

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA POLIFENOLOXIDASE E DA
PEROXIDASE DE AMEIXA RUBIMEL, POLPA DE CACAU E
ESTUDO DO EFEITO DE AGENTES ANTI-ESCURECIMENTO**

Janai Cristiane Santos Nascimento Paz

Engenheira de Alimentos
Mestre em Alimentos e Nutrição

Profª Drª Hélia Harumi Sato

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutora em
Ciência de Alimentos.

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P298c Paz, Janai Cristiane Santos Nascimento
Caracterização bioquímica da polifenoloxidase e da peroxidase de ameixa Rubimel, polpa de cacau e estudo do efeito de agentes anti-escurecimento / Janai Cristiane Santos Nascimento Paz. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Polifenoloxidase. 2. Peroxidase. 3. Ameixa. 4. Cacau. 5. Agentes anti-escurecimento. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Biochemical characterization of polyphenoloxidase and peroxidase of plum Rubimel, cocoa pulp and study of the effect of agents anti-browning.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Polyphenoloxidase, Peroxidase, Plum, Cocoa, Agents anti-browning.

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato

Luciana Francisco Fleuri

Vânia Battestin Wiendl

Juliana Alves Macedo

Haroldo Yukio Kawaguti

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em ____/____/____ por Janai Cristiane Santos Nascimento Paz aprovado pela comissão julgadora em ____/____/____.

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Prof. Dr. Yong Kun Park
Membro Titular

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Membro Titular

Profa. Dra. Vânia Battestin Wiendl
Membro Titular

Dra. Juliana Alves Macedo
Membro Titular

Profa. Dra. Gláucia Pastore
Membro Suplente

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Membro Suplente

Dr. Haroldo Yukio kawaguti
Membro Suplente

À DEUS por me sustentar e dar a vitória cada desafio enfrentado.

À Profa. Hélia, que com paciência, tornou possível a conclusão desse trabalho.

À minha mãe Maria, irmãs Genes e Geane e sobrinhas, por todo amor e apoio a mim dedicados.

À minha sobrinha Taciane e minha amigas Rosângela e Liduína, por terem sido em todo o tempo instrumentos de Deus para me abençoar.

Ao meu querido filho João Felipe, presente de Deus para mim.

Aos irmãos em Cristo pelas orações.

Dedico este trabalho

“Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos, ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós, a ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus por todas as gerações para todo o sempre. Amém.”
(Ef. 3:20,21.)

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me mantido de pé, ao enviar o escape e a provisão sempre que precisei e ser minha alegria e esperança em todo o tempo.

Aos professores e amigos, pelo profissionalismo, ajuda neste trabalho, correções e sugestões apresentadas:

Profa. Dra. Hélia H. Sato, Profa. Dra. Vânia Battestin Wiendl, Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri, Dr. Haroldo Yukio Kawaguti, Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi, Profa. Dra. Gláucia Pastore, Prof. Dr. Yong Kun Park, Dra. Juliana Alves Macedo.

Ao Haroldo pela amizade e ajuda na finalização desse trabalho.

Às amigas Vânia Battestin e Priscila Hoffmann pelo carinho, amizade e apoio nos momentos difíceis e na finalização desse trabalho.

Às amigas Bia (Beatriz) e Val (Valdeci) pela amizade carinho e apoio a mim dedicados.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Bioaromas obrigada pelos bons momentos vividos.

Priscila Becker, Márcio, Fabiano, Patrícia, Franciele, Gisele, Tatiana, Daniele, Marcela, Nadir, Angélica, Dora, Ana Paula (Xispita), Cedenir (CD).

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de alcançar esse objetivo.

A CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Polifenoloxidase	3
2.1.1. Características gerais	3
2.1.2. Fatores que influenciam a atividade da polifenoloxidase.....	4
2.2. Peroxidase	6
2.2.1. Características gerais	6
2.2.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da POD	9
2.3. Agentes inibidores do escurecimento enzimático	10
2.4. Ameixa Rubimel	15
2.5. Cacau.....	19
2.5.1. Aspectos agrícolas do cacau.....	20
2.5.2. Presença da polifenoloxidase e peroxidase no cacau	22
2.5.3. Aproveitamento da polpa de cacau.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Caracterização da polifenoloxidase e peroxidase de ameixa Rubimel e polpa de cacau	27
3.1.1. Equipamentos	27
3.1.2. Reagentes	27
3.1.3. Obtenção do extrato enzimático bruto solúvel de ameixa Rubimel.....	27
3.1.4. Obtenção do extrato enzimático bruto solúvel da polpa de cacau	28
3.1.5. Determinação da atividade enzimática	28
3.1.5.1. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PFO).....	28
3.1.5.2. Determinação da atividade de peroxidase (POD).....	29
3.1.6. Caracterização da PFO bruta de ameixa Rubimel e da polpa de cacau.....	30
3.1.6.1. Efeito da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	30
3.1.6.2. Efeito da temperatura na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	30
3.1.6.3. Efeito do pH na atividade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	31
3.1.6.4. Efeito do pH na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	31
3.1.6.5. Estudo do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da PFO, utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	32
3.1.7. Caracterização da POD bruta de ameixa Rubimel e da polpa de cacau.....	32
3.1.7.1. Efeito da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	32
3.1.7.2. Efeito da temperatura na estabilidade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	33

3.1.7.3.	Efeito do pH na atividade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau	33
3.1.7.4.	Efeito do pH na estabilidade da POD de ameixa Rubimel e de polpa de cacau	34
3.1.7.5.	Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	34
3.2.	Estudo dos efeitos de diferentes agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	35
3.2.1.	Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	35
3.2.2.	Efeito de agentes anti-escurecimento utilizando a metodologia de superfície de resposta na atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	36
3.2.3.	Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da POD de polpa de cacau	37
3.2.4.	Efeito combinado dos agentes anti-escurecimento e tratamento térmico na atividade da POD da polpa de cacau	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1.	Determinação da atividade de PFO e POD do extrato enzimático bruto de ameixa Rubimel e polpa de cacau	39
4.2.	Caracterização da PFO bruta de ameixa Rubimel.....	39
4.2.1.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.....	39
4.2.2.	Efeito do pH na atividade e estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.....	42
4.2.3.	Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta	44
4.3.	Caracterização da POD bruta de ameixa Rubimel	47
4.3.1.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da POD de ameixa Rubimel.....	47
4.3.2.	Efeito do pH na atividade e estabilidade da POD de ameixa Rubimel.....	49
4.3.3.	Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da peroxidase da ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta	51
4.4.	Estudos dos efeitos dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel	54
4.4.1.	Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	54
4.4.2.	Efeito de agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta	56
4.5.	Caracterização da PFO bruta da polpa de cacau	60
4.5.1.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da PFO da polpa de cacau.....	60
4.5.2.	Efeito do pH na atividade da PFO da polpa de cacau	62
4.6.	Caracterização da POD bruta da polpa de cacau.....	63
4.6.1.	4.6.1 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da POD da polpa de cacau	63

4.6.2.	Efeito da temperatura na estabilidade da POD da polpa de cacau.....	64
4.6.3.	Efeito do pH na atividade e na estabilidade da POD da polpa de cacau.....	66
4.6.4.	Estudo do efeito individual dos agentes anti-escurecimento e do efeito combinado dos agentes anti-escurecimento e tratamento térmico na atividade enzimática da POD da polpa de cacau	68
5.	CONCLUSÕES	70
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Escurecimento enzimático pela ação da polifenoloxidase.	3
Figura 2: Formação de tetraguaiacol a partir de guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase.	7
Figura 3: Escurecimento da polpa de ameixa Rubimel.	16
Figura 4: Ameixa Rubimel.	18
Figura 5: Cacaueiro.	21
Figura 6: Escurecimento da polpa de cacau.	26
Figura 7: Efeito da temperatura na atividade da PFO da ameixa Rubimel.	41
Figura 8: Efeito da temperatura na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.	41
Figura 9: Efeito do pH na atividade da PFO de ameixa Rubimel.	43
Figura 10: Efeito do pH na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.	43
Figura 11: Efeito do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel: A) Superfície de Resposta, e B) Curva de Contorno.	46
Figura 12: Efeito da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel.	48
Figura 13: Efeito da temperatura na estabilidade da POD de ameixa Rubimel.	48
Figura 14: Efeito do pH na atividade da POD de ameixa Rubimel.	49
Figura 15: Efeito do pH na estabilidade da POD de ameixa Rubimel.	50
Figura 16: Efeito do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel: A) Superfície de Resposta, e B) Curva de Contorno.	53
Figura 17: Superfícies de resposta e curvas de contorno dos efeitos de agentes anti-escurecimento na inibição da PFO de ameixa Rubimel: A) em função dos agentes anti-escurecimento ácido ascórbico e 4-hexil-resorcinol, B) em função dos agentes anti-escurecimento ácido ascórbico e L-cisteína, C) em função dos agentes anti-escurecimento 4-hexilresorcinol e L-cisteína.	59
Figura 18: Efeito da temperatura na atividade da PFO da polpa de cacau.	60
Figura 19: Efeito da temperatura na estabilidade da PFO da polpa de cacau (40°C a 70°C).	61
Figura 20: Efeito do pH na atividade da PFO de polpa de cacau.	62
Figura 21: Efeito do pH na estabilidade da PFO da polpa de cacau.	63
Figura 22: Efeito da temperatura na atividade da POD da polpa de cacau.	64
Figura 23: Efeito da temperatura na estabilidade da POD da polpa de cacau.	65
Figura 24: Efeito do pH na atividade da POD da polpa de cacau.	66
Figura 25: Efeito do pH na estabilidade da POD da polpa de cacau.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas das polifenoloxidasas de frutas e vegetais	5
Tabela 2: Características bioquímicas de peroxidases de frutas e vegetais	10
Tabela 3: Variáveis reais utilizadas no planejamento composto central rotacional 2 ² para estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade da PFO da ameixa Rubimel.....	32
Tabela 4: Variáveis reais utilizadas no planejamento composto central rotacional 2 ² para estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade da POD da ameixa Rubimel.....	35
Tabela 5: Variáveis utilizadas no planejamento completo com seus respectivos níveis	36
Tabela 6: Planejamento composto central rotacional 2 ² (PCCR-2 ²) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel	44
Tabela 7: Análise de variância do estudo do efeito do pH e da temperatura e influência na atividade da PFO de ameixa Rubimel	45
Tabela 8: Planejamento composto central rotacional 2 ² (PCCR-2 ²) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel	51
Tabela 9: Análise de variância do estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel.....	52
Tabela 10: Teste univariável do efeito de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	54
Tabela 11: Planejamento composto central rotacional 2 ³ (PCCR-2 ³) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para otimizar os efeitos anti-escurecimento das variáveis independentes ácido ascórbico (AA), 4-hexil-resorcinol (HR) e L-cisteína (C), da PFO de ameixa Rubimel	57
Tabela 12: Análise de variância do estudo do efeito dos agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da PFO de ameixa Rubimel.....	58
Tabela 13: Avaliação dos efeitos de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da POD da polpa de cacau	68
Tabela 14: Avaliação dos efeitos combinados do tratamento térmico da polpa de cacau a 70°C/30min e ação de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da POD da polpa de cacau	69

RESUMO

A reação de escurecimento enzimático ocorre em muitas frutas e vegetais quando certos compostos fenólicos são oxidados em reações catalisadas por enzimas como polifenoloxidase (PFO) (EC 1.14.18.1) ou peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7). A ampliação das alternativas de conservação de frutas como a ameixa nacional Rubimel, cuja produção nacional tem aumentado nos últimos anos e da polpa de cacau, uma fruta de sabor exótico e muito agradável, muito consumida no Estado da Bahia, é necessária, pois possibilita a busca por mercado consumidor dos produtos derivados dessas frutas em regiões mais distantes, preservando a qualidade da fruta *in natura*. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as enzimas polifenoloxidase e peroxidase presentes nas polpas de ameixa Rubimel e de cacau e estudar o efeito de alguns agentes antioxidantes na preservação da cor natural dessas polpas. O suco de ameixa Rubimel escureceu rapidamente após a extração. O extrato enzimático bruto obtido pela centrifugação da polpa de ameixa Rubimel apresentou atividade de polifenoloxidase (448U/g de polpa) e peroxidase (705U/g de polpa). Em estudo univariável (ensaio preliminar ao estudo do efeito combinado) a PFO do extrato bruto de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 35°C e pH 6,5 e estabilidade na faixa de pH 3,0 a 7,5, após incubação durante 24h a 5°C ou 4h a 25°C. A enzima foi completamente inativada após tratamento térmico a 70°C por 10 minutos ou a 80°C por 1 minuto. No estudo do efeito combinado do pH e da temperatura utilizando metodologia de superfície de resposta, verificou-se que, da mesma forma que os resultados do estudo univariável, a PFO de ameixa Rubimel apresentou maior atividade em pH 6,5 e na faixa de 30 a 35°C, sendo que a enzima mostrou menor atividade em valores de pH próximos a 4,0, quando incubada a 5°C como a 65°C. Em estudo univariável (ensaio preliminar ao estudo do efeito combinado) a POD do extrato bruto de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima a 40°C e pH 4,0 e estabilidade na faixa de pH 2,5 a 5,5, após incubação durante 24h a 5°C ou 4h a 25°C. A POD foi completamente inativada após tratamento térmico a 70°C por 10 minutos. No estudo do efeito combinado do

pH e da temperatura utilizando metodologia de superfície de resposta, observou-se que a POD de ameixa Rubimel mostrou maior atividade em pH 5,0 e a 35°C, sendo que a enzima mostrou menor atividade em valores de pH próximos a 4,0, quando incubada a 5°C como a 65°C. A adição de N-acetil-L-cisteína ou glutatona na concentração final de 5mMol/L ou a adição das combinações: 5mMol de ácido ascórbico + 1,8 mMol de 4-hexil-resorcinol ou 5 mMol de ácido ascórbico + 3,4 mMol de L-cisteína, proporcionaram uma redução de 99% na atividade da PFO de ameixa Rubimel.

O extrato bruto solúvel, obtido pela centrifugação da polpa de cacau, apresentou baixa atividade de PFO (72U/g de polpa de cacau) e maior atividade de POD (668 u/g de polpa de cacau). Em estudo univariável a PFO do extrato bruto solúvel da polpa de cacau apresentou atividade ótima a 20°C e em pH 7,0 e maior estabilidade na faixa de pH 2,6 a 10, após 24h a 5°C ou 4h a 25°C. A enzima apresentou 13% da atividade inicial após tratamento a 70°C por 10 minutos, sendo completamente inativada após tratamento térmico a 80°C por 1 minuto. Em estudo univariável a POD do extrato bruto solúvel da polpa de cacau apresentou atividade ótima a 40 °C e em pH 5,0. O tratamento da polpa de cacau com ácido ascórbico nas concentrações de 1 a 5 mMol/L, proporcionou uma maior redução na atividade de POD entre os agentes anti-escurecimento, em todas as concentrações testadas, sendo obtida uma redução na atividade de 99% e 100%, após armazenamento por 1h e 24h a 5°C, respectivamente, com a adição de 5mMol/L de ácido ascórbico à polpa de cacau. O tratamento térmico em ebulição por 1 minuto reduziu 99% da atividade da POD da polpa de cacau e o tratamento térmico a 70°C da polpa de cacau contendo 3mMol/L de ácido ascórbico e posterior armazenamento durante 24h a 5°C resultou em completa inativação da POD.

SUMMARY

The enzymatic browning reaction occurs in many fruits and vegetables when certain phenol compounds are oxidized in reactions catalyzed by enzymes such as polyphenol oxidase (PPO) (EC 1.14.18.1) and peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7). A widening of the alternatives for the preservation of fruits such as the Rubimel plum, whose production in Brazil has increased in recent years, and of cocoa pulp, a fruit with an exotic and very agreeable taste, highly consumed in the State of Bahia, Brazil, is necessary because it enables one to search for consumer markets for products derived from these fruits in more distant regions, preserving the quality of the fruit *in natura*. The objective of the present work was to characterize the enzymes polyphenoloxidase and peroxidase present in the pulps of the Rubimel plum and cocoa, and study the effects of some antioxidants on the preservation of the natural color of the pulps. The juice of the Rubimel plum turns brown quickly after extraction. The crude enzymatic extract obtained by centrifugation of the Rubimel plum pulp showed PPO (448U/g of pulp) and POD (705U/g of pulp) activities. In a univariate study PPO (preliminary study preceding a study of the combined effect) the PPO in the crude extracts from the Rubimel plum showed optimum activity in the temperature range from 30 to 35°C at pH 6.5 and was stable in the pH range from 3.0 to 7.5 after 24 hours at 5°C or 4 hours at 25°C. The enzyme was completely inactivated after heat treatment at 70°C for 10 minutes or at 80°C for 1 minute. In a study of the combined effect of pH and temperature using response surface methodology it was found that Rubimel plum PPO was most active at pH 6.5 in the temperature range from 30 to 35°C, and showed less activity at pH values close to 4.0 when incubated at 5°C and at 65°C. In the univariate (preliminary study preceding a study of the combined effect) the POD in the crude extracts of the Rubimel plum showed greater activity at 40°C and pH 4.0 and stability in the pH range from 2.5 to 5.5, after incubation for 24h at 5°C or 4h at 25°C. The POD was completely inactivated after heat treatment at 70°C for 10 minutes. In a study of the combined effect of pH and temperature using response surface methodology the POD of the Rubimel plum showed greater activity at pH

5.0 and 35°C, and less activity at pH values near 4.0 when incubated at 5°C and at 65°C. The addition of N-acetyl-L-cysteine or glutathione at final concentrations of 5 mMol/L or the addition of the combinations: 5mMol/L of ascorbic acid + 1.8 mMol/L of 4-hexyl-resorcinol or 5mMol/L ascorbic acid + 3.4mMol/L of L-cysteine, resulted in a 99% reduction in the PPO activity of the Rubimel plum.

The soluble extract obtained by centrifugation of the cocoa pulp showed low PPO activity (72U/g of cocoa pulp) and high POD activity (668U/g of cocoa pulp). The PPO in the crude extract from cocoa pulp showed optimum activity at 20°C and pH 7.0, and stability in the pH range from 2.6 to 10.0, after 24 hours at 5°C or 4 hours at 25°C. The enzyme showed 13% of its initial activity after treatment at 70°C for 10 minutes, being completely inactivated after heat treatment at 80°C for 10 minutes. In a univariate study the POD in the soluble crude extract from the cocoa pulp showed optimum activity at 40°C and pH 5.0. The treatment of cocoa pulp with ascorbic acid at concentrations from 1 to 5 mMol/L, provided a greater reduction in POD activity than any of the other anti-browning agents tested, at all the concentrations tested, obtaining reductions in activity of 99% and 100%, respectively, after storage for 1 hour and 24 hours at 5°C, with the addition of 5mMol/L ascorbic acid to the cocoa pulp. Heat treatment in boiling water for 1 minute reduced the POD activity of cocoa pulp by 99% and treatment at 70°C for 30 minutes of cocoa pulp containing 3mmol / L of ascorbic acid and then stored for 24 hours at 5°C resulted in complete inactivation of the POD.

1. INTRODUÇÃO

Com a conscientização das pessoas dos benefícios para a saúde em consumir frutas e vegetais, tem ocorrido um aumento na demanda por maior qualidade de frutas, vegetais minimamente processados e de sucos de frutas congelados ou processados. Para atender a essa demanda a indústria de alimentos tem visado o desenvolvimento de novas técnicas de processamento (GONSALEZ-AGUILAR et al., 2001; GACCHE et al., 2004).

Operações de processamento, tais como, corte, remoção de casca e trituração de frutas provocam o escurecimento enzimático, induzem a síntese de etileno, respiração, amolecimento e contaminação microbiana, com deterioração da qualidade (AHVENAINEN, 1996) e podem reduzir a vida de prateleira de 1 a 2 semanas para apenas 1 a 3 dias, dependendo da temperatura (AHVENAINEN, 1996).

A reação de escurecimento enzimático ocorre em muitas frutas e vegetais quando certos compostos fenólicos são oxidados em reações catalisadas por enzimas como polifenoloxidasas (PFO) (EC 1.14.18.1) ou peroxidases (POD) (EC 1.11.1.7) formando compostos escuros denominados melaninas que influenciam negativamente a qualidade e aceitabilidade comercial de polpas de frutas, sobremesas, bebidas, geléias, sorvetes, entre outros. O tratamento térmico necessário para promover a completa inativação destas enzimas causa, muitas vezes, alterações indesejáveis na fruta como perda de frescor e desenvolvimento de sabores residuais (LANGDON, 1987; DUXBURY, 1988).

O procedimento usual para inibir escurecimento oxidativo enzimático e não enzimático tem sido adicionar sulfito e seus derivados, porém um substituto tem sido urgentemente procurado devido às restrições ao uso desses aditivos (LANGDON, 1987; DUXBURY, 1988). A mais freqüente alternativa para o sulfito tem sido o ácido ascórbico, que é reconhecido como um anti-oxidante seguro para

ser usado em frutas e vegetais, para prevenir o escurecimento, entretanto, seu efeito é temporário. Meios alternativos para controlar o escurecimento enzimático são requeridos pela indústria (ÖZOGLU e BAYINDIRLI, 2002).

Outros agentes não tóxicos tais como resorcinol substituído, especialmente o 4-hexilresorcinol, compostos contendo tiol, tais como cisteína, glutathione (GSH, forma reduzida), ácidos fenólicos, incluindo ácido kójico, ácido ascórbico, individualmente ou em combinação em diferentes concentrações, têm sido eficientes em retardar o escurecimento e reduzir a degradação de produtos de frutas cortadas (MONSALVE-GONZALEZ et al., 1995; GUNES e LEE, 1997; KIM e KLIEBER, 1997; BUTA et al., 1999; BUTA e ABBOTT, 2000; GONZÁLEZ-AGUILAR, WANG e BUTA, 2001).

A ampliação das alternativas de conservação de frutas como a ameixa nacional – Rubimel, cuja produção tem aumentado nos últimos anos em algumas regiões dos Estados de São Paulo e Minas Gerais e da polpa de cacau, uma fruta de sabor exótico e muito agradável, muito consumida no Estado da Bahia, é necessária, pois possibilita a busca por mercado consumidor dos produtos derivados dessas frutas em regiões mais distantes, preservando a qualidade da fruta *in natura*. Dessa forma, é importante a determinação quantitativa das enzimas deteriorativas presentes, bem como a caracterização bioquímica destas enzimas, como a sua susceptibilidade a parâmetros como temperatura, pH, e presença de inibidores químicos, para prevenir as alterações que estas enzimas podem causar a essas frutas.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar bioquimicamente as enzimas peroxidase e polifenoloxidase presentes nas polpas de ameixa Rubimel e de cacau e estudar o efeito de agentes anti-escurecimento (L-cisteína, N-acetil-L-cisteína, glutathione reduzida, ácido ascórbico, ácido kójico, ácido oxálico, 4-hexilresorcinol), pH e temperatura na inibição dessas enzimas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Polifenoloxidase

2.1.1. Características gerais

A polifenoloxidase (PFO, *o*-difenoil: oxigênio oxido-redutase), também conhecida como catecol oxidase, catecolase, difenol oxidase, *o*-difenolase, fenoloxidase, tirosinase, ou cresolase é uma enzima que contém íon Cu^{2+} no sítio ativo, catalisa a hidroxilação de monofenóis (atividade de cresolase) e a oxidação de *o*-difenoil para sua correspondente quinona, na presença de oxigênio (atividade de catecolase). As *o*-quinonas formadas são instáveis e assim polimerizam-se rapidamente ou reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais, diminuição do valor nutricional dos alimentos e dão origem a pigmentos escuros (melaninas) conforme reações descritas na Figura 1 (MARTINEZ e WHITAKER, 1995; ESCRIBANO et al., 1997; SERRADELL et al., 2000; CONCELÓN et al., 2004).

