UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA POLIFENOLOXIDASE E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES EM PÊSSEGO (*cv*. BIUTI)

ANA SILVIA FIDELIS BELLUZZO
Engenheira de Alimentos

Profª. Dª. GABRIELA ALVES MACEDO
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Belluzzo, Ana Silvia Fidelis
B417c Caracterização parcial da polifenoloxidase e avaliação de compostos fenólicos e antioxidantes em pêssego (*cv*. Biuti) / Ana Silvia Fidelis Belluzzo. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Pessêgo. 2. Polifenol oxidase. 3. Peroxidase. 4. Fenólicos. 5. Antioxidantes. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Parcial characterization of polyphenoloxidase and antioxidants and phenolic compounds evaluation in peach (*cv*. Biuti)
Palavras-chave em inglês (Keywords): Peach, Polyphenoloxidase, Peroxidase, Phenols, Antioxidants
Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos
Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo
Hilary Castle de Menezes
Luciana Francisco Fleuri
Marcelo Prado
Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dª. Gabriela Alves Macedo
(orientadora)

Profª. Dª. Hilary Castle de Menezes
FEA/UNICAMP

Profª. Dª. Luciana Francisco Fleuri
UNIMEP

Prof. Dr. Marcelo Prado
FEA/UNICAMP

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos e na prudência egoísta que nada arrisca.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelas oportunidades;

À professora Gabriela Alves Macedo, não só pela orientação, mas pela amizade e compreensão;

Aos meus pais, Jacira e Antonio Luís, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida;

Ao meu esposo Robson, meu grande amor e companheiro, pelo incentivo, e principalmente por não ter me deixado desistir;

Aos meus filhos João Victor e João Pedro, presentes de Deus, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência;

A minha irmã Ana Lúcia e meu cunhado Kiko, pelo apoio e estadia durante todo tempo;

Ao meu sobrinho Murilo, por ter tornado minhas viagens à Campinas mais agradáveis;

Ao CEDUC, por ter permitido a utilização do laboratório para a execução de parte deste trabalho;

Às amigas, Nara e Rose, pela companhia durante as tardes e noites no laboratório de Meio Ambiente;

Às técnicas do Laboratório de Bioquímica, Bia e Priscila, pelo auxílio na realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica;

À amiga Gaby, pelas palavras de incentivo e motivação em todos os momentos;

Ao amigo Anderson, que nas horas difíceis sempre me fazia acreditar que tudo daria certo;

Aos amigos da ETFG, pelo apoio, incentivo e principalmente pela amizade;

À Banca Examinadora pelas correções e sugestões;

A todos que passaram pelo meu caminho, que acreditaram em mim e que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

O pêssego é uma das frutas que vêm ganhando destaque na produção nacional. Dentre as principais variedades produzidas, a biuti é uma das mais cultivadas, sendo utilizada tanto para o consumo *in natura* quanto para a indústria. A indústria de processamento de pêssego encontra muita dificuldade na manutenção da qualidade de seus produtos devido às alterações orgnolépticas que ocorrem durante sua vida de prateleira. A principal causa dessas alterações são as enzimas peroxidase (PDO) e polifenoloxidase (PPO), as quais catalisam reações de escurecimento enzimático, causando também mudanças indesejáveis no sabor e textura dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi investigar as características bioquímicas da PPO de pêssego biuti, propor um tratamento térmico eficiente para a inativação da PPO e quantificar os compostos fenólicos e antioxidantes do pêssego congelado, pêssego em calda e polpa de pêssego. A PPO apresentou atividade ótima a 20°C em pH 5,5. A enzima se mostr ou estável após 30 minutos de tratamento térmico na faixa de 15 a 40°C. Na fa ixa de pH 7,0 a 8,0 a atividade ainda se manteve a níveis de 70 a 90% de atividade. A ação dos inibidores mostrou que os mais eficientes foram: ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, β-mercaptoetanol e L-cisteína, inibindo aproximadamente 100% da enzima nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM. No estudo da inativação enzimática, ácido ascórbico, β-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e L-cisteína inativaram cerca de 100% da enzima nas concentrações de 0,001 e 0,005 M, quando incubados a 50°C. O método de planejamento experimental avaliou os efeitos das variáveis pH, temperatura e concentração de inibidor na atividade da PPO. Os resultados mostraram que a enzima é totalmente inativada nas condições de processo aplicadas na indústria de alimentos, o que pode indicar uma falha no tratamento térmico da indústria ou uma provável regeneração da PPO do pêssego biuti, já que as indústrias têm problemas com esta enzima durante a estocagem dos produtos. Para se obter a resposta, novos estudos devem ser realizados. Na determinação de fenóis totais, a fração que apresentou maior concentração desses compostos foi a polpa de pêssego, apresentando em média, 0,210 mg de ácido gálico / mL, assim como, maior índice de antioxidação, 2,10.

