaliar o desempenho de duas classes de derivados do ácido ascórbico, o ácido ascórbico-2-fosfato (AAP) e o ácido ascórbico-3-fosfato (AATP), empregados individualmente ou em combinação com cinamatos e benzoatos de sódio. Concluíram que o AAP e AATP apresentaram certa efi- cácia para inibir o escurecimento de superfícies cortadas de maçã, mas foram ineficazes para o suco. Cinamato e benzoato de sódio aumentaram a eficácia do ácido ascórbico e seus derivados, como inibidores do escurecimento em suco de maçã, mas induziram o escurecimento em superfícies cortadas. Foi estudado também o uso de outros compostos, como ciclo dex- trinas e verificou-se que este composto aplicado sozinho, ou em conjunto com o ácido ascórbico, ou seus derivados, poderá vir a ser um inibidor promissor para a polifenol oxidase de suco de maçã, mas não surtiu efeito em superfícies cortadas da fruta.

REYES & LUH (1962) estudaram o efeito do ácido isoascórbico na inibição da polifenol oxidase, em comparação ao ácido ascórbico. Para pêssegos, ambos mostraram semelhante eficácia, não sendo detectada nenhuma diferença entre suas propriedades antioxidantes.

HSU *et alii* (1988) estudaram o efeito de diversos derivados do ácido ascórbico, tais como ácido deidroascórbico, ácido isoascórbico, ácido ascórbico-2-fosfato (AAP) e ácido ascórbico-2-sulfato (AAS) sobre a atividade da polifenol oxidase de cogumelo. Verificaram que o ácido isoascórbico foi mais eficaz que o ácido deidroascórbico. O AAP e AAS não inibiram a atividade enzimica; porém, na presença da enzima fosfatase ácida, o AAP liberou ácido ascórbico que agiu como inibidor.

SAPERS & ZIOLKOWSKI (1987) realizaram um estudo, comparando a ação do ácido eritórbico em relação ao ácido ascórbico, como inibidor da polifenol oxidase de maçãs. Verificaram que o ácido eritórbico foi similar ao ácido ascórbico na prevenção do escurecimento enzimico.

A adição de xarope de sacarose é um dos meios mais antigos para minimizar a oxidação, tendo sido usado bem antes de se conhecerem as reações responsáveis pela oxidação dos alimentos. O xarope de sacarose retarda o escurecimento enzimico pela formação de uma camada sobre a superfície, impedindo o contato com o oxigênio atmosférico. É um meio comumente usado em frutas descascadas e fatiadas.

especialmente em pêssegos, abricós, maçãs, pêras e cerejas. A sacarose também pode ser usada na forma em pó, diretamente sobre as frutas maduras, que liberarão suco suficiente para solubilizar o açúcar e formar um xarope saturado (POTTER, 1973 e WOODROOF & LUH, 1975).

2.2.2.4. Outros meios de inativação

FINKLE & NELSON (1963) desenvolveram um método para inibição da polifenol oxidase, que inclui uso de enzimas. A fruta ou hortaliça é sujeita ao contato com uma enzima, capaz de bloquear ou modificar um ou ambos grupos ortoidroxi do substrato fenólico, impedindo assim o prosseguimento da reação. A enzima mais adequada para esta finalidade é a o-metiltransferase, que converte os grupos hidroxila em metoxila, alterando quimicamente os precursores da reação de escurecimento e impedindo-os de formarem as ortoquinonas. Para resultados satisfatórios, o tecido vegetal e a enzima devem ser mantidos em pH de 7 a 9. Desde que a reação envolve a conversão de grupos hidroxila a grupos metoxila, é necessário a presença de uma fonte de radicais metoxila. Esta fonte pode ser suprida por componentes naturais do tecido vegetal, ou, também, se for necessário, pela adição de compostos como metionina, S-adenosilmetionina e betaina. A temperatura do sistema deve ser

mantida entre 20°C e 40°C e o tempo de reação varia de 5 minutos a 3 horas, dependendo da temperatura, natureza do composto fenólico e teor de enzima o-metiltransferase empregado.

A exclusão de oxigênio também tem sido empregada para prevenir o escurecimento enzimico, embora tenha efeito limitado. Este método é empregado, domesticamente, quando se descascam e cortam-se batatas com certa antecedência ao seu preparo culinário, deixando-as submersas em água. Este procedimento impede que o oxigênio atmosférico atinja a superfície cortada da batata. Entretanto, este método possui várias desvantagens, pois não exclui o oxigênio naturalmente presente no tecido vegetal e também, quando a fruta ou hortaliça for exposta novamente ao ar irá escurecer (ESKIN *et alii*, 1971).

O palmito é uma hortaliça que possui grande quantidade de ar entre as camadas de tecidos e dentro de determinados tecidos. Assim, é necessário, antes de se utilizar qualquer método para inibição da polifenol oxidase, proceder à remoção dos gases contidos no interior do tecido (PASCHOALINO, 1978). A desaeração mecânica do palmito, à temperatura ambiente, mostrou ser o único meio adequado para evitar o escurecimento enzimico, dentre os vários métodos de desaeração testados. A exposição dos toletes a uma pressão de 130 mm de Hg, durante 15 segundos, foi suficiente para obtenção de um produto final de boa qualidade, segundo PAS-

CHOALINO & BERNHARDT (1978). A exaustão mecânica seguida de esterilização comercial proporcionou excelente controle do escurecimento enzimico, de acordo com BERNHARDT *et alii* (1978).

ANDRES (1987) propôs uma combinação de vários métodos, como o uso de agentes acidificantes, exaustão, embalagem a vácuo e estocagem sob refrigeração, para prevenir o escurecimento enzimico em batatas pré-descascadas e fatiadas. As batatas são colocadas em imersão por 2 minutos, em solução contendo 0,2% de sorbato de potássio e 0,3% a 1,0% de ácido ascórbico, seguindo-se o acondicionamento a vácuo, em sacos plásticos impermeáveis ao oxigênio. Os sacos já selados são imersos rapidamente em água em ebulição para promover a contração da embalagem e sua adesão ao produto em seu interior. A armazenagem é feita a 4°C por até 14 dias. Ao se abrirem as embalagens, o escurecimento inicia-se após 10 a 30 minutos, mas este problema pode ser minimizado, abrindo-se a embalagem imediatamente antes do cozimento, ou mantendo seu conteúdo imerso em água.

SILVA & NOGUEIRA (1983a,b) sugeriram que interações entre o emprego de compostos químicos (SO_2 , ácido ascórbico e outros) e destes com o calor poderão vir a ser a melhor forma para controlar o escurecimento enzimico em frutas e hortaliças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-Prima

No presente projeto foram estudadas as seguintes frutas e hortaliças: abacate (*Persea americana* Mill.) var. Fortuna; banana (*Musa cavendishi*) var. Nanica; maçã (*Mallus sylvestris* Mill.), variedades Ana, Fuji, Gala e Golden; pêra (*Pyrus betulaefolia*), var. d'Água; pêssego (*Prunus persica* v. *vulgaris*), var. Real; batata (*Solanum tuberosum* L.), var. Bintje; berinjela (*Solanum melongena* L.), var. Super F100; cogumelo (*Agaricus bisporus*); palmito (*Euterpe edulis* Mart.) (Juçara).

As frutas e hortaliças (exceto cogumelo e palmito) foram adquiridas na região de Piracicaba e representam as variedades de maior importância econômica no Estado de São Paulo. O cogumelo utilizado foi cultivado na região de Mogi das Cruzes e o palmito foi obtido da região do Vale do Ribeira. Foram selecionadas frutas e hortaliças que se apresentavam em excelentes condições para o consumo "in natura".

A matéria-prima, uma vez adquirida, foi imediatamente transportada para as dependências do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ onde foi analisada e estudada.

3.2. Análises para caracterização da matéria-prima

A caracterização de cada fruta e hortaliça foi obtida pela determinação do pH e percentagem de sólidos solúveis (°Brix). O pH foi determinado em potenciômetro Alphalab modelo PA-200 e a percentagem de sólidos solúveis foi obtida com refratômetro Atago modelo N1.

