ESTUDO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DA POLIFENOL OXIDASE E DA PEROXIDASE
EM ALGUMAS FRUTAS E HORTALIÇAS "IN NATURA" E PROCESSADAS.

Elisete da Silva

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
Novembro, 1981

ESTUDO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DA POLIFENOL OXIDASE E DA PEROXIDASE
EM ALGUMAS FRUTAS E HORTALIÇAS "IN NATURA" E PROCESSADAS.

Elisete da Silva

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 Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
Novembro, 1981

Aos meus pais

JOSÉ e GUIOMAR

pela dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos mais sinceros às seguintes pessoas e entidades:

- Ao Prof.Dr. João Nunes Nogueira, pelo apoio e segura orientação demonstrados no decorrer deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão das bolsas de estudo e auxílio pesquisa, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.
- Ao Prof.Dr. Urgel de Almeida Lima, Chefe do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela amizade e incentivo.
- Ao Prof. Dr.Humberto de Campos e à acadêmica Sonia M.S. Piedade pelo auxílio prestado na análise estatística.
- Aos Profs. do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e em especial ao Prof.Dr. Antonio Joaquim de Oliveira pela amizade.
- Aos Funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em especial os Srs. Luiz Gonzaga de Carvalho e João Baptista Beraldo.
- Aos Colegas do curso de pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e em especial à amiga Eliana pela amizade e estímulo.
- À Srta. Lucia Vasconcelos de Arruda Botelho, bibliotecária do Instituto Zimotécnico "Prof.Jaime Rocha de Almeida" anexo ao Departamento de Tecnologia Rural ESALQ-USP, pelo auxílio na correção das referências bibliográficas.

À Sra. Nelci Teixeira Maniero, pelo serviço datilográfico.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

Página

RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Considerações gerais	5
2.2. Métodos de controle do escurecimento enzimico	12
2.2.1. Inativação pelo calor	12
2.2.2. Inativação por compostos químicos	17
2.2.2.1. Anidrido sulfuroso	17
2.2.2.2. Ácidos	20
2.2.2.3. Outros compostos químicos ...	22
2.2.3. Exclusão do oxigênio	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Matéria-prima	30
3.2. Análise da matéria-prima	31
3.3. Determinação da atividade da polifenol oxida-	
se	31
3.4. Determinação da atividade da peroxidase	33
3.5. Condições em que foram estudadas as atividades	
da polifenol oxidase e da peroxidase	34
3.6. Processamento das frutas	36
3.6.1. Preparo	36
3.6.2. Imersão em solução de espera	38

3.6.3. Acondicionamento	38
3.6.4. Exaustão e recravação	38
3.6.5. Esterilização	39
3.6.6. Resfriamento e armazenamento	39
3.7. Processamento das hortaliças	39
3.7.1. Batata, couve-flor e cenoura	39
3.7.1.1. Preparo	39
3.7.1.2. Imersão em solução de espera e branqueamento	41
3.7.1.3. Acondicionamento	41
3.7.1.4. Exaustão e recravação	41
3.7.1.5. Esterilização	42
3.7.1.6. Resfriamento e armazenamento.	42
3.7.2. Palmito	42
3.7.2.1. Descascamento	42
3.7.2.2. Imersão em solução de espera.	44
3.7.2.3. Branqueamento e resfriamento.	44
3.7.2.4. Acondicionamento	44
3.7.2.5. Exaustão e recravação	45
3.7.2.6. Esterilização	45
3.7.2.7. Resfriamento e armazenamento.	45
3.8. Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Análise da matéria-prima	47
4.2. Atividade das enzimas nas frutas e hortaliças	49

4.3. Comportamento da atividade das enzimas	52
4.4. Efeito dos métodos de inativação enzimica ...	56
4.4.1. Polifenol oxidase em frutas	56
4.4.2. Peroxidase em frutas	61
4.4.3. Polifenol oxidase em hortaliças	65
4.4.4. Peroxidase em hortaliças	69
4.5. Efeito comparativo dos métodos de inativação enzimica por tipo de fruta	73
4.6. Efeito comparativo dos métodos de inativação enzimica por tipo de hortaliça	80
4.7. Considerações sobre a regeneração das enzimas após processamento térmico	87
5. CONCLUSÕES	91
6. LITERATURA CITADA	95

ESTUDO DA ATIVIDADE ENZÍMICA DA POLIFENOL OXIDASE E DA PEROXIDASE EM ALGUMAS FRUTAS E HORTALIÇAS "IN NATURA" E PROCESSADAS.

Candidata: Elisete da Silva

Orientador: Prof.Dr. João Nunes Nogueira

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de contribuir para o conhecimento da atividade da polifenol oxidase (PFO) e da peroxidase (PO) em algumas frutas e hortaliças bem como selecionar o melhor método pelo qual elas podem ser controladas. Com este propósito foi estudado o comportamento das atividades dessas enzimas, o efeito de alguns métodos de inativação (tratamento térmico, metabissulfito de potássio e ácido ascórbico) e a taxa de regeneração após processamento térmico (apertização), nas seguintes frutas e hortaliças em que o escurecimento enzimico constitui real problema no processamento: pera (var. D'água), figo (var. Roxo de Valinhos), banana (var. Nanica), maçã (var. Golden Delicious), pêssigo (var. Talismã), cenoura (var. Roxa), couve-flor (var. Bola de Neve), batata (var. Bintje) e palmito (Juçara ou Jiçara).

A PFO foi considerada a enzima mais importante no escurecimento enzimico das frutas e a PO no das hortaliças. As atividades da PFO e PO das frutas e PFO das hortaliças apresentaram um crescimento linear durante a reação de escurecimento. Já nas hortaliças a PO apresentou atividade com crescimento exponencial no decorrer da mesma reação.

Para a PFO das hortaliças e PO das frutas, o tratamento térmico foi considerado o melhor método de inativação. Tanto o ácido ascórbico como o tratamento térmico mostraram-se eficientes no controle da atividade da PO nas hortaliças. Já para a PFO das frutas, o metabissulfito de potássio foi mais eficiente, porém mostrou-se inadequado para controlar a atividade da peroxidase em quase todos os produtos estudados.

Em termos gerais, nas frutas, a PFO apresentou maior resistência à inativação que a PO e no caso das hortaliças ocorreu o inverso, ou seja, a PO apresentou maior resistência que a PFO.

O palmito destacou-se dos outros produtos estudados pela intensa atividade apresentada pela PFO e PO, o que explica a rapidez com que escurece durante o seu preparo para processamento. Observou-se ainda nesta hortaliça que tanto a atividade da PFO como a da PO são muito maiores na base do creme do que na ponta, o que sugere que estas duas partes deveriam ser processadas separadamente.

Quanto a regeneração das enzimas após o processamento térmico (appertização), o fenômeno foi constatado somente no caso da P0 que mostrou assim grande estabilidade às condições adversas encontradas durante aquele tratamento térmico. A PFO por sua vez, demonstrou ser uma enzima muito sensível, não se regenerando durante o tempo em que os produtos processados ficaram armazenados.

STUDY OF ENZYMIC ACTIVITY OF POLYPHENOL OXIDASE AND PEROXIDASE IN SOME FRESH AND CANNED FRUITS AND VEGETABLES:

Candidate: Elisete da Silva

Adviser: Prof.Dr. João Nunes Nogueira

SUMMARY

The objective of the present work was to contribute for the knowledge of the polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (PO) activities in some fruits and vegetable, as well to select the best method by which they can be controlled. With this purpose the behavior of these enzymes activities, the effect of some inactivation methods (heat treatment, potassium metabisulfite and ascorbic acid) and the regeneration rate after canning were studied in the following fruits and vegetables, in which the enzymic browning represents a great processing problem: pear (var. D'água), fig (var. Roxo de Valinhos), banana (var. Nanica), apple (var. Golden Delicious), peach (var. Talismã), carrot (var. Roxa), cauliflower (var. Bola de Neve), potato (var. Bintje) and heart-of-palm (Juçara ou Jiçara).

The PPO was considered the most important browning enzyme of the fruits and the PO of the vegetables. The

PP0 and P0 activities of the fruits and PP0 of the vegetables presented a linear behavior during the development of the browning reactions. On the other hand, an exponential behavior was observed for the P0 activity of the vegetables during the course of the same reactions.

For the vegetables PP0 and fruits P0, the heat treatment was considered the best method of inactivation. Both ascorbic acid and heat treatment showed to be effective to control the P0 activity in the vegetables. On the other hand for the fruit PP0 potassium metabisulfite was the most effective method, but did not control the P0 activity in almost all products studied.

In general, for the fruits, the PP0 presented more resistance to be inactivated than peroxidase and in the case of the vegetables the inverse occurred, that is, P0 was more resistant than PP0.

Heart-of-palm differed from the others products studied due to the intense activity presented by PP0 and P0 enzymes, which explains the rapid darkening that occurs during its preparation for processing. It was also observed in this vegetable, that PP0 and P0 activities are much higher in the base than in the upper part of the product, suggesting that these two parts should be separately processed.

Concerning to the enzyme regeneration after canning, the phenomenon was evident only in the case of the P0 which showed great stability in adverse conditions found during heat processing. PPO, for his turn, showed to be a very heat sensitive enzyme, as no regeneration was observed during the storage time of the processed products.

1. INTRODUÇÃO

A aceitação de um produto pelo consumidor depende principalmente de sua aparência. Aparência relaciona-se sempre a textura e cor, principalmente a cor. Daí a importância da preservação da cor original dos alimentos após o processamento.

O escurecimento enzimico, geralmente altera não só a aparência como o "flavor" e o valor nutritivo dos alimentos. Assim, é importante que se conheça os mecanismos dessas reações e os métodos pelos quais ela pode ser controlada nos diversos produtos. O escurecimento é considerado desejável em alguns produtos, tais como chá preto, café, suco de maçã, onde contribui para melhorar a aparência e o "flavor" do alimento, do ponto de vista de aceitação pelo consumidor. Entretanto, em muitos outros casos, como, frutas, hortaliças, alimentos congelados e desidratados, ele é indesejável, porque resulta na produção de "flavors" estranhos e aparência inferior.

O escurecimento que ocorre normalmente em frutas e hortaliças durante o processamento, ou quando os tecidos são injuriados ou expostos a condições anormais, é devido principalmente a oxidações enzimáticas (MATHEW e PARPIA, 1971), embora reações de natureza não enzimática possam também ocorrer (MEYER, 1975). O escurecimento ocorre somente após injúrias mecânicas ou fisiológicas, porque no tecido intacto substrato e enzima estão separados (PONTING, 1960).

O tecido injuriado escurece rapidamente quando exposto ao ar devido a conversão de compostos fenólicos a ortoquinonas; estas polimerizam-se dando origem a compostos de coloração escura denominados melanoidinas (CORSE, 1964).

De acordo com ESKIN et alii (1971), a principal enzima responsável pelas reações de escurecimento é a polifenol oxidase, embora também seja possível a participação de outras enzimas, tais como a peroxidase (REED e UNDERKOFER, 1966).

Dentre os substratos mais comuns para essas reações destacam-se, o catecol, a tirosina, a 3,4 - dihidroxifenilalanina, o ácido cafêico, o ácido gálico, a hidroquinona e um grande número de antocianinas e flavonoides (MEYER, 1975), podendo assim, ser considerados importantes constituintes dos alimentos. Segundo HAISMAN (1974) o potencial de escurecimento

das frutas e hortaliças, mesmo em diferentes variedades da mesma espécie, está diretamente relacionado à quantidade de compostos fenólicos, e atividade da enzima, ou à combinação destes dois fatores.

Inúmeros trabalhos tem sido feitos visando selecionar métodos para o controle do escurecimento enzimico. Os antioxidantes tem sido usados com sucesso. Assim, na preparação de pêssegos para congelamento, a adição de pequenas quantidades de ácido ascórbico não só previne o escurecimento como também a perda de "flavor" (MEYER, 1975). O calor inativa as enzimas responsáveis pela reação, e consequentemente quando as frutas ou hortaliças são branqueadas ou quando são submetidas à apertização, a reação de escurecimento é interrompida (PONTING, 1960 e BRAVERMAN, 1963). A retirada do oxigênio e o fechamento à vácuo também são usados para diminuir o nível de oxidação (CRUESS, 1958).

O efeito de diversos compostos tais como o anidrido sulfuroso, a cisteína, o cloreto de sódio e o ácido cítrico, sobre as oxidases, tem sido objeto de vários estudos. Em preparações caseiras, tanto suco de abacaxi como de limão tem sido usados para prevenir o escurecimento. Suco de abacaxi tem uma porcentagem relativamente alta de compostos sulfidrílicos que são antioxidantes, e suco de limão contém ácidos cítrico e ascórbico que também previnem o escurecimento (JOSLYN e PONTING, 1951).

O grande desafio para o tecnólogo é descobrir métodos simples, eficientes e econômicos para evitar a ocorrência do escurecimento durante o manuseio comercial e o processamento de alimentos. Tendo esta meta em vista nos propu^usemos a estudar a atividade da polifenol oxidase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças, visando determinar as melhores condições para o controle do escurecimento enzimico. Os principais objetivos foram:

a. Estudar a atividade da polifenol oxidase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças "in natura".

b. Determinar o efeito de alguns tratamentos térmicos na atividade das duas enzimas nas frutas e hortaliças estudadas.

c. Estudar a influência de alguns compostos químicos no controle do escurecimento enzimico das frutas e hortaliças.

d. Estudar a possível regeneração das enzimas após processamento térmico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações gerais

São muitos os compostos fenólicos, envolvidos na reação de escurecimento enzimico. Segundo CORSE (1964), o escurecimento enzimico consiste na reação de uma enzima (ou múltiplas enzimas) que oxida compostos derivados do catecol a orto - quinonas. O catecol é geralmente formado enzimicamente por hidroxilação, a partir de um monofenol.

GRIFFITHS (1959), estudando o escurecimento enzimico em banana, identificou vários compostos fenólicos, dos quais a 3,4 - dihidroxifeniletilamina (dopamina) foi considerado o mais importante, por ser o mais ativo. Este composto foi identificado tanto na polpa como na casca. PALMER (1963) purificou a polifenol oxidase de banana e registrou também que a dopamina era o substrato mais importante. De acordo com BUCKLEY (1964) é possível que o ácido clorogênico também esteja presen-

te em algumas variedades de banana, porém em baixa concentração. Leucodelphinidina e leucocianidina também foram identificadas na fruta, especialmente quando no estágio imaturo (SIMMONDS, 1954).

SIOUD e LUH (1966), identificaram em peras, os seguintes compostos fenólicos: leucoantocianinas, catecois, epicatecois, ácido clorogênico e ácido cafêico. As análises foram feitas em purê de pera Bartlett e a leucoantocianina demonstrou ser o composto fenólico mais abundante. NORTJE (1966) observou também em peras Bartlett a presença de catecol e proantocianidinas.