ABSTRACT

The production of peach in the national market has been increasing lately. Among all the varieties produced, biuti has one of the greatest production, and can be used both for in the food industry and for *in natura* consume. There is a great difficulty in keeping the quality of the products processed in the peach industry due to the organoleptic changes that happen during shelf life. The main reason for these changes is the peroxidase (PDO) and polyphenoloxidase (PPO), which are catalysts of enzymatic browning reactions, causing undesirable changes in food flavor and texture. The objectives of this work is study the biochemical characteristics of PPO in biuti peach, propose an efficient heat treatment for PPO inactivation and quantify the antioxidant and phenolic compounds in freezed peach, canned peach and peach pulp. PPO presented high activity at 20℃ and pH 5.5. The enzyme is stable after 30 minutes of heat treatment between 15 and 40℃. From pH 7.0 to 8.0 the activity was kept betw een 70 and 90%. The most efficent inhibitors were: ascorbic acid, sodium metabisulfite, β-mercaptoethanol and L-cisteine, inhibiting almost 100% of the enzyme for 5.0 and 10,0 mM. The enzymatic inactivation study showed that ascorbic acid, sodium metabisulfite, β-mercaptoethanol and L-cisteine inactivate nearly 100% of the enzyme when used in concentrations of 0.001 and 0.005 M at 50℃. The effect of pH, temperature and inhibitor concentration on PPO activity was evaluated using experimental design. The results showed that the enzyme is completely inactivated in the process conditions used in the food industry, which can suggest some failure in the heat treatment or a possible regeneration of PPO in biuti peach, since industries have problems with this enzyme during the shelf life of these products. In order to obtain this answer, new studies must be conducted. The peach pulp was the fraction that presented the highest total phenol content , 0.210 mg of galic acid/mL, and the highest antioxidant status, 2.10.

ÍNDICE GERAL

1 – INTRODUÇÃO……..1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……..3
2.1 – A CULTURA DO PÊSSEGO BIUTI…… 3
2.1.1 – Características gerais…….3
2.1.2 – Aspectos comerciais……5
2.2 – BIOQUÍMICA DO PÊSSEGO……..……8
2.3 – PEROXIDASE……...10
2.3.1 – Características gerais……10
2.3.2 – Inativação e regeneração da peroxidase……..13
2.3.3 – Inibidores da atividade da peroxidase……..14
2.4 – POLIFENOLOXIDASE……18
2.4.1 – Características gerais……18
2.4.2 – Inibidores da polifenoloxidase……20
2.4.3 – Aplicações da polifenoloxidase……..23
2.5 – COMPOSTOS FENÓLICOS E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES…….26
3 – MATERIAIS E MÉTODOS……33
3.1 – MATERIAIS ……33
3.1.1 – Equipamentos……..33
3.1.2 – Reagentes……33
3.2 – MÉTODOS……...33
3.2.1 – Coleta de amostras……33
3.2.2 – Preparo das amostras……..34
3.2.3 – Estudos preliminares……34
3.2.3.1 – Efeito do pH do tampão de extração na atividade de PPO e PDO do extrato de pêssego……..34
3.2.3.2 – Precipitação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase...35
3.2.3.3 – Determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)……36
3.2.3.4 – Determinação da atividade de peroxidase (PDO)……..36
3.2.4 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA POLIFENOLOXIDASE DE PÊSSEGO……37