3.3. Determinação da atividade da PFD

A atividade da PFD foi determinada de acordo com a técnica descrita por PONTING & JOSLYN (1948), com algumas alterações conforme descrito em trabalho de SILVA & NOGUEIRA (1983a).

De um lote de 5 kg de cada matéria-prima foi retirada aleatoriamente em torno de 500 g de amostra dos quais cada unidade de fruta ou hortaliça era cortada longitudinalmente em 4 partes. Da matéria-prima subdividida foi retirada 1/4 de cada unidade, aleatoriamente para formar uma

amostra de 100 g. Nos casos dos cogumelos do lote de 5 kg foram retiradas aleatoriamente unidades em quantidades suficientes para totalizar 100 g.

Amostras de 100 g de fruta ou hortaliça, descascada, e 400 ml de água destilada gelada (0-4°C), foram trituradas durante 3 minutos em liquidificador. O material assim preparado, foi centrifugado (International K) por 15 minutos a 364 g. O líquido sobrenadante foi passado para um Erlenmeyer de 125 ml com tampa e colocado em banho de gelo triturado, para ser usado como fonte enzimica (extrato enzimico).

Em outro Erlenmeyer de 300 ml foram adicionados, 96 ml de tampão fosfato 0,2M, pH 6,0, 3 ml de catecol 0,1 M (substrato), que a seguir foi deixado em banho-maria a 30°C até estabilizar a temperatura. A este substrato adicionou-se 1 ml do extrato enzimico, sendo então rapidamente homogeneizado; tomou-se cerca de 10 ml em um tubo de espectrofotômetro, realizando-se 10 leituras de 1 em 1 minuto, em 425 nm.

O espectrofotômetro utilizado foi o CELM modelo E-125D, previamente calibrado com água destilada. Como controle para a reação enzimica, foi utilizado um tubo do espectrofotômetro contendo apenas o substrato (catecol e tampão fosfato).

Uma unidade da enzima (PFO), foi definida como a quantidade de extrato enzimico que acusou um

aumento na absorbância de 0,001 unidades por minuto.

3.4. Condições em que foi estudada a atividade da PFO

Com o objetivo de estudar o efeito de interações entre compostos químicos e destes com o calor no controle do escurecimento enzimático, a atividade da PFO foi determinada e estudada no extrato enzimático de cada fruta e hortaliça após a aplicação dos seguintes tratamentos:

a. Matéria-prima "in natura" - Testemunha

(determinação da atividade ótima da enzima)

b. Combinação de Ácido Ascórbico a 0,1% e

Ácido Cítrico a 0,2%

c. Tratamento Térmico a 70°C/2 minutos

Ácido Ascórbico a 0,1% e

Ácido Cítrico a 0,2%

d. Combinação de Ácido Ascórbico a 0,1% e

EDTA a 30 ppm

e. Tratamento Térmico a 70°C/2 minutos

Ácido Ascórbico a 0,1% e

EDTA a 30 ppm

f. Combinação de Ácido Ascórbico a 0,1%

Ácido Cítrico a 0,2% e

EDTA a 30 ppm

g. Tratamento Térmico a 70°C/2 minutos

Ácido Ascórbico a 0,1%

Ácido Cítrico a 0,2% e

EDTA a 30 ppm

h. Combinação de Ácido Ascórbico a 0,1% e

Metabissulfito de Sódio a 0,05%

i. Tratamento Térmico a 70°C/2 minutos

Ácido Ascórbico a 0,1% e

Metabissulfito de Sódio a 0,05%

j. Combinação de Ácido Ascórbico a 0,1%

Ácido Cítrico a 0,2% e

Metabissulfito de Sódio a 0,05%

k. Tratamento Térmico a 70°C/2 minutos

Ácido Ascórbico a 0,1%

Ácido Cítrico a 0,2%

Metabissulfito de Sódio a 0,05%

As percentagens dos compostos químicos adicionados foram calculadas sobre o peso da fruta ou hortaliça utilizada na obtenção do extrato enzimico e foram adicionados à água destilada antes da trituração da fruta ou hortaliça para a obtenção do extrato.

O procedimento para a realização do tratamento térmico foi o seguinte: Após obtenção do extrato enzimico pré-tratado com o aditivo (ou aditivos) em questão, 5 ml deste foi adicionado a um tubo de ensaio e colocado em banho-maria à 70°C. Após estabilização da temperatura contou-se 2 minutos, sendo então imediatamente resfriado, deixando-se o tubo de ensaio em banho de gelo triturado.

Para a matéria-prima "in natura" (testemunha), determinou-se a atividade ótima sendo feitas seis repetições para cada fruta e hortaliça em estudo. A atividade enzimica da polifenol oxidase para os demais tratamentos foi determinada com duas repetições.

Os tratamentos propostos foram elaborados baseados em resultados obtidos em trabalhos anteriormente realizados por SILVA & NOGUEIRA (1983a e 1983b).

3.5. Análise Estatística

Foi feita a análise apenas dos dados da atividade enzimática (absorbância) obtidos das frutas e hortaliças "in natura". Para verificar o comportamento das enzimas durante o desenvolvimento da reação de escurecimento foi feita análise de regressão polinomial (1° e 2° graus) dos dados. Com esta análise de regressão foi possível verificar se a atividade enzimática foi caracterizada por um crescimento linear ou quadrático em relação ao tempo (GOMES, 1960).

A análise de variância seguiu o seguinte esquema:

Causa da variação	G.L.
R. Linear	1
R. Quadrática	1
Resíduo	8
Total	10

Determinou-se para cada caso o coeficiente de determinação (r^2) e o valor F que servem de indicadores de variação total dos dados.

Assim:

$$r^2 = \frac{\text{SQ regressão}}{\text{SQ total}}$$

$$r = \frac{QM \text{ Trat.}}{QM \text{ Res.}}$$

Para a regressão linear adotou-se o seguinte modelo:

$$y_i = a + bx_i$$

e para a regressão quadrática

$$y_i = a + bx_i + c x_i^2$$

onde:

x_i = tempo em minutos;

y_i = absorbância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados (Tabelas 1 a 5 e Figuras 1 a 33) representam a média das diversas determinações realizadas.

4.1. Análises da Matéria-prima

As análises de pH e sólidos solúveis foram efetuadas para caracterização da matéria-prima utilizada. Os resultados destas análises encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

4.2. Atividade da Polifenol Oxidase nas Frutas e Hortaliças "in natura"

Os resultados das análises da atividade ótima da polifenol oxidase determinada para as frutas e hortaliças "in natura" em estudo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 1. pH e sólidos solúveis das frutas "in natura".

Frutas	pH	Sólidos solúveis
Abacate	6,8	8,0
Banana	5,1	22,0
Maçã Ana	3,6	10,8
Maçã Fuji	3,8	9,8
Maçã Gala	3,8	11,8
Maçã Golden	3,5	10,4
Pêra	3,5	9,8
Pêssego	4,1	14,4

Tabela 2. pH e sólidos solúveis das hortaliças "in natura".

Hortaliças	pH	Sólidos solúveis
Batata	5,8	5,2
Berinjela	5,1	4,2
Cogumelo	6,3	4,8
Palmito (ponta)	6,7	4,0
Palmito (base)	6,8	4,4

Tabela 3. Atividade da polifenol oxidase nas frutas e hortaliças "in natura".

Frutas	Unidades/ml	Hortaliças	Unidades/ml
Abacate	15,7	Batata	14,2
Banana	68,5	Berinjela	16,6
Maçã Ana	4,9	Cogumelo	84,3
Maçã Fuji	6,3	Palmito(ponta)	19,2
Maçã Gala	3,0	Palmito(base)	37,8
Maçã Golden	5,3		
Pêra	11,3		
Pêssego	3,5		

No caso das frutas, as quatro variedades de maçã, assim como o pêssego, apresentaram baixa atividade enzimica. A maçã Gala e a banana foram as frutas em que a polifenol oxidase apresentou respectivamente a menor e a maior atividade (Tabela 3). Pode-se observar também que dentre as hortaliças, o cogumelo foi o que apresentou a maior atividade da enzima. Para o palmito, verifica-se que a atividade da polifenol oxidase é maior na base do que na ponta, confirmando os resultados encontrados por SILVA & NOGUEIRA (1983a).

De um modo geral, a atividade da polifenol oxidase foi maior nas hortaliças do que nas frutas.