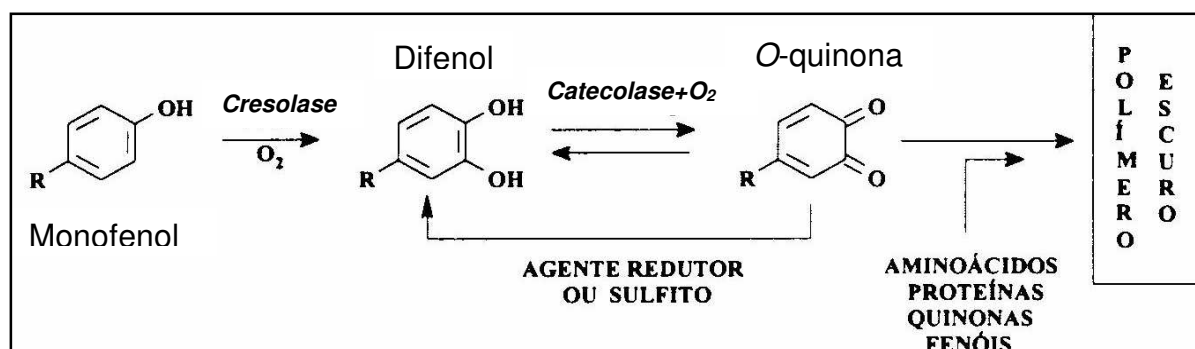


Figura 1: Escurecimento enzimático pela ação da polifenoloxidase.

Em vegetais foi relatada a existência de polifenoloxidase tanto na forma solúvel quanto na forma ionicamente ligada, e estas localizam-se principalmente nos plastídios e cloroplastos das células intactas. Acredita-se que a fração solúvel da PFO aumenta à medida que os frutos amadurecem devido à solubilização e

proteólise da enzima nos plastídios durante o amadurecimento e estocagem. Com a extração ou outro tratamento que danifique a estrutura celular, a enzima e o substrato entram em contato permitindo que a reação ocorra (MARTINEZ e WHITAKER, 1995; CONCELLÓN et al., 2004).

Os substratos comuns da enzima cresolase são os monofenóis *o*-cresol, *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico. Os substratos da enzima catecolase são os *o*-difenois catecol, 4-metil catecol, catequina e epicatequina, ácido clorogênico, dopamina, ácido caféico, ácido gálico, ácido 3-(3,4 dihidroxifenil) propiônico (DHPPA) e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (PARK e LUH, 1985; DINCER et al., 2002). MARTINEZ e WHITAKER (1995) relataram que todas as polifenoloxidasas estudadas possuem a atividade de catecolase, mas nem todas podem hidrolisar monofenóis.

A PFO está presente em algumas bactérias e fungos, na maioria das plantas, em alguns artrópodes e em todos os mamíferos. Em todos os casos essa enzima está associada à pigmentação escura no organismo, e parece ter uma função protetora para os mesmos (MAYER e HAREL, 1991). As quinonas formadas pela polifenoloxidase em plantas constituem o primeiro sinal de resposta fisiológica quando ocorrem danos aos tecidos ou ataque de patógenos, sendo que possuem propriedades antimicrobianas efetivas (SERRADELL et al., 2000).

2.1.2. Fatores que influenciam a atividade da polifenoloxidase

Dentre os fatores mais importantes que determinam a velocidade da reação de escurecimento enzimático de frutas e vegetais, devido a ação da PFO, estão a concentração de PFO ativa e compostos fenólicos presentes. Em tecidos vivos, o substrato fenólico e a enzima estão separados dentro das células. Com a extração, ou outro tratamento que danifique a célula, a enzima e o substrato entram em contato permitindo que a reação ocorra rapidamente (DAWLEY e FLURKEY, 1993; ESCRIBANO et al., 1997).

A Tabela 1 ilustra algumas características bioquímicas das polifenoloxidasas de várias frutas e vegetais.

Tabela 1: Características bioquímicas de polifenoloxidasas de frutas e vegetais

Fonte	Nome Científico	pH Ótimo de atividade	pH de Estabilidade	T(°C) Ótima de atividade	Estabilidade térmica	Referência
Açaí	<i>Eutherpe oleracea</i>	6,0	6-9	40-45	Inativada após 2 min em ebulição	Santos, 2001
Cogumelo	<i>Agaricus bisporus</i>	7,0	4-9	-	Acima de 70°C não há atividade residual	McCord e Kilara, 1983
Damasco	<i>Prunus armeniaca L.</i>	8,5	-	-	50% de inativação após 60°C/47 min ou 80°C/16min	Arslan et al., 1998
Maçã Amasya	<i>Malus sylvestris Miller</i>	6,6-9,0	-	15 - 70	-	Oktay et al., 1995
Manga Haden	<i>Mangifera indica</i>	5,6-6,0	-	-	50% de inativação após tratamento a 80°C/4min ou 85°C/2min	Park et al., 1980
Palmito	<i>Acanthophoenix rubra</i>	5,2	3-8	30	90% de inibição após tratamento a 90°C/3min	Robert et al., 1995
Pinha	<i>Annona squamosa L.</i>	6,5	6-8	20	Inativada rapidamente a 50°C	Lima, 1999
Morango	<i>Fragaria ananassa</i>	5,3	4,5-7,0	50	Inativada após tratamento a 65°C/30min	Serradell et al., 2000

Outros fatores importantes que determinam a velocidade de escurecimento enzimático são o pH, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio dos tecidos. O pH e a presença de oxigênio também influenciam o subsequente escurecimento não enzimático (MARTINEZ e WHITAKER, 1995).

A maioria das polifenoloxidasas de frutas e vegetais apresentam atividade ótima em pH levemente ácido ou próximo a neutralidade, variando com a fonte e a pureza da enzima, o substrato fenólico e também com o tipo de tampão (ZHOU e FENG, 1991; VAMOS-VIGYAZO, 1981; MAYER e HAREL, 1979). Em geral, o tratamento térmico a 70-90°C inativa a PFO, porém o emprego de tratamentos térmicos intensos pode produzir alterações de cor, textura e formação de *off-flavors* (VAMOS-VIGYAZO, 1981; MARTINEZ e WHITAKER, 1995;).

2.2. Peroxidase

2.2.1. Características gerais

O escurecimento enzimático também pode estar relacionado à ação da peroxidase (POD) (doador peróxido de hidrogênio oxidoreductase; EC 1.11.1.7) que é uma enzima amplamente distribuída no reino vegetal e sua presença foi descrita em grande número de espécies e partes de plantas, incluindo frutos climatéricos e não-climatéricos (CIVELLO et al., 1995). A peroxidase encontrada em plantas superiores contém ferro em sua estrutura, na forma de um grupo prostético ferriprotoporfirina III (ONSA et al., 2004). Muitas peroxidases são glicoproteínas e contém cálcio em sua estrutura (MARANGONI et al., 1989).

A POD catalisa a reação de oxidação-redução entre o peróxido de hidrogênio ou de peróxidos orgânicos (receptor) e substratos doadores de hidrogênio como aminas aromáticas primárias, secundárias e terciárias (BURNETTE, 1977), fenóis, antocianinas (LOPEZ-SERRANO e BARCELÓ, 1996), vitamina C (CHAMARRO e MOLINA, 1989; MARTINEZ et al., 2001), e compostos heterocíclicos como os

indóis (HAARD e TOBEN, 1971), sendo assim importante do ponto de vista nutricional e na alteração da coloração de frutas e vegetais crus ou não branqueados (RICHARDSON e HYSLOP, 1985; LAMIKANRA e WATSON, 2000).

A Figura 2 ilustra a formação de tetraguaiacol a partir de guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase. A POD pode também afetar a textura de alguns tipos de frutas participando da síntese de lignina e catalisando a ligação entre moléculas de ácido ferrúlico, substituintes da cadeia de pectina (ADAMS, 1997).

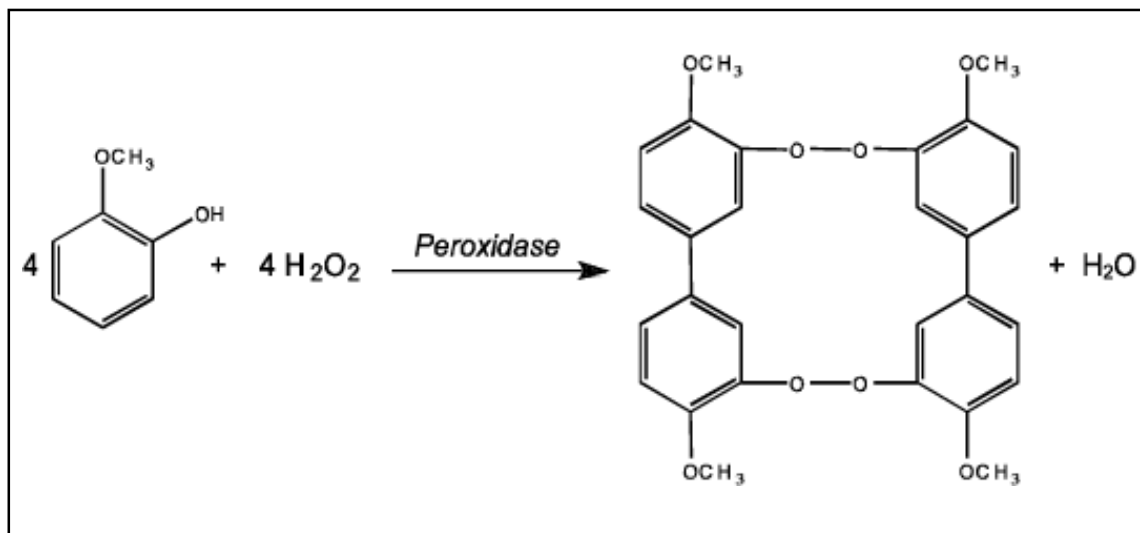


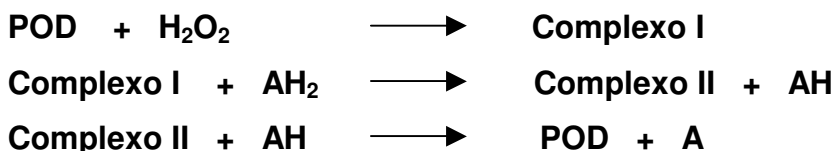
Figura 2: Formação de tetraguaiacol a partir de guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase.

REAÇÃO GERAL E MECANISMO DE AÇÃO DA POD



Onde ROOH é o aceptor de hidrogênio e AH₂ é o doador de hidrogênio.

O mecanismo de ação da POD pode ser esquematizado como:



A POD não é uma enzima específica e pode catalisar a oxidação de um grande número de fenóis e compostos com anéis aromáticos que ocorrem naturalmente em tecidos de plantas (BURNETTE, 1977), tais como aminas aromáticas primárias, secundárias e terciárias, fenóis, antocianinas, clorofila e compostos heterocíclicos como indóis (HAARD e TOBIN, 1971; OHYA et al., 1997; MARTINÉZ et al., 2001).

Avaliações quantitativas de extratos de tecidos vegetais mostraram que a POD ocorre na forma solúvel e também na forma ionicamente ligada à parede celular e ambas as formas apresentam isoenzimas com diferentes propriedades catalíticas, massas moleculares, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos (KHAN e ROBINSON, 1993; VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

Vários papéis fisiológicos têm sido atribuídos às peroxidases de plantas, como por exemplo a síntese de lignina, biossíntese de etileno, degradação da clorofila, eliminação do peróxido de hidrogênio, proteção contra microrganismos fitopatogênicos e metabolismo do ácido indol-3-acético (CHAMARRO e MOLINA, 1989; KASPERA et al., 2001), sendo também associada ao balanceamento hormonal, integridade das membranas e controle dos processos de respiração

celular, senescência e degradação fisiológica de frutas e vegetais (HAARD e TOBIN, 1971). Frutas como manga, uva, maçã e pêra apresentam aumento da atividade de peroxidase ao longo do amadurecimento e com o aumento de situações de estresse fisiológico (HAARD e TOBIN, 1971; KAWAK et al., 1996).

2.2.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da POD

A POD da maioria das frutas e vegetais apresentam atividade ótima na faixa de 5,0 a 6,0 e é considerada por alguns autores a enzima mais termorresistente dentre aquelas presentes em frutas e vegetais (LEE et al., 1984; RODRIGO et al., 1996), sendo portanto utilizada como índice de efetividade do branqueamento de vegetais. Porém, para alguns vegetais como ervilhas e aspargos, enzimas como a lipoxigenase podem ser mais termorresistentes que a POD (GANTHAVORN et al., 1991).

Peroxidases apresentam a propriedade de regenerar sua atividade enzimática após tratamento térmico insuficiente para sua completa inativação. Um dos fatores que afetam a capacidade de regeneração da POD é o tempo que se leva para atingir a temperatura alvo do tratamento térmico. Tratamentos do tipo HTST (High Temperature and Short Time) resultam em taxas de regeneração superiores às dos tratamentos convencionais mais longos e com temperaturas menores (BURNETTE, 1977; RODRIGO et al., 1996).

A regeneração da atividade de peroxidase foi relatada para vários vegetais, como repolho, uva, abacate, maçã (CLEMENTE, 1998), açaí (SANTOS, 2001) e manga (KHAN e ROBINSON, 1994). A POD é também capaz de atuar em condições adversas como a temperaturas abaixo de zero e em condições de umidade muito baixas. Foi relatado o reaparecimento da atividade de peroxidase em couve-flor tratada a 80°C e estocada sob congelamento a -18°C (LEE et al. 1984). A Tabela 2 ilustra as características bioquímicas de peroxidases de algumas frutas e vegetais.

Tabela 2: Características bioquímicas de peroxidases de frutas e vegetais

Fonte	Nome científico	pH ótimo de atividade	pH de estabilidade	T(°C) ótima de atividade	Estabilidade térmica	Referência
Abacaxi	<i>Ananas comosus L.</i>	5,0	3-9	45-55	Inativação após 1 min a 90°C	Brito, 2007
Açaí	<i>Euterpe oleracea</i>	5,0	3-10 (60% da atividade inicial)	35	Retém 50% da atividade inicial após 60 min a 40°C	Santos, 2001
Carambola	<i>Averrhoa carambola L.</i>	5,5	6-9	50	Mantém cerca de 80% da atividade inicial após 24h a 40°C.	Holschuh, 2000
Melão	<i>Cucumis melo L.</i>	5,5-7,5	-	50-55	Perda de 90% da atividade inicial após 5 min a 80°C	Lamikanra e Watson, 2000
Morango	<i>Fragaria ananassa Duch</i>	6,0	4-11 Entre 6 e 7,5 mantém mais de 90% da atividade inicial	30	Mantém 100% da atividade inicial após 20min a 45°C	Civello et al., 1995
Pêssego	-	5,0	-	40	Rápida inativação acima de 70°C.	Lourenço e Neves, 1997

2.3. Agentes inibidores do escurecimento enzimático

Agentes redutores têm um envolvimento relevante na prevenção do escurecimento enzimático reduzindo o-quinonas para difenóis incolores, ou

transformando *o*-quinonas em produtos incolores estáveis. O ácido ascórbico, comumente usado para prevenir o escurecimento enzimático de frutas, pode atuar reduzindo *o*-quinona para seu precursor difenol, removendo O₂ do meio e diminuindo o pH (McEVILY et al., 1992). Pesquisas têm dado ênfase à redução do escurecimento enzimático de pêras frescas cortadas usando solução de ácido ascórbico e sais de cálcio (GORNÝ et al., 1998). Entretanto, esse tratamento não é completamente eficiente para controlar o escurecimento enzimático de pêra fresca cortada, uma vez que o ácido ascórbico é completamente oxidado para ácido dehidroascórbico, as *o*-quinonas não são reduzidas por um período longo e o escurecimento pode ocorrer devido à formação de melanina (ÖZOGLU e BAYINDIRLI, 2002).

Compostos contendo grupamentos sulfidrilas tais como L-cisteína, glutathione, mercaptoetanol e tiouréia, tem sido investigados como agentes anti-escurecimento. A cisteína é o composto mais efetivo desse grupo (ÖZOGLU e BAYINDIRLI, 2002; RICHARD-FORGET, et al., 1991). De acordo com RICHARD-FORGET et al. (1991), a L-cisteína previne as reações de escurecimento transformando *o*-quinonas em compostos de adição cisteína-quinona (CQAC). Os compostos cisteína-quinona provaram ser inibidores competitivos da polifenoloxidase. A inibição direta da polifenoloxidase pela cisteína devido à formação de complexos estáveis com cobre também tem sido proposta (IYIDOĞAN e BAYINDIRLI, 2004).

N-acetil-L-cisteína e glutathione reduzida são substâncias químicas naturais com propriedades antioxidantes com um amplo potencial redox e têm sido sugeridos como inibidores do escurecimento, os quais reagem com quinonas formadas na fase inicial da reação de escurecimento enzimático, formando produtos incolores ou reduzindo *o*-quinonas para *o*-difenois (RICHARD et al., 1991; NOCTOR e FOYER, 1998).

Entre os agentes inibidores da PFO recentemente descritos, os resorcinóis substituídos são estruturalmente relacionados aos substratos fenólicos. O composto 4-hexilresorcinol pode atuar como inibidor competitivo da polifenoloxidase (McEVILY et al., 1992), embora esse efeito seja melhor quando usado em combinação com outros compostos redutores tais como ácido ascórbico (MONSALVE-GONZALEZ et al., 1993; DONG et al., 2000). O 4-hexilresorcinol pode especialmente interagir com a polifenoloxidase, e torná-la incapaz de catalisar a reação de escurecimento, enquanto o ácido ascórbico reduz a quinona. O 4-hexilresorcinol é um agente efetivo para o controle do escurecimento enzimático de maçãs em pedaços bem como em sucos de maçã. O 4-hexilresorcinol tem um longo histórico de uso em fármacos e não exibe toxicidade sistêmica e é seguro como aditivo alimentar (MONSALVE-GONZALEZ et al., 1993; NICOLAS et al., 1994; SON et al., 2001).

Outro composto usado freqüentemente é o ácido cítrico que atua como um agente quelante dos íons Cu^{2+} do centro ativo da enzima, bem como diminui o pH e diminui a atividade da PFO (GACHE et al., 2004). Uma combinação de β -ciclodextrina (agente complexante) e L-ascorbato-2-trifosfato (1:1) mostrou-se efetivo para retardar o escurecimento em sucos de maçã (GACCHE et al., 2003).

Ácidos fenólicos incluindo o ácido cinâmico (CA) e seus derivados, que são conhecidos por possuir potencial antioxidante, têm sido descritos como retardadores eficientes das reações de escurecimento enzimático (RICE-EVANS et al., 1997). Ácidos fenólicos são citados como anti-oxidantes efetivos (LIN et al., 1998). A propriedade anti-oxidante de ácidos fenólicos deve-se a sua elevada reatividade como o hidrogênio ou doadores de elétrons, e a habilidade para quelar íons metálicos de transição (RICE-EVANS et al., 1997). O modelo competitivo de inibição da PFO pelo ácido cinâmico pode ser devido à quelação do cobre do sítio ativo da PFO.

SON et al. (2001) verificaram a capacidade de compostos de cinco grupos químicos para inibir o escurecimento de maçãs em pedaços, incluindo ácidos carboxílicos, derivados do ácido ascórbico, aminoácidos contendo grupos sulfidrilas e ácidos fenólicos. Os compostos ácido oxálico, ácido oxalacético, ácido ascórbico 2-fosfato, cisteína, glutathione, N-acetilcisteína, ácido kójico e 4-hexilresorcinol mostraram maior atividade de inibição do escurecimento de maçãs. As concentrações mínimas de ácido oxalacético, ácido oxálico, cisteína e ácido kójico, para um efetivo efeito anti-escurecimento, foram 0,25; 0,05; 0,05; e 0,05%, respectivamente. Ácido oxálico mostrou um efeito sinérgico na inibição quando 0,02% de ácido oxálico foi usado em combinação com 1% de ácido ascórbico ou seus derivados.

GONZÁLEZ-AGUILAR et al. (2004) verificaram o efeito individual de agentes anti-escurecimento tais como ácido isoascórbico (IAA) (0,1 mol/L); ácido ascórbico (AA) (0,05mol/L) e acetil-cisteína (AC) (0,05 mol/L) em pedaços de abacaxi, armazenados em bandejas de poliestireno por 14 dias a 10°C. O uso desses agentes anti-escurecimento reduziu o escurecimento e deterioração significativamente. Esses tratamentos também diminuíram as mudanças nos valores dos parâmetros de cor L^* (luminosidade) e b^* (posição na gama de cor que vai do azul ao amarelo com valor que vai de -120 a +120), bem como a perda de firmeza.

OMS-OLIU et al. (2006) verificaram que o escurecimento em pêra cortada foi prevenido por 28 dias a 4°C, adicionando-se uma concentração mínima de 0,75% de N-acetil-L-cisteína. O tratamento com glutathione reduzida também foi efetivo ao longo do tempo de estocagem, embora escurecimento tenha sido observado depois de 21 dias de estocagem com 0,75% de glutathione reduzida. Entretanto, tratamento com ácido ascórbico ou 4-hexilresorcinol não preveniram completamente o escurecimento de pêras durante esse período de estocagem. Uma melhora no efeito anti-escurecimento foi observado quando foi utilizado uma combinação de N-acetil-L-cisteína / glutathione reduzida, considerando *hue angle*

como índice de modificação de cor. Assim, o nível máximo de *hue angle* foi alcançado com 5% de N-acetil-L-cisteína (NAC); 1,5% de glutathione (GSH) ou 1% de NAC + 1% de GSH por 28 dias.

ZHOU et al. (2003) verificaram que um aumento na atividade da polifenoloxidase (EC 1.10.3.2 ou 1.14.18.1) estava relacionado com a incidência de sintomas de escurecimento em abacaxi. O grau de maturação dos frutos afetou significativamente a susceptibilidade ao escurecimento, sendo que frutos verdes desenvolveram menos injúrias escuras que frutos maduros. O efeito da maturidade na susceptibilidade ao escurecimento foi altamente relacionado à atividade de PFO devido ao resfriamento. A peroxidase (EC. 1.11.1.7;) não mostrou mudança significativa após resfriamento (MAYER, 1987).

IYIDOGAN e BAYINDIRLI (2004) verificaram o efeito de diferentes antioxidantes no escurecimento enzimático de suco de maçã do cultivar *Amasya* comparando as modificações de cor. Para esse propósito, L-cisteína, ácido kójico e 4-hexilresorcinol foram usados em diferentes concentrações (0 - 4mMol/L) no suco de maçã. Os compostos apresentaram diferentes efeitos inibitórios. A combinação da L-cisteína, ácido kójico e 4-hexilresorcinol também foi estudada para controle do escurecimento enzimático. Os resultados mostraram que 89,2% de inibição foi obtido no fim de 24 horas de estocagem com a combinação de 3,96 mMol/L de L-cisteína, 2,78 mMol/L de ácido kójico e 2,34 mMol/L de 4-hexilresorcinol. A L-cisteína foi considerada o agente anti-escurecimento mais eficiente. A interação do ácido kójico e 4-hexilresorcinol teve um efeito positivo na inibição do escurecimento enzimático.