Estudando os compostos fenólicos que ocorrem em pêssegos, LUH et alii (1967), identificaram catecois, leucoantocianinas e derivados do ácido clorogênico, como os mais importantes. BUREAU et alii (1977) trabalhando com seis diferentes variedades de pêssego verificaram, cromatograficamente, que em todas as variedades os ácidos clorogênico e neoclorogênico estavam presentes, aparecendo a leucoantocianina em quantidades apreciáveis somente em duas das seis variedades analisadas.

Em maçã foram isolados compostos como, leucocianidina, catecol, flavonol, e ácido clorogênico (WILLIAMS, 1953). HULME (1958) encontrou flavonoides, tais como, quercetina e rutina na casca de maçã.

Ácido clorogênico, ácido p-cumárico, flavo -
nois e catecol foram encontrados em damasco enlatado (EL-SAYED
e LUH, 1965).

O conteúdo de ácido cafêico e ácido clorogêni-
co foram determinados por VECHER e YAKIMOVICH (1966), em dife-
rentes variedades de batata, sendo encontrados valores varian-
do entre 0,13 - 0,67 % e 0,07 - 0,12 %, respectivamente.

O escurecimento oxidativo do ácido clorogêni-
co, foi relacionado à descoloração da superfície de cenouras ,
por CHUBEY e NYLUND (1969). Eles encontraram o ácido clorogêni-
co como principal substrato para o escurecimento oxidativo em
cenouras.

São muitas também as enzimas que podem catali-
zar a reação de escurecimento enzimico. De acordo com BOUCHIL-
LOUX (1962), as principais enzimas que tomam parte nas reações
de escurecimento são as polifenol oxidases, embora outras enzi-
mas como a peroxidase, possam também estar envolvidas (REED e
UNDERKOFER, 1966).

JOSLYN e PONTING (1951), usaram o termo poli-
fenol oxidase, abreviado para polifenolase ou fenolase, para
designar todas as enzimas que tem a capacidade de oxidar os
compostos fenólicos a ortoquinonas.

Uma preparação de fenolases obtida de batata, por KUBOWITZ (1938) mostrou ser a enzima composta de 0,20 % de Cu e 14,4 % de N. Afirma o autor que quando o Cu é removido da enzima por diálise, esta perde a sua atividade que pode ser recuperada pela adição de sais de Cu. No entanto, BRAVERMAN (1963) afirma que é praticamente impossível separar o grupo prostético das metaloproteínas, como é o caso da polifenol oxidase, sem a destruição irreversível da potência enzimica.

Uma preparação enzimica semelhante à obtida por KUBOWITZ (1938) em batata, extraída de cogumelo por DALTON e NELSON (1939), mostrou ser a enzima composta de 0,25 % de Cu e 13,6 % de N. Segundo KERTESZ e ZITO (1957), o peso molecular da enzima é de 34.000, e com uma concentração de 0,20 % de Cu, a enzima contém um átomo de Cu por molécula.

PALMER e ROBERTS (1967), também verificaram ser a polifenol oxidase, extraída de banana, uma metaloenzima do Cu, assim como outras polifenol oxidases.

LUH e PHITHAKPOL (1972), calcularam para a polifenol oxidase a constante de Michaelis (K_m), em pêssegos da variedade Haldorf. O valor encontrado foi 0.015M de catecol a pH 6,2. Os autores afirmaram ser K_m uma característica importante da enzima, porque expressa a concentração de substrato requerida para atingir metade da velocidade máxima da ação da mesma.

A atividade das fenolases é dependente do pH. Segundo REED e UNDERKOFER (1966), o pH ótimo para a atividade das fenolases não está muito bem definido, variando entre 5-7. Em valores mais altos de pH, a autooxidação do substrato torna impossível a avaliação da atividade enzimática com muita precisão. Em valores mais baixos, particularmente valores menores que 3, a atividade enzimática não pode ser demonstrada e um subsequente aumento do pH não restaura a atividade perdida.

REYES e LUH (1960), trabalhando com polifenol oxidase de pêssegos da variedade Fay Elberta, descaroçados, encontraram o pH ótimo para sua atividade entre 5,9 e 6,3. LUH e PHITHAKPOL (1972), verificaram o efeito do pH na atividade da polifenol oxidase extraída de pêssegos da variedade Halford, em três níveis de maturação da fruta. A atividade ótima da polifenol oxidase ocorreu a pH 6,2.

LIMA et alii (1974), trabalhando com polifenol oxidase de palmito, encontraram o pH ótimo, tendo como substrato o catecol, entre 6-7.

KAHN (1977), estudando a atividade da polifenol oxidase de duas variedades de abacate (Fuerte e Lerman), em função do pH, mostrou que a enzima das duas fontes exibiu uma curva ótima de atividade a valores de pH entre 5,5 - 6,5, tendo como substrato tanto o 4-metil catecol como DL-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina).

De uma maneira geral, o pH ótimo para a atividade da polifenol oxidase em frutas como cerejas (BENJAMIM e MONTGOMERY, 1973), pêssegos Clingstone e Halford (LUH e PHITHAKPOL, 1972) e banana (PALMER e ROBERTS, 1967), tem sido encontrado sempre na faixa de 6,2 - 7,2. Já para o abacate 'Lula', o pH ótimo para a atividade da enzima variou de 4,7 a 4,8, constituindo assim, uma exceção (KNAPP, 1965).

A susceptibilidade das frutas e hortaliças ao escurecimento enzimico, varia entre as espécies, e mesmo entre diferentes variedades da mesma espécie. Pêssegos das variedades Elberta Freestone e Haldorf, por exemplo, diferem em suas taxas de escurecimento, e ficou demonstrado que isto está diretamente relacionado com a atividade da polifenol oxidase de cada variedade. As enzimas das frutas destas duas variedades mostraram grande diferença nos valores de K_m (constante de Michaelis), para substratos específicos (LUH e PHITHAKPOL, 1972).

HAISMAN (1974), verificou que existem marcas das diferenças na susceptibilidade ao escurecimento enzimico entre diferentes variedades de maçã. As variedades Golden Delicious e Laxton Superb são mais susceptíveis ao escurecimento do que as variedades Cox's Orange Pippin, Crispin e Bramley's Seedling. Afirma o autor que o tempo de colheita pode ter algum efeito, pois é conhecido que maçãs muito verdes frequentemente, tornam-se escuras rapidamente. No caso da variedade

Bramley's Seedling existem indicações de que maçãs colhidas muito prematuras ou tardiamente, tornam-se escuras mais rapidamente do que aquelas colhidas na meia estação. Salienta ainda o autor que, consideráveis variações metabólicas tem lugar durante o armazenamento de maçãs após a colheita, e durante este tempo a sensibilidade ao escurecimento pode aumentar ou decrescer de acordo com a variedade. Maçãs Golden Delicious escurecem muito menos após armazenamento a $3,5^{\circ}\text{C}$ por 3 meses, enquanto que as frutas da variedade Laxton Superb mostram mais susceptibilidade ao escurecimento, após o mesmo tratamento.

KAHN (1975) estudou a atividade da polifenol oxidase de três variedades de abacate: Fuerte, Horeshim e Lerman. A variedade Fuerte mostrou a maior atividade, seguida por Horeshim e Lerman. O autor testou por vários caminhos, a possibilidade de que a baixa atividade da variedade Lerman, fosse devida à presença de inibidores ou fatores degradantes da enzima, ou de que a polifenol oxidase da variedade Fuerte contivesse um fator ativante. Entretanto estas possibilidades foram rejeitadas, e o autor concluiu que a diferença na taxa de escurecimento das três variedades está diretamente relacionada com a atividade da polifenol oxidase expressa na fração enzimica.

IADEROZA et alii (1980) trabalhando com dois cultivares de abacate (Wagner e Quintal), constatou que o extrato enzimico da cultivar Wagner apresentou uma atividade seis

vezes superior ao da cultivar Quintal, apesar da polpa de ambas diferirem muito pouco quanto à velocidade de escurecimento.

De acordo com REED e UNDERKOFER (1966), VOIROL (1972) e WHITAKER (1976) a peroxidase também tem importância no escurecimento enzimico de frutas e hortaliças. Segundo REED e UNDERKOFER (1966) esta enzima tem um peso molecular de cerca de 40.000, e contém um átomo de Fe por molécula.

O guaiacol é um dos principais substratos para a peroxidase (WHITAKER, 1976). MARSHALL e CHISM (1979) estudando o emprego da o-dianisidina, guaiacol e pirogalol, como substratos para a peroxidase concluíram que o guaiacol e o pirogalol são os compostos mais apropriados para a análise quantitativa da enzima.

A atividade da peroxidase também é afetada pelo pH. O pH ótimo é 7,0 e 70 % de sua atividade máxima é obtida em valores de pH entre 6 e 8 (WILDER, 1962).

2.2. Métodos de controle do escurecimento enzimico

2.2.1. Inativação pelo calor

A resistência das oxidases ao calor tem sido muito estudada, isto porque talvez seja o calor o método mais utilizado para inativação destas enzimas em processos como bran

queamento e pasteurização, pré-tratamentos a que são submetidas as frutas e hortaliças antes da apertização, congelamento ou desidratação, ou ainda na obtenção de sucos e purês (ESKIN et alii, 1971).

A estabilidade da polifenol oxidase, em 18 diferentes sucos de frutas, foi investigada por YANKOV (1962). As análises foram feitas em sucos com e sem polpa. Ele observou que as enzimas do suco contendo polpa, são mais resistentes ao calor do que aquelas do suco clarificado, provavelmente devido a uma maior atividade enzimica na polpa.

JANKOW (1963) estudou os efeitos do calor na inativação de oxidases. Construiu as curvas de inativação pelo calor da polifenol oxidase e peroxidase, de sucos clarificados e não clarificados de cereja, ameixa, damasco e algumas hortaliças. Nas diferentes frutas observou uma grande resistência da polifenol oxidase e uma baixa resistência da peroxidase. Nas hortaliças o autor obteve resultados inversos. YANKOV (1963) num estudo comparativo da resistência ao calor da polifenol oxidase em frutas e hortaliças, observou também que a enzima é mais estável nas frutas.

Muitos problemas podem aparecer quando o calor é usado. A fruta ou hortaliça tratada pelo calor pode apresentar textura indesejável, variação do "flavor" original ,

e desenvolvimento de "flavors" estranhos (PONTING, 1960). Por isso é essencial, que o binômio tempo-temperatura a ser usado no processamento seja cuidadosamente escolhido, levando-se sempre em conta as características particulares de cada produto.

De acordo com REED e UNDERKOFER (1966), o binômio tempo-temperatura necessário para inativar a polifenol oxidase vai depender em grande parte do pH. A diminuição do pH resulta num decrêscimo de atividade da enzima, sendo irreversivelmente inativada em valores de pH menores que 3.

Para a peroxidase, também, tanto as taxas de inativação quanto de regeneração são dependentes do pH. Ela é inativada muito rapidamente a 76°C e pH 4,5 ou mais baixo, e nestas condições não ocorre recuperação apreciável de sua atividade. Valores de pH entre 5 e 10 tem pequeno efeito na inativação da enzima (LUH e WHITAKER, 1974).

RESENDE et alii (1969) trabalhando com peroxidase em purê de ervilha e de espinafre, calcularam os proces-sos requeridos para inativar e impedir a regeneração da enzima. Verificaram os autores que valores de 2,2 e 1,3 minutos são respectivamente requeridos a 132 e 143°C para impedir a regeneração da peroxidase no purê de ervilha. Estes valores entretanto, levam a uma completa perda de cor, podendo-se efetivamente excluir a ervilha como candidata ao HTST (High Temperature

Short Time). Já para com o purê de espinafre, este problema não ocorre, pois a enzima não se regenera após o referido processo.

A resistência térmica das enzimas, particularmente da peroxidase varia consideravelmente, mesmo entre as diferentes variedades da mesma hortaliça (ESSELEN et alii, 1956). De um modo geral, um aquecimento a 80°C por 10 a 20 minutos ou a 100°C por 2 a 5 minutos, é suficiente para a inativação das enzimas. No entanto, deve-se sempre ter em mente que tudo depende da fruta ou hortaliça considerada (MATHEW e PARPIA, 1971).

Segundo alguns autores, as polifenol oxidases de frutas como abacate, variedades Lerman e Fuerte (KAHN, 1977), pêssigo Clingstone (WONG et alii, 1971), cerejas Ann Royal (BEN JAMIN e MONTGOMERY, 1973) e peras Bartlett (RIVAS e WHITAKER, 1973), se caracterizam por uma grande resistência ao calor. Do mesmo modo, a peroxidase também é uma enzima altamente resistente ao calor podendo mesmo se regenerar dependendo das condições de sua inativação (LUH e WHITAKER, 1974).

O fenômeno da regeneração não tem até o presente uma explicação adequada. Supõe-se que a proteína desnaturada possa, depois de um certo tempo, reorganizar-se parcialmente através de pontes de hidrogênio e ligações dissulfeto, recuperando assim sua atividade (BRAVERMAN, 1963).

GIBRIEL et alii (1978), fizeram uma comparação entre a peroxidase de três fontes diferentes: espinafre, abricô e cenoura, mostrando que a enzima da última fonte é a mais estável ao calor. A mais sensível é a de abricô que foi rapidamente inativada e cuja atividade mais diminuiu durante o armazenamento refrigerado.

ESSENLEN e ANDERSON (1956), apresentaram dados da destruição térmica da peroxidase em 17 diferentes vegetais a 87 e 134°C, e mostraram que a quantidade de calor requerida para prevenir a regeneração da enzima durante o armazenamento é de duas a quatro vezes maior do que a requerida para inativar a enzima.

O branqueamento tem sido um dos métodos mais usados na prevenção do escurecimento enzimico. Entretanto, a necessidade de uma rápida inativação da enzima foi salientada por TATE et alii (1964). No caso de pera Bartlett eles observaram que em alguns casos o branqueamento lento, além de prejudicar a textura, resultou na ativação em vez da inativação da enzima. Tem sido demonstrado que o branqueamento através de microondas (COLLINS e McCARTY, 1969) inativa as fenolases mais rapidamente que a imersão em água fervente e que seu emprego pode reduzir o tempo de branqueamento com vantagens. QUENZER e BURNS (1981), estudando diversos tipos de branqueamento (vapor, água fervente e microondas), concluíram também que o branquea-

mento por microondas é o melhor, no que diz respeito à retenção de ácido ascórbico e manutenção da textura original do produto.

2.2.2. Inativação por compostos químicos

2.2.2.1. Anidrido sulfuroso

Dos produtos químicos usados no controle do escurecimento enzimico, o anidrido sulfuroso (SO_2) talvez seja o mais importante.