4.3. Comportamento da atividade das enzimas

O cálculo de regressão polinomial possibilitou a verificação do comportamento da atividade da polifenol oxidase durante a reação de escurecimento.

A atividade da polifenol oxidase de todas as frutas em estudo caracterizou-se por um crescimento linear como pode-se observar pela Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização do comportamento da polifenol oxidase em frutas.

Frutas	Equação			r^2	F
	a	b	c		
Abacate	-0,2417	1,5962	-	0,9992	9,9924**
Banana	-1,5871	7,0732	-	0,9987	9,9874**
Maçã Ana	-0,2303	0,5164	-	0,9907	9,9068*
Maçã Fuji	0,3682	0,6124	-	0,9655	9,6545*
Maçã Gala	0,3038	0,2868	-	0,9815	9,8152*
Maçã Golden	0,2386	0,5402	-	0,9922	9,9216*
Pêra	0,8886	1,1153	-	0,9774	9,9774*
Pêssego	-0,2439	0,3764	-	0,9929	9,9290*

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% de probabilidade.

No caso das hortaliças, a atividade da polifenol oxidase também mostrou um crescimento linear como podemos verificar pela Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização do comportamento da polifenol oxidase em hortaliças.

Hortaliças	Equação			r^2	F
	a	b	c		
Batata	1,4394	1,4824	-	0,9288	9,2885*
Berinjela	3,6235	1,5480	-	0,8843	8,8428*
Cogumelo	25,5121	7,4133	-	0,7863	7,8633*
Palmito(base)	-0,8824	3,8635	-	0,9989	9,9887**
Palmito(ponta)	1,5954	1,7730	-	0,9888	9,8878*

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% de probabilidade.

SILVA (1981) ao estudar o comportamento da atividade da polifenol oxidase em frutas e hortaliças verificou que a atividade enzimática foi caracterizada por um crescimento linear para a banana, a pêra, o pêssego e o palmito (ponta e base), concordando com os resultados obtidos no presente estudo.

Os valores obtidos para os coeficientes de determinação (r^2) e F significativo a 5% de probabilidade e em alguns casos (abacate, banana, palmito base) até 1% de probabilidade indicam o grande ajuste dos dados obtidos à equação.

4.4. Efeito dos métodos de inativação enzimica

4.4.1. Polifenol oxidase em frutas

A atividade da polifenol oxidase em frutas será a seguir discutida, tendo em vista seu comportamento frente aos diversos tratamentos empregados.

As Figuras 1 a 10 tem a seguinte legenda:

A - Abacate	E - Maçã Gala
B - Banana	F - Maçã Golden
C - Maçã Ana	G - Pêra
D - Maçã Fuji	H - Pêssego

O método de inativação enzimica utilizando a adição de ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%) não apresentou eficácia nas frutas em estudo. Na Figura 1 verifica-se que a enzima permaneceu com 100% de atividade

para o abacate, maçã Ana e maçã Fuji. A menor resistência à inativação foi apresentada pela polifenol oxidase de maçã Golden que teve 47,2% de sua atividade inibida. De um modo geral, o tratamento em questão não foi eficiente na inibição da atividade da PFO nas frutas em estudo.

SILVA & NOGUEIRA (1983b) verificaram que o ácido ascórbico na concentração de 0,1% não foi eficaz para inativar a polifenol oxidase de pêra, banana, maçã e pêssego.

Figura 1. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Pela Figura 2 observa-se que com o tratamento usado conseguiu-se 100% de inativação enzimica para as quatro variedades de maçã, para a pêra e o pêssego. Por outro lado, a polifenol oxidase do abacate mostrou-se alta-

mente resistente a inativação não sendo inibida por este tratamento. A PFO de banana demonstrou pouca estabilidade a este método de inativação sendo sua atividade reduzida em 80,5%.

Segundo MONTGOMERY & PETROPAKIS (1980) para inativar a polifenol oxidase de pêra durante o processamento do suco foram necessários a adição de 330 ppm de ácido ascórbico e calor de 91°C/30 segundos.

Figura 2. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Quanto ao efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm), vê-se que apenas para a polifenol oxidase de maçã Golden e pêra ocorreu inibição da atividade

enzímica, embora em pequena extensão. As demais frutas apresentaram alta resistência ao tratamento, permanecendo a enzima com 100% de atividade (Figura 3).

Contrariando os resultados aqui obtidos FURIA (1977) afirmou que o EDTA exerce efeito sinérgico sobre a atividade antioxidante do ácido ascórbico, pois uma concentração de 1000 ppm de ácido ascórbico é necessária para evitar o escurecimento em maçãs enquanto a adição de 250 ppm de EDTA permite um controle eficaz com apenas 250 ppm de ácido ascórbico.

Figura 3. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Observando-se a Figura 4 constata-se que a polifenol oxidase do abacate foi a que se mostrou mais resistente ao tratamento de inativação mantendo 100% de atividade enzimica. Por outro lado este tratamento foi capaz de inibir em 100% a atividade da PFO de maçã Golden e do pêssgo e também mostrou-se eficaz para a maçã Ana, maçã Gala e pêra, inibindo a atividade da PFO em 97,9%, 93,3% e 94,2% respectivamente. Banana e maçã Fuji apresentaram resistência ao tratamento em estudo, tendo sua atividade enzimica reduzida em apenas 37,8% e 9,5% respectivamente.

Figura 4. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Na Figura 5 está demonstrado o efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase das frutas em estudo. Mais uma vez, a PFO do abacate, maçã Ana e maçã Fuji apresentaram maior estabilidade não sendo inibidas por este tratamento. As frutas restantes também mostraram pouca sensibilidade sofrendo pequena inibição como se pode observar no gráfico.

Figura 5. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

O tratamento aplicado mostrado na Figura 6, apresentou efeitos variados nas diferentes frutas. O abacate, como se tem observado, mostrou grande resistência ao tratamento que inibiu apenas 2,2% da atividade original de sua enzima. Banana e maçã Fuji foram pouco sensíveis ao tratamento apresentando valores baixos de inibição (71,0% e 28,6% respectivamente). Por outro lado, este método de inativação mostrou-se eficaz para a maçã Ana, maçã Gala, maçã Golden, pêra e pêssago, que sofreram 100% de inibição, com exceção da pêra que teve sua atividade enzimica reduzida em 99,1%.

Figura 6. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Figura 7. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e metabisulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

A adição de ácido ascórbico (0,1%) e metabisulfito de sódio (0,05%) como método de inibição da atividade da polifenol oxidase mostrou-se eficaz para a maioria das frutas (Figura 7). Com este tratamento conseguiu-se 100% de inibição enzimática para as frutas, exceto para a banana, que teve sua atividade enzimática reduzida em 97,9%. Como visto anteriormente, para outros

tratamentos, o abacate apresentou maior resistência, mantendo 100% da atividade da PFO.

O metabissulfito de potássio a 0,05% por si só foi suficiente para promover total inibição da polifenol oxidase de maçã e pêssago, segundo SILVA & NOGUEIRA (1983b).

Figura 8. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

A Figura 8 demonstra claramente a grande sensibilidade da enzima das frutas ao tratamento aplicado. Para todas as frutas houve completa inibição da atividade da polifenol oxidase, com exceção do abacate que obteve uma redução de 77,3% da sua atividade enzimica. Este método apresentou-se muito eficaz na inibição da atividade da PFO.

Pela observação da Figura 9 pode-se verificar que a PFO de todas as frutas em estudo não apresentou resistência à inativação por este método, ocorrendo 100% de inibição em todos os casos.

Figura 9. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Figura 10. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em frutas.

Quanto a aplicação do tratamento mostrado na Figura 10, verifica-se que os resultados encontrados foram os mesmos obtidos na Figura 9, como era de se esperar. A sensibilidade da enzima polifenol oxidase das frutas em estudo foi tal, que sua atividade foi 100% inibida.