3.2.4.1 – Efeito da temperatura na atividade de PPO do pêssego…..37
3.2.4.2 – Efeito do pH na atividade de PPO de pêssego…….....37
3.2.4.3 – Efeito da temperatura na estabilidade de PPO de pés-sego…….38
3.2.4.4 – Efeito do pH na estabilidade de PPO de pêssego……..38
3.2.4.5 – Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO de pêssego……..39
3.2.5 – ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA ENZIMA PPO…….....39
3.2.5.1 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas……..39
3.2.5.2 – Efeito de compostos químicos e tratamento térmico na inativação da enzima PPO……..40
3.2.5.3 – Determinação do efeito das variáveis: pH, temperatura e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.....42
3.2.5.4 – Determinação do efeito das variáveis: pH e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.....44
3.2.6 – COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....45
3.2.6.1 – Extração dos compostos fenólicos e antioxidantes.....46
3.2.6.2 – Determinação de compostos fenólicos totais.....47
3.2.6.3 – Determinação da atividade antioxidante.....47
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....49
4.1 – EFEITO DO PH DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO NA ATIVIDADE DE PPO E PDO DO EXTRATO DE PÊSSEGO.....49
4.2 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DA POLIFENO-LOXIDASE E PEROXIDASE.....50
4.3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA POLIFENO-LOXIDASE DE PÊSSEGO.....51

4.3.1 – Efeito da temperatura na atividade de PPO de pêssego.....51
4.3.2 – Efeito da temperatura na estabilidade da PPO de pêssego..... 52
4.3.3 – Efeito do pH na atividade de PPO de pêssego.....54
4.3.4 – Efeito do pH na estabilidade de PPO de pêssego.....55
4.3.5 – Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO de pêssego.....56
4.4 – ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA ENZIMA PPO.....58
4.4.1 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas.....58
4.4.2 – Efeito de compostos químicos e tratamento térmico na inativação da enzima PPO.....60
4.4.3 - Determinação do efeito das variáveis: pH, temperatura e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.....62
4.5 – COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....67
4.5.1 – Determinação de compostos fenólicos totais.....67
4.5.2 – Determinação da atividade antioxidante.....71
5 – CONCLUSÕES.....74
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Frutos do pessegueiro (*Prunus pérsica* (L) Batsch).....3
FIGURA 2 – Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.....27
FIGURA 3 – Estrutura genérica da molécula de um flavonóide.....28
FIGURA 4 – Estrutura genérica das principais classes de flavonóides.....28
FIGURA 5 – Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio, superóxido, peróxidos de hidrogênio e radical hidroxila.....30
FIGURA 6 – Efeito da temperatura na atividade de PPO em pêssego biuti....51
FIGURA 7 – Estabilidade térmica da poifenoloxidase em pêssego biuti.....53
FIGURA 8 – Efeito do pH na atividade da PPO de pêssego biuti.....54
FIGURA 9 – Efeito do pH na estabilidade da PPO de pêssego biuti.....55
FIGURA 10 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas, na concentração de 1 mM.....59
FIGURA 11 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas, na concentração de 5 mM.....59
FIGURA 12 – Efeito do uso de inibidores e tratamento térmico na inativação da PPO.....61
FIGURA 13 – Pêssego em calda que sofreu escurecimento enzimático comparado ao pêssego com coloração normal.....65
FIGURA 14 – Variação da concentração de compostos fenólicos no pêssego congelado (A).....69
FIGURA 15 – Variação da concentração de compostos fenólicos no pêssego em calda (B).....70
FIGURA 16 – Variação da concentração de compostos fenólicos na polpa de pêssego (C).....70