JOSLYN e BRAVERMAN (1954), indicaram a adição de SO_2 , na forma de ácido sulfuroso e sulfito, a produtos como maçãs e batatas, como um bom meio para o controle do escurecimento enzimico. O SO_2 pode entretanto, ser usado tanto na forma de gás como na forma de sulfitos. O gás é mais eficiente devido a sua elevada taxa de penetração nas frutas e hortaliças, mas os sulfitos são mais fáceis de serem manuseados e por isso são os mais usados nas indústrias de processamento (REED e UNDERKOFER, 1966).

Existem vantagens e desvantagens no uso desses compostos. Sua aplicação pode resultar no desenvolvimento de "flavor" e odor indesejáveis, pode alterar a cor natural do alimento, ou pode acelerar o processo de corrosão das latas ,

além de ser tóxico em concentrações elevadas (ESKIN et alii , 1971). A maior desvantagem do emprego de SO_2 é o seu efeito destrutivo sobre a vitamina B_1 ou tiamina (ROBERTS e McWEENY, 1972). Apesar disso, esse inibidor tem sido usado no processamento de alimentos, devido principalmente à sua eficiência e baixo custo.

O "flavor" desagradável que pode resultar da aplicação de SO_2 nos alimentos não é o maior problema, uma vez que o excesso pode ser facilmente removido após a inativação da enzima. A remoção pode ser feita pela aplicação de vácuo, por aquecimento, ou pela reação com um composto químico como o peróxido de hidrogênio (ESKIN et alii, 1971).

Duas escolas principais tentam explicar o mecanismo pelo qual o SO_2 inibe o grupo das fenolases. A primeira diz que o SO_2 inibe a enzima, e a outra, que a quinona formada é reduzida pelo SO_2 para o fenol original (ESKIN et alii, 1971).

MUNETTA (1966), nos fornece evidências que sugerem que o bissulfito impede o aparecimento do escurecimento enzimático por inibição da hidroxilação oxidativa da L-tirosina para 3,4 dihidroxifenilalanina. Por outro lado EMBS e MARKAKIS (1965), apresentam evidências que mostram que a inibição do escurecimento enzimático pelo SO_2 é devido, em grande parte, à in-

teração deste composto com a o-quinona, impedindo a sua polimerização que levaria à formação das melanoidinas. Existe também uma outra possibilidade, a de que o SO_2 agiria reduzindo o oxigênio, tornando-o não disponível à reação de oxidação (MATHEW e PARPIA, 1971).

Deve ser enfatizado que somente o SO_2 livre é efetivo na prevenção do escurecimento enzimico. Uma certa proporção do SO_2 adicionado aos alimentos reage com aldeídos e cetonas (glucose por exemplo), para formar compostos de adição, tornando assim o SO_2 não disponível para a reação (ESKIN et alii, 1971).

PONTING (1960), estudando o controle do escurecimento enzimico em frutas pelo SO_2 , concluiu que baixas concentrações, tais como 1 ppm de SO_2 livre, podem inibir a polifenol oxidase. Ele realizou uma série de experimentos nos quais diferentes concentrações de bissulfito de sódio eram adicionados à quantidades fixas de uma solução de catecol. A reação enzimica era iniciada pela adição de iguais quantidades de uma preparação de polifenol oxidase purificada e verificou que 1 ppm de SO_2 reduziu a atividade enzimica a cerca de 20 % e que 10 ppm podem inativar completamente a mesma.

Segundo REED e UNDERKOFER (1966), concentrações baixas, como 1 ppm são suficientes para a obtenção de bons

resultados, mas que na prática concentrações bem maiores são utilizadas.

FRANCIS e AMLA (1961), mostraram que pedaços de batata colocados por 30 segundos numa solução contendo 2500 ppm de SO_2 , absorvem cerca de 50 ppm, e que este nível é suficiente para inibir o escurecimento.

Deve-se ressaltar entretanto, que a concentração mínima de SO_2 requerida irá variar com a fonte e com a variedade da matéria-prima, de acordo com o nível de atividade enzimica e a natureza dos substratos fenólicos de cada caso (HAISMAN, 1974).

2.2.2.2. Ácidos

A aplicação de ácidos é um método muito usado no controle do escurecimento enzimico. Os ácidos usados estão entre aqueles que ocorrem naturalmente nas frutas e hortaliças, particularmente ácido cítrico, ácido málico, ácido fosfórico e ácido ascórbico. No geral, eles agem diminuindo o pH o que provoca um decréscimo da taxa de escurecimento. O pH ótimo para a atividade das fenolases se situa entre a faixa de 6 a 7, sendo que abaixo de 3 não há atividade enzimica (ESKIN et alii, 1971).

Dentre os ácidos usados, destaca-se pelas vantagens que apresenta, o ácido ascórbico. Ele não confere "flavor" aos alimentos, pelo contrário, é usado para preservá-lo durante o processamento (GUTTERSON, 1971). Não possui ação corrosiva sobre os metais, e além disso seu valor como vitamina é bem conhecido (CORSE, 1964 e ESKIN et alii, 1971).

De acordo com PONTING (1960) e ADAMS e BLUNDS TONE (1971), o ácido ascórbico não inibe diretamente a enzima, mas reduz a ortoquinona. Este processo é acompanhado por uma perda gradual de atividade pela enzima, conhecida como reação de inativação. BAUERNFEIND e PINKERT (1970), também afirmam que quando uma quantidade adequada de ácido ascórbico está presente, a ortoquinona é reduzida para as formas ortofenólicas e o escurecimento não se efetua.

Segundo DIMPFH e SOMOGYI (1975), o ácido ascórbico pode agir de três maneiras diferentes: pela redução das ortoquinonas formadas, inativando diretamente a enzima ou ainda por competição com o substrato. TATE et alii (1964), trabalhando com polifenol oxidase de pera Bartlett, observou que o ácido ascórbico é muito efetivo no controle do escurecimento, porém age mais como um antioxidante do que como um verdadeiro inibidor da enzima.

As frutas e hortaliças devem ser tratadas com quantidades adequadas de ácido ascórbico, caso contrário a taxa de reação diminuirá apenas ligeiramente. O controle total da reação só é obtido quando quantidades de ácido ascórbico em excesso forem utilizadas (ESKIN et alii, 1971).

Frequentemente a combinação do ácido cítrico com o ácido ascórbico ou sulfito de sódio, também é usada no controle do escurecimento enzimico (JOSLYN e PONTING, 1951 e PONTING, 1960). O ácido cítrico possui um duplo efeito inibidor, diminui o pH do meio e também forma quelatos com o Cu, removendo-o da enzima, o que a torna inativa. Entretanto, o ácido cítrico não parece ser um inibidor tão eficiente quanto o ácido ascórbico (ESKIN et alii, 1971).

2.2.2.3. Outros compostos químicos

Muitos outros agentes químicos, além do SO_2 e dos ácidos, podem ser usados no controle do escurecimento enzimico. O cloreto de sódio é comumente utilizado, principalmente nas soluções de espera onde a fruta ou hortaliça descascada é mantida até que o processamento tenha continuidade. Num sistema modelo ficou demonstrado que uma concentração de 0,1 % de cloreto de sódio inibe de maneira significativa o escurecimento, porém no caso de frutas, a concentração de cloreto de sódio

requerida para inativar totalmente as enzimas é muito alta, prejudicando o "flavor", limitando assim o seu uso (ESKIN et alii, 1971).

LUH e PHITHAKPOL (1972), estudando o efeito do cloreto de sódio na polifenol oxidase de pêssegos, concluíram que a atividade da enzima diminui com o aumento da concentração de NaCl. A inibição da atividade a uma concentração de 0,5 % de NaCl foi de 16 %, a 1 % de 28 %, e a 3,0 % de 30 %. Em relação à polifenol oxidase de pera d'Anjou, o NaCl mostrou ser um inibidor pouco potente, inibindo apenas 20-30 % da atividade enzimática, em concentrações relativamente altas (HALIM e MONTGOMERY, 1978). Resultados semelhantes foram também registrados por BENJAMIN e MONTGOMERY (1973) para a polifenol oxidase de cerejas.

LUH e PHITHAKPOL (1972), estudando o efeito do EDTA na polifenol oxidase de pêssego, concluíram que o EDTA provoca apenas um ligeiro decréscimo na taxa de escurecimento enzimático, indicando que no caso de pêssegos ele não é o método de controle ideal. O EDTA também não foi considerado um bom inibidor da polifenol oxidase do abacate (KAHN, 1977) e da uva (WISSEMAN e LEE, 1981). Por outro lado, TWIGG et alii (1974), trabalhando com batata doce, testou o efeito de vários aditivos na prevenção do escurecimento enzimático, verificando que o EDTA era o mais efetivo dos aditivos usados. O EDTA foi efi-

ciente mesmo em baixas concentrações, e particularmente quando o produto era exposto ao ar. Os autores sugeriram que a ação do EDTA pode ser devida a quelação dos íons metálicos, que são os responsáveis pela formação, juntamente com a quinona, de um com
plexo de coloração escura no produto. O EDTA apresentou, entre-
tanto, o inconveniente de ocasionar o amolecimento da batata do
ce.

Os sais de boro tem sido também citados, como um bom método de controle do escurecimento enzimico (BEDROSIAN et alii 1959). Quanto ao seu modo de ação, parece que os boratos formam um complexo com os polifenóis (substratos), justamen
te no grupo di-OH, que é o sítio da oxidação catalizada pela en
zima (BEDROSIAN et alii, 1960).

A cisteína é um outro composto químico que com
binando-se com os produtos iniciais da reação enzimica (ortoqui
nonas), impede a sua polimerização e o consequente escurecimen
to (ADAMS e BLUNDSTONE, 1971). A cisteína parece levar vantagem
quando comparada ao ácido ascórbico, isto porque menores quanti
dades são necessárias e inibe a reação de escurecimento por um
período mais longo (WALKER e REDDISH, 1964). Este aminoácido pa
rece ser especialmente efetivo para inibir a polifenol oxidase
de pera (WANG e MELLENTIN, 1973 e HALIM e MONTGOMERY, 1978).

Dietilditio-carbamato é outro agente quelante do cobre, que inibe o escurecimento enzimico (REED e UNDERKOFFLER, 1966 e MATHEW e PARPIA, 1971). Este composto foi considerado como um dos melhores inibidores da polifenol oxidase de peras d'Anjou, reduzindo a atividade enzimica de 40 a 60 %, a uma concentração de 1mM (HALIM e MONTGOMERY, 1978). REYES e LUH (1960), concluíram que no caso de pêssegos, o dietilditio-carbamato de sódio inibe fortemente tanto a polifenol oxidase quanto a peroxidase, apesar da última ser uma enzima que contém ferro.

WISSEMAN e LEE (1981), estudaram o efeito de nove diferentes inibidores, sobre a polifenol oxidase de uva das variedades Niagara e Ravat, e os inibidores que se mostraram mais potentes foram justamente a cisteína e o dietilditio-carbamato de sódio.

PALMER e ROBERTS (1967), trabalhando com polifenol oxidase de banana, concluíram ser o 2-Mercaptobenzotiazol (MBT), o seu mais efetivo inibidor. MBT inibe a oxidação do substrato a concentrações mais baixas que $10^{-7}M$ e causa uma inibição prolongada a concentrações de $2.10^{-5}M$ ou maiores. A inibição resulta da formação de um complexo entre a enzima e o inibidor.

MURR e MORRIS (1974), estudaram o uso do ácido succínico-2,2-dimetilhidrazina (SADH), como método de controle da descoloração em cogumelos. A descoloração foi significativamente retardada, pelo tratamento com SADH. O efeito entretanto, não durou mais do que três dias, sendo que após este tempo todos os cogumelos descoloriram em taxas iguais ou maiores do que o controle. Os autores concluíram que o SADH exerce um duplo efeito na redução da descoloração em cogumelos: primeiro por um aumento do nível de protease dentro do tecido, que então induz um aumento da degradação da ortodifenoloxidase; segundo o SADH compete com outros compostos (p.ex. prolina) pelas quinonas produzidas e isto resultaria em pequenas quantidades de quinonas altamente reativas.

Trabalhando com ácidos cinâmicos no controle do escurecimento enzimico em maçãs, WALKER (1976) concluiu que a adição desses ácidos ou de seus sais de sódio, mais solúveis, pode oferecer um método barato e eficiente no controle do escurecimento enzimico. Dos ácidos usados o cinâmico e o p-cumárico mostraram ser os inibidores mais eficientes. Baixas quantidades destes compostos são capazes de prover um controle por tempo relativamente longo do escurecimento enzimico. O autor afirma ainda que os ácidos citados e seus respectivos sais tem sido encontrados naturalmente em muitas frutas e plantas comestíveis, não trazendo portanto, nenhum problema para a saúde se forem usados como método de controle do escurecimento enzimico.

O uso de enzimas tipo oxigenase, tem sido citado também, como um método alternativo de controle do escurecimento enzimico (KELLY e FINKLE, 1969). Estas enzimas catalizam a quebra de anéis hidroxiaromáticos dos substratos como catecol ou tipo catecol, resultando produtos que não entram na reação de escurecimento.

Um outro método alternativo foi desenvolvido, e se baseia na metilação enzimica da estrutura o-dihidroxi, feita por enzimas como a meta-o-metiltransferase, o que bloquearia o grupo reativo do difenol (FINKLE e NELSON, 1963). Esta enzima funciona na presença de um doador do grupo metil tal como a S-adenosilmetionina, e de um receptor, tal como o o-difenol. Assim, o produto deverá ser imerso numa solução ligeiramente alcalina, contendo a enzima e o doador do grupo metil. Este método, parece que torna a fruta ou hortaliça resistente ao escurecimento, sem afetar cor, "flavor", odor e textura originais (ESKIN et alii, 1971).

2.2.3. Exclusão do oxigênio

Uma simples aplicação deste método para o controle do escurecimento é feita pelas donas de casa, durante o descascamento de frutas e hortaliças submergindo as mesmas em água limitando assim o oxigênio que pode entrar em contato com o tecido superficial (ESKIN et alii, 1971).

Este método, entretanto, tem muitas desvantagens. A fruta ou hortalíça, pode escurecer quando reexposta ao ar, e além disso deve-se considerar também, o oxigênio que ocorre naturalmente nos seus tecidos. O palmito por exemplo, apresenta uma quantidade de gases apreciável em seus tecidos (PASCHOALINO et alii, 1978). Segundo PASCHOALINO e BERNHARDT (1978) a desaeração mecânica do palmito, a temperatura ambiente, mostrou ser o único método adequado para evitar seu escurecimento. A exposição dos toletes a uma pressão de 120 mm de Hg durante 15 seg. foi suficiente para se obter um produto final de alta qualidade.