Comparando-se os resultados mostrados nas Figuras 1 a 6 pode-se concluir que no caso das frutas em estudo os tratamentos incluindo ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%); ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) assim como ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) não foram eficazes na inibição da polifenol

oxidase. Porém, quando houve o emprego do calor (Figuras 2, 4 e 6) ocorreu um grande aumento na inativação enzimica especialmente para as maçãs Ana, Gala e Golden, para a pêra e o pêssego. Observa-se ainda que a enzima proveniente de banana e abacate mostrou-se resistente a todos os tratamentos (Figuras 1 a 6) inclusive quando houve uso de calor.

SILVA & NOGUEIRA (1983a) observaram que a polifenol oxidase de pêra, maçã e pêssego apresentou pouca resistência à inativação térmica, sendo totalmente inibida a 80°C/2 minutos.

SANCHEZ-NIEVA & MERCADO (1978) citam a polifenol oxidase proveniente de banana como sendo altamente resistente ao calor. O mesmo afirmam GALEAZZI & SGARBIERI (1981) ao observarem que a 75°C/15 minutos não houve inativação enzimica, o que ocorreu somente a 95°C/5 minutos.

Com relação ao uso do EDTA podemos observar que não houve ação sinérgica com os outros aditivos a ele associados. Pode-se notar que o uso isolado do ácido ascórbico, ácido cítrico e calor foi mais eficaz que a associação com o EDTA. Esta observação coincide com a encontrada recentemente por PASCHOALINO (1989) em seu trabalho com palmito.

IADEROZA *et alii* (1980), verificaram que o uso do EDTA (0,03M) inibiu apenas 8% da atividade da polifenol oxidase de abacate. KAHN (1977), também observou que o EDTA foi um fraco inibidor para o abacate.

O EDTA também mostrou-se um inibidor ineficaz para a polifenol oxidase de pêssego segundo VAMOS-VIGYÁZÓ & MIHALYI (1976) e LUH & PHITHAKPOL (1972).

Os tratamentos incluindo metabissulfito de sódio (Figuras 7 a 10) mostraram-se eficazes para todas as frutas com exceção do abacate, no caso dos tratamentos mostrados nas Figuras 7 e 8.

4.4.2. Polifenol oxidase em hortaliças

A seguir será discutido o comportamento da atividade polifenol oxidase das hortaliças em resposta aos diferentes tratamentos aplicados.

Para as Figuras 11 a 20 será utilizada a seguinte legenda:

- A - Batata
- B - Berinjela
- C - Cogumelo
- D - Palmito (base)
- E - Palmito (ponta)

A resposta da enzima polifenol oxidase ao método de inativação enzimica mostrado na Figura 11 não foi satisfatória. O cogumelo apresentou alta resistência ao

tratamento, uma vez que a atividade da PFO foi inibida em apenas 5,5%. A hortaliça que melhor respondeu ao método usado foi o palmito, onde a PFO proveniente de sua base sofreu 95,3% de inibição e a enzima da ponta sofreu uma inativação de 89,2%. Por outro lado, batata e berinjela foram bem mais resistentes ao tratamento aplicado (48,6% e 42,2% de inibição respectivamente).

Segundo SILVA & NOGUEIRA (1983b) o ácido ascórbico na proporção de 0,1% foi ineficiente para controlar o escurecimento enzimático em palmito (ponta e base).

Figura 11. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Quanto ao efeito do método de inativação enzimica mostrado na Figura 12, verificou-se um aumento de eficácia na inibição da PFO em comparação ao tratamento anterior. A berinjela foi a hortaliça que mostrou maior resistência ao tratamento, apresentando uma inibição de 84,3%. As enzimas provenientes do cogumelo, palmito base e palmito ponta mostraram-se bastante sensíveis ao tratamento em questão (97,9%, 96,9% e 95,2% de inibição respectivamente).

Figura 12. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

O tratamento empregando a adição de ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) não foi eficaz. As hortaliças em questão não tiveram a atividade da polifenol oxidase afetada, exceto o palmito (ponta) que apresentou uma inibição de 53,9% (Figura 13).

Segundo BERNHARDT *et alii* (1978) o EDTA não surtiu efeito mensurável na inibição da atividade da polifenol oxidase de palmito.

Figura 13. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Pela Figura 14, verifica-se que o tratamento empregado apresentou efeito variado nas diferentes hor-

taliças em estudo. Berinjela e palmito (base) foram as hortaliças cuja atividade enzimática foi menos afetada pelo tratamento, apresentando uma inibição enzimática de 12,7% e 15,4% respectivamente. Batata, cogumelo e palmito (ponta), por sua vez, mostraram maior sensibilidade ao método em questão apresentando 77,1%, 96,9% e 65,3% de inibição enzimática respectivamente.

Fazendo-se uma comparação com o tratamento anterior verifica-se que a inclusão do calor aumentou significativamente a inibição enzimática para a batata e cogumelo.

Figura 14. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Quanto ao método de inativação enzimica mostrado na Figura 15, observa-se uma baixa eficácia na inibição da atividade da polifenol oxidase das hortaliças em estudo. O palmito (base) e palmito (ponta) apresentaram maior inibição enzimica (94,5% e 85,2% respectivamente). Por outro lado, a PFO do cogumelo mostrou-se altamente resistente ao tratamento. As hortaliças restantes, batata e berinjela sofreram um controle parcial apresentando 48,9% e 49,1% de inibição enzimica respectivamente.

Figura 15. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Observando-se a Figura 16 vê-se que a polifenol oxidase proveniente da batata não apresentou resistência ao tratamento de inativação, sendo totalmente inibida. A PFO das outras hortaliças em estudo não sofreu total inibição enzimica, embora tenha apresentado alta taxa de inibição. Dentre estas, a enzima da berinjela foi a que apresentou menor sensibilidade ao tratamento sofrendo 91,3% de inibição.

Figura 16. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

O emprego de ácido ascórbico e metabissulfito de sódio apresentou efeito variado na inibição da atividade da polifenol oxidase das hortaliças em estudo. Obteve-se 100% de inibição para a PFO proveniente de batata e palmito (base). A PFO originária do palmito (ponta) não foi totalmente inibida, apresentando 95,0% de inibição. Por outro lado este tratamento surtiu pouco efeito sobre a atividade da PFO da berinjela e do cogumelo (12,7% e 25,4% de inibição respectivamente).

Figura 17. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Pela Figura 18 observa-se que com o tratamento empregado conseguiu-se 100% de inibição enzimica para a batata, cogumelo e palmito (ponta e base). Houve resistência à inativação enzimica pela berinjela que apresentou apenas 68,9% de inibição da polifenol oxidase com o emprego do método em questão.

Figura 18. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), metabisulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

O gráfico da Figura 19 mostra a alta sensibilidade da polifenol oxidase tanto de batata, quanto do palmito (ponta e base) em relação ao tratamento em questão, pois a enzima foi completamente inativada. Por outro lado, a PFO proveniente da berinjela e do cogumelo mostrou-se mais resistente apresentando 89,8% e 62,8% de inibição respectivamente.

Figura 19. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e metabissulfito de sódio (0,05%) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Figura 20. Efeito da adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos) na atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

A Figura 20 demonstra claramente a alta sensibilidade da enzima das hortaliças ao tratamento utilizado. Para todas as hortaliças, com exceção da berinjela (98,2% de inativação) a polifenol oxidase sofreu completa inativação.

Comparando-se os resultados mostrados nas Figuras 11 a 20 verifica-se que para todas as hortaliças em estudo os tratamentos empregando o ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%); ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm) assim como ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e

EDTA (30 ppm) não foram eficazes na inibição da polifenol oxidase. Porém ao ser incluído o calor (Figuras 12, 14 e 16) observa-se um aumento significativo na inibição enzimica.

De acordo com TWIGG *et alii* (1974), o ácido cítrico a 1,5% juntamente com o ácido ascórbico a 1,5% não surtiram efeito no controle do escurecimento enzimico em batatas. A polifenol oxidase de batata mostrou-se altamente resistente ao calor não sendo inativada a 70°C/2 minutos (SILVA & NOGUEIRA, 1983a). Entretanto, pode-se verificar no presente estudo que o emprego de calor potencializou a ação do ácido ascórbico e ácido cítrico na inativação da polifenol oxidase.

O EDTA usado em associação apenas com o ácido ascórbico não surtiu efeito na inibição da polifenol oxidase em hortaliças.