O ácido kójico é encontrado em muitos alimentos fermentados japoneses. SON et al. (2001) relataram que o ácido kójico mostrou uma atividade inibitória mais alta no escurecimento de pedaços de maçã entre os ácidos fenólicos testados (caféico, clorogênico, cinâmico, cumárico, ferrúlico, gálico, kójico). Alguns autores propuseram que o ácido kójico atua como um agente redutor, bem como

um inibidor da enzima (CHEN et al., 1991). De acordo com esses autores, o ácido kójico mostrou efeito de inibidor competitivo na oxidação do ácido clorogênico e catecol pela PFO de batata e maçã. Uma mistura de ácido ascórbico e ácido kójico foi patenteada para uso como agente anti-escurecimento em alimentos (McEVILY et al., 1992). Embora a presença de ácido kójico em certos alimentos ocorra como um produto de fermentação natural, o seu uso na indústria alimentícia pode ser restrito devido à dificuldade de produção em larga escala e seu alto custo.

Vários agentes redutores são capazes de inibir a ação da peroxidase. Alguns deles são capazes de inativar irreversivelmente a enzima, através de mecanismo que parece envolver oxigênio e íon ferro. Supõe-se que ocorra a formação de espécie reativa de oxigênio na posição do sítio ocupada pelo íon ferro. Dentre esses agentes está o ascorbato (LAMIKANRA e WATSON, 2000).

A atividade de peroxidase pode ser significativamente reduzida na presença de Mn^{2+} , $NaNO_2$ e $CaCl_2$ (LAMIKANRA e WATSON, 2000). A estabilidade térmica da peroxidase de raiz forte é significativamente reduzida na presença de cloreto de sódio, porém a capacidade de regeneração da enzima não é afetada pela presença do sal (LU e WHITAKER, 1974).

HOLSCHUH (2000) relatou o efeito inibitório dos ácidos ferrúlico, caféico e *p*-cumárico sobre a peroxidase de carambola. O ácido cítrico, quando combinado com outros tratamentos, acelerou a inativação da peroxidase de tomate (PLAZA et al., 2003).

2.4. Ameixa Rubimel

A ameixa é uma fruta com caroço, de sabor doce, ligeiramente mais ácida na parte da polpa próxima ao caroço. Pode ser consumida fresca, seca, ou na preparação de geléias e outros tipos de doces. A ameixa seca tem várias

aplicações: em caldas, sorvetes, pudins, mousses, bolos, tortas, refrescos e licores.

A obtenção de derivados da ameixa Rubimel que mantenham as características da fruta *in natura* requer a inibição de reações de que promovam o escurecimento da polpa (Figura 3).

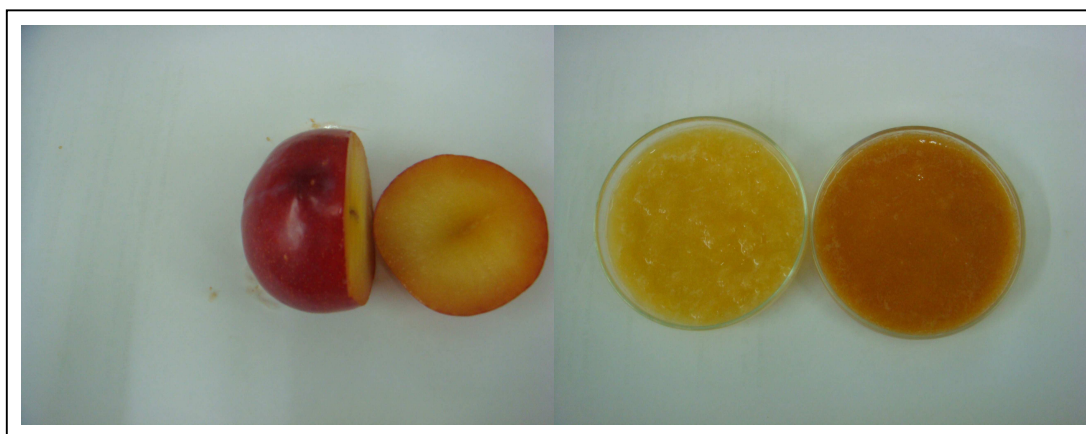


Figura 3: Escurecimento da polpa de ameixa Rubimel.

No mercado pode ser encontrada uma bebida para atletas sabor ameixa que é aromatizada e colorida artificialmente.

Todas as variedades de ameixas proporcionam elementos nutritivos para o ser humano. Seu valor calórico médio é de 45 calorias para cada 100g e em sua composição encontramos proteínas, cálcio, ferro, fósforo, além das vitaminas A, B1, B2, B3 e C (cerca de 7mg de vitaminas em cada 100g de ameixa). Devido ao alto conteúdo de sorbitol, a ameixa funciona como laxante natural (LORENZI et al., 2006; SCHNEIDER, 1984).

Existem muitas variedades e tipos de ameixas, diversas de origem européia e outras de origem asiática, especialmente da China. As ameixeiras européias (*Prunus domestica* L.), devido à sua origem, necessitam de locais com temperaturas mais baixas, ou seja, se adaptam melhor em regiões frias. No Brasil,

os melhores locais para o seu cultivo são as serras e na Região Sul do país. As variedades originárias da China (*Prunus salicina* L.), mais conhecidas como japonesas, ao contrário das européias, não suportam temperaturas baixas e se adaptam muito bem ao clima quente. Desta forma, essas variedades se adaptam bem a praticamente todo o território brasileiro, mesmo em boa parte da Região Sul (www.todafruta.com.br, 09/2007).

Os solos mais indicados para o plantio das ameixeiras são os argilo-silicosos, os sílico-argilosos e os argilo-calcários. Praticamente, esta cultura se desenvolve bem em qualquer tipo de solo, só havendo restrições aos solos muito úmidos. Como regra geral, a escolha da melhor variedade deve ser feita de acordo com a região, ou seja, pelo clima e médias de temperatura. Os tratos culturais são simples, requerendo que se mantenha uma faixa limpa em torno dos troncos. Além disso, devem ser feitas podas de formação, que ajudam no desenvolvimento das plantas nos primeiros anos e, depois, podas de frutificação, que auxiliam na manutenção da qualidade dos frutos obtidos. A colheita é feita em épocas diferentes, de acordo com a utilização que será dada aos frutos. Para a comercialização de frutos frescos, por exemplo, a colheita deve ser feita antes da maturação estar completa. Quando forem destinados à produção industrial, os frutos poderão ser colhidos totalmente maduros (www.todafruta.com.br 09/2007). Ameixas de modo geral, têm curto período de conservação pós-colheita, havendo necessidade de otimizar as condições de colheita e de armazenamento.

Dentre as cultivares de ameixeira, plantadas atualmente no Estado de São Paulo, destacam-se as introduzidas da Flórida e da África do Sul, tais como: 'Reubennel' ou Rubimel (Figura 4a e 4b) e 'Harry Pickestone', sendo as mais cultivadas nas últimas décadas (BARBOSA et al., 2001).



Figura 4: **Ameixa Rubimel.**

A ameixa Rubimel é originária da África e foi trazida para o Brasil pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) do Rio Grande do Sul. Atualmente ela é a mais consumida e produzida no país. É popularmente conhecida como ameixa Rubimel, devido à sua casca de coloração vermelho intenso, polpa amarela e sabor bastante adocicado. Além do sabor, os aspectos nutricionais da fruta atraem muito os consumidores. A ameixa contém compostos antioxidantes, que protegem as células do envelhecimento precoce (BARBOSA et al., 2001).

A cultura da ameixeira vem alcançando importância econômica considerável no Rio Grande do Sul, onde a área cultivada é de aproximadamente 1.455 hectares, com produção de 12.905 toneladas (JOÃO et al., 2002). A safra de ameixas geralmente concentra-se em um período de apenas 45 dias, havendo, nesta época, grande oferta do produto que, muitas vezes, não pode ser absorvido imediatamente (NASCIMENTO et al., 1993). O armazenamento dos frutos apresenta-se como a mais importante alternativa para regulação da oferta e dos preços. Entretanto, a ameixa caracteriza-se pelo baixo tempo de conservação pós-colheita, devido à sua elevada taxa metabólica durante a maturação, além da ocorrência de desordens fisiológicas.

A principal forma adotada pelos produtores para reduzir o metabolismo dos frutos e aumentar seu tempo de conservação é o armazenamento refrigerado. A temperatura recomendada para o armazenamento de ameixas é de $-0,5^{\circ}\text{C}$ a 0°C , sendo que temperaturas acima de 4°C encurtam sensivelmente o período de armazenamento. Entretanto, a exposição dos frutos à temperaturas demasiadamente baixas, associadas com um tempo de exposição prolongado, pode ocasionar o escurecimento interno, distúrbio fisiológico mais importante em ameixas (EKSTEEN, 1982; CANTILLANO, 1987).

2.5. Cacau

O cacau é produzido no Brasil, na América Central, na Venezuela, no Equador, na África (Ghana e Nigéria), Sri Lanka e Java. Os países compradores são os Estados Unidos e os países integrantes da Comunidade Econômica Européia: dentre eles a Inglaterra, Suíça, Holanda, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, França e Itália. O Brasil produz atualmente uma média de 350.000 t/ano de cacau, particularmente na Bahia sendo 90% exportado e 10% destinado às indústrias brasileiras de chocolate. O cacau é o quarto produto brasileiro de exportação e já atingiu divisas da ordem de US\$ 1 bilhão/ano. As divisas de US\$ 550 milhões dos últimos anos são consideradas baixas devido a conjuntura internacional desfavorável. O Brasil é o segundo produtor mundial de cacau. Ghana, na África é a primeira produtora. A área plantada atual com cacau no Brasil está em torno de 650 mil ha (no sul da Bahia = 95%, no norte do Espírito Santo = 2,5% e no Amazonas = 2,5%). A produtividade média/ha é de 700 kg, sendo a maior produtividade média mundial (www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm).

O cacau passa por uma fase de crise, pois a infestação pelo fungo *Crinipellis pernicios*, "vassoura-de-bruxa" nos cacaueiros baianos traz perspectivas de significativas perdas de receita. A praga exige tratamentos fitossanitários, o que aumenta o custo da produção e diminui a renda para o produtor devido ao baixo preço (cerca de US\$ 800/t) pago pelo mercado. Em

virtude dessa crise, os produtores de cacau da Bahia, por intermédio da Secretaria de Indústria, Comércio e Turismo do Estado da Bahia, procuram novas alternativas para aumentar a rentabilidade da cultura. O aproveitamento da polpa, antes inteiramente desprezada pelo agricultor, cujo interesse se concentrava apenas na amêndoa fermentada e seca para fabricação do chocolate foi uma das alternativas encontradas. Atualmente a polpa de cacau é utilizada no preparo de sucos e sorvetes. Entretanto, o controle de qualidade do processo de obtenção da polpa e dos produtos derivados é praticamente inexistente, o que tem sido um fator limitante às ações voltadas para a expansão do mercado atual. A CEPLAC = Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira vinculado ao Ministério da Agricultura e o CEPEC = Centro de Pesquisas do Cacau, ambos em Ilhéus na Bahia são órgãos que trabalham com pesquisas agrícolas e tecnológicas com o cacau (www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm).

2.5.1. Aspectos agrícolas do cacaueiro

O cacaueiro é uma árvore que atinge 4 a 12 m de altura (Figura 5). As principais espécies brasileiras são o "criollo" - *Theobroma cacao*, Linnaeus e o "forasteiro" ou cacau roxo, *Theobroma leiolepis*. Este último tem quatro variedades: Comum, Pará, Maranhão e Catongo e representa praticamente, a totalidade do cacau de consumo no mundo atual, incluindo o cacau do Brasil. O cacaueiro é uma árvore essencialmente tropical, cultivado a temperaturas acima de 20°C durante o ano todo. Exige solos profundos de aluvião com espessa camada de húmus. O cacaueiro é cultivado no viveiro por cerca de um ano, é transplantado e cresce ramificado, sendo podado no terceiro ano. Começa a produzir aos quatro anos, atingindo plena produtividade aos doze anos e produz até trinta e cinco anos em média.



Figura 5: Cacaueiro.

Normalmente em um cacaual são feitos replantios para garantir a atividade por todo o tempo na área plantada. A época da colheita é variável nas zonas cacaueiras, mas pode ser feita o ano todo. No Brasil a safra comercial vai de maio a setembro. O fruto aparece no tronco da árvore, quatro a seis meses após a floração e é composto de casca, polpa e sementes ou amêndoas. A relação peso/volume do fruto é 1:2 (500 g: 1.000 cm³) sendo que a casca pesa 75% do total. Os frutos são de forma e tamanho semelhantes a um melão, com cerca de 25 cm de comprimento e 10 cm no maior diâmetro. No interior do fruto estão as amêndoas ou favas envolvidas pela polpa branca, mucilaginosa com 80% de umidade e 15% de monossacarídeos. As amêndoas ou favas que constituem o cacau e que interessa à indústria processadora de chocolate, têm forma variável medindo 2 cm de comprimento e 1 cm de largura e são cerca de 20 a 50 por fruto.

Nos amontoados de polpas há a possibilidade de crescimento de leveduras, pois a polpa é rica em açúcar contém cerca de 15% de monossacarídeos e 80% de umidade. A polpa de cacau apresenta pH 3,5 a 3,6 e o principal ácido presente é o cítrico (www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm).

2.5.2. Presença da polifenoloxidase e peroxidase no cacau

A produção de *flavor* é importante na manufatura de cacau em pó. Essa característica organoléptica é desenvolvida durante as fases de maturação, fermentação e secagem da amêndoa do cacau. São conhecidos dois grupos básicos de compostos que influenciam essencialmente esse parâmetro. O primeiro grupo consiste de peptídeos e aminoácidos. Essas substâncias são formadas na hidrólise enzimática de proteínas durante armazenamento e reações posteriores com açúcares redutores na etapa de torrefação da amêndoa de cacau, gerando o *flavor* típico de cacau (VOIGT et al., 1994).

Os outros componentes que contribuem para o *flavor* de cacau são os polifenóis, que também têm recebido muita atenção devido a sua capacidade antioxidante e suas possíveis implicações benéficas à saúde humana, tais como no tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Essas substâncias são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de sabor adstringente e amargo em amêndoas de cacau não fermentadas, seguidas de alcalóides, alguns aminoácidos, peptídeos e pirazinas (BONVEHI e COLL, 2000). Tais características de sabor devem ser minimizadas em produtos de chocolate.

A polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) é uma enzima muito importante na oxidação de polifenóis da amêndoa de cacau, que atua na fermentação e no processo de secagem da amêndoa. A remoção do sabor adstringente e amargo da amêndoa de cacau é o principal resultado da oxidação enzimática durante a fase de fermentação e secagem, levando à coloração marrom típica do chocolate quando o processo de produção é completado (HANSEN et al., 1998).

SELAMAT et al. (2002) verificaram que durante os processos de fermentação e secagem ocorre uma forte inativação da polifenoloxidase devido às

condições de temperatura e pH, resultados que estão de acordo com os obtidos por HANSEN et al. (1998).

A peroxidase que pode catalisar a oxidação de compostos fenólicos é outra importante enzima no controle do *flavor* específico do pó de cacau.

SAKHAROV e ARDILA (1999) verificaram que a atividade da peroxidase da amêndoa de cacau aumentou significativamente no processo de maturação e diferentemente do que ocorreu com a polifenoloxidase, houve um aumento adicional em sua atividade durante a fermentação e secagem da amêndoa. De acordo com ZIEGLER (1988), essa alta atividade permaneceu por 3 dias de fermentação e então a atividade diminuiu um pouco. O próximo aumento na atividade foi verificado durante o processo de secagem.

SAKHAROV e ARDILA (1999) verificaram também que depois de terminado os processos de fermentação e secagem, a amêndoa de cacau retém alta atividade peroxidase e a presença da atividade enzimática no produto final pode alterar a qualidade deste na estocagem. Para prevenir essas possíveis alterações em frutas e vegetais por tempo prolongado, é necessário desnaturar completamente as peroxidases (PIZZOCARO et al., 1988). SAKHAROV e ARDILA (1999) verificaram que para completa inativação da peroxidase, as amêndoas fermentadas e secas deveriam ser incubadas por tempo maior que 3 dias a 30°C.

SAKHAROV e ARDILA (1999) relataram que a amêndoa e a casca de cacau apresentaram 5700U de peroxidase/g enquanto que a polpa não apresentou atividade peroxidase. MERCÊS PENHA e DA MATA (1998) detectaram qualitativamente a presença de polifenoloxidase e peroxidase na polpa de cacau.

2.5.3. *Aproveitamento da polpa de cacau*

A polpa de cacau foi, durante muitas décadas, resíduo do beneficiamento da amêndoa, sendo praticamente descartada. O extrato aquoso obtido da polpa de cacau, denominado mel de cacau, foi o primeiro subproduto a ser utilizado para a produção de geléia. A queda do preço da amêndoa no mercado internacional, aliado ao fator ambiental, pela necessidade de redução de resíduos, tornou urgente a busca de alternativas para um aproveitamento integral do fruto, já que a amêndoa representa apenas 8% do seu peso. Com a polpa de cacau pode se fazer ainda geléias, destilados finos, fermentados como vinho e vinagre, xaropes para confeito, além de néctares, sorvetes, doces e uso para iogurtes. Existe mercado amplo e imediato, principalmente para o suco de cacau, tanto no país como no exterior (NETO et al., 1994).

Considerando uma produção anual de 300.000 t. de cacau seco e uma utilização de 85% dessa produção para extração de 60 - 70% da polpa presente nas sementes, verifica-se que é possível a obtenção de 120.000 t. de polpa integral, que pode vir a ser aproveitada, se processada industrialmente. O aproveitamento da polpa de cacau como matéria-prima industrial apresenta a vantagem, quando comparada às outras frutas tropicais potencialmente aproveitáveis na região, de tratar-se de um produto abundante, proveniente de uma cultura já estabelecida, como é a do cacau (NETO et al., 1994).

O suco de cacau possui sabor bem característico, considerado exótico e muito agradável ao paladar. É fibroso e rico em açúcares (glicose, frutose e sacarose) e também em pectina. Em termos de proteína e de algumas vitaminas, é equivalente aos sucos de acerola, goiaba e umbu. O suco de cacau apresenta alta viscosidade e aspecto pastoso. A utilização desta matéria-prima em lanchonetes da região produtora da Bahia já era feita nos anos de 1970/72. A partir de 1983, com a primeira fazenda vindo a extrair e comercializar a polpa de

cacau em bares e lanchonetes, desencadeou-se um crescente interesse de outros fazendeiros na extração e comercialização desse produto (MORORÓ,1999).

A polpa de cacau vem sendo extraída, acondicionada em sacos plásticos, congelada nas próprias fazendas e comercializada. Um dos principais fatores limitantes para a expansão do mercado consumidor para além das fronteiras regionais, bem como um aproveitamento em maior escala, é sua conservação sob congelamento durante a comercialização. A alternativa do congelamento como método de conservação pode ser considerada para a comercialização regional ou intermediária (da fazenda para a indústria); entretanto, para ser alcançada uma expansão comercial além-fronteiras regionais é necessário um método mais econômico de transporte e comercialização do produto, como o tratamento térmico (MORORÓ,1999).

Existe, hoje, a perspectiva de industrialização da polpa para fabricação de suco ou néctar e para tanto tem sido desenvolvida e aperfeiçoada a tecnologia do seu processamento térmico. O Centro de Pesquisas do cacau (CEPEC), em cooperação com a CAJUBA (Caju da Bahia S.A.), Nova Soure – BA vem desenvolvendo trabalhos no sentido conservar a polpa pelo processo de pasteurização e uso de conservantes químicos, objetivando a diminuição dos custos de conservação, armazenamento e transporte, sem causar mudanças nas características organolépticas do produto. Como resultado desse estudo e considerando duas realidades econômicas entre os produtores de polpa de cacau, os pesquisadores propuseram diferentes alternativas de processamento para atender os dois segmentos: para Cooperativas e produtores de grande porte, um processo de nível tecnológico e custo mais altos, com pasteurização rápida (92°C/20s) em que obtiveram resultado negativo para POD após este tratamento sem alteração na cor e sabor da polpa e para pequenos produtores rurais a pasteurização lenta (72°C/30min) para destruição de patógenos com adição de sulfito (máximo 0,004g/100g de polpa), sendo que o tratamento térmico nesse tempo e temperatura alterou a cor da polpa de cacau (NETO et al., 1994). A

Figura 6a ilustra a cor da polpa de cacau *in natura* e a Figura 6b a polpa de cacau recém-extraída. As Figuras 6c, 6d e 6e ilustram o escurecimento da polpa de cacau.

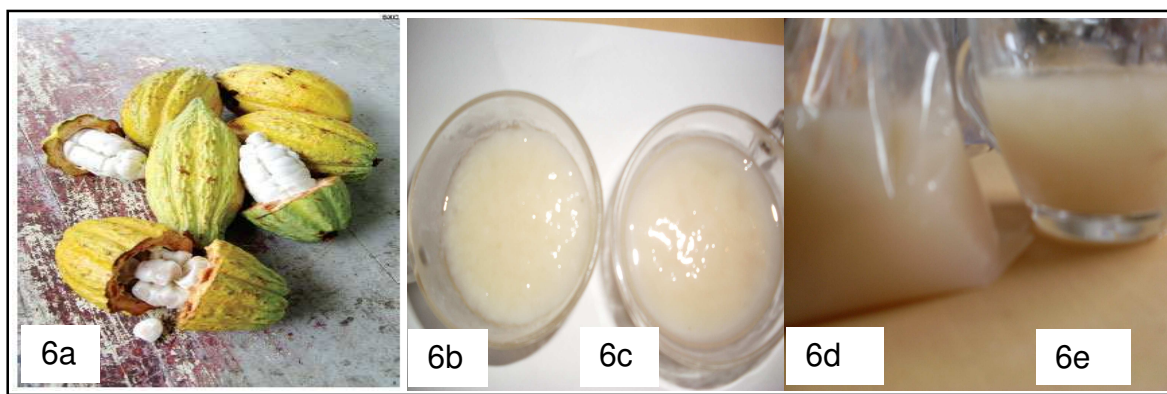


Figura 6: Escurecimento da polpa de cacau.

6a – Cacau *in natura*

6b - Polpa de cacau recém-extraída

6c - Escurecimento da polpa de cacau

6d - Escurecimento da polpa de cacau

6e - Escurecimento da polpa de cacau

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da polifenoloxidase e peroxidase de ameixa Rubimel e polpa de cacau

3.1.1. Equipamentos

- Balança analítica Sartorius, modelo H-10
- Medidor de pH Digimed DMPH-2
- Centrífuga refrigerada BECKMAN, MODELO J2-21
- Espectrofotômetro BECKMAN, DU-70
- Banhos de água termostatizados

3.1.2. Reagentes

- Ácidos, bases e sais PA (Merck, Sigma ou equivalente)
- Catecol (Sigma), guaiacol (Sigma)
- Agentes anti-escurecimento: N-acetil-L-cisteína, glutatona reduzida, ácido kójico, 4-hexilresorcinol (ACROS Organics), ácido oxálico (Synth), ácido L-ascórbico (Nuclear) e L-cisteína (Ecibra)
- Outros reagentes químicos de grau analítico
- Ameixas Rubimel cultivadas em Pilar do Sul – SP
- Polpa de cacau Forasteiro cultivado em Ilhéus - BA

3.1.3. Obtenção do extrato enzimático bruto solúvel de ameixa Rubimel

Ameixas Rubimel (100 g) foram lavadas, retirados os caroços e a polpa foi diluída em água destilada na proporção 1:1 (m:v) e triturada em liquidificador. A

preparação foi centrifugada em centrífuga Beckman modelo J2-21 a 9600 x *g* por 20 minutos a 5°C e o sobrenadante foi utilizado na determinação e caracterização enzimática da PFO solúvel (OKTAY et al., 1995) e POD solúvel (KHAN e ROBINSON, 1994) em diferentes valores de pH e temperatura e na determinação do efeito de diferentes agentes anti-escurecimento na manutenção da cor da polpa da ameixa Rubimel.