No caso de pêssego congelado em pedaços, a superfície dos pedaços é frequentemente tratada com excesso de ácido ascórbico antes do processamento. O ácido ascórbico utiliza o oxigênio da superfície para a sua autooxidação, estabelecendo assim uma barreira à difusão do ar no espaço entre a fruta e a embalagem (GUADAGNI e NIMMO, 1957). A sacarose tem sido também usada, na preservação de frutas por congelamento. Quando em solução ela reduz a concentração de oxigênio dissolvido no meio e a taxa de difusão do oxigênio do ar para os tecidos da fruta (JOSLYN e PONTING, 1951).

Deve ser também lembrado que a exaustão, é o método mais usado para a remoção do oxigênio, e que geralmente é feita pelo aquecimento da lata, já com seu conteúdo, antes do fechamento (CRUESS, 1958). Alternativamente, a fruta ou hor

taliça, pode ser acondicionada à vácuo em uma embalagem hermeticamente fechada (ESKIN et alii, 1971).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

Neste estudo foram utilizadas as seguintes frutas e hortaliças: pera (Pyrus betulaefolia), var. d'Água ; figo (Ficus carica L.), var. Roxo de Valinhos; banana (Musa cavendishi), var. Nanica; maçã (Mallus sylvestris Mill), var. Golden Delicious; pêssago (Prunus persica v. vulgaris), var. Talismã; cenoura (Daucus carota), var. Roxa; couve-flor (Brassica oleracea v. botrytis), var. Bola de Neve; batata (Solanum tuberosum L.), var. Bintje e palmito (Euterpe edulis Mart.) (Juçara ou Jiçara).

As diversas variedades foram adquiridas na região de Piracicaba e representam, de um modo geral, as respectivas frutas e hortaliças mais comercializadas no Estado de São Paulo.

Para obtenção das frutas e hortaliças, adotou-se como critério, adquirir somente aquelas que se apresentavam em excelentes condições para o consumo "in natura".

Uma vez obtida, a matéria-prima era imediatamente transportada para as dependências do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo em Piracicaba, onde foi analisada e processada.

3.2. Análise da matéria-prima

Para cada fruta ou hortaliça foram determinados o pH e a % de sólidos solúveis, expressa em graus de Brix, afim de caracterizar a matéria-prima utilizada.

Para a determinação do pH, utilizou-se um potenciômetro Metrohm, Modelo E 350. A % de sólidos solúveis medida em refratômetro Bausch & Lomb (0-40°).

3.3. Determinação da atividade da polifenol oxidase (PFO)

A atividade da PFO foi determinada de acordo com a técnica descrita por PONTING e JOSLYN (1948), com algumas alterações.

Amostras de 40 g de fruta ou hortaliça, descascada, e 160 ml de água destilada gelada ($0^{\circ} - 4^{\circ}\text{C}$), foram trituradas por três minutos em liquidificador. O material assim preparado, foi centrifugado (International K) por 15 minutos a 1500 rpm. O líquido sobrenadante foi passado para um Erlenmeyer de 250 ml com tampa e colocado em banho de gelo picado, para ser utilizado como fonte enzimica (extrato enzimico).

Em outro Erlenmeyer de 250 ml foram adicionados, 3 ml de catecol 0,1M e 96 ml de tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 (substrato), que a seguir foi deixado em banho-maria a 30°C até estabilizar a temperatura. A este substrato foi adicionado 1 ml do extrato enzimico, sendo então rapidamente homogeneizado; tomou-se cerca de 10 ml em um tubo do espectrofotômetro, efetuando-se 10 leituras de 1 em 1 minuto, em 425 nm.

O espectrofotômetro usado foi o Coleman Junior II, modelo 6/20, 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 (PF0), foi definida como a quantidade de extrato enzimico que acusou um aumento na absorbância de 0,001 unidades por minuto.

3.4. Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com a técnica descrita por FERHRMANN e DIAMOND (1967) , com algumas modificações.

Amostras de 40 g de fruta ou hortalica, des - cascada, e 160 ml de água destilada gelada (0° - 4°C), foram trituradas por três minutos em liquidificador. O material assim preparado, foi centrifugado (International K) por 15 minutos a 1500 rpm. O líquido sobrenadante foi passado para um Erlenmeyer de 250 ml com tampa e colocado em banho de gelo picado, para ser utilizado como fonte enzimica (extrato enzimico).

Em outro Erlenmeyer de 50 ml foram adiciona - dos, 20 ml de tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 e 2 ml do extrato en - zimico, que a seguir foi deixado em banho-maria a 25°C até es - tabilizar a temperatura. Após a estabilização, foi adicionado 1 ml de guaiacól 0,5 % e em seguida 1 ml de H_2O_2 0,08 %, sendo então rapidamente homogeneizado; tomou-se a seguir 10 ml em tu - bo do espectrofotômetro, efetuando-se 10 leituras de 1 em 1 mi - nuto, em 470 nm.

O espectrofotômetro usado foi o Coleman Junior II, modelo 6/20, previamente calibrado com água destilada. Co - mo controle para a reação enzimica foi utilizado um tubo do es -

pectrofotômetro contendo a mistura reativa menos o peróxido de hidrogênio (tampão fosfato, extrato enzimico e guaiacol).

Também no caso de peroxidase uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de extrato enzimico que acusou um aumento na absorbância de 0,001 unidades por minuto.

3.5. Condições em que foram estudadas as atividades da polifenol oxidase e da peroxidase

As atividades da polifenol oxidase e da peroxidase foram estudadas nas frutas e hortaliças nas seguintes condições:

- a. No extrato enzimico obtido da matéria-prima "in natura".

Neste caso determinou-se a atividade ótima das enzimas, sendo feitas seis repetições para cada fruta ou hortaliça, em estudo.

- b. No extrato enzimico submetido à tratamento térmico.

Após a obtenção do extrato de cada enzima, 5 ml deste, em tubo de ensaio (série de três tubos), foi colocado em

banho-maria às temperaturas de 70° , 80° e 90°C . Após a estabilização da temperatura, foram contados 2 minutos e o extrato foi então imediatamente resfriado, colocando-se em banho de gelo picado. Após o resfriamento, foi feita a avaliação da atividade das duas enzimas, com duas repetições para cada tratamento térmico em estudo.

c. No extrato enzimico tratado com metabissulfito de potássio.

Foi utilizado metabissulfito a 0,05, 0,1 e 0,2%, porcentagem esta calculada sobre o peso de fruta ou hortaliça utilizada na obtenção do extrato (40 g). O metabissulfito foi adicionado juntamente com a água destilada, à fruta ou hortaliça antes de ser triturada no liquidificador. Para cada concentração em estudo foram feitas duas repetições.

d. No extrato tratado com ácido ascórbico.

Foi utilizado ácido ascórbico a 0,1, 0,5 e 1 %, porcentagem também calculada sobre o peso da fruta ou hortaliça utilizada na obtenção do extrato (40 g). O ácido ascórbico foi adicionado juntamente com a água destilada à fruta ou hortaliça, antes de ser triturada no liquidificador. Foram feitas duas repetições para cada concentração de ácido ascórbico em estudo.

e. No extrato obtido da fruta ou hortaliça após zero, 30 e 60 dias do processamento térmico (appertização).

Neste caso também foram feitas duas repetições para cada período de tempo estudado.

3.6. Processamento das frutas

As frutas foram processadas na forma de frutas em calda. A Figura 1 mostra o fluxograma das operações utilizadas no processamento.

3.6.1. Preparo

Conforme a fruta, variou o modo como foi feito o preparo. Os pêssegos foram descascados, cortados e descaroçados em metades. As peras e maçãs também foram descascadas e cortadas em metades. A banana foi descascada e cortada em pedaços de 9 cm de comprimento. O figo foi apenas cortado em metades. O descascamento foi feito à mão, tendo-se o cuidado de mergulhar frequentemente as frutas numa solução de cloreto de sódio a 2 %, como um tratamento prévio temporário para evitar o escurecimento enzimico.

Figura 1 - Fluxograma das operações utilizadas no processamento das frutas.

3.6.2. Imersão em solução de espera

Após o preparo, as frutas, exceção feita à banana, foram imersas em uma solução contendo 2 % de cloreto de sódio, onde ficaram até que o processamento tivesse prosseguimento.

3.6.3. Acondicionamento

O acondicionamento foi feito em latas de 1 kg (99,5 x 118,0 mm) revestidas internamente com verniz epoxi, obtidas da Rheem Metalúrgica S.A. Em cada lata foram colocadas 500 g da fruta e 1,5 g de ácido cítrico, no caso da pera e pêssego, e 3,0 g no caso da banana, maçã e figo. A seguir foi adicionado xarope de sacarose a 50⁰ Brix até cobrir todo o material, deixando um espaço-livre de 6 a 8 mm. Para facilitar a exaustão, o xarope foi adicionado à quente (cerca de 90⁰C).

3.6.4. Exaustão e recravação

Os recipientes devidamente preenchidos, ainda abertos, foram colocados em banho-maria com água em ebulição (98⁰C), ficando a parte superior das latas a cerca de 3 cm acima do nível da água. Os recipientes foram aquecidos até que a temperatura do xarope atingisse 85⁰C, no centro geométrico da lata. Após a exaustão, as latas foram recravadas em recravadeira de laboratório, da Dixie Canner Co, e conduzidas para a esterelização.

3.6.5. Esterilização

A esterilização foi feita por imersão das latas em água fervente (98°C), por 30 min. no caso do pêssego, pera, maçã e figo e por 40 min. no caso das bananas.

3.6.6. Resfriamento e armazenamento

Após a esterilização, as latas foram resfriadas por imersão em tanque com circulação de água fria. As latas foram retiradas com uma temperatura de cerca de 35°C , escurridas e armazenadas à temperatura ambiente ($25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$).

3.7. Processamento das hortaliças

3.7.1. Batata, couve-flor e cenoura

O fluxograma das operações utilizadas no processamento da batata, couve-flor e cenoura, constam da Figura 2.

3.7.1.1. Preparo

As batatas foram descascadas à mão, tendo-se o cuidado de mergulhá-las frequentemente numa salmoura com 2 % de cloreto de sódio, e processadas inteiras. A couve-flor foi cortada em pedaços (5 cm de comprimento) e a cenoura em rodinhas (1 cm de espessura).

Figura 2 - Fluxograma das operações utilizadas no processamento da batata, couve-flor e cenoura.

3.7.1.2. Imersão em solução de espera e branqueamento

As batatas não foram branqueadas, permanecendo imersas em uma salmoura com 2 % de cloreto de sódio, até o acondicionamento.

A cenoura e a couve-flor foram branqueadas por imersão em água fervente (98°C) por 3 min., após o que foram imediatamente resfriadas.

3.7.1.3. Acondicionamento

O acondicionamento, também como para as frutas, foi feito em latas de 1 kg ($99,5 \times 118,0$ mm), revestidas internamente com verniz epoxi, obtidas da Rheem Metalúrgica S.A. Em cada lata foram colocadas 500 g de hortaliça e a seguir adicionada salmoura a 3 %, a quente (cerca de 90°C), até cobrir o material, deixando-se um espaço livre de 6 a 8 mm.

3.7.1.4. Exaustão e recravação

Os recipientes devidamente preenchidos, ainda abertos, foram parcialmente imersos em água em ebulição, ficando a parte superior dos mesmos a cerca de 3 cm acima do nível da água. Os recipientes foram aquecidos até que a temperatura da

salmoura atingisse 85°C , no centro geométrico da lata. Após exaustão as latas foram recravadas em recravadeira Dixie e conduzidas para a esterilização.

3.7.1.5. Esterilização

A esterilização destas hortaliças foi feita em autoclave, a $115,5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

3.7.1.6. Resfriamento e armazenamento

Imediatamente após a esterilização as latas foram resfriadas por imersão em tanque com circulação de água fria. As latas foram retiradas com uma temperatura de cerca de 35°C , escorridas e armazenadas à temperatura ambiente ($25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$).

3.7.2. Palmito

A Figura 3 mostra o fluxograma das operações utilizadas no processamento do palmito.

3.7.2.1. Descascamento

No descascamento inicial, foram deixadas duas bainhas protegendo o creme. Cada creme foi dividido ao meio, separando-se ponta e base, que foram processadas separadamente.

Figura 3 - Fluxograma das operações utilizadas no processamento do palmito.

O descascamento final e o corte do creme em pedaços (toletes com 9 cm de comprimento), foram efetuados dentro de uma solução contendo 0,5 % de ácido cítrico, como um tratamento prévio temporário para evitar o escurecimento enzimico.

3.7.2.2. Imersão em solução de espera

Após o corte do creme, os toletes foram imediatamente colocados numa solução de espera contendo 5 % de cloreto de sódio e 1 % de ácido cítrico, onde permaneceram até que fosse aplicado o branqueamento.

3.7.2.3. Branqueamento e resfriamento

O branqueamento foi feito por imersão dos toletes numa salmoura em ebulição, durante 20 min. A salmoura continha 2 % de cloreto de sódio e 0,2 % de ácido cítrico. Imediatamente após o branqueamento, os toletes foram resfriados por imersão em água à temperatura entre 3^o e 5^oC.

3.7.2.4. Acondicionamento

O acondicionamento foi feito da mesma maneira que para as outras hortaliças (item 3.7.1.3.), variando apenas a composição da solução de enlatamento, que conteve 3 % de cloreto de sódio e 0,7 % de ácido cítrico (pH de equilíbrio 4,3).

3.7.2.5. Exaustão e recravação

Foi feita da mesma maneira que para as outras hortaliças (item 3.7.1.4.).

3.7.2.6. Esterilização

A esterilização foi feita por imersão das latas em água fervente (98°C) por 45 minutos.

3.7.2.7. Resfriamento e armazenamento

Também foram feitos da mesma maneira que para as outras hortaliças (item 3.7.1.6.).

3.8. Análise estatística

Foram analisados somente os dados da atividade enzimica (absorbância) obtidos nas frutas e hortaliças "in natura". Foi feita análise de regressão polinomial (1º e 2º graus) dos dados (GOMES, 1960), para se verificar o comportamento das enzimas durante o desenvolvimento da reação, isto é, se sua atividade tem um crescimento linear ou quadrático em relação ao tempo.

O esquema de análise de variância foi o que se segue:

<u>C. da variação</u>	<u>G.L.</u>
R. Linear	1
R. Quadrática	1
Resíduo	8
Total	10

Para cada caso foi determinado o coeficiente de determinação (r^2) que indica a proporção da variação total dos dados, explicada pela regressão. Neste caso:

$$r^2 = \frac{\text{SQ Regressão}}{\text{SQ Total}}$$

No caso da regressão linear foi adotado o seguinte modelo:

$$y_i = a + bx_i + e_i$$

e no caso da regressão quadrática:

$$y_i = a + bx_i + cx_i^2 + e_i$$

onde:

x_i = tempo em minutos

y_i = absorvância

$e_i \sim N(0, \sigma^2)$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados (Quadros 1 a 37) correspondem, de um modo geral, às médias das diversas determinações.