MAHONEY & GRAF (1986), estudaram a ação do EDTA como pró-oxidante em sistemas modelo. Metais como cobre e ferro são catalizadores eficazes de reações oxidativas e os autores verificaram que o complexo formado por ferro e EDTA possui maior solubilidade e maior potencial de oxirredução que o ferro sozinho favorecendo mais ainda a ocorrência de reações oxidativas.

Comparando-se a Figura 13 com a Figura 15 observa-se que a associação do ácido cítrico ao EDTA foi responsável por significativa inibição na atividade enzimica. Isto pode ser explicado pelo fato do EDTA formar complexos

estáveis com cobre em meio ácido (FURIA, 1977), e o ácido cítrico tendo diminuído o pH pode ter concorrido para o aumento na inibição da polifenol oxidase.

O tratamento da Figura 16 difere daquele da Figura 12 apenas pela adição do EDTA. Observando os resultados obtidos podemos notar que o EDTA não contribuiu para melhorar a inibição enzimática exceto em pequena extensão para a berinjela. Porém, segundo KNAPP (1961) este composto se mostrou eficaz na inibição da polifenol oxidase de berinjela.

Em estudo realizado por SILVA & NOGUEIRA (1983b) verificou-se que o metabissulfito de potássio a 0,05% e o ácido ascórbico a 0,1% quando empregados individualmente não proporcionaram inibição eficaz da polifenol oxidase de batata e palmito (base). Pela Figura 17 pode-se notar uma ação sinérgica destes 2 compostos inibindo totalmente a polifenol oxidase de batata e palmito (base).

Para a polifenol oxidase de berinjela, cogumelo e palmito o calor potencializou a ação dos compostos químicos (Figura 18).

A Figura 19 mostra que houve uma pequena melhora na inativação enzimática em relação ao tratamento da Figura 17. Isto deve ter ocorrido devido à adição do ácido cítrico, diminuindo o pH e aumentando a ação do SO_2 como inibidor da reação de oxidação (MUNETTA & WANG, 1977).

4.5. Efeito comparativo dos métodos de inativação enzimica por tipo de fruta

A atividade da polifenol oxidase será a seguir discutida, visando uma comparação do efeito dos diversos tratamentos sobre cada fruta em particular.

Os diversos tratamentos constantes das Figuras 21 a 28 têm a seguinte legenda:

- T₁ - ácido ascórbico (0,1%) e ácido cítrico (0,2%)
- T₂ - ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70°C/2 minutos)
- T₃ - ácido ascórbico (0,1%) e EDTA (30 ppm)
- T₄ - ácido ascórbico (0,1%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos)
- T₅ - ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e EDTA (30 ppm)
- T₆ - ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), EDTA (30 ppm) e calor (70°C/2 minutos)
- T₇ - ácido ascórbico (0,1%) e metabissulfito de sódio (0,05%)
- T₈ - ácido ascórbico (0,1%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos)
- T₉ - ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e metabissulfito de sódio (0,05%)

T₁₀- ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%), metabissulfito de sódio (0,05%) e calor (70°C/2 minutos).

A polifenol oxidase presente no abacate apresentou resistência à maioria dos tratamentos (Figura 21). A enzima não foi inibida pelos tratamentos envolvendo apenas ácido cítrico, ácido ascórbico, EDTA e calor. O tratamento T₉ que incluiu ácido cítrico, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, promovendo 100% de inibição enzimática é o método mais indicado para esta fruta. O tratamento T₁₀ embora promovendo também 100% de inativação inclui ainda o calor e, portanto o anterior deve ser o preferido. Neste caso, não foi encontrado um método alternativo para substituir totalmente o emprego de SO₂.

No caso da banana os tratamentos mais eficientes foram T₇, T₈, T₉ e T₁₀, todos eles contendo em comum os compostos ácido ascórbico e metabissulfito de sódio (Figura 22). Os tratamentos T₂ e T₆ resultaram num alto valor de inibição enzimática, 80,6% e 71,0% respectivamente. Os métodos de inativação empregando os tratamentos T₁, T₄ e T₅ não foram satisfatórios, ocasionando pequena inibição. A adição de ácido cítrico e EDTA (T₃) não surtiu efeito, pois a enzima permaneceu com sua atividade

original. Para a banana o tratamento mais indicado para a inativação da PFO é o T7, que emprega a combinação de apenas 2 componentes (ácido ascórbico e SO₂). Como alternativa para substituição do SO₂, o tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) parece ser o mais indicado.

A adição de 0,1% de metabissulfito de sódio e 0,2% de ácido cítrico à polpa de banana mostrou-se mais eficaz na prevenção do escurecimento que o uso do metabissulfito sozinho (PINTAURO, 1974).

Figura 21. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em abacate.

Figura 22. Efeito dos métodos de inativação enzimática na atividade da polifenol oxidase em banana.

A Figura 23 mostra o efeito dos diversos métodos de inativação enzimática sobre a polifenol oxidase de maçã Ana. Os métodos T1, T3 e T5, tendo em comum a não utilização de metabissulfito de sódio e calor não promoveram inibição enzimática. Todos os tratamentos empregando calor e/ou adição de metabissulfito (T2, T4, T6 a T10) foram

altamente eficientes na inativação da PFO. Assim, neste caso, como método alternativo ao emprego de SO_2 , o tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) é o mais indicado para o controle da PFO.

Figura 23. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Ana.

A enzima polifenol oxidase proveniente da maçã Fuji foi 100% inibida por todos os métodos contendo metabissulfito de sódio (T7, T8, T9 e T10), assim como pelo tratamento T2 (Figura 24). Os demais tratamentos (T1, T3, T4, T5 e T6) promoveram baixa inibição e não devem ser considerados. Para a maçã Fuji o tratamento mais recomendado é também o T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor), especialmente quando o emprego do SO₂ é indesejável.

Figura 24. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Fuji.

Dentre as frutas estudadas, a maçã Gala (Figura 25), foi a que apresentou a PFO com maior sensibilidade aos tratamentos que incluíram metabissulfito de sódio e/ou calor (T2, T4, T6 a T10). Os demais tratamentos (T1, T3 e T5) não foram eficientes no controle da atividade da PFO. Também neste caso, o tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) pode ser indicado como o mais adequado principalmente como método alternativo ao emprego do SO₂.

Figura 25. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em maçã Gala.

Comparando-se os efeitos dos métodos de inativação sobre a atividade da polifenol oxidase de maçã Golden verifica-se que os tratamentos T₁, T₃ e T₅ não foram eficazes (Figura 26). Estes tratamentos têm em comum a ausência de metabissulfeto de sódio e calor. Todos os outros tratamentos (T₂, T₄, T₆ a T₁₀) ocasionaram 100% de inibição enzimática, porém o T₂ e o T₄ são os mais recomendados por não incluírem o SO₂.

Figura 26. Efeito dos métodos de inativação enzimática na atividade da polifenol oxidase em maçã Golden.

A polifenol oxidase da pêra apresentou alta sensibilidade aos tratamentos T2, T4 e T6 a T10. Estes tratamentos tem em comum a presença de metabissulfito de sódio e/ou calor e neste caso são portanto os mais eficientes. Mais uma vez T2 é o tratamento que deve ser recomendado por não incluir o SO₂ em sua composição. Por outro lado, os tratamentos T1, T3 e T5 devem ser descartados considerando a baixa eficiência que tiveram no controle da atividade da PFO (Figura 27).

Figura 27. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em pêra.

O pêssego apresentou resultados semelhantes à maçã Golden com relação ao controle da atividade da polifenol oxidase. Os tratamentos T₁, T₃ e T₅ apresentaram baixa eficiência, porém os tratamentos restantes (T₂, T₄, T₆ a T₁₀) proporcionaram uma inativação completa da enzima. Por não incluir o SO₂, T₂ e T₄ são os tratamentos mais indicados no controle da PFO do pêssego (Figura 28).

Figura 28. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em pêssego.

Analisando as Figuras 21 a 28 notamos que dentre todas as frutas estudadas, a polifenol oxidase do

abacate foi a que mostrou maior resistência à maioria dos tratamentos sendo eficazes apenas o T₉ e T₁₀. Pode-se notar que a única diferença entre o T₇ e o T₉ é a adição do ácido cítrico e verifica-se que com a associação deste composto com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio houve uma ação sinérgica pois a enzima foi 100% inibida. Com a diminuição do pH do meio devida a adição do ácido cítrico, ocorre, conseqüentemente, aumento da inibição da oxidação pelo SO₂ (MUNETTA & WANG, 1977).