3.1.4. Obtenção do extrato enzimático bruto solúvel da polpa de cacau

A polpa de cacau foi separada dos caroços com o auxílio de um liquidificador doméstico Wallita com copo com rotor adaptado para não triturar as sementes. Amostras de 200g de polpa de cacau e 200 mL de tampão fosfato 0,05Mol/L, pH 7,0 contendo 5% de polietileno-glicol foram homogeneizadas em liquidificador por 2 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas em centrífuga Beckman modelo J2-21 a 9600 x *g* durante 20 minutos a 5°C. Ao sobrenadante foi adicionado acetona na proporção 1:1 (v:v) e este foi novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O precipitado obtido permaneceu por 12h a 5°C para evaporação da acetona residual sendo posteriormente ressuspendido em água destilada 20% do volume inicial e dialisado em água a 5°C por 12 horas. O extrato enzimático foi então utilizado como fonte de polifenoloxidase e peroxidase.

3.1.5. Determinação da atividade enzimática

3.1.5.1. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PFO)

A atividade de PFO nos extratos solúveis de ameixa e de polpa de cacau foi determinada como descrito por OKTAY et al. (1995) e LIMA (1999), com algumas modificações. A mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 Mol/L em tampão fosfato 0,1

Mol/L, pH 6,0, foi incubada a 25°C durante 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático bruto de ameixa Rubimel obtido de acordo com o item 3.1.3 ou de polpa de cacau obtido de acordo com o item 3.1.4. Após 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 420 nm foi acompanhado até 5 minutos de reação em espectrofotômetro Beckman DU 70 com controle de temperatura. O tubo branco foi preparado com a mistura de 2,9 mL de catecol 0,01Mol/L em solução tampão fosfato 0,05 Mol/L, pH 6,0 e 0,1 mL de tampão fosfato 0,05 Mol/L, pH 6,0. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL de amostra.

3.1.5.2. Determinação da atividade de peroxidase (POD)

A atividade de POD nos extratos de ameixa Rubimel e de polpa de cacau foi determinada como descrito por HOLSCHUH (2000) e KHAN e ROBINSON (1994), com algumas modificações.

A mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão fosfato 0,05 Mol/L, pH 6,0 e 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 Mol/L, pH 6,0, foi previamente equilibrada a 25°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,4 mL de H₂O₂ em tampão (0,33 mL de H₂O₂ 30% em 100 mL de tampão fosfato 0,05 Mol/L, pH 6,0) e 0,1 mL de extrato enzimático bruto de ameixa Rubimel obtido de acordo com o item 3.1.3 ou de polpa de cacau obtido de acordo com o item 3.1.4.

Após 15 segundos de reação o aumento de absorbância a 470 nm foi acompanhado durante 5 minutos de reação a 25°C contra branco em espectrofotômetro Beckman DU 70 com controle de temperatura. O tubo branco consistiu da mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 6,0, 1,6 mL de tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 6,0 e 0,1 mL do extrato enzimático.

Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL de amostra.

3.1.6. Caracterização da PFO bruta de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

As características bioquímicas da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau foram determinadas nos extratos enzimáticos brutos obtidos como descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4.

3.1.6.1. Efeito da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

A mistura de 2,9 mL de solução de catecol 0,01 Mol/L em tampão fosfato 0,1 Mol/L pH 6,0 foi pré incubada em tubos de ensaio nas temperaturas entre 5°C e 70°C (com variação de 5°C) durante 10 minutos para equilíbrio da temperatura. Posteriormente foi adicionado em cada tubo 0,1 mL de extrato enzimático bruto de ameixa Rubimel obtido de acordo com o item 3.1.3 ou de polpa de cacau obtido de acordo com o item 3.1.4 e a mistura de reação foi então transferida para a cubeta do espectrofotômetro Beckman DU 70 com controle de temperatura. A atividade enzimática foi medida conforme descrito no item 3.1.5.1, em cada uma das temperaturas.

3.1.6.2. Efeito da temperatura na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

Alíquotas de 2 mL dos extratos enzimáticos obtidos de acordo com os itens 3.1.3 e 3.1.4 foram incubadas nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C durante 10, 20, 30 e 60 minutos; de 80, 85, 90°C e em ebulição por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, para os testes de inativação térmica. Após a incubação nas diferentes temperaturas, as

amostras foram resfriadas imediatamente em banho de gelo. A atividade residual da PFO foi determinada conforme descrito nos itens 3.1.5.1.

3.1.6.3. Efeito do pH na atividade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

A mistura de 2,9 mL de solução de catecol 0,01 Mol/L nos sistemas tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 6,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 7,6); tampão ácido bórico-bórax (pH 8,0 a 8,8); tampão bórax-NaOH (pH 9,2 a 10), todos na concentração 0,1 Mol/L e dentro da faixa de capacidade tamponante foi previamente equilibrada por 10 minutos a 30°C. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático obtido de acordo com o item 3.1.3 ou do extrato obtido de acordo com o item 3.1.4. A atividade enzimática foi medida conforme descrito no item 3.1.5.1.

3.1.6.4. Efeito do pH na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

O efeito do pH na estabilidade da PFO foi determinado na faixa de pH 2,6 a 10. Foram utilizados os sistemas tamponantes: tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 6,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 7,6); tampão ácido bórico-bórax (pH 8,0 a 8,8); tampão bórax-NaOH (pH 9,2 a 10), todos na concentração 0,1 Mol/L e dentro da sua respectiva faixa de capacidade tamponante.

As misturas de 2,0 mL de extrato enzimático obtido de acordo com o item 3.1.3 ou do extrato obtido de acordo com o item 3.1.4 e 2,0 mL de soluções tampão de diferentes valores de pH foram incubadas por 24 horas a 5°C e também por 4 horas a 2°C. Após a incubação, a atividade residual da PFO foi determinada conforme descrito no item 3.1.5.1, no pH ótimo de atividade da enzima, utilizando-se tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5.

3.1.6.5. Estudo do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da PFO, utilizando a metodologia de superfície de resposta

O planejamento composto central rotacional 2^2 (PCCR- 2^2) foi utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da polifenoloxidase de ameixa Rubimel. O PCCR- 2^2 contendo 12 ensaios, incluindo 4 ensaios referentes ao fatorial completo 2^2 , 4 ensaios referentes aos pontos axiais ($\alpha=\pm 1,41$), a quadruplicata no ponto central (0), a variável dependente atividade de polifenoloxidase e as variáveis reais, apresentam-se na Tabela 3. A atividade de polifenoloxidase foi determinada como descrito no item 3.1.5.1.

Tabela 3 Variáveis reais utilizadas no planejamento composto central rotacional 2^2 para estudo da influência da temperatura e do pH na atividade da PFO da ameixa Rubimel

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
T (°C)	5,0	13,7	35	56,3	65,0
pH	4,0	4,4	6,5	8,6	9,0

3.1.7. Caracterização da POD bruta de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

3.1.7.1. Efeito da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

A mistura de reação descrita no item 3.1.5.2 para a determinação de atividade POD foi pré-incubada em tubos de ensaio nas temperaturas entre 5°C e 70°C (com variação de 5°C) durante 10 minutos para equilíbrio da temperatura. Posteriormente foi adicionado em cada tubo 0,1 mL do extrato enzimático de

ameixa Rubimel obtido de acordo com o item 3.1.3 e ou de extrato enzimático de polpa de cacau obtido de acordo com o item 3.1.4 e a mistura de reação foi então transferida para a cubeta do espectrofotômetro Beckman DU 70 com controle de temperatura. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.1.5.2, em cada uma das temperaturas.

3.1.7.2. Efeito da temperatura na estabilidade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

Alíquotas de 2 mL de cada um dos extratos enzimáticos obtidos de acordo com os itens 3.1.3 e 3.1.4 foram incubadas nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C durante 10, 20, 30 e 60 minutos e também a 80, 85, 90°C e em ebulição por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, para os testes de inativação térmica. Após a incubação nas diferentes temperaturas, as amostras foram resfriadas imediatamente em banho de gelo. A atividade residual da POD foi determinada conforme descrito no item 3.1.5.2.

3.1.7.3. Efeito do pH na atividade da POD de ameixa Rubimel e da polpa de cacau

A mistura de reação descrita no item 3.1.5.2, nos sistemas tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 6,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 7,6); tampão ácido bórico-bórax (pH 8,0 a 8,8); tampão bórax-NaOH (pH 9,2 a 10), todos na concentração 0,1 Mol/L e dentro da faixa de capacidade tamponante foi previamente equilibrada a 30°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático obtido de acordo com o item 3.1.3 ou de extrato enzimático de polpa de cacau obtido de acordo com o item 3.1.4. A atividade enzimática foi medida conforme descrito no item 3.1.5.2.

3.1.7.4. Efeito do pH na estabilidade da POD de ameixa Rubimel e de polpa de cacau

O efeito do pH na estabilidade da POD foi determinado na faixa de pH 2,6 a 10. Foram utilizados os sistemas tamponantes: tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 6,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 7,6); tampão ácido bórico-bórax (pH 8,0 a 8,8); tampão bórax-NaOH (pH 9,2 a 10), todos na concentração de 0,1 Mol/L e dentro da sua respectiva faixa de capacidade tamponante. Misturas contendo 2 mL de cada um dos extratos enzimáticos obtidos de acordo com os itens 3.1.3 e 3.1.4 e 2mL das diferentes soluções tampões 0,1Mol/L foram incubadas por 24 horas a 5°C e também por 4 horas a 25°C. Após a incubação, a atividade residual da POD foi determinada conforme descrito no item 3.1.5.2, no pH ótimo de atividade da enzima.

3.1.7.5. Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta

O planejamento composto central rotacional 2^2 (PCCR- 2^2) foi utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da peroxidase de ameixa Rubimel. O PCCR- 2^2 contendo 12 ensaios, incluindo 4 ensaios referentes ao fatorial completo 2^2 , 4 ensaios referentes aos pontos axiais ($\alpha=\pm 1,41$), a quadruplicata no ponto central (0), para estimar o erro experimental, apresentam-se na Tabela 4. A atividade de peroxidase foi determinada como descrito no item 3.1.5.2.

Tabela 4: Variáveis reais utilizadas no planejamento composto central rotacional 2^2 para estudo da influência da temperatura e do pH na atividade da POD da ameixa Rubimel

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
T (°C)	5,0	13,7	35	56,3	65,0
pH	3,0	3,6	5,0	6,4	7,0

3.2. Estudo dos efeitos de diferentes agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel

3.2.1. Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel

Alíquotas de 20 mL do extrato enzimático obtido de acordo com o item 3.1.3 foram transferidas para frascos béquer de 50 mL e foram adicionados individualmente os agentes anti-escurecimento: glutatona reduzida, N-acetil-L-cisteína, L-cisteína, 4-hexilresorcinol, ácido kójico, ácido oxálico e ácido ascórbico, nas concentrações de 0 a 5 mM/L. As amostras foram agitadas em agitador magnético até a completa solubilização dos compostos. As amostras foram incubadas a 5°C por 1 hora e 24 horas, e a atividade residual de polifenoloxidase foi determinada utilizando-se catecol como substrato nas condições ótimas de atividade (pH 6,5 e 30°C) acompanhando-se o aumento da absorbância a 420 nm até 5 minutos de reação em espectrofotômetro Beckman DU 70, segundo o método descrito por OKTAY et al. (1995), com algumas modificações. Os experimentos foram realizados em duplicata

3.2.2. Efeito de agentes anti-escurecimento utilizando a metodologia de superfície de resposta na atividade da PFO de ameixa Rubimel

O planejamento composto central rotacional 2^3 (PCCR- 2^3) foi utilizado para otimizar o efeito anti-escurecimento das variáveis independentes ácido ascórbico (AA), 4-hexil-resorcinol (HR) e L-cisteína (C), previamente selecionados através do teste univariável considerando a associação de agentes com diferentes mecanismos de atuação e dentre os mais efetivos, aminoácidos sulfurados, o de menor custo. O PCCR- 2^3 contendo 17 ensaios, incluindo 8 ensaios referentes ao fatorial completo 2^3 , 6 ensaios referentes aos pontos axiais ($\alpha=\pm 1,68$), a triplicata no ponto central (0), apresentam-se na Tabela 5. Alíquotas de 20 mL do extrato enzimático solúvel obtido conforme descrito no item 3.1.3 foram transferidas para 17 frascos béquer de 50 mL (um para cada ensaio) e os reagentes foram adicionados à cada alíquota nas concentrações descritas na Tabela 5. As amostras foram armazenadas por 24 horas a 5°C e a atividade de polifenoloxidase foi determinada como descrito anteriormente.

Tabela 5: Variáveis reais utilizadas no planejamento completo com seus respectivos níveis

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Ácido Ascórbico (AA)	1,0	2,0	3,5	5,0	6,0
4-Hexil-resorcinol (HR)	1,0	1,8	3,0	4,2	5,0
L-Cisteína (C)	1,0	1,6	2,5	3,4	4,0

3.2.3. Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da POD de polpa de cacau

Foram preparadas soluções com concentrações individuais de 2 a 5 mMol/L de glutathiona reduzida, N-acetil-Lcisteína, L-cisteína, 4-hexilresorcinol, ácido kójico e ácido oxálico. Alíquotas de 500 µL do extrato enzimático solúvel concentrado de polpa de cacau, obtido conforme descrito no item 3.1.4 foram transferidas para microtubos contendo 500 µL das soluções dos agentes anti-escurecimento, em cada uma das concentrações descritas acima, sendo agitadas em agitador de tubos por 10s. Uma amostra foi mantida como controle, onde 500 µL de água destilada foi adicionada a igual volume de extrato enzimático. As amostras foram incubadas a 5°C por 1 horas e 24 horas, e posteriormente foram determinadas a atividade de peroxidase, segundo método descrito no item 3.1.5.2 com alteração no volume de extrato enzimático que foi de 200 µL. A atividade foi realizada no pH 5,0 e a 40°C, condições ótimas da peroxidase da polpa de cacau. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.4. Efeito combinado dos agentes anti-escurecimento e tratamento térmico na atividade da POD da polpa de cacau

Foram preparadas soluções com concentrações individuais de 2 a 5 mMol/L de glutathiona reduzida, N-acetil-Lcisteína, L-cisteína, 4-hexilresorcinol, ácido kójico e ácido oxálico. Amostras de 1 mL de extrato enzimático solúvel concentrado de polpa de cacau, obtido conforme descrito no item 3.1.4, foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 1 mL das soluções dos agentes anti-escurecimentos, em cada uma das concentrações descritas acima, sendo agitadas em agitador de tubos por 10s e posteriormente submetidas ao tratamento térmico a 70°C por 30 minutos. Uma amostra foi mantida como controle, onde 1 mL de água destilada foi adicionada a igual volume de extrato enzimático. As amostras foram incubadas a 5°C por 1 horas e 24 horas, e posteriormente foram determinadas a atividade de

POD, segundo método descrito no item 3.1.5.2, com alteração no volume de extrato enzimático que foi de 200 μ L. A atividade foi realizada no pH e temperatura de atividade ótima da POD da polpa de cacau. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação da atividade de PFO e POD do extrato enzimático bruto de ameixa Rubimel e polpa de cacau

O extrato enzimático bruto obtido pela centrifugação da polpa de ameixa Rubimel apresentou atividade de polifenoloxidase (448 U/g de polpa) e de peroxidase (705 U/g de polpa). Observou-se que o precipitado obtido da centrifugação da polpa de ameixa Rubimel contendo as frações das enzimas ligadas apresentou baixa atividade de PFO E POD.

O extrato enzimático bruto solúvel polpa de cacau apresentou atividade de POD (668U /g de polpa de cacau) e de PFO (72U /g de polpa de cacau).

FLURKEY e JEN (1979) verificaram que a semente de cacau apresentou atividade de peroxidase (1.600U/g) e de polifenoloxidase (900U/g), determinadas usando respectivamente, guaiacol+peróxido de hidrogênio e catecol como substratos. As unidades de atividade de POD e PFO foram definidas como o aumento de 0,1 unidade na absorbância a 420 e 470 nm, respectivamente. SAKAROV e ARILA (1999) relataram que a amêndoa e a casca de cacau apresentaram 5.700U de peroxidase/g enquanto que a polpa não apresentou atividade de peroxidase. MERCÊS PENHA e DA MATA (1998) determinaram qualitativamente a presença de polifenoloxidase e peroxidase na polpa de cacau.

4.2. Caracterização da PFO bruta de ameixa Rubimel

4.2.1. *Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da PFO de ameixa Rubimel*

A PFO de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima na faixa de 30 a 35°C, apresentando uma redução de 50% de sua atividade na temperatura de

$\pm 10^{\circ}\text{C}$, conforme ilustrado na Figura 7. A atividade ótima da PFO de ameixa Rubimel foi verificada em temperaturas mais baixas que para as polifenoloxidasas de açaí (SANTOS, 2001) e repolho (FUJITA et al., 1995), ambas com atividade ótima na faixa de $40\text{-}45^{\circ}\text{C}$. LOURENÇO et al. (1990) e ROBERT et al. (1995) verificaram que as polifenoloxidasas dos palmitos *Acanthophoenix rubra* e *Euterpe edulis* apresentaram atividade ótima a 30°C .

O efeito da temperatura na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel é mostrado na Figura 8. Após 10 minutos de tratamento do extrato enzimático bruto a 30°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C , a atividade residual da PFO da ameixa Rubimel foi de 79, 50, 50, 29 e 0%, respectivamente. Após 60 minutos de tratamento a 30°C , 40°C , 50°C e 60°C , a atividade residual da PFO da ameixa Rubimel foi de 64, 42, 30 e 12%, respectivamente. A PFO de ameixa Rubimel foi completamente inativada após 1 minuto de tratamento a 80°C , mostrando-se mais termossensível do que a PFO do palmito *Acanthophoenix rubra* descrita por ROBERT et al. (1995). A PFO desse palmito reteve 50% da atividade inicial após 18 minutos de tratamento a 70°C .

SIDDIQ et al. (1994), observaram que a PFO em suco de ameixa apresentou estabilidade na faixa de 10 a 50°C , porém acima de 50°C a enzima perdia atividade rapidamente. ARSLAN et al. (1998), estudando a PFO de damasco, observaram que o tratamento a 40°C , após 40 minutos não causou perda de atividade significativa. Os tempos requeridos para obter 50% de inativação a 60 e 80°C foram respectivamente, 47 e 16 minutos. Os autores afirmaram ainda que a estabilidade térmica estava relacionada ao grau de amadurecimento da fruta e em alguns casos, ao pH. Além disso, diferentes formas moleculares da enzima, de uma mesma fonte, podem apresentar termoestabilidades diferentes.

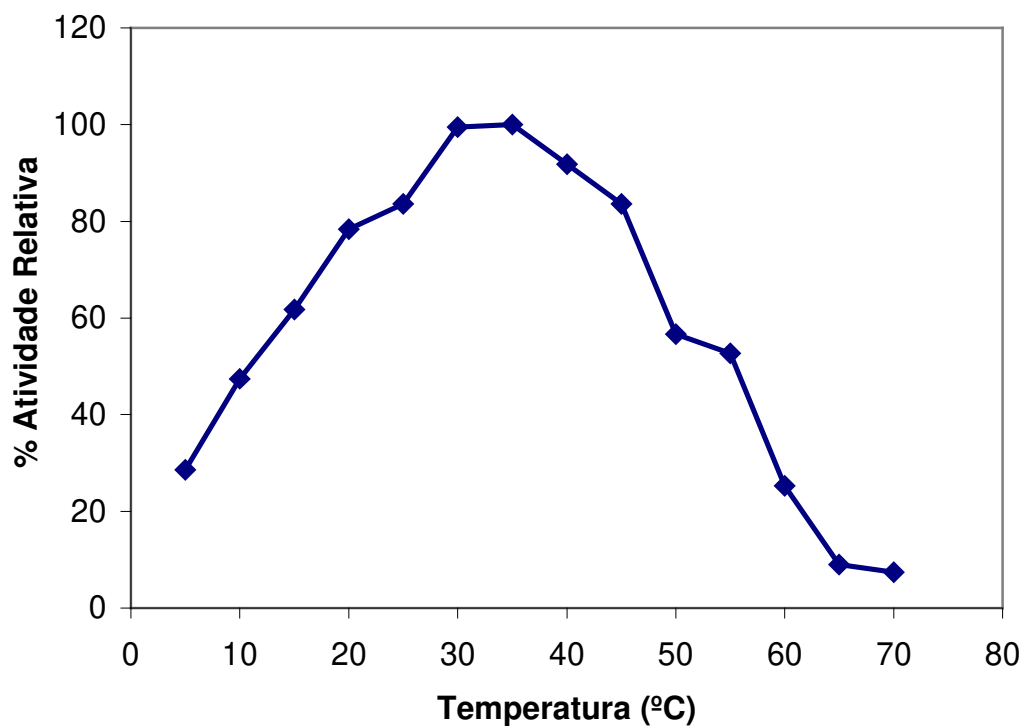


Figura 7: Efeito da temperatura na atividade da PFO da ameixa Rubimel.

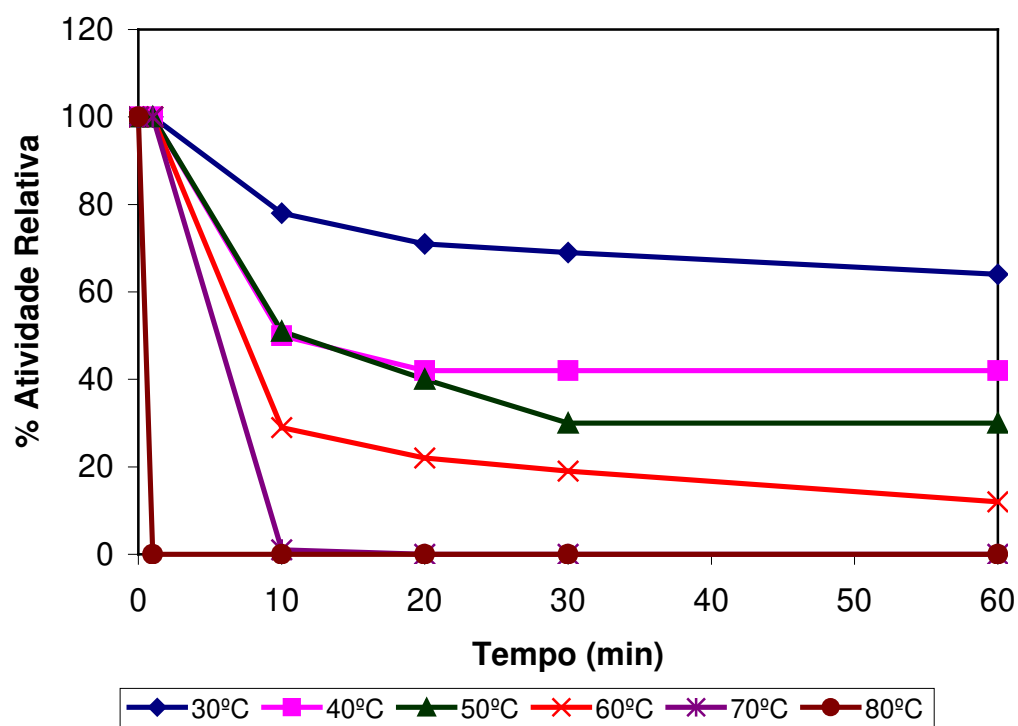


Figura 8: Efeito da temperatura na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.

4.2.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da PFO de ameixa Rubimel

A PFO de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima em pH 6,5 (Figura 9). As polifenoloxidasas da maioria das plantas apresentam máximo de atividade em pH neutro ou próximo da neutralidade, sendo 6,0 o pH ótimo de atividade da PFO de açaí (SANTOS 2001); 5,6 a 6,0 da PFO de manga Haden (PARK et. al., 1980) e 6,5 o pH ótimo de atividade da PFO de pinha (LIMA, 1995).