4.1. Análise da matéria-prima

Para caracterizar a matéria-prima utilizada , foram feitas análises de pH e sólidos solúveis, cujos resultados são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - pH e sólidos solúveis das frutas "in natura".

Frutas	pH	Sólidos solúveis
Pera	3,5	9,0
Figo	4,6	5,0
Banana	4,6	18,5
Maçã	3,8	13,5
Pêssego	3,1	12,0

Quadro 2 - pH e sólidos solúveis das hortaliças "in natura".

Hortaliças	pH	Sólidos solúveis
Cenoura	7,9	6,0
Couve-flor	6,1	8,0
Batata	6,0	5,0
Palmito (ponta)	7,5	3,5
Palmito (base)	7,1	3,0

4.2. Atividade das enzimas nas frutas e hortaliças

O estudo do sistema enzimico das frutas pera, figo, banana, maçã e pêssago indicou a presença tanto da polifenol oxidase como da peroxidase, (Quadro 3).

Quadro 3 - Atividade da polifenol oxidase e peroxidase (em unidades/ml) nas frutas "in natura".

Frutas	Polifenol oxidase	Peroxidase
Pera	18,6	0,8
Figo	2,3	71,3
Banana	36,0	0,5
Maçã	7,3	1,3
Pêssego	6,3	14,1

No sistema enzimico de peras d'Água foi constatada atividade das duas enzimas, mas a atividade da peroxidase é pequena, indicando que neste caso apenas a polifenol oxidase é importante no escurecimento enzimico. HALIM e MONTGOMERY (1978) definiram também o escurecimento enzimico de peras d'Anjou, como causado pela oxidação dos compostos fenólicos da fruta pela enzima polifenol oxidase.

Segundo WEAVER e CHARLEY (1974), o escurecimento enzimico em banana é devido a oxidação de compostos fenólicos pela polifenol oxidase. Os nossos resultados também demonstram ser a polifenol oxidase a enzima responsável pelo escurecimento enzimico em bananas, isto porque apenas pequenos traços de atividade da peroxidase foram constatados.

No caso da maçã também a polifenol oxidase apresentou uma atividade maior que a peroxidase, o que confirma os resultados obtidos por SMOCK e NEUBERT (1950), que estudando o sistema enzimico de maçãs concluíram que a polifenol oxidase pode ser mais importante do que a peroxidase, que não ultrapassa 30 % do total de enzimas presentes.

Pelo Quadro 3, pode-se observar ainda que, duas foram as frutas (figo e pêssego), em que a atividade da peroxidase foi maior do que a da polifenol oxidase. No figo a atividade da peroxidase foi muito maior em relação a da polifenol oxidase, podendo-se afirmar que neste caso a peroxidase é a enzima mais importante.

No caso do pêssego, apesar da peroxidase apresentar-se mais ativa, a atividade da polifenol oxidase também é apreciável. REYS e LUH (1960) também caracterizam a peroxidase e a polifenol oxidase como as duas enzimas relacionadas com a reação de escurecimento em pêssegos.

No caso das hortaliças, verifica-se pelo Quadro 4, que apenas em duas delas a polifenol oxidase apresentou atividade: couve-flor e palmito. Em cenoura e batata, somente a peroxidase apresentou atividade. Em couve-flor foi constatada a atividade das duas enzimas, mas a atividade da polifenol oxidase é muito pequena, indicando que a peroxidase é mais importante no escurecimento enzimico desta hortaliça.

Quadro 4 - Atividade da polifenol oxidase e peroxidase (em unidade/ml) nas hortaliças "in natura".

Hortaliças	Polifenol oxidase	Peroxidase
Cenoura	0,0	36,1
Couve-flor	2,3	88,5
Batata	0,0	39,3
Palmito (ponta)	28,6	300,0
Palmito (base)	104,6	360,6

Nos estudos feitos com palmito, trabalhou-se com a ponta e a base de um mesmo creme, separadamente, isto porque, nos estudos preliminares constatou-se uma marcada diferença de atividade entre as enzimas naquelas partes da hortaliça, principalmente quanto à atividade da polifenol oxidase.

Com relação ao escurecimento enzimico do palmito, a maioria dos autores o define como sendo um fenômeno devido a ação enzimica da polifenol oxidase (LIMA et alii ; 1974; PASCHOALINO, 1978). Pelos nossos resultados podemos dizer que não só a peroxidase está também presente no sistema enzimico do palmito, como apresenta maior atividade que a polifenol oxidase. Neste caso, portanto, as duas enzimas são importantes.

É importante ainda no palmito, ressaltar a intensa atividade das duas enzimas em estudo, quando comparada com as outras hortaliças, o que explica a rapidez com que o palmito escurece durante o preparo para o seu processamento.

Assim, de um modo geral, vemos que em algumas frutas a polifenol oxidase é a enzima mais importante, em outras a peroxidase, e que no caso das hortaliças a peroxidase é a enzima mais importante.

4.3. Comportamento da atividade das enzimas

Através do cálculo de regressão pode-se observar como se comportam as atividades da polifenol oxidase e peroxidase no decurso da reação de escurecimento.

No caso das frutas, foi observado (Quadro 5), que tanto em banana como em pera a atividade da polifenol oxidase se caracteriza por um crescimento linear.

Quadro 5 - Caracterização do comportamento da atividade da polifenol oxidase em frutas.

Frutas	Equação			r^2
	a	b	c	
Banana	0,0049	0,0372	-	0,9987
Pera	0,0484	0,0202	-	0,9634

Em figo e pêssago a enzima mais importante é a peroxidase, que também se caracteriza, assim como a polifenol oxidase, por um crescimento linear em sua atividade (Quadro 6).

Quadro 6 - Caracterização do comportamento da atividade da peroxidase em frutas.

Frutas	Equação			r^2
	a	b	c	
Pêssego	0,1286	0,0248	-	0,9840
Figo	0,0196	0,1414	-	0,9921

Em maçã, devido a pequena atividade das duas enzimas, os dados não puderam ser analisados.

No caso das hortaliças, a atividade da polifenol oxidase, também se caracteriza por um crescimento linear (Quadro 7), tendo isto sido constatado em palmito (ponta e base). A couve-flor que também apresenta atividade da polifenol oxidase não pode ter seus dados analisados por ser esta atividade muito pequena.

A atividade da peroxidase em hortaliças, foi a única dentre as enzimas analisadas, que se caracterizou por uma regressão quadrática (Quadro 8), diferenciando-se assim da peroxidase das frutas.

Quadro 7 - Caracterização do comportamento da atividade da polifenol oxidase em hortaliças.

Hortaliças	Equação			r^2
	a	b	c	
Palmito (base)	0,1147	0,1047	-	0,9873
Palmito (ponta)	0,0315	0,0303	-	0,9941

Quadro 8 - Caracterização do comportamento da atividade da peroxidase em hortaliças.

Hortaliças	Equação			r^2
	a	b	c	
Couve-flor	1,2293	0,1102	-0,0303	0,8569
Palmito (base)	0,5948	0,1703	-0,0179	0,9945
Palmito (ponta)	0,3196	0,1536	-0,0093	0,9992
Cenoura	0,2198	0,0717	-0,0041	0,9990
Batata	0,1718	0,0708	-0,0044	0,9984

Pelos Quadros 5, 6, 7 e 8, pode-se observar que os valores dos coeficientes de determinação (r^2) em todos os casos, tanto naqueles em que prevaleceu a regressão linear (polifenol oxidase e peroxidase das frutas, polifenol oxidase das hortaliças), como naqueles em que prevaleceu a regressão quadrática (peroxidase das hortaliças), mostram o grande ajustamento dos dados às equações consideradas para cada caso.

4.4. Efeito dos métodos de inativação enzimica

4.4.1. Polifenol oxidase em frutas

No sistema enzimico de todas as frutas foi constatada a atividade da polifenol oxidase. O figo foi a fruta que apresentou a menor atividade para esta enzima, mas apesar disso, a polifenol oxidase do figo foi a que demonstrou maior resistência ao tratamento térmico, não sendo totalmente inativada mesmo no binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos, tratamento que inativou completamente a enzima nas outras frutas (Quadro 9).

A polifenol oxidase de pera d'Água foi a que demonstrou maior sensibilidade ao tratamento térmico. Já RIVAS e WHITAKER (1973), trabalhando com polifenol oxidase de peras Bartlett, concluíram que ela se caracteriza por uma grande resistência térmica, relatando em seus resultados que após 60 minutos de aquecimento a 75°C permanecia ainda 35 a 27 % de atividade da en

zima. HALIM e MONTGOMERY (1978) trabalhando também com peras d'Anjou, relataram que 50 % da atividade da enzima foi inativada após aquecimento a $80^{\circ}\text{C}/2,25$ minutos. Em nosso trabalho a polifenol oxidase da pera não pode ser caracterizada como tendo uma grande resistência térmica, isto porque após aquecimento a $70^{\circ}\text{C}/2$ minutos, 90,5 % de sua atividade foi perdida e a $80^{\circ}\text{C}/2$ minutos conseguimos 100 % de inativação.

O tratamento térmico também foi eficiente para a inativação da polifenol oxidase da banana, porém somente foi completamente inativada pelo binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos.

A polifenol oxidase da maçã apresentou grande sensibilidade ao tratamento térmico, pois no binômio $70^{\circ}\text{C}/2$ minutos houve uma redução de 75 % em sua atividade e a $80^{\circ}\text{C}/2$ minutos, foi obtida a inativação total.

WONG et alii (1971) trabalhando com pêssegos da variedade Clingstone isolaram quatro isoenzimas que se caracterizavam por uma diferença em relação à estabilidade ao tratamento térmico, entretanto todas elas foram rapidamente inativadas a $76^{\circ}\text{C}/2$ minutos. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho para a variedade Talismã, pois a polifenol oxidase desta variedade de pêssogo foi totalmente inativada pelo binômio $80^{\circ}\text{C}/2$ minutos.

Quadro 9 - Efeito do calor na atividade da polifenol oxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Tratamentos térmicos (2 minutos)		
	70°C	80°C	90°C
Pera	90,5	100,0	100,0
Figo	25,0	50,0	75,0
Banana	52,8	94,5	100,0
Maçã	75,0	100,0	100,0
Pêssego	28,6	100,0	100,0

Quanto ao efeito do metabissulfito de potássio (Quadro 10), vemos que a polifenol oxidase da banana foi a que demonstrou maior resistência à inativação por aquele composto químico, não sendo totalmente inativada nem mesmo na maior concentração usada (0,2 %), que foi suficiente para a total inativação da enzima nas outras frutas. A polifenol oxidase da pera demonstrou pouca estabilidade na presença do metabissulfito de potássio, sendo sua atividade reduzida em 94,2 % e 100 % respectivamente a 0,05 e 0,1 %. Já para maçã, pêssego e figo, a polifenol oxidase mostrou-se muito sensível aquele tratamento químico, conseguindo-se 100 % de inativação na menor concentração usada (0,05 %).

Quadro 10 - Efeito da adição de metabissulfito de potássio na atividade da polifenol oxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Metabissulfito de Potássio		
	0,05 %	0,1 %	0,2 %
Pera	94,2	100,0	100,0
Figo	100,0	100,0	100,0
Banana	20,0	71,5	91,1
Maçã	100,0	100,0	100,0
Pêssego	100,0	100,0	100,0

Pelo Quadro 11 observa-se que a polifenol oxidase da banana, foi também a enzima mais resistente à inativação pelo ácido ascórbico, não sendo totalmente inibida na maior concentração utilizada (1 %), enquanto que a polifenol oxidase das outras frutas tiveram 100 % de inibição com 0,5 % daquele composto químico. A polifenol oxidase do figo foi a que se mostrou mais sensível à inativação pelo ácido ascórbico sendo 100% inativada na menor concentração usada (0,1 %).

Quadro 11 - Efeito da adição de ácido ascórbico na atividade da polifenol oxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Ácido Ascórbico		
	0,1 %	0,5 %	1,0 %
Pera	22,3	100,0	100,0
Figo	100,0	100,0	100,0
Banana	13,6	46,0	91,1
Maçã	43,0	100,0	100,0
Pêssego	16,7	100,0	100,0

Observando-se os Quadros 9, 10 e 11 vemos que a polifenol oxidase da banana foi a que se mostrou mais resistente aos tratamentos de inativação aplicados. As enzimas das outras frutas mostraram-se menos resistentes sendo mais facilmente inativadas, com exceção da polifenol oxidase do figo que apresentou alta resistência ao tratamento térmico. De modo geral, todos os tratamentos aplicados se mostraram capazes de inibir a polifenol oxidase das frutas sendo o metabissulfito considerado o método mais eficiente. O metabissulfito também foi considerado o melhor inibidor no caso da polifenol oxidase do abacate (IADEROZA et alii, 1980) e da manga (PARK et alii, 1980).

O Quadro 12, dá uma visão geral da resistência da polifenol oxidase das frutas aos tratamentos empregados.

Quadro 12 - Classificação das frutas quanto à resistência da polifenol oxidase aos tratamentos de inativação.

Tratamentos	Resistência à inativação (ordem decrescente)
Calor	Figo > Banana > Pêssego > Maçã > Pera
Metabissulfito de potássio	Banana > Pera > Figo = Maçã = Pêssego
Ácido ascórbico	Banana > Pêssego > Pera > Maçã > Figo

4.4.2. Peroxidase em frutas

Foi em figo que se constatou a maior atividade da peroxidase, encontrada nas frutas. Foi também a peroxidase do figo que demonstrou a maior resistência ao tratamento térmico (Quadro 13), não se conseguindo a inativação total nem mesmo no tratamento mais severo aplicado ($90^{\circ}\text{C}/2$ minutos), enquanto que nas outras frutas aquela enzima foi totalmente inativada. No caso da pera, banana e pêssego a peroxidase demonstrou grande sensibilidade ao tratamento térmico, conseguindo-se 100 % de inibição de sua atividade a $70^{\circ}\text{C}/2$ minutos. A peroxidase da maçã mostrou uma resistência um pouco maior pois no binômio $70^{\circ}\text{C}/2$ minutos obteve-se apenas 50 % de redução em sua atividade, mas a $80^{\circ}\text{C}/2$ minutos a inativação foi total.

Quadro 13 - Efeito do calor na atividade da peroxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Tratamentos Térmicos (2 minutos)		
	70 ⁰ C	80 ⁰ C	90 ⁰ C
Pera	100,0	100,0	100,0
Figo	11,2	31,9	98,6
Banana	100,0	100,0	100,0
Maçã	50,0	100,0	100,0
Pêssego	100,0	100,0	100,0

O Quadro 14 mostra o efeito do metabissulfito de potássio na atividade da peroxidase em frutas. Também neste caso a peroxidase do figo foi a que apresentou a maior resistência à inativação. Na maior concentração usada (0,2 %) houve uma redução de apenas 24,1 % em sua atividade. Já para a pera e banana, a peroxidase foi bem mais sensível, obtendo-se 100 % de inativação na menor concentração usada (0,05 %). No caso da maçã e pêssego houve uma certa resistência à inativação pelo metabissulfito de potássio, uma vez que a inibição total da atividade da enzima não foi alcançada, nem mesmo a 0,2 % (maior concentração).