IADEROZA *et alii* (1980) cita o metabissulfito de potássio como sendo o inibidor mais eficaz da polifenol oxidase de abacate.

O tratamento alternativo indicado para substituir o SO₂ para o caso das frutas foi o T₂, que inclui a adição de ácido ascórbico, ácido cítrico e calor. Para o abacate não foi encontrado nenhum método alternativo para o SO₂.

As maçãs com exceção da variedade Fuji e o pêssego mostraram-se sensíveis a todos os tratamentos que incluíam o calor. SILVA & NOGUEIRA (1983a e b) citam que o calor (70°C/2 minutos) e ácido ascórbico (0,1%) quando empregados individualmente não inibiram a polifenol oxidase de maçã e pêssego. No presente estudo pode-se notar que a associação de pelo menos calor e ácido ascórbico já foi suficiente para inativar a enzima proveniente da maçã e pêssego.

4.6. Efeito comparativo dos métodos de inativação enzimica por tipo de hortaliça

Assim como para as frutas, a atividade da polifenol oxidase será discutida fazendo-se uma comparação do efeito dos diversos métodos sobre cada hortaliça em particular.

Os tratamentos constantes das Figuras 29 a 33 possuem a mesma legenda citada no item 4.5.

Figura 29. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em batata.

O gráfico apresentado na Figura 29 mostra que a polifenol oxidase da batata sofreu 100% de inibição quando aplicados os tratamentos T2 e T6 a T10. A enzima apresentou-se altamente resistente ao tratamento T3 (0,0% de inibição). Os tratamentos restantes (T1, T4 e T5), também não foram eficientes, proporcionando apenas uma inibição parcial da enzima. O tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) pode ser indicado como o mais adequado, principalmente como método alternativo ao emprego do SO₂.

Figura 30. Efeito dos métodos de inativação enzimática na atividade da polifenol oxidase em berinjela.

Dentre as hortaliças, a polifenol oxidase da berinjela foi a que apresentou maior resistência aos tratamentos aplicados. Nenhum dos tratamentos foi capaz de inibir totalmente a atividade enzimica. A adição de ácido ascórbico, ácido cítrico, metabissulfito de sódio e calor (T10), resultou em 98,2% de inibição sendo o tratamento mais eficaz. O método de menor eficácia foi o T3, pois não ocasionou nenhuma alteração na atividade enzimica (Figura 30). Como método alternativo ao emprego do SO₂, o tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) pode ser recomendado uma vez que proporcionou 84,3% de inibição da PFO.

Figura 31. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em cogumelo.

Na Figura 31 observa-se que a inibição total da atividade da polifenol oxidase do cogumelo só foi obtida com tratamentos empregando em conjunto o metabissulfito de sódio e calor (T8 e T10). Outros métodos como T2, T4 e T6 foram também altamente eficientes na inibição da PFO e desta forma o tratamento T2 é o mais indicado como substituto ao emprego do SO₂. Os tratamentos restantes foram pouco eficazes principalmente o T3, que manteve a atividade enzimática inalterada.

Figura 32. Efeito dos métodos de inativação enzimática na atividade da polifenol oxidase em palmito (base).

A polifenol oxidase extraída da base do palmito sofreu 100% de inibição enzimica quando exposta aos tratamentos T7 a T10, todos eles empregando metabissulfito de sódio. Os outros métodos estudados, exceto T3 e T4, também apresentaram alto valor de inibição e assim também neste caso, o tratamento T2 (ácido ascórbico, ácido cítrico e calor) é o mais indicado para o controle da atividade da enzima pois não inclui o SO₂ em sua composição.

Figura 33. Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase em palmito (ponta).

Na Figura 33 verifica-se que a polifenol oxidase da ponta do palmito também foi inibida totalmente pelos tratamentos T₈ a T₁₀, todos contendo metabissulfito em sua composição. Foram também altamente eficientes os tratamentos T₁, T₂, T₅, T₆ e T₇ e mais uma vez o tratamento T₂ deve ser considerado como o método alternativo mais adequado ao emprego do SO₂. Já, os tratamentos T₃ e T₄ foram muito pouco eficazes, sendo que o primeiro não teve efeito sobre a atividade enzimática.

Analisando-se as Figuras 29 a 33 observa-se que dentre as hortaliças estudadas a polifenol oxidase de berinjela foi a que apresentou maior resistência não sendo totalmente inibida por nenhum dos tratamentos propostos. Batata e palmito base foram as hortaliças que apresentaram de um modo geral, maior sensibilidade à maioria dos tratamentos.

A polifenol oxidase de cogumelo mostrou-se pouco sensível à aplicação de compostos químicos. Por outro lado, todos os tratamentos incluindo calor resultaram em alto valor de inibição enzimática. Segundo McCORD & KILARA (1983) a polifenol oxidase de cogumelo é facilmente inativada pelo calor quando exposta a temperaturas acima de 70°C.

Dentre todos os tratamentos estudados pode-se indicar o T₂ como o método alternativo ao uso de SO₂ para as hortaliças estudadas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho possibilitaram chegar às seguintes conclusões:

- Para as frutas, de um modo geral, o método mais adequado para a inativação da polifenol oxidase foi o tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e metabissulfito de sódio.

- Com exceção do abacate, o tratamento com ácido ascórbico, metabissulfito de sódio e calor, também promoveu inibição completa da polifenol oxidase nas frutas estudadas.

- Os métodos de inativação menos eficazes para as frutas foram aqueles que empregaram ácido ascórbico e EDTA.

- A polifenol oxidase proveniente das frutas, com exceção do abacate, mostrou-se bastante sensível ao tratamento térmico apresentando elevadas taxas de inibição

quando submetidas aos métodos que incluíram a aplicação de calor. Esta mesma observação pode ser estendida ao emprego do metabissulfito.

- Para as frutas, com exceção do abacate, o método alternativo mais indicado para substituir o SO_2 foi o tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e calor.

- Para o abacate em particular, o tratamento mais indicado para inativar a polifenol oxidase foi o que empregou a combinação de ácido cítrico, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio.

- Maçã Golden e pêssego apresentaram a enzima mais sensível sendo inibida pela maioria dos tratamentos.

- A polifenol oxidase mais resistente aos métodos de inibição dentre as frutas estudadas foi a proveniente do abacate.

- Para as hortaliças, de um modo geral, o melhor método de inativação para a polifenol oxidase foi a combinação de ácido ascórbico, ácido cítrico, metabissulfito de sódio e calor.

- O método menos eficaz para a inativação da polifenol oxidase das hortaliças foi o que incluiu a adição de ácido ascórbico e EDTA.

- Dentre as hortaliças, a polifenol oxidase proveniente da berinjela foi a que mostrou maior resistência, não sendo totalmente inativada por nenhum dos tratamentos aplicados.

- A batata foi a hortaliça que apresentou a polifenol oxidase mais sensível sendo inibida pela maioria dos tratamentos empregados.

- Como método alternativo ao emprego do SO_2 , o tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e calor é o mais indicado para a inativação da polifenol oxidase das hortaliças.

- Para as hortaliças e em particular para o cogumelo, o tratamento térmico foi um fator importante para a inativação enzimica pois a maioria dos tratamentos incluindo calor promoveram alta taxa de inibição.

- A polifenol oxidase proveniente das frutas, apresentou em termos gerais, maior resistência à inativação que a PFO das hortaliças.

- Tanto para a polifenol oxidase das frutas quanto para a das hortaliças, o método de inativação enzimica menos eficaz foi a adição de ácido ascórbico e EDTA.

- Tanto para a polifenol oxidase proveniente das frutas quanto das hortaliças, o método de inativação enzimica que de um modo geral, se mostrou mais eficaz foi a combinação de ácido ascórbico, ácido cítrico, metabissulfito de sódio e calor.