A Figura 10 ilustra que a PFO de ameixa Rubimel mostrou-se estável na faixa de pH de 3,0 a 7,5, mantendo cerca de 50% ou mais da atividade inicial, após 24 h a 5°C e após 4 h a 25°C. A PFO de ameixa Rubimel mostrou menor estabilidade em pH superior a 8,5; restando menos que 40% da atividade inicial, após 24h a 5°C e após 4 h a 25°C.

LOURENÇO et al. (1990) relataram que a PFO de palmito (*Euterpe edulis*) apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 8,0, após 3 h a 30°C utilizando o substrato ácido clorogênico em pH 5,6. ROBERT et al. (1995) verificaram que a PFO de palmito (*Acanthophoenix rubra*) mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,0 após 10 minutos a 30°C, usando 4-metilcatecol como substrato.

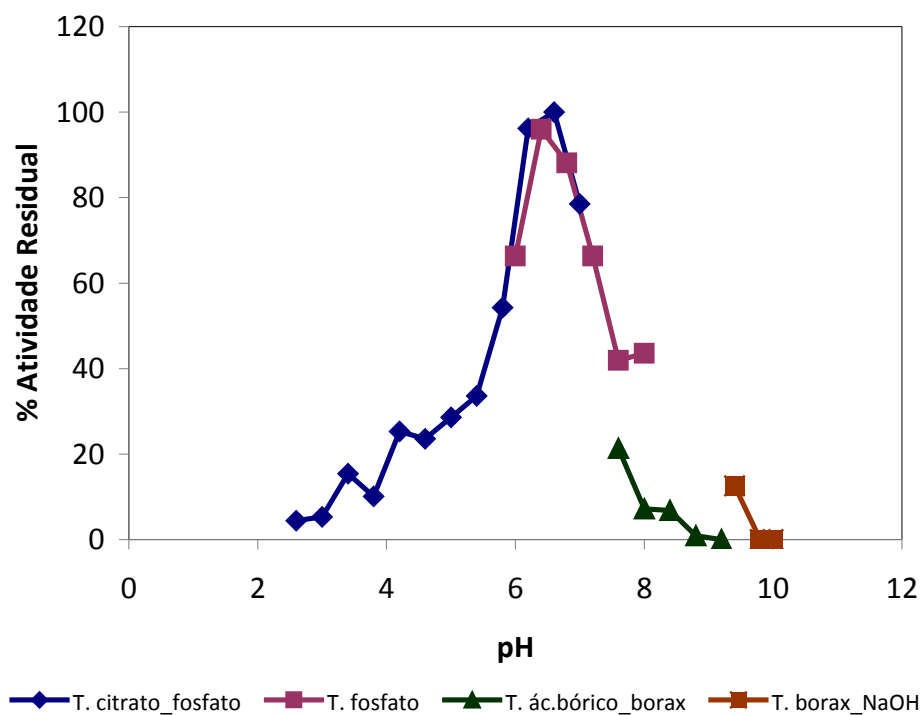


Figura 9: Efeito do pH na atividade da PFO de ameixa Rubimel.

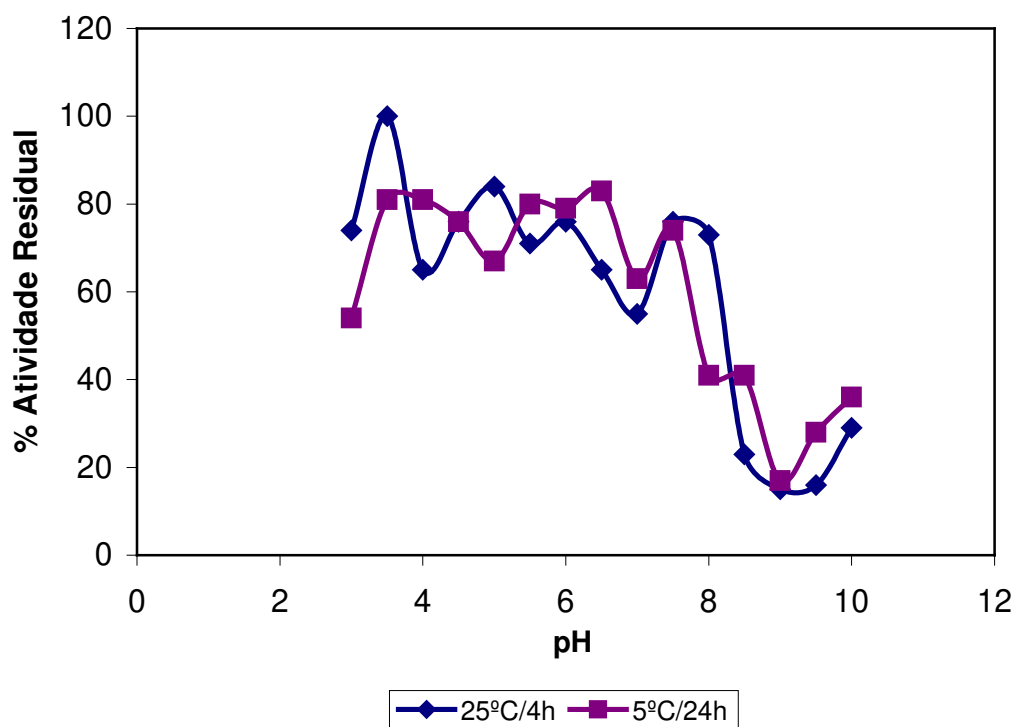


Figura 10: Efeito do pH na estabilidade da PFO de ameixa Rubimel.

4.2.3. *Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta*

As variáveis pH e temperatura foram estudadas utilizando um planejamento composto central rotacional (DCCR). A resposta avaliada foi a atividade enzimática da PFO. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Planejamento composto central rotacional 2^2 (PCCR- 2^2) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel

Ensaio	Variável		
	Temperatura (°C)	pH	Atividade da PFO (U/g)
1	-1 (13,7)	-1 (4,4)	40,1
2	+1 (56,3)	-1 (4,4)	130,9
3	-1 (13,7)	+1 (8,6)	2,3
4	+1 (56,3)	+1 (8,6)	0,0
5	-1,41 (5,0)	0 (6,5)	172,8
6	+1,41 (65,0)	0 (6,5)	0,0
7	0 (35,0)	-1,41 (4,0)	95,0
8	0 (35,0)	+1,41 (9,0)	0,0
9	0 (35,0)	0 (6,5)	322,1
10	0 (35,0)	0 (6,5)	331,6
11	0 (35,0)	0 (6,5)	324,7
12	0 (35,0)	0 (6,5)	392

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 7. As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2). Quanto maior a proximidade de R da unidade (1) melhor a correlação entre os valores de atividade preditos pelo modelo e os valores observados. Foi obtido um valor de R de 0,96%. O valor

de F obtido a partir da ANOVA foi de 26,48, maior que o $F_{\text{tabelado}} = 4,12$, indicando que o modelo para estudo do efeito da temperatura de reação e pH na atividade da PFO é considerado estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%. Esses resultados são satisfatórios a 95% de confiança, permitindo obter as superfícies de resposta e curvas de contorno, em função das variáveis independentes analisadas. As Figuras 11A e 11B mostram que a PFO de ameixa Rubimel apresentou maior atividade em pH 6,5 e a 35°C. A enzima mostrou menor atividade em valores de pH próximos a pH 4,0 quando incubada a 5°C como também a 65°C.

Tabela 7: Análise de variância do estudo do efeito do pH e da temperatura e influência na atividade da PFO de ameixa Rubimel

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	300063,95	4	75015,99	26,48
Resíduos	19827,73	7	2832,53	
Falta de Ajuste	1564,52	4		
Erro Puro	4187,21	3		
Total	280236,22	11		

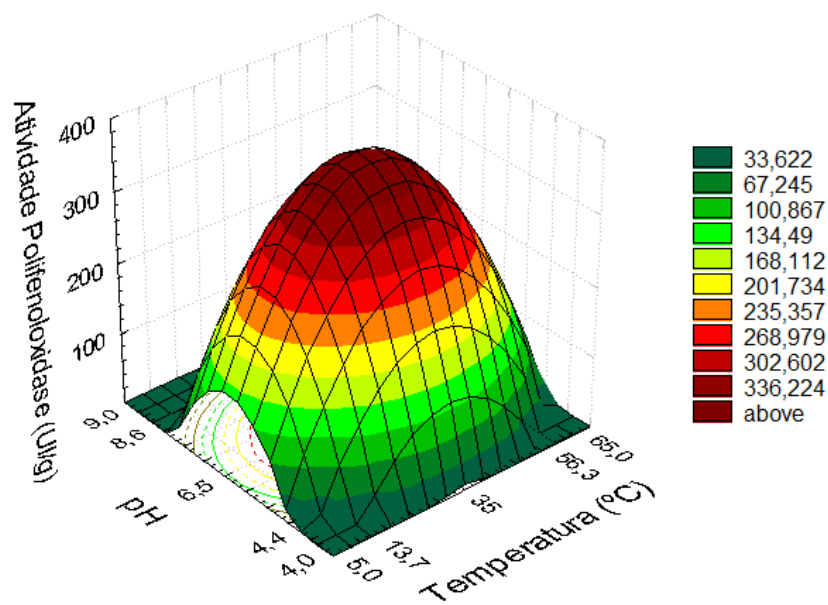
Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,93$; Valor-F tabelado $_{0,95;4;7} = 4,12$

Após as análises, foi possível obter a Equação 1, que representa o modelo codificado:

$$y = 369,85 - 109,79x_1^2 - 33,69x_2 - 183,84x_2^2 \quad (\text{equação 1})$$

Onde y é a atividade de PFO, x_1 é a temperatura e x_2 é o pH.

A)



B)

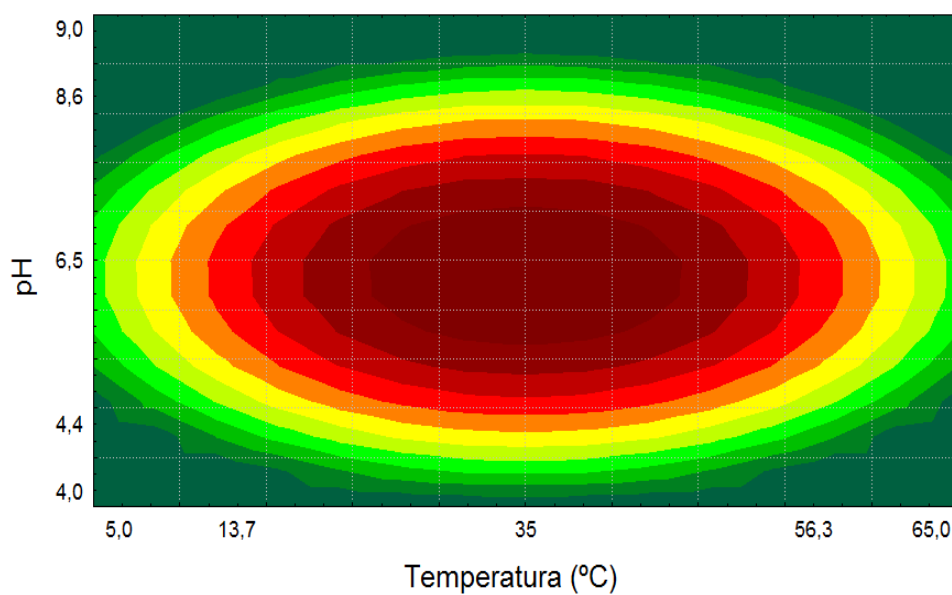


Figura 11: Efeito do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel: A) Superfície de Resposta, e B) Curva de Contorno.

4.3. Caracterização da POD bruta de ameixa Rubimel

4.3.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da POD de ameixa Rubimel

A Figura 12 ilustra que a POD de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima a 40°C. Nas temperaturas de 5°C e 10°C a POD de ameixa Rubimel apresentou atividade relativa igual a 15,5% e 20% respectivamente, sendo que em temperaturas superiores a 40°C, a atividade diminuiu rapidamente, não mostrando atividade a 55°C. Peroxidases de frutas podem apresentar atividade ótima em ampla faixa de temperatura, desde valores próximos à ambiente até temperaturas mais elevadas, entre 50°C e 65°C (Tabela 2). As peroxidases de morango (CIVELLO et al., 1995) e açaí (SANTOS, 2001) mostraram atividade ótima a 30°C e 35°C, respectivamente. As peroxidases de melão (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2000) e abacaxi (BRITO, 2001) apresentaram temperatura ótima a 50°C.

A Figura 13 ilustra que a POD de ameixa Rubimel perdeu cerca de 45% e 85% da atividade inicial após 60 minutos de incubação a 30°C e 40°C. A grande estabilidade térmica comum às peroxidases de frutas, não foi observada para POD de ameixa Rubimel, visto que 10 minutos de tratamento a 70°C ou 1 minuto a 80°C foi suficiente para inativá-la. O tratamento térmico necessário para a completa inativação a POD bruta solúvel de ameixa Rubimel se encontra dentro da faixa de temperatura (70°C a 100°C) empregada no branqueamento de frutas e vegetais íntegros (FORSYTH et al., 1999).

A POD parcialmente purificada de açaí manteve 20% da atividade inicial após 5 minutos a 90°C, ou 3 minutos em temperatura de ebulição (SANTOS, 2001), mostrando-se mais termorresistente que a POD de ameixa Rubimel. A POD de maçã mostrou-se também termorresistente mantendo até 80% (isoperoxidases catiônicas) e 20% (isoperoxidases aniônicas) de sua atividade inicial quando tratada a 80°C por 10 minutos (VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

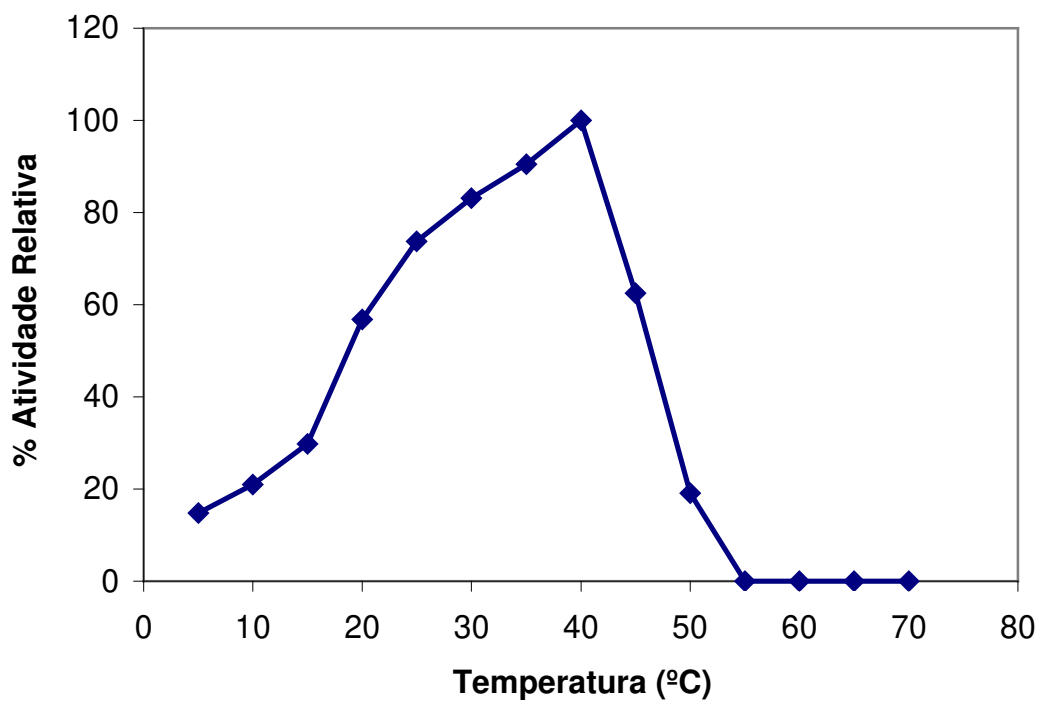


Figura 12: Efeito da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel.

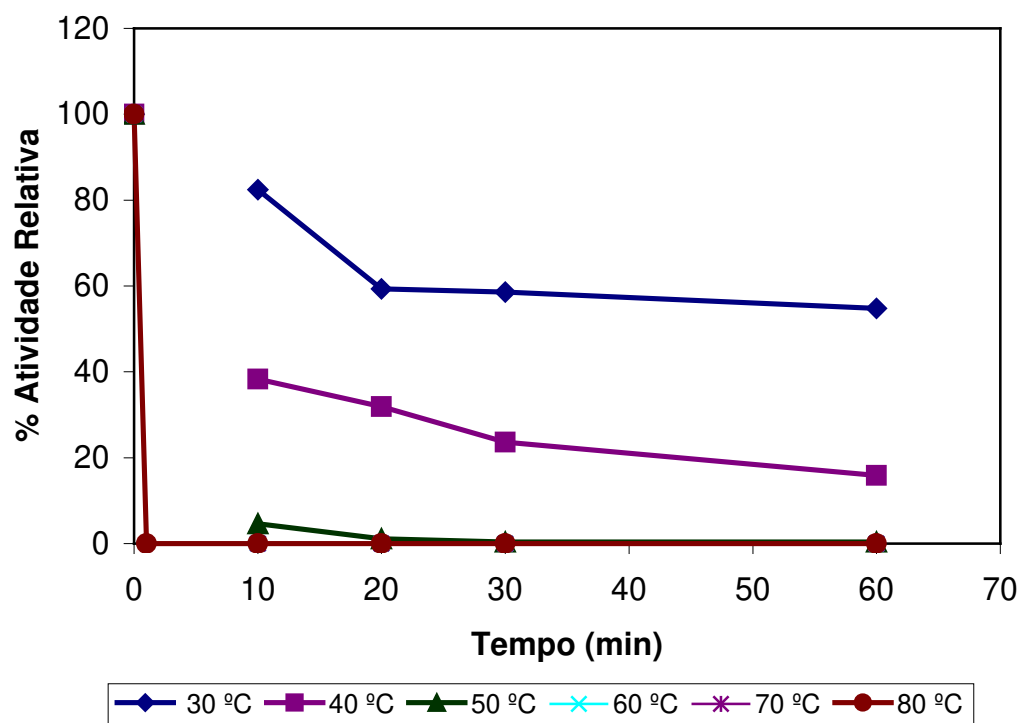


Figura 13: Efeito da temperatura na estabilidade da POD de ameixa Rubimel.

4.3.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da POD de ameixa Rubimel

O efeito do pH na atividade da POD do extrato bruto de ameixa Rubimel foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.7.3, a 40°C, sua temperatura de maior atividade.

A POD do extrato bruto de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima em pH 4,0 (Figura 14). Este valor de pH ótimo de atividade da POD está dentro da faixa de valores encontrados para pH ótimo de atividade de POD de diversas frutas citadas na literatura, 4,0 a 7,0 (Tabela 2). As peroxidases parcialmente purificadas de morango (CIVELLO et al., 1995) e de palmito (ONSA et al., 2004) apresentaram pH ótimo de atividade igual a 6,0. A POD de melão apresentou pH ótimo em 5,5 (RODRIGUEZ-LÓPEZ et al., 2000). Para a enzima proveniente de abacaxi, o valor de pH para atividade ótima foi de 4,5 (BRITO, 2001), e para a peroxidase de açaí, na faixa de 4,0 a 5,0 (SANTOS, 2001).

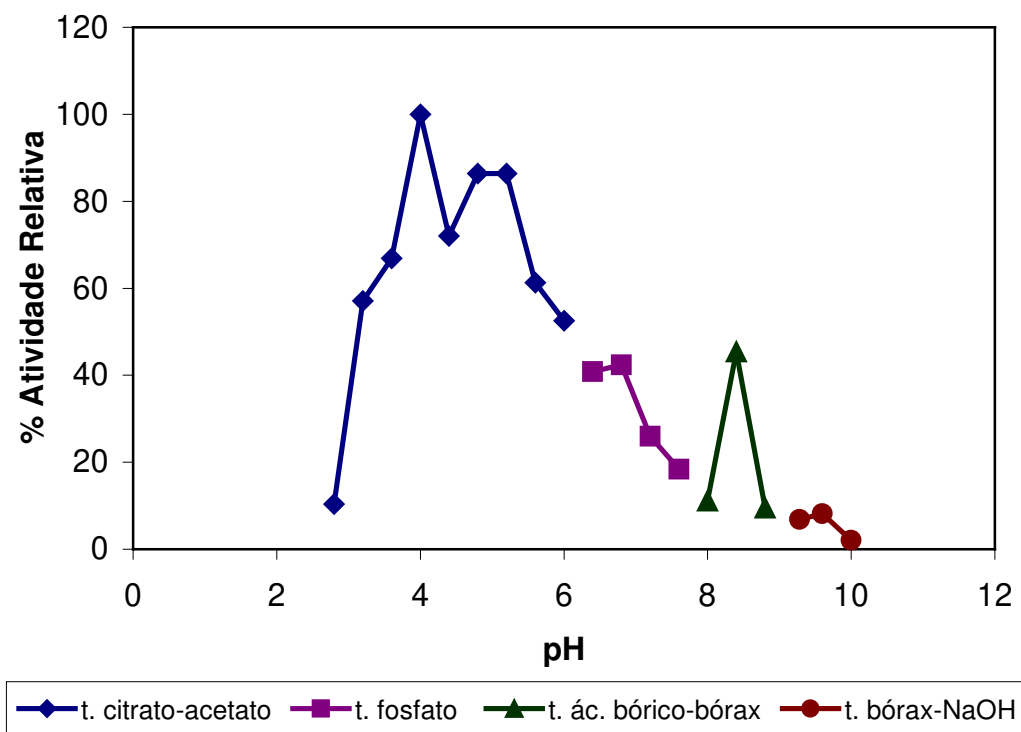


Figura 14: Efeito do pH na atividade da POD de ameixa Rubimel.

A Figura 15 mostra que a POD de ameixa Rubimel permaneceu estável na faixa de pH de 3,0 a 5,5 mantendo mais que 60% da atividade inicial com rápida redução da atividade quando mantidas em valores de pH superiores a 5,5, nas duas condições de tempo e temperatura de armazenamento. A POD bruta de abacaxi manteve quase que integralmente sua atividade enzimática quando exposta a valores de pH na faixa de 3,0 a 9,0, tanto a 5°C por 24h quanto a temperatura ambiente por 3 h (BRITO, 2007). A POD parcialmente purificada de açaí mostrou-se estável na faixa de pH de 2,6 a 10,0, quando exposta durante 24 h a 5°C mantendo em torno de 90% da sua atividade. Após incubação à temperatura ambiente por 3h, a POD de açaí mostrou menor estabilidade em valores de pH 4,0 (SANTOS, 2001).