Quadro 14 - Efeito da adição do metabissulfito de potássio na atividade da peroxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Metabissulfito de Potássio		
	0,05 %	0,1 %	0,2 %
Pera	100,0	100,0	100,0
Figo	16,1	21,0	24,1
Banana	100,0	100,0	100,0
Maçã	80,0	80,0	80,0
Pêssego	58,4	58,4	58,4

No Quadro 15 está demonstrado o efeito do ácido ascórbico na atividade da peroxidase das frutas. Mais uma vez, a peroxidase do figo foi a que se mostrou mais estável, porém neste caso a inativação total foi conseguida com 1 % de ácido ascórbico (maior concentração utilizada). A peroxidase mais sensível, a este tratamento, foi a da banana, conseguindo-se 100 % de inativação na menor concentração usada (0,1 %). Com exceção do figo, todas as outras frutas tiveram a peroxidase totalmente inativada com 0,5 % de ácido ascórbico.

Quadro 15 - Efeito da adição de ácido ascórbico na atividade da peroxidase em frutas (% de inibição).

Frutas	Ácido Ascórbico		
	0,1 %	0,5 %	1,0 %
Pera	50,0	100,0	100,0
Figo	0,8	99,3	100,0
Banana	100,0	100,0	100,0
Maçã	0,0	100,0	100,0
Pêssego	48,0	100,0	100,0

Pelos Quadros 13, 14 e 15, observa-se que a peroxidase do figo foi a mais resistente aos tratamentos de inativação aplicados. Nas outras frutas a peroxidase apresentou menor resistência aos tratamentos, especialmente a da banana, que se mostrou como a mais sensível.

Dos tratamentos aplicados o metabissulfito foi o inibidor menos potente. Tanto o tratamento térmico quanto o ácido ascórbico se mostraram eficientes, sobressaindo-se o tratamento térmico (exceção feita ao figo) como o mais eficiente inibidor para a peroxidase das frutas.

Uma visão geral da resistência da peroxidase das frutas aos tratamentos aplicados, pode ser obtida pela observação do Quadro 16.

Quadro 16 - Classificação das frutas quanto à resistência da peroxidase aos tratamentos de inativação.

Tratamentos	Resistência à Inativação (ordem decrescente)
Calor	Figo > Maçã > Pera = Banana = Pêssego
Metabissulfito de potássio	Figo > Pêssego > Maçã > Pera = Banana
Ácido Ascórbico	Figo > Maçã > Pêssego > Pera > Banana

4.4.3. Polifenol oxidase em hortaliças

Dentre as hortaliças estudadas, somente na couve-flor e palmito foi constatada atividade da polifenol oxidase, sendo a maior atividade registrada no palmito (base).

Analisando-se o Quadro 17 observamos que a polifenol oxidase do palmito mostrou uma maior resistência a inativação pelo tratamento térmico do que a polifenol oxidase da couve-flor, que perdeu 100 % de sua atividade no binômio 70°C/2 minutos. A polifenol oxidase da ponta do creme do palmito mos -

trou-se menos resistente que a da base, sendo totalmente inibida pelo binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos (tratamento mais severo aplicado), mas que não inativou totalmente a polifenol oxidase da base.

Quadro 17 - Efeito do calor na atividade da polifenol oxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Tratamentos Térmicos (2 minutos)		
	70°C	80°C	90°C
Cenoura	-	-	-
Couve-flor	100,0	100,0	100,0
Batata	-	-	-
Palmito (ponta)	40,7	84,4	100,0
Palmito (base)	57,3	88,4	97,1

O Quadro 18 demonstra o efeito inibidor do metabisulfito de potássio na atividade da polifenol oxidase em hortaliças. Também neste caso, a polifenol oxidase da couve-flor foi a mais sensível, sendo totalmente inativada a 0,05 %, menor concentração usada. Já a polifenol oxidase do palmito se mostrou muito resistente não sendo totalmente inativada nem mesmo na maior concentração usada (0,2 %). Nesta concentração, obteve-se uma inibição de 96 % e 76,1 %, respectivamente para a enzima da ponta e da base do creme.

Quadro 18 - Efeito da adição de metabissulfito de potássio na atividade da polifenol oxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Metabissulfito de Potássio		
	0,05 %	0,1 %	0,2 %
Cenoura	-	-	-
Couve-flor	100,0	100,0	100,0
Batata	-	-	-
Palmito (ponta)	36,0	56,0	96,0
Palmito (base)	13,1	37,0	76,1

Quanto ao efeito do ácido ascórbico na polifenol oxidase das hortaliças (Quadro 19), verifica-se que ele foi eficiente nas concentrações usadas, para inativar totalmente a polifenol oxidase da couve-flor, o mesmo não acontecendo com a polifenol oxidase do palmito. A enzima extraída da base mostrou uma resistência bem maior à inativação pelo ácido ascórbico. Na maior concentração usada (1 %), enquanto a polifenol oxidase da ponta teve sua atividade reduzida em 96,6 % a da base teve uma redução de apenas 6,8 %. Nas concentrações utilizadas portanto, o ácido ascórbico pode ser considerado ineficiente para controlar o escurecimento da base do creme do palmito.

Quadro 19 - Efeito da adição de ácido ascórbico na atividade da polifenol oxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Ácido Ascórbico		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Cenoura	-	-	-
Couve-flor	100,0	100,0	100,0
Batata	-	-	-
Palmito (ponta)	41,4	89,7	96,6
Palmito (base)	0,0	3,4	6,8

Pelos Quadros 17, 18 e 19 observa-se que a polifenol oxidase do palmito, principalmente a da base do creme, foi a que mostrou maior resistência aos tratamentos de inativação. A polifenol oxidase da couve-flor foi, por sua vez, a mais sensível. Verifica-se também que para a inativação da polifenol oxidase das hortaliças o tratamento térmico se mostrou mais eficiente, levando-se em consideração principalmente a inibição da polifenol oxidase do palmito. Neste caso, o ácido ascórbico foi o inibidor menos potente.

Pela observação do Quadro 20, pode-se ter uma visão geral da resistência da polifenol oxidase das hortaliças aos tratamentos aplicados.

Quadro 20 - Classificação das hortaliças quanto à resistência da polifenol oxidase aos tratamentos de inativação.

Tratamentos	Resistência à Inativação (ordem decrescente)
Calor	Palmito (base) > Palmito (ponta) > Couve-flor
Metabissulfito de potássio	Palmito (base) > Palmito (ponta) > Couve-flor
Ácido Ascórbico	Palmito (base) > Palmito (ponta) > Couve-flor

4.4.4. Peroxidase em hortaliças

Como já discutido anteriormente, a peroxidase mostrou ser a enzima mais abundante e mais ativa nas hortaliças, sendo neste caso a mais importante (Quadro 4).

A peroxidase do palmito (base) foi a que apresentou a maior atividade e também a que demonstrou maior resistência ao tratamento térmico (Quadro 21). A peroxidase da cenoura foi por sua vez a mais sensível àquele tratamento, obtendo-se sua total inativação no binômio 80°C/2 minutos. A peroxidase da couve-flor e da batata mostrou uma resistência térmica maior que a da cenoura não sendo totalmente inativada nem mesmo no binômio 90°C/2 minutos (tratamento mais enérgico aplicado).

Quadro 21 - Efeito do calor na atividade da peroxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Tratamentos Térmicos (2 minutos)		
	70 ⁰ C	80 ⁰ C	90 ⁰ C
Cenoura	37,5	100,0	100,0
Couve-flor	27,5	97,0	99,4
Batata	42,5	91,8	95,9
Palmito (ponta)	7,9	17,7	40,6
Palmito (base)	10,5	12,1	27,5

O metabissulfito de potássio (Quadro 22) não foi um bom inibidor, pois em todas as hortaliças, a peroxidase mostrou-se resistente à inativação por esse tratamento. A mais resistente, também neste caso, foi a peroxidase do palmito (base). Na maior concentração utilizada houve uma redução de apenas 3,3 % em sua atividade. Dentre as outras hortaliças, a peroxidase da cenoura foi a que se mostrou mais sensível ao metabissulfito, embora tenha tido uma redução de apenas 33,8 % em sua atividade na concentração mais elevada desse composto químico (0,2 %).

Quadro 22 - Efeito da adição de metabissulfito de potássio na atividade da peroxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Metabissulfito de Potássio		
	0,05 %	0,1 %	0,2 %
Cenoura	22,5	30,4	33,8
Couve-flor	2,8	3,3	5,5
Batata	11,8	14,9	21,3
Palmito (ponta)	4,1	8,2	13,6
Palmito (base)	2,8	2,8	3,3

Também no tratamento com ácido ascórbico (Quadro 23) a peroxidase do palmito (base) foi a mais resistente à inativação, pois na maior concentração usada (1 %), houve uma redução de apenas 8,5 % em sua atividade. A peroxidase que demonstrou maior sensibilidade a este tratamento foi a da cenoura, vindo logo em seguida, a da batata. Entretanto no caso da batata, ao invés de inativar a enzima, o ácido ascórbico, na concentração de 0,1 %, promoveu sua ativação, pois a atividade encontrada foi sempre maior do que a obtida na enzima da hortaliça sem tratamento ("in natura"). Não foi encontrada explicação para este fenômeno. Com a peroxidase da couve-flor e palmito (ponta) não se conseguiu inativação total, mesmo na maior concentração utilizada (1 %).

Quadro 23 - Efeito da adição de ácido ascórbico na atividade da peroxidase em hortaliças (% de inibição).

Hortaliças	Ácido Ascórbico		
	0,1 %	0,5 %	1,0 %
Cenoura	10,8	100,0	100,0
Couve-flor	2,8	15,8	97,3
Batata	0,0	98,6	100,0
Palmito (ponta)	18,8	36,3	55,1
Palmito (base)	2,9	5,1	8,5

Dentre as hortaliças estudadas, a peroxidase do palmito foi a que se mostrou mais resistente à inativação, principalmente a extraída da base do creme. Por outro lado, a peroxidase da cenoura foi a que ofereceu menor resistência aos tratamentos aplicados. Os tratamentos mais eficientes para a inativação da peroxidase em hortaliças foram o térmico e o ácido ascórbico. O tratamento térmico se mostrou mais eficiente no caso da cenoura, couve-flor e batata, o mesmo acontecendo com o ácido ascórbico. Mais uma vez o metabissulfito não se mostrou um inibidor eficiente para a peroxidase nas concentrações utilizadas. É importante ressaltar ainda, que nenhum dos tratamentos aplicados foi suficiente para inativar de maneira adequada a peroxidase do palmito (ponta e base).

O Quadro 24 dá uma visão geral da resistência da peroxidase aos tratamentos de inativação aplicados.

Quadro 24 - Classificação das hortaliças quanto à resistência da peroxidase aos tratamentos de inativação.

Tratamentos	Resistência à Inativação (ordem decrescente)
Calor	Palmito (base) > Palmito (ponta) > Batata > Couve-flor > Cenoura
Metabissulfito de Potássio	Palmito (base) > Couve-flor > Palmito (ponta) > Batata > Cenoura
Ácido Ascórbico	Palmito (base) > Palmito (ponta) > Couve-flor > Batata > Cenoura

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

No caso da pera, a enzima mais ativa foi a polifenol oxidase, sendo constatada uma pequena atividade da peroxidase que foi facilmente inibida pelos diferentes tratamentos aplicados (Quadro 25). A polifenol oxidase se mostrou mais ativa e também mais resistente aos tratamentos de inibição, mas mesmo assim foi também facilmente inativada. No caso do sistema enzimico da pera o tratamento mais eficiente foi o metabissulfito.

Quadro 25 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em pera.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ^o C	90,5	100,0
	80 ^o C	100,0	100,0
	90 ^o C	100,0	100,0
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	94,2	100,0
	0,10 %	100,0	100,0
	0,20 %	100,0	100,0
Ácido Ascórbico	0,1 %	22,3	50,0
	0,5 %	100,0	100,0
	1,0 %	100,0	100,0

O sistema enzimico do figo apresentou atividade tanto da polifenol oxidase quanto da peroxidase. A atividade da polifenol oxidase foi pequena, a menor encontrada nas frutas estudadas. Já a peroxidase além de ser a mais ativa foi a que apresentou maior resistência aos tratamentos aplicados (Quadro 26).

Quanto à inativação da polifenol oxidase o calor não foi um método eficiente quando comparado com o metabisulfito e o ácido ascórbico. Mesmo no binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos, não se conseguiu a inativação total da enzima, havendo uma redução de apenas 75 % em sua atividade, enquanto que os outros tratamentos proporcionaram uma inibição de 100 % nas menores concentrações utilizadas.

Quanto a peroxidase, a sua inativação total foi obtida com o ácido ascórbico, na concentração de 1 % (maior utilizada). O tratamento com metabissulfito foi o menos eficiente. Com o tratamento térmico não se conseguiu inativação total, mas no binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos houve uma redução de 98,6 % da atividade. Assim, no caso do sistema enzimico do figo o ácido ascórbico parece ser o melhor inibidor.

Dentre as frutas, a banana foi a que apresentou maior atividade da polifenol oxidase e a menor da peroxidase. A peroxidase foi facilmente inibida por todos os tratamentos aplicados (Quadro 27). Já a polifenol oxidase apresentou maior resistência, obtendo-se a sua inativação total somente com o tratamento térmico mais severo. O ácido ascórbico foi o inibidor menos eficiente, e com o metabissulfito obteve-se 97,2 % de redução na atividade, na concentração de 0,2 %. Portanto no sistema enzimico da banana, o tratamento térmico parece ser o mais eficiente para a inativação.

Quadro 26 - Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição), em figo.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ^o C	25,0	11,2
	80 ^o C	50,0	31,9
	90 ^o C	75,0	98,6
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	100,0	16,1
	0,10 %	100,0	21,0
	0,20 %	100,0	24,1
Ácido Ascórbi- co	0,1 %	100,0	0,8
	0,5 %	100,0	99,3
	1,0 %	100,0	100,0

Quadro 27 - Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em banana.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ⁰ C	52,8	100,0
	80 ⁰ C	94,5	100,0
	90 ⁰ C	100,0	100,0
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	20,0	100,0
	0,10 %	71,5	100,0
	0,20 %	97,2	100,0
Ácido Ascórbico	0,1 %	13,6	100,0
	0,5 %	46,0	100,0
	1,0 %	91,1	100,0

No caso da maçã a peroxidase apresentou uma atividade muito baixa, e o tratamento que se mostrou mais eficiente para sua inativação foi o tratamento térmico (Quadro 28). Com o ácido ascórbico, também se conseguiu a inativação total, enquanto o metabissulfito se mostrou menos eficiente, em todas as concentrações utilizadas.