- Como conclusão final pode-se dizer que tanto para a polifenol oxidase proveniente do extrato enzimico brutodas frutas (exceção do abacate) quanto das hortaliças, o método de inativação incluindo apenas a adição de ácido ascórbico (0,1%), ácido cítrico (0,2%) e calor (70 °C/2 minutos), parece ser o mais recomendado, já que o objetivo deste estudo é encontrar métodos alternativos para substituir o uso do SO₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.B. & BLUNDSTONE, H.A.W. Canned fruits other than citrus. In: HULME, A.C., ed. The biochemistry of fruits and their products. London, Academic Press, 1971, vol. 2, p.507-41.
- ANDRESS, C. Ingredient, package, process system in alternative to sulfites. Food Proceedings, London, 48(5): 54-5, 1987.
- AYLWARD, F.R. & HAISMAN, D.R. Oxidation systems in fruits and vegetables, their relation to the quality of preserved products. Advances in Food Research, New York, 17: 1-57, 1969.
- BAUERNFEIND, J.C. & PINKERT, D.M. Food processing with added ascorbic acid. Advances in Food Research, New York, 18: 219-315, 1970.
- BENJAMIN, N.D. & MONTGOMERY, M.W. Polyphenoloxidase of royal ann cherries: purification and characterization. Journal of Food Science, Chicago, 38: 799-806, 1973.

- BERNHARDT, L.W.; LIMA, D.C.; YANG, J.F.; SOARES, G.J.D. Melhoria das técnicas de processamento de palmito enlatado. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9: 43-62, 1978.
- CONSTANTINIDES, S.M. & BEDFORD, C.L. Multiple forms of phenoloxidases. *Journal of Food Science*, Chicago, 32: 446-50, 1967.
- COSETENG, M.Y. & LEE, C.Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, Chicago, 52(4): 985-9, 1987.
- EMBS, R.J. & MARKAKIS, P. The mechanism of sulfite inhibition on browning caused by polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, Chicago, 30(5): 753-8, 1965.
- ESKIN, N.A.M.; MENDERSON, H.M., TOWNSEND, R.J. *Biochemistry of foods*. London, Academic Press, 1971. 293p.
- FINKLE, B.J. & NELSON, R.F. Enzyme reaction phenolic compounds: effect of o-methyltransferase on a natural substrate of fruit polyphenoloxidase. *Nature*, London, 197: 902-3, 1963.
- FLURKEY, W.M. & JEN, J.J. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, Chicago, 43: 1826-31, 1978.
- FURIA, T.E. Sequestrants in Food. In: FURIA, T.E., *CRC Handbook of food additives*, Ohio, CRC Press Inc., 1977. vol 1, cap. 6, p.271-94.

- GAJZÁGÓ, I.; VAMOS-VIGYÁZÓ, L.; NADUDVARI-MÁRKUS, V. Investigations into the enzymic browning of apricot cultivars. *Acta Alimentaria*, Budapest, 6(1): 95-104, 1977.
- GALEAZZI, M.A.H. Extração, purificação e propriedades da polifenoloxidase da banana nanica (*Musa cavendishii* L.). Campinas, 1978. 195p. (Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - UNICAMP). Apud. *Informativo Anual da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - UNICAMP*. Campinas, (7): 54-8, 1979 (Resumo).
- GALEAZZI, M.A.M. Comportamento das polifenoloxidases em alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Guatemala, 34(2): 269-89, 1984.
- GALEAZZI, M.A. & SGARBIERI, V.C. Substrate specificity and inhibitor of polyphenoloxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa canesdishii*, L.). *Journal of Food Science*, Chicago, 46: 1404-6, 1981.
- GOLAN, A.; KAHN, V.; SADOVSKI, A.Y. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the fuerte and lerman cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 25(6): 1253-9, 1977.
- GOODENOUGH, P.W. The o-diphenol-oxygen-oxidoreductase of *Agaricus bisporus*: Activity and multiple forms during ageing. *Phytochemistry*, 17: 633-36, 1978.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1960. 229p. (Publicação didática nº 2).

- HAISMAN, D.R. The effect of sulfur dioxide on oxidising systems in plant tissues. *Journal of the Science of Food Agriculture*, London, 25(7): 803-10, 1974.
- HSU, A.F.; SHIEH, J.J.; BILLS, D.D.; WHITE, K. Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. *Journal of Food Science*, Chicago, 53(3): 765-71, 1988.
- IADEROZA, M.; DRAETTA, I.S.; PADULA, M. Polifenol oxidase de duas cultivares de abacate. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 11: 53-64, 1980.
- JAYARAMAN, K.S.; RAMANUJA, M.N.; DHAKWE, Y.S.; VIJAYA-RAGHAVAN, P.K. Enzymatic browning in some banana varieties as related to polyphenoloxidase activity and other endogenous factors. *Journal of Food Science and Technology*, Mysore, 19(5): 181-6, 1982.
- JOSLYN, M.A. *Methods in food analysis*. 2ed. New York, Academic Press, 1970. 845p.
- KAHN, V. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *Journal of Science and Food Agriculture*, London, 36(9): 1925-32, 1975.
- KAHN, V. Effect of some phenolic compounds on the oxidation of 4-methyl catechol catalyzed by avocado polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, Chicago, 41(5): 1011-2, 1976.

- KAHN, V. Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *Journal of Food Science, Chicago*, 42(1): 38-43, 1977.
- KAHN, V. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenoloxidase of mushroom, avocado, and banana. *Journal of Food Science, Chicago*, 50: 111-4, 1985.
- KNAPP, F.W. Browning enzymes of egg plant. *Proc. of Florida State Horticulture Society, Lake Alfred*, 74: 256-9, 1961.
- KNAPP, F.W. Some characteristics of egg plant and avocado polyphenolases. *Journal of Food Science, Chicago*, 30: 930-6, 1965.
- LUH, B.S. & PHITHAKPOL, B.K. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *Journal of Food Science, Chicago*, 37: 1264-7, 1972.
- MAHONEY, J.A. & GRAF, E. Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric acidant EDTA as oxidants in model systems. *Journal of Food Science, Chicago*, 51(5): 1293-6, 1986.
- MATHEW, A.G. & FARPIA, H.A.B. Food browning as a polyphenoloxidase reaction. *Advances in Food Research, New York*, 19: 75-145, 1971.
- MCCORD, J.D. & KILARA, A. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science, Chicago*, 48: 1479-83, 1983.

- MIHALYI, K.; VAMOS-VIGYAZÓ; KISS-KUTZ, N.; BABOS-SZEBENYI, E. The activities of polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature. *Acta Alimentaria*, Budapest, 7(1): 57-67, 1978.
- MONTGOMERY, M.W. Cysteine as an inhibitor of browning in pear juice concentrate. *Journal of Food Science*, Chicago, 48: 951-2, 1983.
- MONTGOMERY, M.W. & PETROPAKIS, H.J. Inactivation of Bartlett pear polyphenoloxidase with heat in the presence of ascorbic acid. *Journal of Food Science*, Chicago, 45(4): 1090-1, 1980.
- MONTGOMERY, M.W. & SGARBIERI, V.C. Isoenzymes of banana polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, Oxford, 14(5/6): 1245-9, 1975.
- MUNETTA, P. Bissulfite inhibition of enzymatic blackening caused by tirosine oxidation. *American Potato Journal*, New Jersey, 43: 397-41, 1966.
- MUNETTA, P. & WANG, H. Influence of pH and bissulfite on the enzymatic blackening reaction in potatoes. *American Potato Journal*, New Jersey, (2): 73-81, 1977.
- NOGUEIRA, J.N. Influência de alguns métodos de processamento nas propriedades organolépticas da maçã em pedaços: variedade Bucker do Brasil. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Piracicaba, 30: 227-39, 1973a.

- NOGUEIRA, J.N. Influência de alguns métodos de processamento nas propriedades organolépticas da maçã em pedaços: variedade Ohio Beauty. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 30: 241-53, 1973b.
- NOGUEIRA, J.N. Estudo sobre o processamento do palmito (*Euterpe edulis* Mart.) por apertização. Piracicaba, 1979. 141p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PARK, Y.K.; SATO, H.H.; ALMEIDA, T.D.; MORETTI, R.H. Polyphenoloxidase of mango (*Mangifera indica* var. Haden). Journal of Food Science, Chicago, 45(6): 1619-21, 1980.
- PASCHOALINO, J.E. Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o processamento. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 56: 175-81, 1978.
- PASCHOALINO, J.E. & BERNHARDT, L.W. Influência dos métodos de exaustão sobre a qualidade do palmito enlatado. Coleção do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9: 15-25, 1978.
- PASCHOALINO, J.E. Cinética do amolecimento térmico do palmito (*E. edulis* L.) e prevenções do seu escurecimento na esterilização em autoclave. São Paulo, 1989. 102p. (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP).
- PINTAURO, N.D. Food additives to extend sheft life. London, Noyes Data, 1974. 397p.