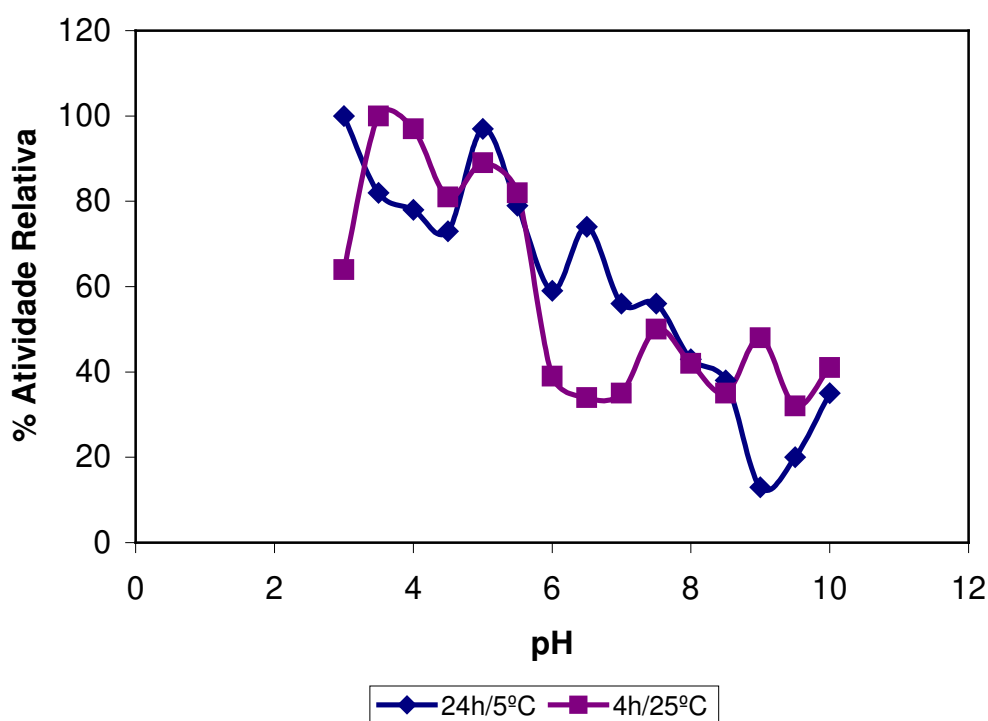


Figura 15: Efeito do pH na estabilidade da POD de ameixa Rubimel.

4.3.3. *Determinação do efeito combinado do pH e da temperatura na atividade da peroxidase da ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta*

As variáveis pH e T (°C) foram estudadas através de um planejamento composto central rotacional (DCCR). A resposta avaliada foi a atividade enzimática da POD. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Planejamento composto central rotacional 2^2 (PCCR- 2^2) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para verificar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel

Ensaio	Variável		
	Temperatura (°C)	pH	Atividade POD U/g
1	-1 (13,7)	-1 (3,6)	45,7
2	+1 (56,3)	-1 (3,6)	0,0
3	-1 (13,7)	+1 (6,4)	330,8
4	+1 (56,3)	+1 (6,4)	0,0
5	-1,41 (5,0)	0 (5,0)	171,2
6	+1,41 (65,0)	0 (5,0)	0,0
7	0 (35,0)	-1,41 (3,0)	11,6
8	0 (35,0)	+1,41 (7,0)	6,7
9	0 (35,0)	0 (5,0)	201,6
10	0 (35,0)	0 (5,0)	174,3
11	0 (35,0)	0 (5,0)	211,5

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 9. As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2). Quanto maior a proximidade de R da unidade (1) melhor a correlação entre os valores de atividade preditos pelo modelo e os valores observados. Foi obtido um valor de R de 0,87. O valor de

F obtido a partir da ANOVA foi 31,77, maior que o $F_{\text{tabelado}} = 4,12$, indicando que o modelo para estudo do efeito da temperatura de reação e pH na atividade da POD é considerado estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%. Esses resultados são satisfatórios a 95% de confiança, permitindo obter as superfícies de resposta e curvas de contorno, em função das variáveis independentes analisadas, como mostrado nas Figuras 16A e 16B.

Tabela 9: Análise de variância do estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da POD de ameixa Rubimel

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	455252,49	4	113813,12	31,77
Resíduos	25078,01	7	3582,57	
Falta de Ajuste	18992,08	4		
Erro Puro	6085,93	3		
Total	480330,49	11		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,87$; Valor-F tabelado $_{0,95;4;7} = 4,12$

Após as análises, foi possível obter a Equação 2, que representa o modelo codificado:

$$y = 607,79 - 163,94x_1^2 + 66,48x_2 - 219,32x_2^2 \quad (\text{equação 2})$$

Onde y é a atividade de POD, x_1 é a temperatura e x_2 é o pH.

As Figuras 16A e 16B, ilustram que a POD de ameixa Rubimel apresentou maior atividade em pH 5,0 e a 35°C. A enzima mostrou menor atividade de POD em valores de pH próximos a 3,0, quando incubada tanto a 5°C como a 65°C.

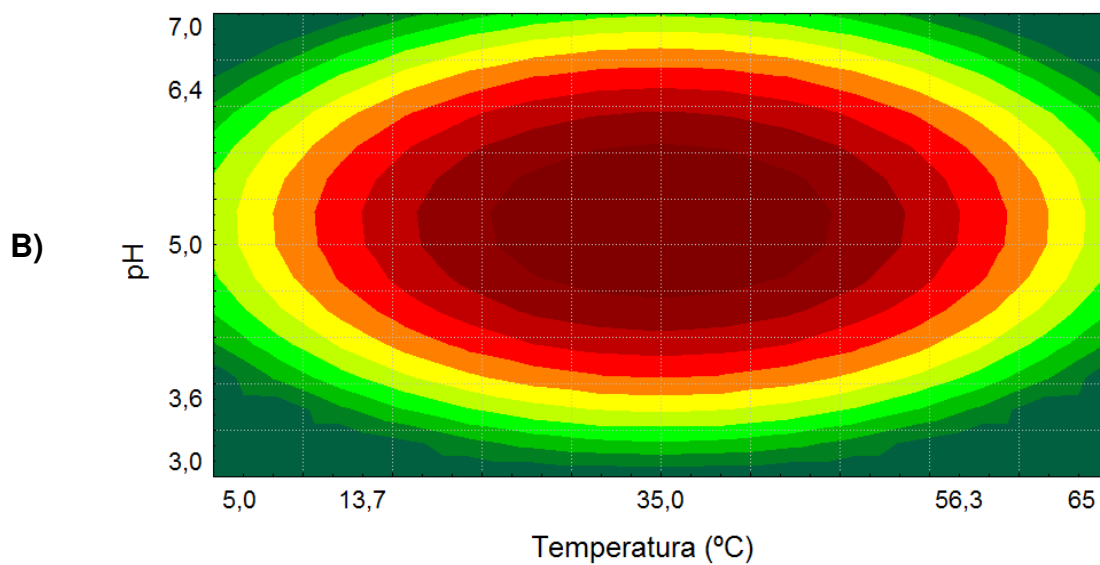
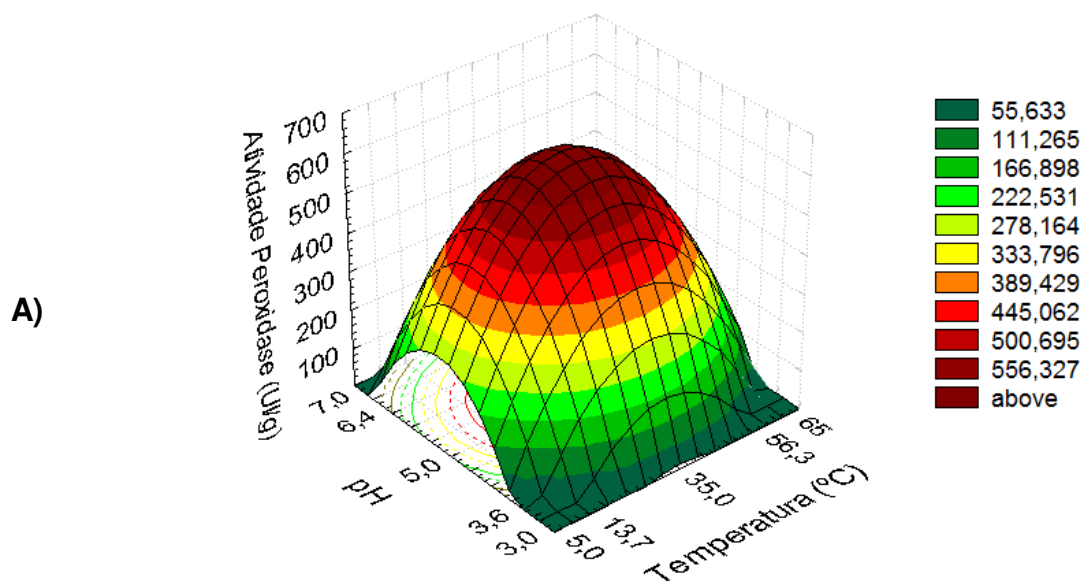


Figura 16: Efeito do pH e da temperatura na atividade da PFO de ameixa Rubimel: A) Superfície de Resposta, e B) Curva de Contorno.

4.4. Estudos dos efeitos dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel

4.4.1. Efeito individual dos agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel

Considerando a maior sensibilidade da POD comparada à da PFO ao tratamento térmico aplicado à polpa de ameixa Rubimel, com a finalidade de destruição de microrganismos patogênicos, foram testados os efeitos dos agentes anti-escurecimento na atividade de PFO de ameixa Rubimel (Tabela 10).

Tabela 10: Teste univariável do efeito de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da PFO de ameixa Rubimel

Agente anti-escurecimento	% Inibição da PFO de ameixa Rubimel após adição de diferentes concentrações de agente anti-escurecimento e incubação por 1h a 5°C						% Inibição da PFO de ameixa Rubimel após adição de diferentes concentrações de agente anti-escurecimento e incubação por 24h a 5°C					
	Concentração de inibidores (mMol/L)						Concentração de inibidores (mMol/L)					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Ácido ascórbico	0	0	0	0	11	16	0	0	0	0	12	15
Ácido oxálico	0	35	35	37	37	42	0	35	35	44	44	52
Ácido kójico	0	30	48	53	56	71	0	45	55	62	71	74
4-hexil - resorcinol	0	14	35	53	68	68	0	48	62	74	82	98
L-cisteína	0	14	38	70	84	87	0	14	42	73	84	87
N-acetil - L-cisteína	0	37	46	83	99	99	0	50	74	99	99	99
Glutathiona	0	11	21	40	64	99	0	35	37	54	64	99

O ácido ascórbico pode inibir o escurecimento enzimático catalisado pela PFO pela redução do produto quinona para ortodifenol, remoção de O₂, inibição da enzima pela redução do Cu²⁺ do sítio ativo para Cu⁺ e diminuição do pH (WALKER, 1977). A adição de ácido ascórbico nas concentrações 1, 2 e 3 mMol/L

e armazenamento a 5°C durante 1 e 24h não inibiu o escurecimento do extrato enzimático de ameixa Rubimel enquanto que a adição de ácido ascórbico nas concentrações de 4 e 5 mM/L inibiu 11 e 16%; 12 e 15% da atividade da PFO após armazenamento a 5°C durante 1h e 24h, respectivamente. O efeito desse agente redutor pode ser considerado temporário, pois ele é oxidado irreversivelmente ao reagir com intermediários da reação de escurecimento, enzimas endógenas e metais tais como o cobre. Esses resultados foram similares aos obtidos por ÖZOGLU e BAYINDIRLI (2002), que verificaram escurecimento devido à oxidação do ácido ascórbico em pedaços de maçã tratados com solução 1% de ácido ascórbico após 20 minutos de armazenamento, sendo esse efeito também observado por outros pesquisadores (SON et al., 2001; SAPERS e MILLER, 1992) em estudos com maçã e batata.

Os ácidos carboxílicos mostram efeito inibitório no escurecimento enzimático devido à sua característica quelante ou por abaixar o pH do meio (FÚRIA, 1964); certos ácidos fenólicos podem inibir a atividade de polifenoloxidase agindo como agente redutor ou se ligando ao sítio ativo da enzima (JANOVITZ-KLAPP et al, 1990; MONSALVE-GONZALEZ et al., 1993). O ácido oxálico, 4-hexil-resorcinol e o ácido kójico mostraram ser muito mais efetivos como agente anti-escurecimento do suco de ameixa Rubimel que o ácido ascórbico nas concentrações testadas. A adição de ácido oxálico, ácido kójico e 4-hexil-resorcinol, na concentração final de 5mM, no extrato enzimático de ameixa Rubimel e incubação durante 24h a 5°C resultou em 52%, 74% e 98% de inibição da PFO, respectivamente. Esses resultados foram similares aos obtidos por alguns pesquisadores (ÖZOGLU e BAYINDIRLI, 2002; SON et al., 2001).

Os aminoácidos sulfurados L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutatona foram os mais efetivos na inibição da polifenoloxidase de ameixa Rubimel entre todos os agentes testados, sendo que a N-acetil-L-cisteína foi o mais efetivo. A adição de ácido ascórbico, ácido oxálico, ácido kójico, 4-hexil-resorcinol, L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutatona na concentração final 5mM/L e incubação durante 24h a

5°C, resultou em 15%, 52%, 74%, 98%, 87%, 99% e 99% de inibição da PFO de ameixa Rubimel, respectivamente. Os aminoácidos sulfurados são bem conhecidos por sua atividade anti-escurecimento e têm sido freqüentemente usados para inibir o escurecimento de batata (GUNES e LEE, 1997), maçãs (BUTA et al., 1999) e outras bebidas de frutas (McEVILY et al., 1992), embora o mecanismo de inibição não esteja claro. KAHN (1985) propôs que a L-cisteína pode reagir com íons Cu^{2+} do sítio ativo da PFO inativando a enzima. A L-cisteína pode reagir com a quinona e formar compostos conjugados incolores (MOLNAR-PERL e FRIEDMAN, 1990; RICHARD-FORGET et al., 1992).

4.4.2. Efeito de agentes anti-escurecimento na atividade da PFO de ameixa Rubimel utilizando a metodologia de superfície de resposta

As variáveis ácido ascórbico (AA), 4-hexil-resorcinol (HR) e L-cisteína (C) foram estudadas utilizando planejamento composto central rotacional (PCCR). A resposta avaliada foi a atividade enzimática da PFO e os resultados estão ilustrados na Tabela 11.

Tabela 11: Planejamento composto central rotacional 2^3 (PCCR- 2^3) codificado e não codificado (valores reais entre parênteses) utilizado para otimizar os efeitos anti-escurecimento das variáveis independentes ácido ascórbico (AA), 4-hexil-resorcinol (HR) e L-cisteína (C), da PFO de ameixa Rubimel

Ensaio	Variável			Atividade de PFO (U/g)
	AA (mMol/L)	HR (mMol/L)	C (mMol/L)	
1	-1 (2,0)	-1 (1,8)	-1 (1,6)	43,8
2	+1 (5,0)	-1 (1,8)	-1 (1,6)	42,2
3	-1 (2,0)	+1 (4,2)	-1 (1,6)	25,4
4	+1 (5,0)	+1 (4,2)	-1 (1,6)	1,9
5	-1 (2,0)	-1 (1,8)	+1 (3,4)	18,6
6	+1 (5,0)	-1 (1,8)	+1 (3,4)	0,8
7	-1 (2,0)	+1 (4,2)	+1 (3,4)	0,4
8	+1 (5,0)	+1 (4,2)	+1 (3,4)	0,4
9	-1,68 (1,0)	0 (3,0)	0 (2,5)	19,5
10	+1,68 (6,0)	0 (3,0)	0 (2,5)	0,7
11	0 (3,5)	-1,68 (1,0)	0 (2,5)	24,1
12	0 (3,5)	+1,68 (5,0)	0 (2,5)	1,0
13	0 (3,5)	0 (3,0)	-1,68 (1,0)	5,4
14	0 (3,5)	0 (3,0)	+1,68 (4,0)	0,2
15	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (2,5)	8,2
16	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (2,5)	4,9
17	0 (3,5)	0 (3,0)	0 (2,5)	7,6

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 12. As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2). Quanto maior a proximidade de R da unidade (1) melhor a correlação entre os valores de atividade preditos pelo modelo e os valores observados. Foi obtido um valor de R de 0,9. O valor de F obtido a partir da ANOVA foi de 5,93, maior que o $F_{\text{tabelado}} = 3,22$, indicando que o modelo para estudo da inibição da PFO pode ser considerado estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%. Esses resultados podem ser considerados satisfatórios a 95% de confiança, permitindo obter as superfícies de

resposta e curvas de contorno, em função das variáveis independentes analisadas, como mostrado na Figura 17.

Tabela 12: Análise de variância do estudo do efeito dos agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da PFO de ameixa Rubimel

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2623,7339	6	437,2890	5,93
Resíduos	737,5249	10	73,7525	
Falta de Ajuste	731,3449	8		
Erro Puro	6,1800	2		
Total	3361,2588	16		

Coeficiente de correlação: $R = 0,9$; $F_{0,95;6;10} = 3,22$.

As Figuras 17A, 17B e 17C, indicam que para a variável ácido ascórbico (AA) a faixa em que se obtém a menor atividade da PFO, em um efeito combinado, é de 2,9 a 6,0 mMol/L, sendo a concentração ótima de 5 mMol/L. Em relação à variável hexilresorcinol (HR) a maior inibição da PFO está na faixa de concentração de 1,2 a 5,0 mMol/L, com inibição máxima com 4,0 mMol/L e para a variável cisteína (C), de 3,0 a 4,0 mMol/L, com inibição máxima com 4,0 mMol/L. Diferentemente ao observado no ensaio univariável, a variável AA teve efeito anti-escurecimento quando combinado com as variáveis HR e C, sendo possível obter 99% de inibição da atividade PFO com a adição de 5,0 mMol/L de ácido ascórbico + 1,8 mMol/L de HR + 3,4 mMol/L da variável C. O uso desta combinação de agentes anti-escurecimento com concentrações de HR e C mais baixas que as concentrações requeridas individualmente é importante não só para a redução de custos, mas também para a preservação das características organolépticas do suco de ameixa Rubimel. Resultados semelhantes foram observados por ÖZOGLU e BAYINDIRLI (2002) e GACCHE et al., (2004) ao testar o efeito combinado dos agentes anti-escurecimento na preservação da cor de suco de maçã.

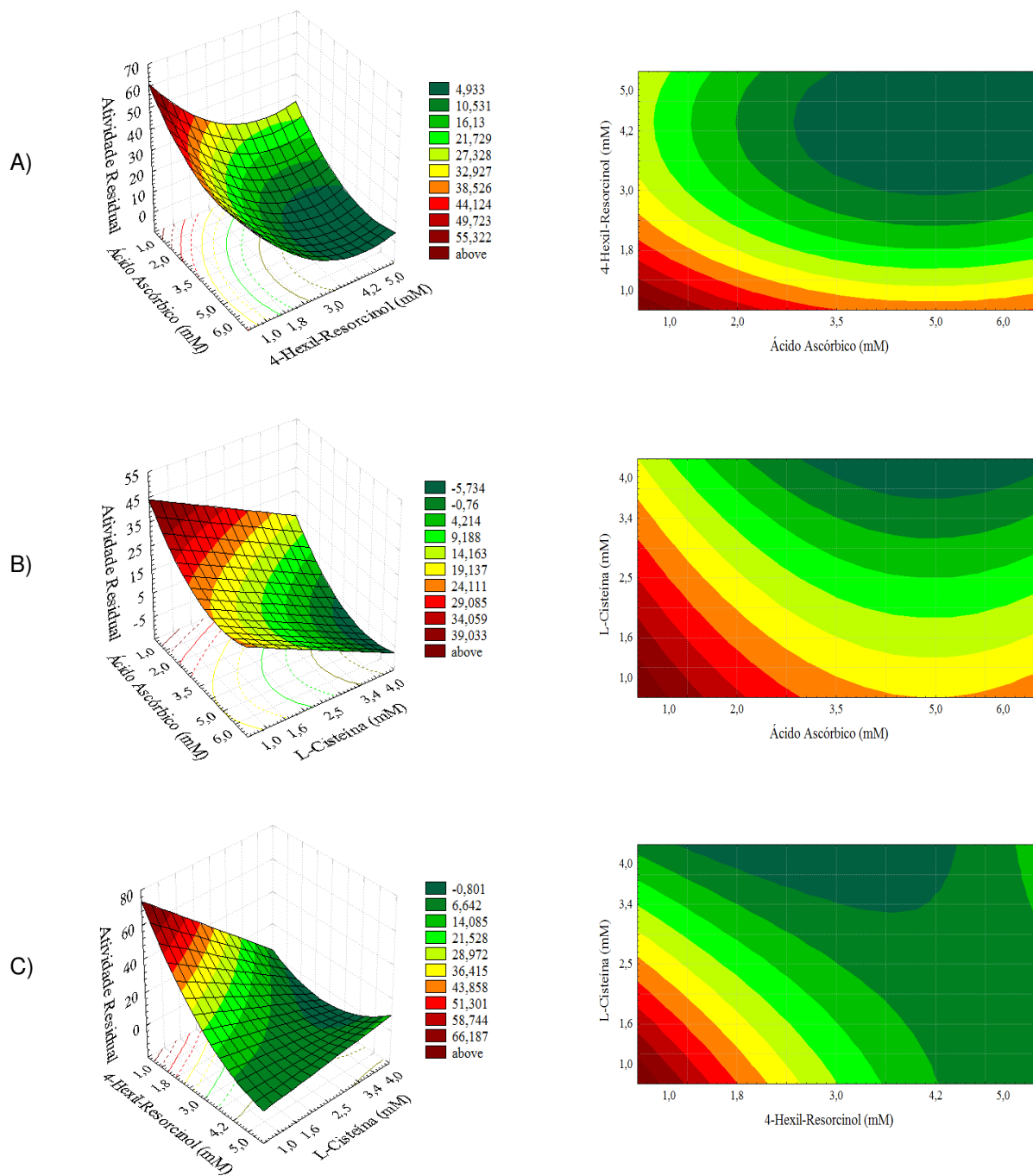


Figura 17: Superfícies de resposta e curvas de contorno dos efeitos de agentes anti-escurecimento na inibição da PFO de ameixa Rubimel: A) em função dos agentes anti-escurecimento ácido ascórbico e 4-hexil-resorcinol, B) em função dos agentes anti-escurecimento ácido ascórbico e L-cisteína, C) em função dos agentes anti-escurecimento 4-hexilresorcinol e L-cisteína.

4.5. Caracterização da PFO bruta da polpa de cacau

4.5.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da PFO da polpa de cacau

A PFO de polpa de cacau apresentou maior atividade a 20°C sendo que a 10°C, a enzima apresentou 90% da atividade relativa. Nas temperaturas de 40°C e 60°C a enzima apresentou cerca de 77% e 8 % da atividade relativa, respectivamente (Figura 18).

A PFO da polpa de cacau apresentou atividade ótima em temperaturas mais baixas que as polifenoloxidasas de açaí (SANTOS, 2001) e repolho (FUJITA et al., 1995), ambas com atividade ótima na faixa de 40-45°C. O mesmo é verificado ao comparar com a temperatura ótima de atividade da PFO de ameixa Rubimel (30-35°C).

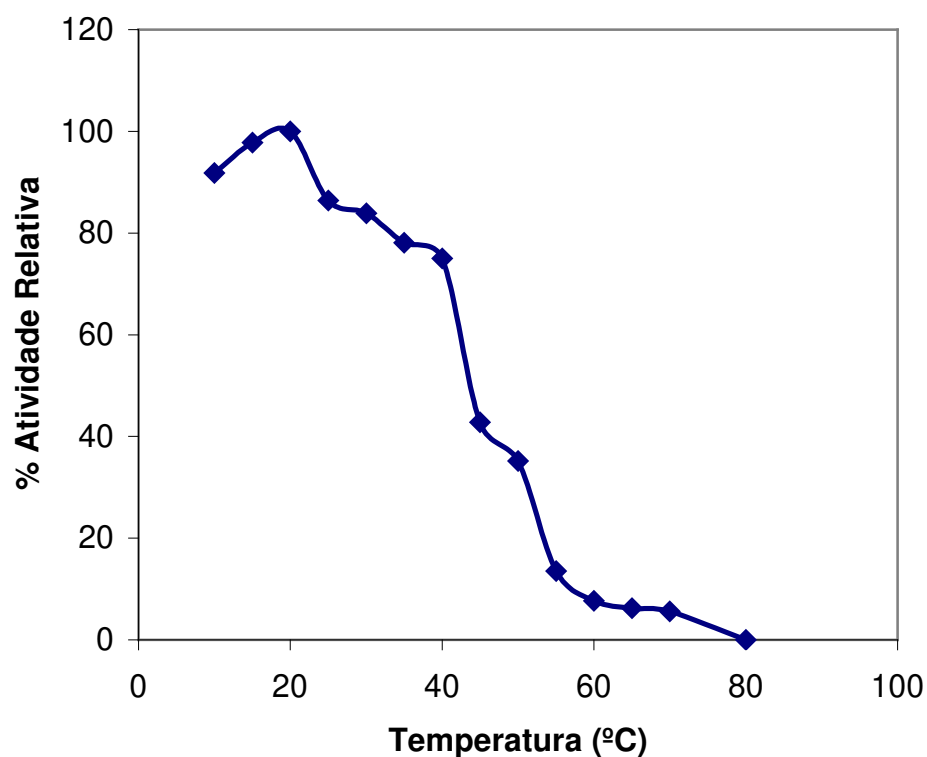


Figura 18: Efeito da temperatura na atividade da PFO da polpa de cacau.