Para inativação da polifenol oxidase, o método mais eficiente foi o metabissulfito, pois na menor concentração usada, já houve a total inativação da enzima. O tratamento térmico também se mostrou eficiente bem como o emprego de ácido ascórbico, mas menos eficientes que o metabissulfito. Assim, levando-se em consideração a inibição das duas enzimas, o tratamento térmico parece ser o mais indicado no caso de maçã.

Quadro 28 - Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em maçã.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70°C	75,0	50,0
	80°C	100,0	100,0
	90°C	100,0	100,0
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	100,0	80,0
	0,10 %	100,0	80,0
	0,20 %	100,0	80,0
Ácido Ascórbico	0,1 %	43,0	0,0
	0,5 %	100,0	100,0
	1,0 %	100,0	100,0

Pelo Quadro 29 vemos que, também no caso da polifenol oxidase do pêssego o melhor método de inativação foi o emprego de metabissulfito de potássio, mas também o calor e o ácido ascórbico se mostraram bons métodos de inativação. Quanto a peroxidase, enzima de maior atividade nesta fruta, o tratamento térmico foi o que se mostrou mais eficiente para a inativação, seguido pelo ácido ascórbico. Mais uma vez o metabissulfito se caracterizou como um inibidor muito pobre para peroxidase. Tudo indica que também no sistema enzimico de pêssego, o tratamento térmico seja o mais indicado.

Quadro 29 - Efeito dos métodos de inativação enzimica na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em pêssego.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70°C	28,6	100,0
	80°C	100,0	100,0
	90°C	100,0	100,0
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	100,0	58,4
	0,10 %	100,0	58,4
	0,20 %	100,0	58,4
Ácido Ascórbi- co	0,1 %	16,7	48,0
	0,5 %	100,0	100,0
	1,0 %	100,0	100,0

Fazendo-se uma comparação entre os Quadros 25, 26, 27, 28 e 29 pode-se dizer que no caso das frutas, a polifenol oxidase apresentou, em termos gerais, maior resistência à inativação que a peroxidase, principalmente com relação ao tratamento térmico. Isto confirma os resultados obtidos por JANKOW (1963) e YANKOV (1963), que em diferentes frutas observaram uma maior resistência da polifenol oxidase. Assim, a inativação da polifenol oxidase em frutas, implicará na maioria dos casos também na inativação da peroxidase.

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

Em cenoura foi constatada apenas atividade da peroxidase, e tanto o tratamento térmico quanto o ácido ascórbico se mostraram eficientes métodos de inativação, como se pode observar pelo Quadro 30. Já o metabissulfito não se mostrou um bom método de inibição, reduzindo na concentração mais alta utilizada, apenas 33,8% da atividade da enzima.

Quadro 30 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% da inibição) em cenoura.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70°C	-	37,5
	80°C	-	100,0
	90°C	-	100,0
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	-	22,5
	0,10 %	-	30,4
	0,20 %	-	33,8
Ácido Ascórbi- co	0,1 %	-	10,8
	0,5 %	-	100,0
	1,0 %	-	100,0

No sistema enzimico da couve-flor foi constatada uma pequena atividade da polifenol oxidase, sendo esta facilmente inativada em todos os tratamentos utilizados (Quadro 31). A peroxidase mostrou uma maior atividade e também uma maior resistência à inativação. Os tratamentos que deram melhores resultados foram o térmico e o emprego de ácido ascórbico, reduzindo

respectivamente, 99,4 % e 97,3 % a atividade enzimica nas condições mais severas. O metabissulfito mais uma vez não foi eficiente.

Quadro 31 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em couve-flor.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70°C	100,0	27,5
	80°C	100,0	97,0
	90°C	100,0	99,4
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	100,0	2,8
	0,10 %	100,0	3,3
	0,20 %	100,0	5,5
Ácido Ascórbico	0,1 %	100,0	2,8
	0,5 %	100,0	15,8
	1,0 %	100,0	97,3

Como visto anteriormente, em batatas, foi constatada atividade apenas da peroxidase. A total inativação da enzima só foi conseguida com o emprego do ácido ascórbico que se mostrou, como o método mais eficiente neste caso (Quadro 32).

Com o tratamento térmico, também foram obtidos bons resultados principalmente no binômio 90⁰C/2 minutos em que a atividade da enzima foi reduzida em 95,9 %. Também no caso da batata, o metabissulfito não se mostrou um bom inibidor, para a peroxidase.

Quadro 32 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em batata.

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ⁰ C	-	42,5
	80 ⁰ C	-	91,8
	90 ⁰ C	-	95,9
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	-	11,8
	0,10 %	-	14,9
	0,20 %	-	21,3
Ácido Ascórbico	0,1 %	-	0
	0,5 %	-	98,6
	1,0 %	-	100,0

Nos Quadros 33 e 34, temos o efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase extraídas da ponta e base do palmito. Na ponta as duas enzimas estudadas apresentaram uma atividade menor do que a encontrada na base do creme.

No caso da polifenol oxidase, tanto para a ponta como para a base, o calor foi o melhor método de inibição. Para a polifenol oxidase da ponta o metabissulfito de potássio e o ácido ascórbico também se mostraram eficientes como inibidores, o mesmo não acontecendo para a polifenol oxidase da base que teve uma redução de 76,1 % em sua atividade com o emprego do metabissulfito (0,2 %), e de 6,8 % pelo emprego de ácido ascórbico (1 %).

A peroxidase, no caso do palmito, apresentou uma atividade muito alta, e, conseqüentemente, uma maior resistência aos métodos de inativação aplicados. No caso da peroxidase da ponta o emprego de ácido ascórbico foi o método que apresentou os melhores resultados, seguido pelo calor. Já para a peroxidase da base, o tratamento térmico deu os melhores resultados. Apesar de ter reduzido, no binômio $90^{\circ}\text{C}/2$ minutos, apenas 27,5% da atividade da enzima. Também no caso do palmito, o metabissulfito mostrou que não é um bom inibidor para a peroxidase.

Quadro 33 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em palmito (ponta).

Métodos de Inativação		Polifenol oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ⁰ C	40,7	7,9
	80 ⁰ C	84,4	17,7
	90 ⁰ C	100,0	40,6
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	36,0	4,1
	0,10 %	56,0	8,2
	0,20 %	96,0	13,6
Ácido Ascórbico	0,1 %	41,4	18,8
	0,5 %	89,7	36,3
	1,0 %	96,6	55,1

Quadro 34 - Efeito dos métodos de inativação na atividade da polifenol oxidase e peroxidase (% de inibição) em palmito (base).

Métodos de Inativação		Polifenol Oxidase	Peroxidase
Calor (2 minutos)	70 ⁰ C	57,3	10,5
	80 ⁰ C	88,4	12,1
	90 ⁰ C	97,1	27,5
Metabissulfito de Potássio	0,05 %	13,1	2,8
	0,10 %	37,0	2,8
	0,20 %	76,1	3,3
Ácido Ascórbi- co	0,1 %	0,0	2,9
	0,5 %	3,4	5,1
	1,0 %	6,8	8,5

Pela comparação dos Quadros 30, 31, 32, 33 e 34 pode-se afirmar que no caso das hortaliças, a peroxidase apresentou uma resistência à inativação bem superior à polifenol oxidase para todos os tratamentos aplicados. Isto confirma os resultados obtidos por JANKOW (1963), que trabalhando com hortaliças observou que nelas a peroxidase apresentava-se mais resis

tente à inativação que a polifenol oxidase. Portanto para hortaliças, se inativarmos a peroxidase a polifenol oxidase consequentemente também será inativada.

4.7. Considerações sobre a regeneração das enzimas após processamento térmico

A regeneração da atividade enzimática após o tratamento térmico ou tratamento com outros agentes desnaturantes é bem conhecida. Os Quadros 35 e 36, mostram os resultados obtidos com o estudo da regeneração das enzimas polifenol oxidase e peroxidase após o processamento térmico (appertização). Podemos observar que tanto nas frutas como nas hortaliças não houve regeneração da polifenol oxidase mesmo após 60 dias do processamento. O mesmo não aconteceu com a peroxidase que em alguns casos se regenerou.

Quadro 35 - Atividade da polifenol oxidase e peroxidase (em unidades/ml.min.) em frutas após processamento térmico (appertização).

Frutas Processadas	Polifenol Oxidase			Peroxidase		
	Dias após o processamento					
	0	30	60	0	30	60
Pera	0	0	0	0	0	0
Figo	0	0	0	0	0	1
Banana	0	0	0	0	0	0
Maçã	0	0	0	0	0	0,5
Pêssego	0	0	0	0	0	0

Quadro 36 - Atividade da polifenol oxidase e peroxidase (em unidades/ml.min.) em hortaliças após o processamento térmico (appertização).

Hortaliças Processadas	Polifenol Oxidase			Peroxidase		
	Dias após o processamento					
	0	30	60	0	30	60
Cenoura	0	0	0	0	0	0,5
Couve-flor	0	0	0	0	0	0,5
Batata	0	0	0	0	0	0
Palmito (ponta)	0	0	0	0	8	50,0
Palmito (base)	0	0	0	0	6	12,0

Segundo SCHWIMMER (1972) a peroxidase é geralmente muito estável às condições adversas encontradas durante o processamento de alimentos, tais como temperatura elevada, congelamento, radiações ionizantes, desidratação e, sempre quando inativada por tais tratamentos é capaz de readquirir atividade. A regeneração da peroxidase poderá ocorrer em algumas horas ou dias, após o tratamento térmico, e esta regeneração é atribuída a uma desnaturação reversível da proteína (WANG e DIMARCO, 1972).

Pelo Quadro 36, pode-se observar que após 30 dias do processamento, já ocorreu regeneração da peroxidase do palmito, nas duas partes do creme estudadas (ponta e base). A peroxidase da ponta se apresentou menos ativa, na análise feita no palmito "in natura", do que a enzima da base, mas apresentou uma maior taxa de regeneração. Após 30 dias do processamento havia recuperado 2,6 % da atividade original enquanto que a enzima da base recuperou 1,6 % (Quadro 37).

Após 60 dias do processamento, a regeneração da peroxidase também ocorreu no figo, maçã, cenoura e couve-flor. A peroxidase da couve-flor, cenoura e do figo apresentou uma taxa de regeneração pequena em relação às outras, recuperando, respectivamente 0,5 %, 1,3 % e 1,4 % da atividade original (Quadro 37). A enzima da maçã, apesar da pouca atividade no extrato "in natura", foi a que se mostrou mais estável ao

tratamento térmico, tendo a maior taxa de regeneração durante o armazenamento (38,4 %), seguida pela enzima extraída da ponta do creme do palmito.

As enzimas da pera, banana, e pêssago demonstraram uma grande sensibilidade ao tratamento térmico, não ocorrendo regeneração durante o armazenamento do produto processado.

Quadro 37 - Regeneração da atividade da peroxidase em relação à atividade original, após processamento térmico (appertização).

Fruta ou Hortalica	% da Atividade Original Após	
	30 dias do processamen to	60 dias do prodes- samento
Figo	-	1,4
Maçã	-	38,4
Cenoura	-	1,3
Couve-flor	-	0,5
Palmito (ponta)	2,6	16,6
Palmito (base)	1,6	3,3

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- a. De um modo geral, no escurecimento enzimico de frutas a polifenol oxidase é a enzima mais importante e no de hortaliças destaca-se a peroxidase.
- b. As atividades da polifenol oxidase e peroxidase das frutas e polifenol oxidase das hortaliças apresentaram um crescimento linear durante a reação de escurecimento. Já nas hortaliças a peroxidase apresentou atividade com crescimento exponencial no decorrer da mesma reação.

- c. Em geral para as frutas, o melhor método de inativação para polifenol oxidase foi o metabissulfito de potássio e para a peroxidase o tratamento térmico.
- d. Em geral para as hortaliças, o tratamento térmico foi considerado o método mais eficiente para a inativação da polifenol oxidase, enquanto que, para a peroxidase tanto o ácido ascórbico como o tratamento térmico se mostraram adequados para controlar a atividade da enzima.
- e. Na maioria dos casos estudados ficou demonstrado que o metabissulfito de potássio não é um bom inibidor para a peroxidase.
- f. Para a pera, maçã e pêssigo, em particular, o tratamento com metabissulfito de potássio foi o melhor método para a inativação da polifenol oxidase.
- g. Nos casos particulares da polifenol oxidase da banana, palmito (ponta), palmito (base) e peroxidase da pera, maçã, pêssigo, cenoura, couve-flor e palmito (base), o tratamento térmico foi o método de inativação mais eficiente.

- h. Particularmente para a peroxidase do figo, batata e palmito (ponta), o melhor método de inativação foi o ácido ascórbico.
- i. No caso particular da polifenol oxidase do figo, tanto o metabissulfito como o ácido ascórbico mostraram-se eficientes como métodos de inativação.
- j. No caso da peroxidase da banana, em particular, todos os tratamentos estudados foram eficientes como métodos de inativação.
- l. Nas frutas, a polifenol oxidase da banana e a peroxidase do figo, foram as enzimas de maior atividade e também as que apresentaram maior resistência aos tratamentos de inativação.
- m. Nas hortaliças, a polifenol oxidase e a peroxidase do palmito (base), foram as enzimas de maior atividade e também as que apresentaram maior resistência aos tratamentos de inativação.

- n. No palmito, as atividades tanto da polifenol oxidase como da peroxidase são muito maiores na base do creme do que na ponta.
- o. Nas frutas, a polifenol oxidase apresentou, em termos gerais, maior resistência à inativação que a peroxidase, principalmente com relação ao tratamento térmico.
- p. Nas hortaliças, a peroxidase demonstrou maior resistência à inativação que a polifenol oxidase em todos os tratamentos aplicados.
- q. A polifenol oxidase das frutas e das hortaliças caracterizaram-se por uma grande sensibilidade ao tratamento térmico (apertização), não se regenerando durante o tempo em que os produtos processados ficaram armazenados.
- r. A peroxidase das frutas e das hortaliças apresentaram o fenômeno da regeneração durante o tempo em que os produtos processados ficaram armazenados, caracterizando assim, a grande estabilidade que a enzima apresenta ao tratamento térmico.

6. LITERATURA CITADA

ADAMS, J.B. e H.A.W. BLUNDSTONE, 1971. Canned fruits other than citrus. In: HULME, A.C. ed. The Biochemistry of Fruits and Their Products. London, Academic Press. vol. 2, p. 507-541.

BAUERNFEIND, J.C. e D.M. PINKERT, 1970. Food processing with added ascorbic acid. Advances in Food Research, New York, 18: 219-315.