- PONTING, J.D. The control of enzymatic browning of fruits.
In: SCHULTZ, H.W., ed. Food enzymes. Westport, AVI
Publ., 1960. p.105-24.
- PONTING, J.D. & JACKSON, R. Pre-freezing processing of
golden delicious apple slices. Journal of Food Science,
Chicago, 37: 812-14, 1972.
- PONTING, J.D. & JOSLYN, M.A. Ascorbic acid oxidation and
browning in apple tissue extracts. Archives of Biochemistry,
New York, 19: 44-63, 1948.
- POTTER, N.N. Food Science. Westport, AVI Publishing,
1973. 706p.
- PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. Polyphenols of avocado
(*Persia americana*) and their endogenous oxidation.
Journal of Food Science and Technology, Mysore, 17(5):
215-17, 1980.
- PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. A comparison of the poly-
phenolic patterns in some indian varieties of apples and
their endogenous oxidation. Journal of the Food Science
and Technology, Mysore, 22(6): 404-7, 1985a.
- PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. A comparison of the brow-
ning potential of some indian cultivars of ripening
apples II. Journal of Food Science and Technology, My-
sore, 22(6): 431-433, 1985b.
- PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. Endogenously oxidizable
polyphenols of mango, sapota and banana. Acta Alimenta-
taria, Budapest, 15(2): 123-28, 1986a.

- PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. In vitro effect of polyphenols on some enzyme systems. *Acta Alimentaria*, Budapest, 15(2): 125-35, 1986b.
- RANADIVE, A.S. & HAAR, N.F. Changes in polyphenolics on ripening of selected pear varieties. *Journal of Science and Food Agriculture*, London, 22: 86-90, 1971.
- REED, G. & UNDERKOFER, L.A. *Enzymes in food processing*. New York, Academic Press, 1966. 483p.
- REYES, P. & LUH, B.S. Ascorbic and isoascorbic acids as antioxidants for frozen freestone peaches. *Food Technology*, Chicago, 16(3): 116-8, 1962.
- SANCHES-NIEVA, F. & MERCADO, M. Control of enzymatic browning in green bananas for freezing. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, Rio Piedras, 62(3): 232-40, 1978.
- SAPERS, G.M. & ZIOLKOWSKI, M.A. Comparison of erythorbic and ascorbic acids as inhibitors of enzymatic browning in apple. *Journal of Food Science*, Chicago, 52(6): 1792-3, 1987.
- SAPERS, G.M.; DOUGLAS, F.N.; BILYK, A.B.; HSU, A.F.; DOWER, H.W.; GARZARELLA, L.; KOZEMPEL, M. Enzymatic browning in atlantic potatoes and related cultivars. *Journal of Food Science*, Chicago, 54(2): 362-5, 1989a.

- SAPERS, G.M.; HICKS, K.B.; PHILLIPS, J.G.; GARZARELLA, L.; PONDISH, .; MATULAITIS, R.M.; McCORMACK, T.J.; SONDEY, S.M.; SEIB, S.M., EL-ATAWY, Y.S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. *Journal of Science, Chicago*, 54(4): 997-1002, 1989b.
- SATJAWATCHARAPHONG, K.S.; RYMAL, K.S.; DOZIER, W.A.; SMITH, R.C. Polyphenol oxidase system in red delicious apples. *Journal of Food Science, Chicago*, 48: 1879-80, 1983.
- SAYAVEDRA-SOTO, L.A. & MONTGOMERY, M.W. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *Journal of Food Science, Chicago*, 51(6): 1531- , 1986.
- SILVA, E. Estudo da atividade enzimica da polifenol oxidase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças "in natura" e processadas. Piracicaba, 1981. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SILVA, E. & NOGUEIRA, J.N. Efeito do calor na atividade da polifenol oxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 40: 137-61, 1983a.
- SILVA, E. & NOGUEIRA, J.N. Efeito do SO₂ e do ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP*, Piracicaba, 40: 163-80, 1983b.
- TAYLOR, S.L. & BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. *Food Technology, Champaign*, 140(6): 47-52, 1986.

- TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K., EBERT, A. Sulfites in foods. Press Conference Report. Food Technology, Champaign, 40 (9): 48-50, 1986a.
- TAYLOR, S.L.; HIGLEY, N.A.; BUSH, R.K. Sulfites in foods: uses, analytical, methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity. Advances in Food Research, New York, 30: 1-7, 1986b.
- TWIGG, B.A.; SCOTT, L.E.; BOUNKAMP, J.C. Color of processed sweet potatoes: effect of additives. Journal of Food Science, Chicago, 39: 565-7, 1974.
- VAMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, 15(1): 49-127, 1981.
- VAMOS-VIGYÁZÓ, L. & GAJZÁGÓ, L. Substrates specificity on the enzymic browning of apples. Acta Alimentaria, Budapest, 7(1): 79-90, 1978.
- VAMOS-VIGYÁZÓ, L. & MIHÁLYI, K. Review of the international literature on diphenol oxidases of peach fruits. Confructa, Frankfurt, 21(6): 234-41, 1976.
- VAMOS-VIGYÁZÓ, L.; MIHÁLYI, K.; GAJZÁGÓ, I.; NADUDVARI-MARKUS, V. The role of enzyme-substrate ratio in the enzymatic browning of fruit tissue homogenates. Acta Alimentaria, Budapest, 61(4): 379-88, 1977.
- VAMOS-VIGYÁZÓ, L. & NADUDVARI-MARKUS, V. Enzymatic browning polyphenol content, polyphenol oxidase and peroxidase activities in pear cultivars. Acta Alimentaria, Budapest, 11(2): 157-68, 1982.

- VOIROL, F. Blanching of vegetables and fruits. Food Processing Industry, Londres, 41: 27-33, 1972.
- WALKER, K.R.L. The control of enzymic browning in fruit juices by cinamic acids. Journal of Food Technology, Oxford, 11: 341-5, 1976.
- WALKER, J.R.L. & REDDISH, C.E.S. Note on the use of cystein to prevent browning in apple products. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 15: 902-4, 1964.
- WALTER, W.M. & PURCELL, A.E. Effect of substrate levels and polyphenoloxidase acitivity on darkening in sweet potato cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, 28(5): 941-4, 1980.
- WARMBIER, H.C.; FENNEMA, O.; MARTH, E.H. Inhibition of o-difenol oxidase by diclorofluorometano. Journal of Food Science, Chicago, 37: 702-5, 1972.
- WEAVER, M.L. Potato composition: III Tissue selection and its effects on total nitrogen, free amino acid nitrogen and enzyme activity (polyphenolase, monophenolase, peroxidase and catalase). American Potato Journal, New Jersey, 55(6): 319-31, 1978.
- WESCHE-EBELING, P. & MONTGOMERY, M.W. Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. Journal of Food Science, Chicago, 55(3): 731-4, 1990.
- WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. New York, Marcel Dekker, 1972. 636p.

WHITAKER, J.R. Fundamentals aspects of enzymology. In:
COOLER, F.W., ed. Enzymes; use and control in foods.
Ananheim, IFT Short Course, p.2-1-2-13, 1976.

WILD-ALTAMIRANO, C. Enzymic activity during growth of
vanilla fruit. 1. Proteinase, glucosidase, peroxidase
and polyphenoloxidase. Journal of Food Science, Chi-
cago, 34: 235-8, 1969.

WOODROOF, J.G. & LUH, B.S. Comercial fruit processing.
Westport, AVI Publ., 1975. 603p.

ZEMEL, G.P.; SIMS, C.A.; MARSHALL, M.B.; BALABAN, M. Low pH
inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. Journal
of Food Science, Chicago, 55(2): 562-3, 1990.