A Figura 19 ilustra que após 10 min de tratamento do extrato enzimático bruto de polpa de cacau a 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, a atividade residual da PFO foi de 82, 69, 32 e 13%, respectivamente. Após 60 minutos de tratamento a 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, a atividade residual da PFO da polpa de cacau foi 61, 54, 13 e 5%, respectivamente. A PFO da polpa de cacau foi completamente inativada após 1 minuto de tratamento a 80°C. A PFO da polpa de cacau mostrou-se mais termossensível do que a PFO de palmito *Acanthophoenix rubra* descrita por ROBERT et al. (1995). A PFO desse palmito apresentou 50% da atividade inicial após 18 minutos de tratamento a 70°C.

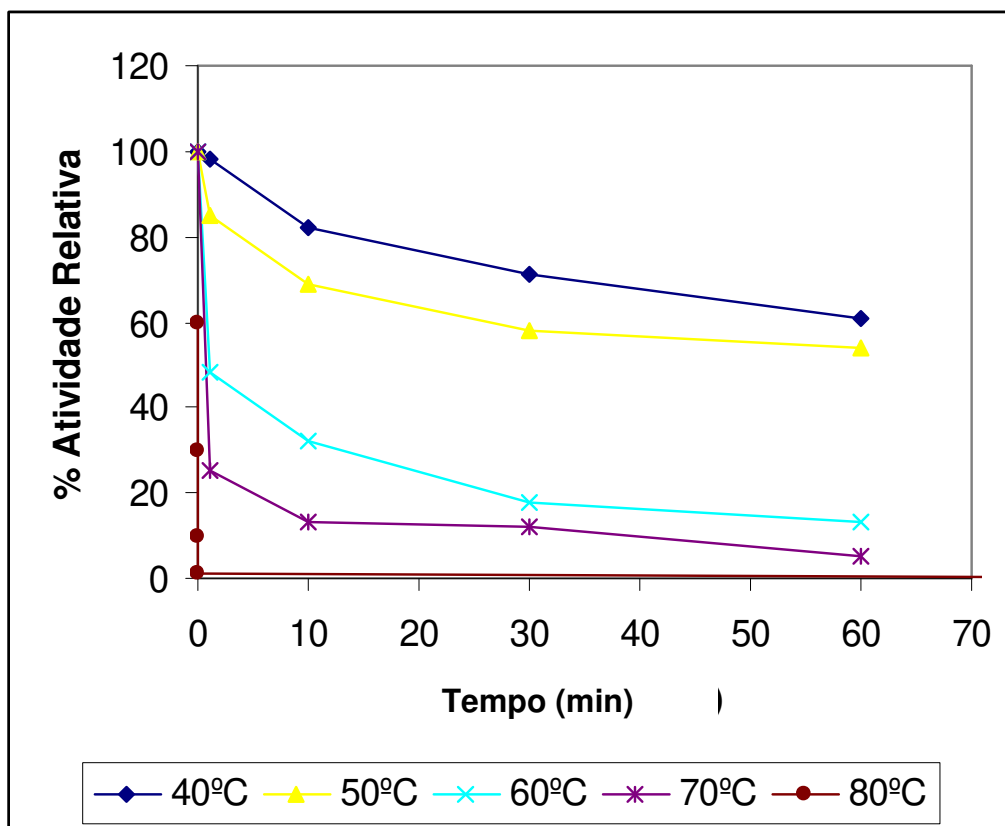


Figura 19: Efeito da temperatura na estabilidade da PFO da polpa de cacau (40°C a 70°C).

4.5.2. Efeito do pH na atividade da PFO da polpa de cacau

A Figura 20 ilustra que a enzima PFO da polpa de cacau apresentou maior atividade em pH 7,0. Este valor está de acordo com a constatação feita pelos autores OKTAY et al. (1995) e ARSLAN et al. (1998), em que as polifenoloxidasas da maioria das plantas apresentam máximo de atividade em pH neutro ou próximo da neutralidade.

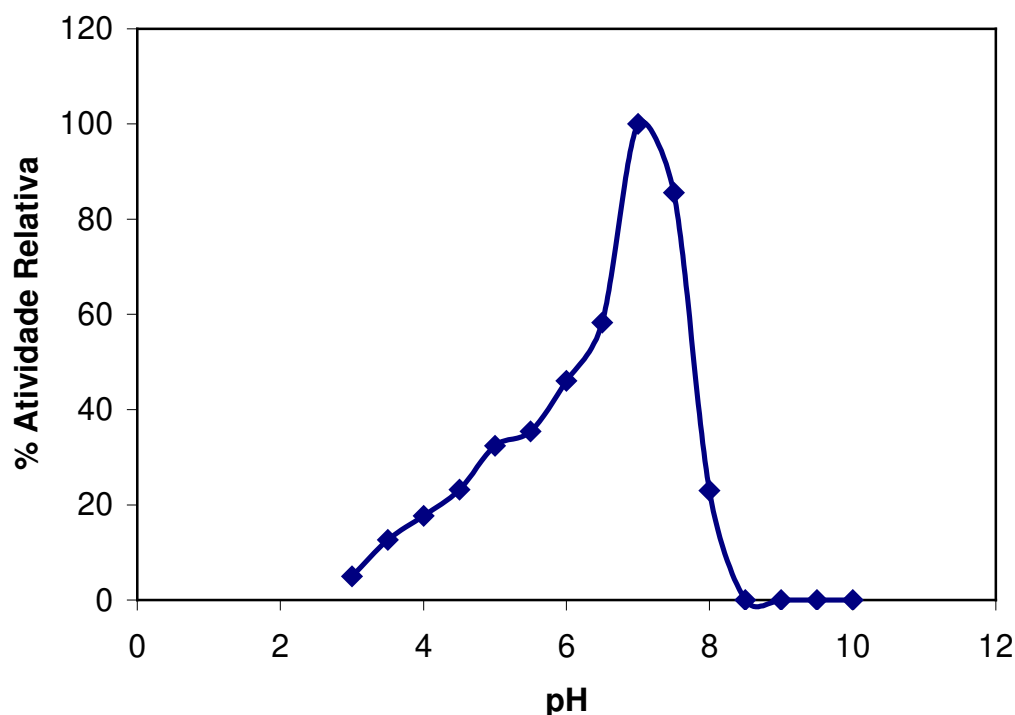


Figura 20: Efeito do pH na atividade da PFO de polpa de cacau.

A PFO da polpa de cacau mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 10, após 4h de incubação a 25°C ou 24h de incubação a 5°C (Figura 21).

LOURENÇO et al. (1990) relataram que a PFO de palmito (*Euterpe edulis*) apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 8,0, após 3 horas a 30°C utilizando ácido clorogênico em pH 5,6. ROBERT et al. (1995) verificaram que a

PFO de palmito (*Acanthophoenix rubra*) mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,0 após 10 minutos a 30°C, usando 4-metilcatecol como substrato.

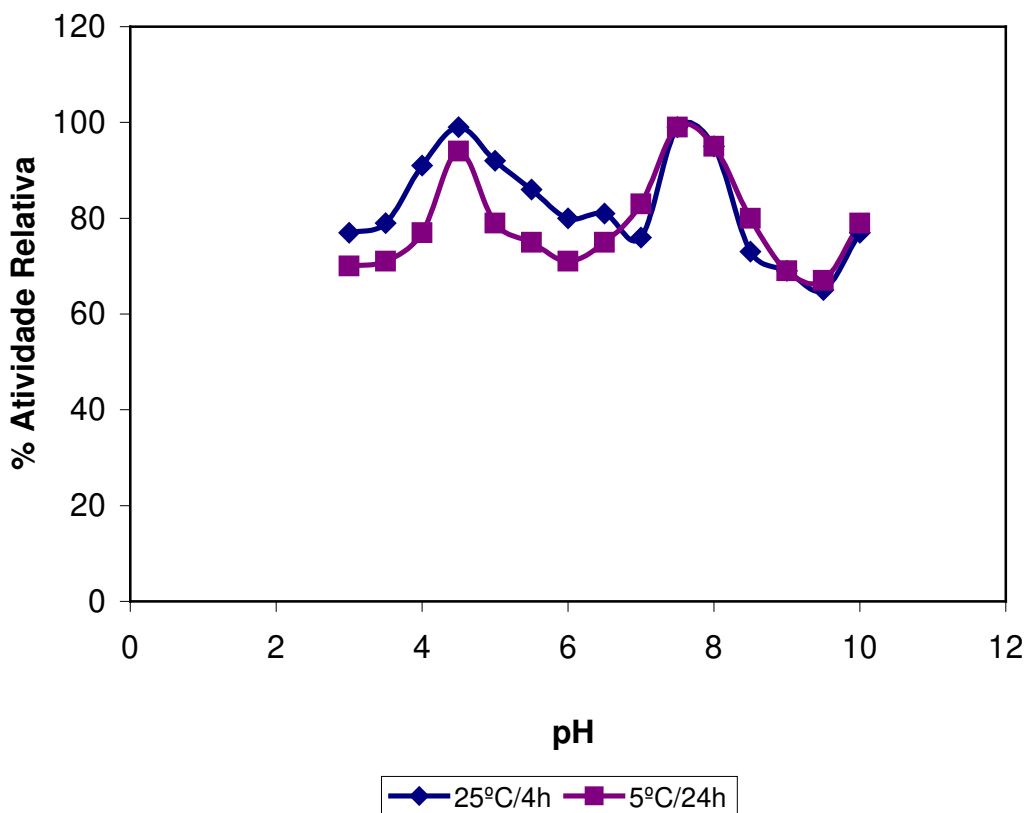


Figura 21: Efeito do pH na estabilidade da PFO da polpa de cacau.

4.6. Caracterização da POD bruta da polpa de cacau

4.6.1. 4.6.1 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da POD da polpa de cacau

A POD da polpa de cacau apresentou atividade ótima à temperatura de 40°C (Figura 22). Peroxidases de frutas podem apresentar atividade ótima em ampla faixa de temperatura, desde valores próximos à temperatura ambiente até temperaturas mais elevadas, entre 50°C e 65°C. As peroxidases de morango (CIVELLO et al., 1995) e açaí (SANTOS, 2001) apresentam atividade ótima a

30°C e 35°C, respectivamente enquanto que as POD de melão (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2000) e abacaxi (BRITO, 2007) mostraram temperatura ótima a 50°C.

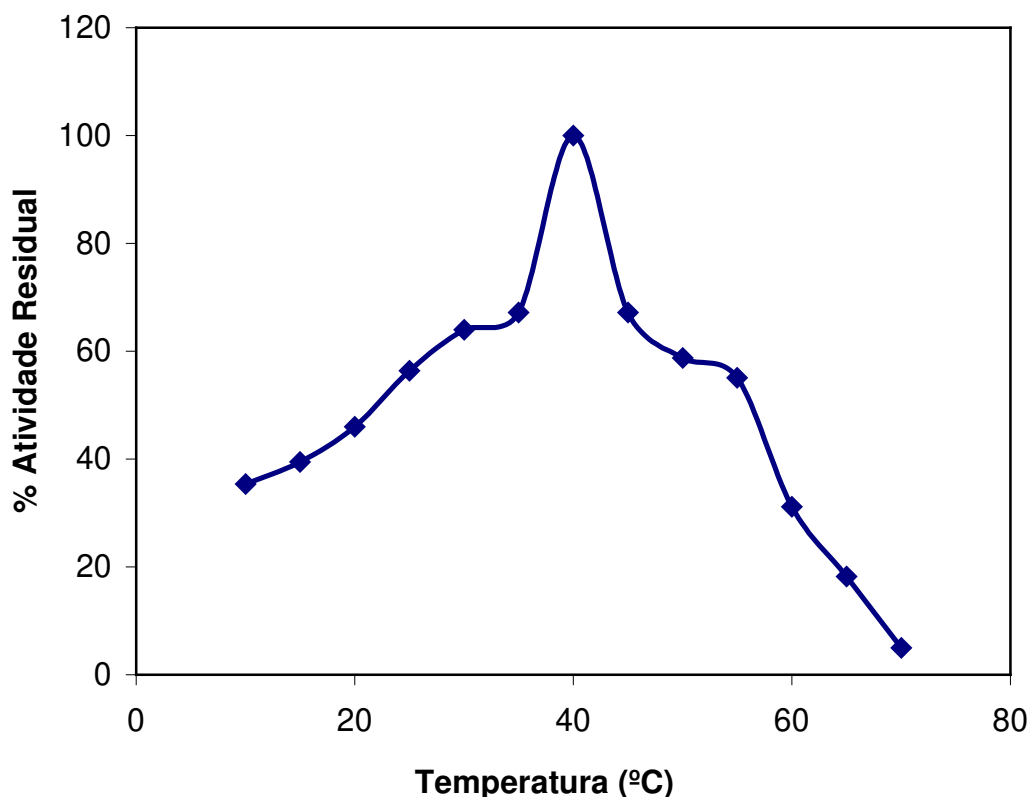


Figura 22: Efeito da temperatura na atividade da POD da polpa de cacau.

4.6.2. Efeito da temperatura na estabilidade da POD da polpa de cacau

A POD da polpa de cacau mostrou-se estável retendo 46% e 3,6% da sua atividade após 60 minutos de tratamento a 70°C e 80°C respectivamente (Figura 23).

NETO et al. (1994), em atendimento a uma solicitação da Associação de Produtores de Cacau da Bahia, realizaram testes de pasteurização da polpa de cacau com o intuito de reduzir a carga microbiana e manter as características

sensoriais após tratamento térmico. Considerando duas realidades econômicas distintas entre produtores de polpa de cacau realizaram estudos com pasteurização rápida (92°C/20s) e pasteurização lenta (72°C/30 minutos). A pasteurização lenta mostrou-se inadequada, pois o aumento lento da temperatura até atingir 72°C, catalisou as reações enzimáticas e/ou químicas que provocaram o escurecimento imediato da polpa de cacau. Após a pasteurização rápida da polpa de cacau comercial os autores obtiveram resultado negativo em análise qualitativa para POD. No presente estudo a POD perdeu 99% de sua atividade após 1 minuto de tratamento em ebulição (Figura 23), apresentando estabilidade térmica comparável à POD parcialmente purificada de açaí que manteve 20% da atividade enzimática após 5 minutos a 90°C, ou 3 minutos em temperatura de ebulição (SANTOS, 2001). O mesmo comportamento pode ser observado para a POD de maçã, que manteve até 80% (isoperoxidasas catiônicas) e 20% (isoperoxidasas aniônicas) de sua atividade inicial quando tratada a 80°C por 10 minutos (VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

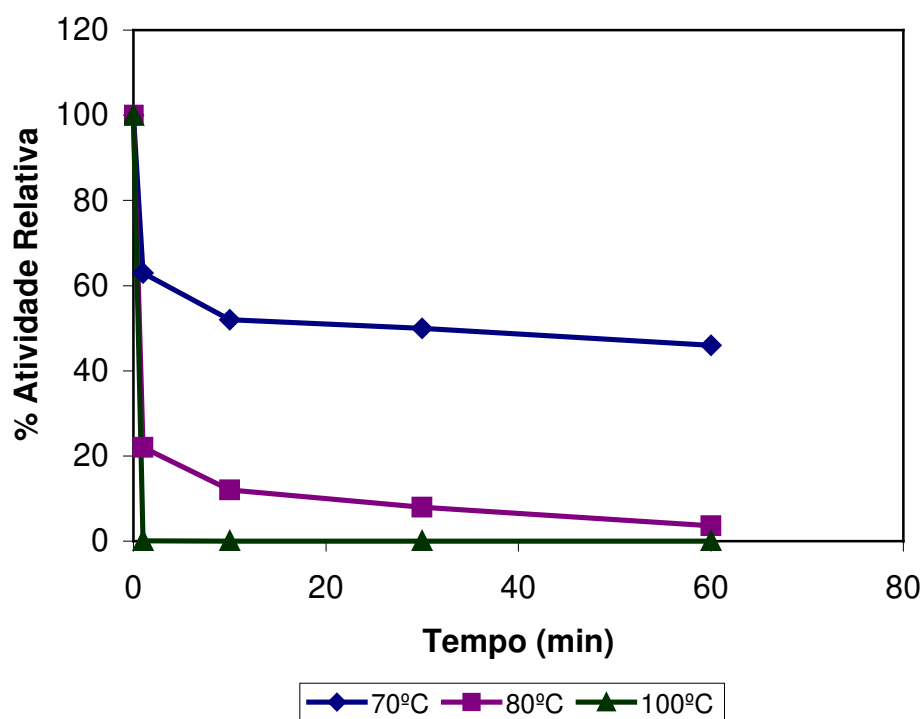


Figura 23: Efeito da temperatura na estabilidade da POD da polpa de cacau.

4.6.3. Efeito do pH na atividade e na estabilidade da POD da polpa de cacau

A Figura 24 ilustra que a POD do extrato bruto da polpa de cacau apresentou maior atividade em pH 5,0. Este resultado está dentro da faixa de valores encontrados para pH ótimo de atividade de diversas peroxidases de frutas citadas na literatura, 4,0 a 7,0 (Tabela 2).

As peroxidases parcialmente purificadas de morango (CIVELLO et al., 1995) e de palmito (ONSA et al., 2004) apresentaram pH ótimo de atividade igual a 6,0. A POD de melão apresentou pH ótimo em 5,5 (RODRIGUEZ-LÓPEZ et al, 2000). As peroxidases de abacaxi (BRITO, 2007), e açaí (SANTOS, 2001), mostraram atividade ótima em pH 4,5 e na faixa de 4,0 a 5,0, respectivamente.

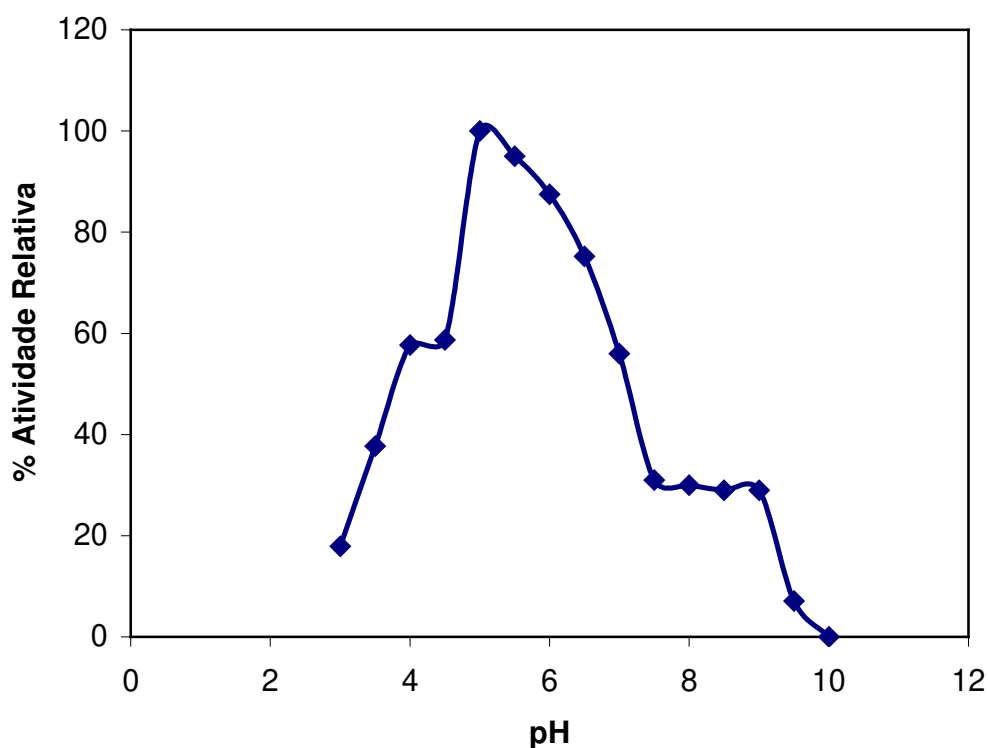


Figura 24: Efeito do pH na atividade da POD da polpa de cacau.

A Figura 25 mostra que a POD da polpa de cacau mostrou-se estável na faixa de pH de 3,0 a 8,0 após incubação durante 4h a 25°C ou 24h a 5°C mantendo mais que 50% da atividade inicial, nas duas condições de tempo e temperatura de armazenamento.

A POD bruta de abacaxi manteve quase que integralmente sua atividade enzimática quando tratada a valores de pH na faixa de 3,0 a 9,0, tanto a 5°C por 24h quanto a temperatura ambiente por 3h (BRITO, 2007).

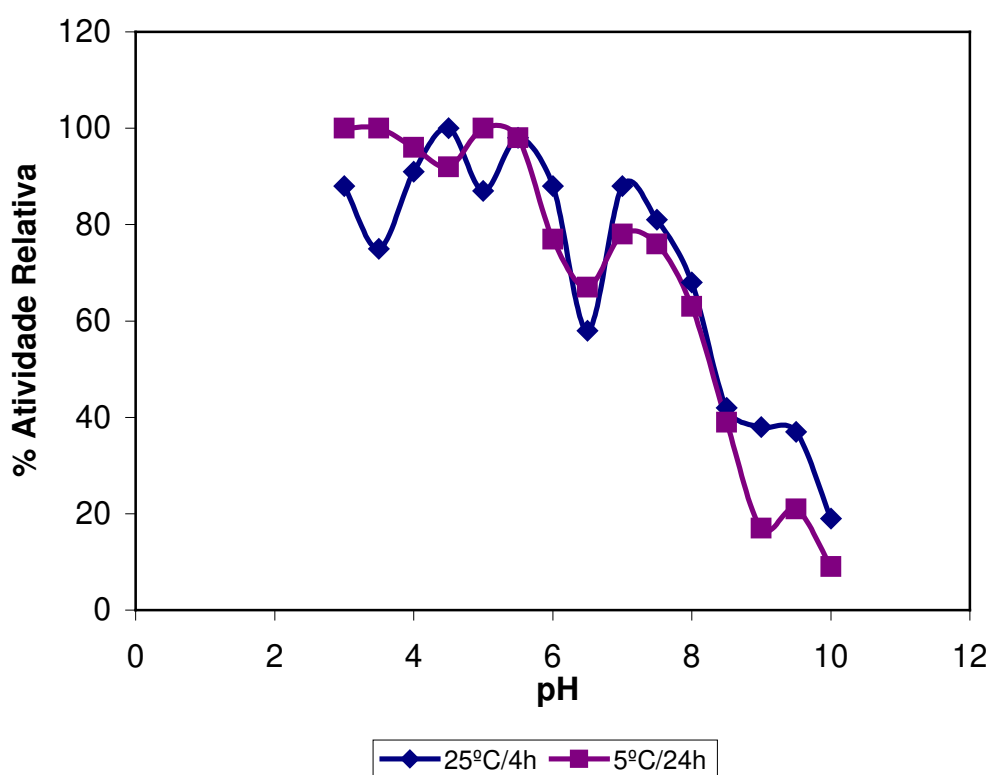


Figura 25: Efeito do pH na estabilidade da POD da polpa de cacau.