BEDROSIAN, K.; A.I. NELSON e M.P. STEINBERG, 1959. Effect of borates and other inhibitors on enzymatic browning in apple tissue. Food Technology, Chicago, 13: 722-726.

BEDROSIAN, K.; M.P. STEINBERG e A.I. NELSON, 1960. Effect of borates and other inhibitors on enzymatic browning in apple tissue. Mechanism. Food Technology, Chicago, 14: 480-483.

- BENJAMIN, N.D. e M.W. MONTGOMERY, 1973. Polyphenol oxidase of royal ann cherries, purification and characterization. Journal of Food Science, Chicago, 38 (2): 799-806.
- BOUCHILLOUX, S., 1962. Enzymatic browning reactions. In: RUNECKLES, V.C., ed. Plant Phenolics and Their Industrial Significance. Montreal, Imperial Tobacco Co., p. 1-14.
- BRAVERMAN, J.B.S., 1963. Introduction to the Biochemistry of Foods. Amsterdam, Elsevier, 336 p.
- BUCKLEY, E.H., 1964. Dopamine in banana. In: RUNECKLES, V.C., ed. Phenolics in Normal and Diseased Fruits and Vegetables, Montreal, Imperial Tobacco Co., p-1-10.
- BUREAU, D.; J.J. MACHEIX e M.A. ROVERT-MAYER, 1977. Relation among the o-diphenol content, polyphenol-oxidase activity, and the browning capacity in some varieties of peaches. Lebensmittel - Wissenschaft Technologie, Zurich, 10 (4): 211-216.
- CHUBEY, B.B. e R.E. NYLUND, 1969. Surface browning of carrots. Cannadian Journal of Plant Science, Ottawa, 49: 421-426.

- COLLINS, J.L. e I.E. McCARTY, 1969. Comparison of microwave energy with boiling water for blanching whole potatoes. Food Technology, Chicago, 23 (3): 63-66.
- CORSE, J., 1964. The enzymatic browning of fruits and vegetables. In: RONECKLES, V.C. ed. Phenolic in Normal and Diseased Fruits and Vegetables, Montreal, Imperial Tobacco Co., p. 41-62.
- CRUESS, W.V., 1958. Commercial Fruit and Vegetables Products. 4a. ed. New York, Mc Graw-Hill, 884 p.
- DALTON, H.R. e J.M. NELSON, 1939. Tyrosinase from the wild mushroom, Lactarius piperatus. Journal of American Chemical Society, Easton, 61 (2): 2946-2950.
- DIMPFH, D. e J.C. SOMOGYI, 1975. Enzymic browning and its inhibition by various substances. Mitt. Geb. Lebensmillelunters Hyg. 66 (2): 183-190. Apud Chem. Abstr., Easton, 57: 146014t, 1975.
- EL-SAYED, A.S. e B.S. LUH, 1965. Polyphenolic compounds in canned apricots. Journal of Food Science, Chicago, 30: 1016 1020.

- EMBS, R.J. e P. MARKAKIS, 1965. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenoloxidase. Journal of Food Science, Chicago, 30 (5) 753-758.
- ESKIN, N.A.M.; H.M. HENDERSON e R.J. TOWNSEND, 1971. Biochemistry of Foods. London, Academic Press. 239 p.
- ESSELEN, W.B. e E.E. ANDERSON, 1956. Thermal destruction of peroxidase in vegetables at high temperatures. Food Research Champaign, 21: 322-325.
- FERHRMANN, H. e A.E. DIAMOND, 1967. Peroxidase activity and Phytopora resistance in different organs of the potato plant. Phytopathology, Lancaster, 57: 69-72.
- FINKLE, B.J. e R.F. NELSON, 1963. Enzyme reaction phenolic compounds: Effects of o-methyltransferase on a natural substrate of fruit polyphenol oxidase. Nature, London, 197: 902-903.
- FRANCIS, F.J.; B.J. AMLA, 1961. Effect of residual sulphur dioxide on the quality of prepeeled potatoes. American Potato Journal, New Jersey, 38: 89-94.

- GIBRIEL, A.Y.; A.F. EL-SHRIGI, S.H. KANDIL e H.A. EL-MANSY , 1978. Effect of pH, sodium chloride and sucrose on heat - inactivation and reactivation of peroxidase in certain foods. Journal of the Science Food and Agriculture, London, 29 (3): 261-266.
- GOMES, F.P., 1960. Curso de Estatística Experimental. Piracicaba, ESALQ/I.G., 229 p. (Publicação didática nº 2).
- GRIFFITHS, L.A., 1959. Detection and identification of the polyphenoloxidase substrate of the banana. Nature, London , 184: 58-59.
- GUADAGNI, D.G. e C.C. NIMMO, 1957. The time-temperature tolerance of frozen foods. III. Effectiveness of vacuum oxygen removal, and mild heat in controlling browning in frozen peaches. Food Technology, Chicago, 11: 43-47.
- GUTTERSON, M., 1971. Vegetable Processing. Park Ridge, Noyes Data. 335 p.
- HAISMAN, D.R., 1974. Effect of sulfur dioxide on oxidizing enzyme systems in plant tissues. Journal of the Science Food and Agriculture, London, 25 (7): 803-810.

- HALIM, D.H. e M.W. MONTGOMERY, 1978. Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (Pyrus communis L.). Journal of Food Science, Chicago, 43: 603-608.
- HULME, A.C., 1958. Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits. Advances in Food Research, New York, 8: 297-413.
- IADEROZA, M.; J.S. DRAETTA e M.PADULA, 1980. Polifenoloxidase da polpa de duas cultivares de abacate. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 11: 53-64.
- JANKOW, C.I., 1963. Thermal inactivation of oxidases in fruits and vegetables. Lebensmittel Ind. 10: 23-25. Apud Chem. Abstr., Easton, 63: 7578a, 1965.
- JOSLYN, M.A. e J.D. PONTING, 1951. Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruits products. Advances in Food Research, New York, 3: 1-44
- JOSLYN, M.A. e J.B.S. BRAVERMAN, 1954. The chemistry and technology of the pretreatment and preservation of fruit and vegetable products with sulphur dioxide and sulfites. Advances in Food Research, New York, 5: 97-160.

- KAHN, V., 1975. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. Journal of the Science Food and Agriculture, London, 26(9): 1319-1324.
- KAHN, V., 1977. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. Journal of Food Science, Chicago, 42: 38-43.
- KELLY, S.H.; B.J. FINKLE, 1969. Action of a ringcleaving oxygenase in preventing oxidative darkening of apple juice. Journal of the Science Food and Agriculture, London 20:629-632.
- KERTESZ, D. e R. ZITO, 1957. Polyphenoloxidase (tyrosinase) purification and molecular properties. Nature, London, 179: 1017-1018.
- KNAPP, F.W., 1965. Some characteristics of eggplant and avocado polyphenoloxidase. Journal of Food Science, Chicago, 30: 930-936.
- KUBOWITZ, F., 1938. Cleavage and resynthesis of polyphenoloxidase and of hemocyanin. Biochem. Z., 299: 32-57. Apud Chem. Abstrat., 33: 656-3, 1939.

LIMA, D.C.; M. SHIMOKOMAKI; A.R. CARVALHO e I.S. DRAETTA, 1974.

Estudo comparativo entre palmito doce (Euterpe edulis) e o palmito amargo de guariroba (Syagrus oleracea). IV - Polifenol oxidase. Ciência e Cultura, Resumos. São Paulo, 26: 448. Suplemento.

LUH, A.T. e J.R. WHITAKER, 1974. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. Journal of Food Science, Chicago, 39: 1173-1177.

LUH, B.S.; E.T. HSU e K. STACHOWICZ, 1967. Polyphenolic compounds in canned cling peaches. Journal of Food Science, Chicago, 32: 251- 258.

LUH, B.S. e B. PHITHAKPOL, 1972. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. Journal of Food Science, Chicago, 37: 264-268.

MARSHALL, M. e G.W. CHISM, 1979. A comparison of the suitability of three hydrogen donors in the determination of peroxidase activity. Journal of Food Science, Chicago, 44 (3): 942-943.

MATHEW, A.G. e H.A.B. PARPIA, 1971. Food browning as a polyphenol reaction. Advances in Food Research, New York, 19: 75-145.

- MEYER, L.H. 1975. Food Chemistry. West port, The AVI Publishing Company. 385 p.
- MUNETA, P. 1966. Bissulfite inhibition of enzymatic blackening caused by tirosine oxidation. American Potato Journal, New Jersey, 43: 397-402.
- MURR, D.P. e L.L. MORRIS, 1974. Effect of succinic acid-2,2-dimethylhydrazide on mushroom o-diphenol oxidase. Journal of the American Society for Horticultural Science, Michigan, 99 (1): 3-6.
- NORTJE, B.K., 1966. Some catechins and proanthocyanidins in the core of Bartlett pears. Journal of Food Science, Chicago, 31 (5): 733-735.
- PALMER, J.K., 1963. Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties. Plant Physiology, New York, 38: 508-513.
- PALMER, J.K. e J.B. ROBERTS, 1967. Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzothiazole. Science, Washington, 157: 200-201.
- PARK, Y.R.; H.H. SATO; T.D. ALMEIDA; R.H. MORETTI, 1980. Polyfenoloxidase de manga (Mangifera indica var. Haden). In: 32a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Rio de Janeiro, p. 56 (Resumos).

- PASCHOALINO, J.E., 1978. Aspectos sobre o escurecimento do palmito durante o processamento. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 56: 175-181.
- PASCHOALINO, J.E. e L.W. BERNHARDT, 1978. Influência dos métodos de exaustão sobre a qualidade do palmito enlatado. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9: 15-25.
- PASCHOALINO, J.E.; L.W. BERNHARDT e D.G. QUAST, 1978. Volume e composição da mistura de gases oclusos nos tecidos de palmito. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9: 1-14.
- PONTING, J.D. e M.A. JOSLYN, 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Archives of Biochemistry, New York, 19: 47-63.
- PONTING, J. D., 1960. The control of enzymatic browning of fruits. In: SCHULTZ, H.W. ed. Food Enzymes Westport, The AVI Publ., p. 105-124.
- QUENZER, N.M. e E.E. BURNS, 1981. Effects of microwave, steam and water blanching on freeze-dried spinach. Journal of Food Science, Chicago, 46 (2): 410-413.

REED, G. e L.A. UNDERKÖFLER, 1966. Enzymes in Food Processing. 2a. ed. New York, Academic Press. 483 p.

RESENDE, R., F.J. FRANCIS e C.R. STUMBO, 1969. Thermal destruction and regeneration of enzymes in green bean and spinach puree. Food Technology, Chicago, 23: 63-110.

REYS, P. e B.S. LUH, 1960. Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. Food Technology, Chicago, 14: 570-575.

RIVAS, N.D.J. e J.R. WHITAKER, 1973. Purification and some properties of two polyphenol oxidase from Bartlett pears. Plant Physiology, New York, 52: 501-507.

ROBERTS, A.C. e D.J. McWEENY, 1972. The uses of sulphur dioxide in the food industry. Journal of Food Technology, London, 7: 221-228.

SCHWIMMER, S., 1972. Cell disruption and its consequences in food processing. Journal of Food Science, Chicago, 37: 530-535.

SIMMONDS, N.J., 1954. Anthocyanins in bananas. Nature, London, 173: 402-403.

- SIOUD, F.B. e B.S. LUH, 1966. Polyphenolic compounds in pear puree. Food Technology. Chicago, 20: 534-538.
- SMOCK, R.M. e A.M. NEUBERT, 1950. Apples and Apples Products. New York, Interscience. 486 p. (Economic Crops, v. 2).
- TATE, J.N., B.S. LUH e G.K. YORK, 1964. Polyphenoloxidase in Bartlett pear. Journal of Food Science, Chicago, 29 (6): 829-836.
- TWIGG, B.A.; L.E. SCOTT e J.C. BOUWKAMP, 1974. Color of processed sweet potatoes. Effect of additives. Journal of Food Science, Champaign, 39(3): 565-567.
- VECHER, A.S. e YAKIMOVICH, N.A., 1966. Polyphenolic acids in tubers of some potato varieties in the Belorussian SSR. Dokl Akad. Nauk. Beloruss. SSR, 10, 421-423. Apud Chem, Abstracts 65: 12556g (1966).
- VOIROL, F., 1972. Blanching of vegetables and fruits. Food Processing Industry, London, 41: 27:33.
- WALKER, J.R.L. e C.E.S. REDDISH, 1964. Note on the use of cysteine to prevent browning in apple products. Journal of the Science Food and Agriculture, London, 15 (12): 902-904.

- WALKER, J.R.L., 1976. The control of enzymic browning in fruits by cinnamic acids. Journal of Food Technology, Oxford, 11 (4): 341-345.
- WANG, S.S. e G.R. DIMARCO, 1972. Isolation and characterization of the native, thermally inactivated and regenerated horseradish peroxidase isozymes. Journal of Food Science, Chicago, 37 (4): 574-578.
- WANG, G.Y. e W.M. MELLENTHIN, 1973. Relationship of friction discoloration to phenolic compounds in d'Anjou pears. Hortscience, Michigan, 8 (4): 321-323.
- WEAVER, C. e H. CHARLEY, 1974. Enzymatic browning of ripening bananas. Journal of Food Science, Chicago, 39 (2): 1200 - 1202.
- WHITAKER, J.R., 1976. Fundamental aspects of enzymology. In: COOLEY, F.W. ed. Enzymes Use and Control in Foods. Anaheim, IFT, p.2-13.
- WILDER, C.J., 1962. Factors affecting heat inactivation and partial reactivation of peroxidase purified by ion-exchange chromatography. Journal of Food Science, Chicago, 27: 567-573.

- WILLIAM , A.H., 1953. The tannin of apple juice and cider. An interpretation of the permanganat titration method. Ann. Rept. Agr. and Hort. Research Sta, Long Ashton, Bristol, p. 219-224. Apud Chem. Abstr., Easton, 48: 10252d, 1954.
- WISSEMAN, K.W. e C.Y. LEE, 1981. Characterization of poly - phenoloxidase from Ravat 51 and Niagara grapes. Journal of Food Science, Chicago, 46 (2): 506-508.
- WONG, T.C.; B.S. LUH e J.R. WHITAKER, 1971. Isolation and characterization of polyphenoloxidase isoenzymes of Clings-tone peach. Plant Physiology, New York, 48: 19-23.
- YANKOV, S.I., 1962. Stability of polyphenoloxidase in fruit juice. Biokhimiya, 27: 235-239. Apud Chem. Abstr., Easton, 57: 2638g, 1962.
- YANKOV, S.I., 1963. Heat inactivation of oxidizing enzymes in some fruit and vegetables. Izv. Vgssh. Uch. Zaved. Pishch. Teknol, p. 29-32. Apud Chem. Abstr., Easton, 59: 7851g, 1963.