4.6.4. *Estudo do efeito individual dos agentes anti-escurecimento e do efeito combinado dos agentes anti-escurecimento e tratamento térmico na atividade enzimática da POD da polpa de cacau*

Considerando que o tratamento térmico empregado à polpa de cacau com a finalidade de destruição de microrganismos patogênicos foi suficiente para a inativação da PFO, foram testados os efeitos de agentes anti-escurecimento na atividade da POD, que se mostrou termo-resistente (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13: Avaliação dos efeitos de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da POD da polpa de cacau

Agentes anti-escurecimento	% de inibição da atividade de POD de polpa de cacau após adição de diferentes concentrações de agente anti-escurecimento e armazenamento por 1h a 5°C						% de inibição da atividade de POD de polpa de cacau após adição de diferentes concentrações de agente anti-escurecimento e armazenamento por 24h a 5°C					
	(concentração em mMol/L)						(concentração em mMol/L)					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Ácido ascórbico	0	35	58	73	88	99	0	30	34	90	92	100
L-cisteína	0	6	16	29	30	48	0	34	45	57	58	62
N-acetil L-cisteína	0	46	50	50	55	63	0	41	46	53	55	59
Glutathione	0	17	34	35	47	54	0	2	26	49	63	66
Ácido kójico	0	2	3	7	8	9	0	1	2	5	50	54
Ácido oxálico	0	7	15	17	23	49	0	0	3	6	41	67
4-Hexilresorcinol	0	0	17	33	38	38	0	8	22	27	39	40

Dentre todos os agentes anti-escurecimento testados, o ácido ascórbico foi o que apresentou melhores resultados na inibição da POD (Tabela 13). Nas concentrações de 3, 4 e 5mMol/L, após a incubação durante 1h a 5°C, a inibição verificada foi de 73, 88 e 99%, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos após a incubação da polpa de cacau por 24h a 5°C, com inibição da POD de 90, 92 e 100%, nas concentrações de 3,4 e 5mMol/L, respectivamente.

Tabela 14: Avaliação dos efeitos combinados do tratamento térmico da polpa de cacau a 70°C/30min e ação de diferentes agentes anti-escurecimento na inibição da atividade da POD da polpa de cacau

Agentes anti-escurecimento	% de inibição da atividade de POD de polpa de cacau após tratamento com diferentes concentrações de agente anti-escurecimento a 70°C por 30 minutos posterior armazenamento por 1h a 5°C						% de inibição da atividade de POD de polpa de cacau após tratamento com diferentes concentrações de agente anti-escurecimento a 70°C por 30 minutos posterior armazenamento por 24h a 5°C					
	(concentração em mMol/L)						(concentração em mMol/L)					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Ácido ascórbico	50	83	96	100	100	100	50	84	96	100	100	100
L-cisteína	50	73	82	83	84	85	50	76	85	94	98	98
N-acetil L-cisteína	50	71	71	71	77	77	50	72	74	74	79	80
Glutathione	50	80	81	71	76	78	50	80	81	91	93	93
Ácido kójico	50	80	83	83	83	84	50	71	73	73	74	75
Ácido oxálico	50	71	76	80	87	88	50	70	80	86	86	88
4-Hexilresorcinol	50	72	72	72	76	79	50	72	72	72	76	78

A Tabela 14 ilustra que a adição de L-cisteína nas concentrações 3 a 5mMol/L e tratamento térmico da polpa de cacau a 70°C durante 30 minutos, com posterior incubação da polpa de cacau por 1h a 5°C ou a 24h a 5°C, resultou em cerca de 90% a 98% de inibição da POD.

A adição de 3mMol/L de ácido ascórbico na polpa de cacau combinado ao tratamento térmico a 70°C durante 30 minutos e posterior incubação por 1h a 5°C ou a 24h a 5°C, resultou na completa inativação da POD. Este resultado é interessante visto que o ácido ascórbico é uma vitamina e seu custo é menor que a adição de L-cisteína.

5. CONCLUSÕES

O extrato enzimático bruto, obtido pela centrifugação da polpa de ameixa Rubimel, apresentou atividade de PFO (448U/g de polpa) e de POD (705 U/g de polpa).

A PFO de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 35°C e em pH 6,5.

A PFO de ameixa Rubimel mostrou-se termossensível perdendo 50% de sua atividade inicial após 10 minutos de tratamento a 40°C, sendo completamente inativada após 10 minutos de tratamento a 70°C ou após 1 minuto de tratamento a 80°C.

A PFO de ameixa Rubimel mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 7,5, mantendo mais que 50% da atividade inicial após 24h de armazenamento a 5°C e a 4h a 25°C.

A redução do pH da polpa para pH 4,0, associada a temperatura de resfriamento (5°C) ou a tratamento térmico a 65°C, leva a redução da atividade da PFO de ameixa Rubimel.

A adição de ácido ascórbico, ácido oxálico, ácido kójico, 4-hexil-resorcinol, L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutathione na concentração final de 5mMol/L e incubação durante 24h a 5°C, resultou em 15%, 52%, 74%, 98%, 87%, 99% e 99% de inibição da PFO de ameixa Rubimel.

A combinação de ácido ascórbico (5mMol/L) + 4-hexil-resorcinol (1,8mMol/L)+ L-cisteína (3,4 mMol/L), possibilitou a inibição de 99% da atividade de PFO de ameixa Rubimel.

A POD de ameixa Rubimel apresentou atividade ótima a 40°C e em pH 4,0.

A POD de ameixa Rubimel mostrou-se termossensível perdendo, respectivamente, 45% e 85% de sua atividade inicial após 60 minutos de tratamento a 30°C e 40°C, sendo completamente inativada após 10 minutos de tratamento a 70°C ou 1 min de tratamento a 80°C.

A POD de ameixa Rubimel permaneceu estável na faixa de pH 2,5 a 5,5, mantendo mais que 60% da atividade inicial, com redução de atividade quando mantidas em valores de pH superiores a 5,5, após 24h de armazenamento a 5°C e a 4h a 25°C.

O extrato bruto solúvel, obtido pela centrifugação da polpa da polpa de cacau, apresentou baixa atividade de PFO (72U/g de polpa de cacau) e maior atividade de POD (668 U/g de polpa de cacau).

A PFO da polpa de cacau apresentou atividade ótima a 20°C e em pH 7,0.

A PFO da polpa de cacau manteve 82% e 13% de sua atividade inicial após 10 minutos de tratamento a 40°C e a 70°C, respectivamente, sendo completamente inativada após tratamento térmico a 80°C por 1 minuto.

A PFO de polpa de cacau mostrou-se estável na faixa de pH de 3,0 a 10,0, após 24h de incubação a 5°C ou a 4h a 25°C, mantendo mais que 60% de sua atividade inicial. Foram observados dois picos de maior estabilidade da PFO em pH 4,5 e pH 7,5, indicando a presença de isoenzimas.

A POD do extrato da polpa de cacau apresentou atividade ótima a 40°C e em pH 5,0.

A POD bruta solúvel da polpa de cacau mostrou estabilidade ao tratamento térmico, mantendo 46% e 3,6% de sua atividade inicial após 60 minutos de

tratamento a 70°C e 80°C, respectivamente, sendo completamente inativada após 1 minuto de tratamento à temperatura de ebulição.

A POD da polpa de cacau permaneceu estável na faixa de pH 3,0 a 8,0, mantendo mais de 60% da atividade inicial, após 24h de incubação a 5°C ou a 4h a 25°C.

O tratamento do extrato bruto da polpa de cacau com ácido ascórbico nas concentrações de 3 a 5 mMol/L, proporcionou uma maior inibição da atividade de POD entre os agentes anti-escurecimento testados, sendo obtida inibição de 73% e 100% da POD, após armazenamento por 1h a 5°C e 24h a 5°C, respectivamente.

O tratamento térmico do extrato bruto da polpa de cacau contendo 3mMol/L de ácido ascórbico durante 30 minutos a 70°C e posterior armazenamento durante 24 h a 5°C resultou em completa inativação da POD.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, J.B., Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation, **Food Chemistry**, v. 60, n.2, p. 201-206, 1997.
2. AHVENAINEN, R., New approaches in improving the shelf-life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 179-187, Jun. 1996.
3. ARSLAN, O.; TEMUR, A.; TOZLU, I., Polyphenol oxidase from malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1239-1241, 1998.
4. BARBOSA, W.; POMMER, C.V.; RIBEIRO, M.D.; VEIGA, R.F.A.; COSTA, A.A., Diversidade de espécies e cultivares de frutíferas de clima temperado no Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE (SIRGEALC), 3., Londrina, 2001. *Resumos Expandidos*. Londrina: 2001. p. 216-218.
5. BONVEHI, J.S.; COLL, F.V., Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. **European Food Research Technology**, v.210, p.189-195, 2000.
6. BRITO, C.A.K.; SATO, H.H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W.J., Abacaxi IAC Gomo-de-mel (*Ananas comosus* (L.) Merrill): características da polpa e da peroxidase do suco. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.25 n.2, p.257-266, 2007.
7. BURNETTE, F.S., Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1-5, 1977.

8. BUTA, J.G.; MOLINE, H.E.; SPAULDING, D.W.; WANG, C.Y., Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 1 -6, 1999.
9. BUTA, J.G.; ABBOTT, J.A., Browning inhibition of fresh-cut 'Anjou', 'Bartlett', and 'Bosc' pears. **HortScience**, v. 35, n.11, p. 111-113, 2000.
10. CANTILLANO, R.F.F., Fisiologia e manejo de pós-colheita de ameixa. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1987. 10p. (Comunicado Técnico, 54).
11. CHAMARRO, J.; MOLINA, I., Oxidation of indoleacetic acid by an apparently homogeneous peroxidases from the flavedo of Washington navel oranges (*Citrus sinensis*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 361-375, 1989.
12. CHEN, J.S.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R., Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1897–1901, 1991.
13. CIVELLO, P.M.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C., Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 10, p. 2596-2601, 1995.
14. CLEMENTE, E.; PASTORE, G.M. Peroxidase and polyphenol oxidase: the importance for food technology. **Boletim SBCTA**, v. 32, n.2, p. 167-171, 1998.
15. CONCELLÓN, A.; AÑÓN, M.C.; CHAVES, A.R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. **Food Chemistry**, v. 88, p. 17-24, 2004.
16. DAWLEY, R.M.; FLURKEY, W.H. 4-Hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. **Journal Food Science**, v. 58, p. 609–610, 1993.

17. DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S., Characterization of polyphenoloxidase from Medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosacea). **Food Chemistry**, v. 77, p. 1-7, 2002.
18. DONG, X.; WROLSTAD, R.E.; SUGAR, D., Extending shelf life of fresh-cut pears. **Journal Food Science**, v. 65, n. 1, p. 181-186, 2000.
19. DUXBORY, D.D., Stabilizer blend stands shelf life of fresh fruit, vegetable. Effective sulfite alternative without bleaching. **Food Processing**, v. 49, p. 98-100, 1988.
20. EKSTEEN, G.J., Internal breakdown of plums. The Deciduous Fruit Grower. Stellenbosch. v. 32, n. 9, p. 359-361, 1982.
21. ESCRIBANO, J.; CABANES, J., CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F., Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4209-4214, 1997.
22. FLURKEY, W.H.; JEN, J.J., Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. **Journal of Food Science**, v.43, n.6, p. 1826-1831, 1978.
23. FORSYTH, J.L., OWUSU APENTEN, R.K., ROBINSON, D.S., The thermo stability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. gemmifera. **Food Chemistry**, v. 65, p. 99-109, 1999.
24. FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T., Partial purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 1138-1142, 1995.
25. GACCHE, R.N.; ZORE, G.B.; GHOLE, V.S., Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by β -cyclodextrin and L-

- ascorbate-2-triphosphate. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, n.1, p. 1–5, 2003.
26. GACCHE, R.N.; WARANGKAR, S.C.; GHOLE, V.S., Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of polyphenol oxidase in apple juice. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 175–179, 2004.
 27. GANTHAVORN, C.; NAGEL, C.W.; POWERS, J.R., Thermal inactivation of asparagus lipoxigenase and peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 47-49, 1991.
 28. GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; WANG, C. Y.; BUTA, J. G., Maintaining quality of fresh-cut mangoes using antibrowning agents and modified atmosphere packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4204–4208, 2001.
 29. GONZALEZ-AGUILAR, G.A.; TIZNADO-HERNANDEZ, M.E.; ZAVALA-GATICA, R.; MARTINEZ-TELLEZ, M.A., Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 694–701, 2004.
 30. GORNY, J.R.; GIL, M.I. KADER, A.A., Postharvest physiology and quality maintenance of fresh-cut pears. **Acta Hort**, v. 464, p.231-236.
 31. GUNES, G.; LEE, C.Y., Colour of minimally processed potatoes as affected by modified atmosphere packaging and antibrowning agents. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 572-575, 1997.
 32. HAARD, N.F.; TOBIN, L., Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 854-857, 1971.

33. HANSEN, C.E.; del OLMO, M.; BURRI, C., Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal Science Food Agriculture**, v.77, p.273-281, 1998.
34. HOLSCHUH H.J., Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.) Campinas, 2000, 159 p. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
35. IYIDOGAN, N.F; BAYINDIRLI, A., Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexilresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. **Journal Food Eng**, v. 62, p. 299–304, 2004.
36. JANOVITZ-KLAPP, A. H.; RICHARD, F.C., GOUPY, P.M.; NICOLAS, J.J. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 926–931, 1990.
37. JOÃO, P.L.; da ROSA, J.I.; FERRI, V.C.; MARTINELLO, M.D., Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: EMATER-RS: ASCAR, 2002, 80P (EMATER –RS. Realidade Rural, 28).
38. KAHN, V., Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenoloxidase of mushroom, avocado and banana. **Journal of Food Science**, v. 50, p.111-115, 1985.
39. KASPERA, R.; McCUE, P.; SHETTY, K., Partial purification of a basic guaiacol peroxidase from fava bean (*Vicia faba* L.): characterization of enzyme stability following elicitor treatment. **Food Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 99-111, 2001.
40. KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S., Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, p. 407-410, 1994.

41. KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S., The thermo stability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 47, p. 53-59, 1993.
42. KIM, B., & KLIEBER, A., Quality maintenance of minimally processed Chinese cabbage with low temperature and citric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 31–36, 1997.
43. KWAK, S.; KIM, S.; PARK, I.; LIU, J., Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, v. 43, p. 565-568, 1996.
44. LAMIKANRA, O.; WATSON, M.A., Cantaloupe melon peroxidase: characterization and effects of food additives on activity. **Nahrung**, v. 44, 3, p. 168-172, 2000.
45. LANGDON, T. T., Preventing browning in freshly prepared potatoes without the use of sulfating agents. **Food Technology**, v. 41, p. 64–67, 1987.
46. LEE, C.H.; PENNESI, A.P.; DICKSON, M.H., Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 32, p. 16-21, 1984.
47. LIMA, E.D.P.A., Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família Anonácea-Pinha (*Annona squamosa* L.) Campinas, 131 p. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
48. LIN, W.Z.; NAVARATNAM, S.; YAO, S.D.; LIN, N.Y., Antioxidative properties of hydroxycinnamic acid derivatives and a phenylpropanoid glycoside. A pulse radiolysis study. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 53, p. 425–430, 1998.

49. LOPEZ-SERRANO, M.; BARCELO, A.R., Purification and characterization of a basic peroxidase isozyme from strawberry. **Food Chemistry**, v. 55, n. 2. p. 133–137, 1996.
50. LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S., Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). Instituto Plantarum, 2006.
51. LOURENÇO, E.J.; LEÃO, J.S.; NEVES, V.A., Heat inactivation and kinetics of polyphenoloxidase from palmito (*Euterpe edulis*). **Journal of Science and Food Agriculture**, v.52, n.2, p.249-259, 1990.
52. LOURENÇO, E.J.; NEVES, V.A., Peroxidase solúvel de pessego: purificação parcial e propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1, p.42-48, 1997.
53. LU, A.T.; WHITAKER, J.R., Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v.39, p.1173-1178, 1974.
54. MARANGONI, A. G.; SMITH, A. K.; YADA, R. Y.; STANLEY, D. W., Ultrastructural changes associated with chilling injury in mature-green tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.114, n.6, p.958-962, 1989.
55. MARTINEZ, M.V.; WHITAKER, J.R., The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.195-200, 1995.
56. MARTINÉZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit, **Phytochemistry**, v.58, p.379-387, 2001.
57. MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in plants, **Phytochemistry**, v.18, p.193-215, 1979.

58. MAYER, A.M. Polyphenol oxidase and peroxidase in plants - recent progress, **Phytochemistry**, v.26, p.11-20, 1987.
59. MAYER, A.M.; HAREL, E. **Food Enzymology**, (Fox, P.F. ed.), p.373-399, Elsevier, 1991.
60. MCCORD, J.; KILARA, A., Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of Food Science**, v.48, n.5, p.1479-1483, 1983.
61. McEVILY, A.J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W.S., Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Rev Food Science and Nutrition**, v.32, n.3, p.253-73, 1992.
62. MERCÊS PENHA, E.D.; DA MATA, V.M., Physical, chemical and microbial characteristics of cocoa pulp. **Pesquisa Agropecuária**, v.33, n.11, p.1945-1949, 1998.
63. MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, M., Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1648-1651, 1990.
64. MONSALVE-GONZALEZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; CAVALIERI, R.P.; MCEVILY, A.J.; IYENGAR, R., Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexylresorcinol as antibrowning agent. **Journal of Food Science**, v.58, n.4, p.797, 1993.
65. MONSALVE-GONZALEZ A, BARBOSA-CANOVAS GV, MCEVILY AJ, IYENGAR R., Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol. **Food Technology**, v.49, p.110-118, 1995.

66. MORORÓ, R.C., Desenvolvimento e caracterização da agroindústria de polpa de cacau e de outras frutas da região sudeste da Bahia, Tese de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Ceará, 1999.

67. NASCIMENTO, L.M.; YOTSUYANAGI, K.; COUTINHO, J.R., Efeito do cloreto de cálcio bihidratado no armazenamento refrigerado de ameixas (*Prunus* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.15, n.1, p.1-8, 1993.
68. NETO, F.L.A.; XAVIER, J.A.M.; GOIS, M.F.S.; SANTOS, M.L.F.; AMORIM, P.J.S., Aproveitamento tecnológico do cacau – **Secretaria da Indústria e Comércio da Bahia – SIC/DI/Agrorindústria**, 1994.

69. NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S.Y., Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.2, p.104–157, 1994.

70. NOCTOR, G.; FOYER C.H., Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.249–279, 1998.

71. OHYA, T.; MORIMURA, Y.; SAJI, H.; MIHARA, T.; IKAWA, T., Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish, **Plant Science**, v. 25, p.137-145, 1997.

72. OKTAY, M.; KÜFREVIDGLU, I.; KOCACALISKAN, L.; SAKIROGLU, H., Polyphenoloxidase from amaya apple. **Journal of Food Science, Chicago**, v.60, n.3, p.494-496, 1995.

73. OMS-OLIU, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; MARTIN-BELLOSO, O., Inhibition of browning of fresh-cut pear wedges by natural compounds, **Journal of Food Science**, v. 71, n.3, p.216-224, 2006.

74. ONSA, G. H., SAARI, N., SELAMAT, J., & BAKAR, J., Purification and characterization of membrane bound peroxidases from Metroxylon sagu. **Food Chemistry**, v.85, p.365–376, 2004.
75. OZOGLU, H.; BAYINDIRLI, A., Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v.13, p.213–221, 2002.
76. PARK, Y.K.; SATO, H.H.; ALMEIDA, T.D.; MORETTI, R.H., Polyphenol oxidase of mango (*Mangifera indica* var. Haden). **Journal of Food Science**, v.45, p.1619-1621, 1980.
77. PARK, E. Y.; LUH, B. S., Polyphenol oxidase of kiwifruit. **Journal of Food Science**, v.50, p.678-683, 1985.
78. PIZZOCARO, F.; RICCI, R.; ZANETTI, L., New aspects of bleaching of vegetables before freezing. Peroxidase and lipoxygenase activity. **Ind. Aliment.**, v.27, p.993-998, 1988.
79. PLAZA, L.; MUÑOZ, M.; ANCOS, B.; CANO, P., Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree. **European Food Research Technology**, v.216, p.514-519, 2003.
80. RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, v.4, p.304-309, 1997.
81. RICHARD, F. C.; GOUPY, M. P.; NICOLAS, J. J.; LACOMBE, J. M.; PAVIA, A., Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.841–847, 1991.

82. RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; NICOLAS, J. J., Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning 2. Kinetic studies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.40, n.1, p. 2108-2113, 1992.
83. RICHARDSON, T.; HYSLOP, D.B., Enzymes. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**, 2ed., 1985, New York, Marcel Dekker, INC.
84. ROBERT, C.M.; CADET, F.R.; ROUCH, C.C.; PABION, M.; RICHARD-FORGET, F., Kinetic study of the irreversible thermal deactivation of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenoloxidase and effect of pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1143-1150, 1995.
85. RODRIGO, C.; RODRIGO, M.; ALVARRUIZ, A.; FRÍCGOLA, A., Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidases. **Journal of Food Protection**, v.59, n.10, p.1065-1071, 1996.
86. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N.; ESPÍN, J.C.; AMOR, F.; TUDELA, J.; MARTÍNEZ, V.; CERDÁ, A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F., Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.1537-1541, 2000.
87. SAKHAROV, I.Y.; ARDILA, G.B., Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. **Food Chemistry**, v.65, p.51-54, 1999.
88. SANTOS, H.R. Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*), Campinas, 109 p. **Tese (Mestre em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

89. SAPERS, G.M.; MILLER, R.L. Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphate. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1132-1135, 1992.
90. SCHNEIDER, E. A cura e a saúde pelos alimentos. Casa Publicadora Brasileira, 1984.
91. SELAMAT, J.; BAKAR, J.; NAZAMID, S., Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.559-566, 2002.
92. SERRADELL, M.A.; ROZENFELD, P.A.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; AÑON, M.C., Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 80, p. 1421-1427, 2000.
93. SIDDQ, M.; ARNOLD, J..F.; SINHA, N.K.; CASH, J.N., Effect of polyphenoloxidase and its inhibitors on anthocyanin changes in plum juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.18, p.75-84, 1994.
94. SON, S.M.; MOON, K.D.; LEE, C.Y., Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, v. 73, p 23-30, 2001.
95. TODA FRUTA, Ameixa Rubimel. Disponível em: www.todafruta.com.br/todafruta, acesso em 09/07.
96. VALDERRAMA, P.; CLEMENTE, E., Isolation and thermo stability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. **Food Chemistry**, v. 87, p. 601-606, 2004.

97. VAMOS-VIGYAZO L., Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetable. C.R.C. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15: p. 49-127, 1981.
98. VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOIGT, G.; BIEHL, B., Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chemistry**, v.50, p.177-184, 1994.
99. WALKER, J.R.L., Enzymatic browning in food. Its chemistry and control. **Food Technology**, v.31, p. 19-25, 1977.
100. WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, v. 33, p. 449-459, 2000.
101. ZIEGLEDER, G., BIEHL, B. Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In H. Linskens & J. F. Jackson (Eds.), *Methods in Plant Analysis* v. 8, new series, p. 321-393). Berlin:Springer-Verlag.,1988
102. ZHOU, Y.; DAHLER, J.M.; UNDERHILL, S.J.R.; WILLS, R.B.H., Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. **Food Chemistry**, v.80, p.565-572, 2003.