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Principais países produtores de pêssegos (1000 ton.).....5
TABELA 2 – Produção de pêssegos por blocos produtores (1000 ton.).....6
TABELA 3 – Estados brasileiros produtores de pêssego – 1998.....7
TABELA 4 – Composição média de pêssego por 100g de parte comestível....8
TABELA 5 – Característica de peroxidase de algumas frutas e vegetais.....16
TABELA 6 – Característica de polifenoloxidase de algumas frutas e vegetais.....24
TABELA 7 – Classe de compostos fenólicos em vegetais.....26
TABELA 8 – Aditivos, tempo e temperatura aplicados para inativação da enzima PPO.....41
TABELA 9 – Variáveis e níveis para delineamento experimental.....42
TABELA 10 – Delineamento experimental para 3 variáveis em valores codificados…….43
TABELA 11 – Variáveis e níveis para delineamento experimental.....44
TABELA 12 – Delineamento experimental para 2 variáveis em valores codificados e reais.....45
TABELA 13 – Atividades de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (PDO) obtidas a partir de diferentes soluções-tampão.....49
TABELA 14 – Efeito dos inibidores na atividade de PPO.....57
TABELA 15 – Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de pêssego.....63
TABELA 16 – Efeito do pH e concentração de ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de pêssego.....64
TABELA 17 – Concentração de fenólicos totais da amostra A extraídos com acetona, etanol e metanol.....67
TABELA 18 – Concentração de fenólicos totais da amostras B extraídos com acetona, etanol e metanol.....68
TABELA 19 – Concentração de fenólicos totais da amostras C extraídos com acetona, etanol e metanol.....68

TABELA 20 – Índice de antioxidação da fruta congelada (A) (extração com acetona, etanol e metanol.....72
TABELA 21 – Índice de antioxidação da fruta congelada (B) (extração com acetona, etanol e metanol.....72
TABELA 22 – Índice de antioxidação da fruta congelada (C) (extração com acetona, etanol e metanol.....72

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil se caracteriza por ser um dos grandes produtores de frutas do mundo. Dentre as principais frutas produzidas, o pêssego vem ocupando lugar de destaque. No Brasil a produção de pêssego é destinada tanto para o mercado *in natura,* aproximadamente 57% da produção, como para a indústria de alimentos, 43%; sendo que as principais variedades produzidas são o biuti, aurora I e II e diamante (EMBRAPA, 1984).

A produção nacional de pêssego ultrapassa as 100 mil toneladas/ano, sendo os principais estados produtores, o Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais. Dentre esses, o Rio Grande do Sul se destaca, sendo responsável por 46% da produção nacional, uma vez que nessa região a cultura encontra as melhores condições para o seu desenvolvimento, especialmente no tocante ao clima, já que necessita de um determinado número de horas de frio para uma floração e brotação normais (Madail, 1994).

O pêssego, por ser uma fruta de cor atraente, textura suculenta e sabor diferenciado, possui um grande potencial de aplicação na indústria de alimentos. Porém, a indústria de conservas de pêssego encontra muitos problemas no que diz respeito à manutenção da qualidade do produto processado, uma vez que essa fruta apresenta algumas enzimas oxidativas tais como polifenoloxidase e peroxidase, que levam ao escurecimento do produto acabado durante seu prazo de validade (Brandelli, 2005).

Tais enzimas estão naturalmente presentes na maioria das frutas e suas atividades estão relacionadas com a quantidade de compostos fenólicos presentes. Dessa forma, tais enzimas têm sido consideradas como as principais responsáveis pela diminuição da qualidade da maioria das frutas e vegetais (Cano *et al.,* 1995).

Existem pesquisas no Brasil a respeito do melhoramento genético de cultivares, procurando plantas mais resistentes a fisiopatias nos pomares, características de cultivo e estocagem do pêssego com o objetivo de minimizar os ataques de pragas que afetam as plantas e aumentar o período de armazenamento dos frutos pós-colheita. Embora, alguns estudos mostrem características de enzimas em pêssegos produzidos na Europa, pouco se sabe sobre as variedades de pêssegos nacionais e a relação da atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase com a quantidade de compostos fenólicos. A carência de pesquisas e dados sobre pêssegos nacionais aliada ao crescimento da produção e da indústria de produtos a base de pêssegos e sua necessidade de determinar parâmetros que minimizem os problemas tecnológicos para garantia da qualidade dos produtos, levou-nos a iniciar este estudo.

Este trabalho visou verificar a atividade das oxirredutases polifenoloxidase e peroxidase no pêssego biuti e seus produtos: pêssego em calda e polpa; avaliar a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante na fruta e seus produtos; caracterizar parcialmente a enzima polifenoloxidase do pêssego biuti; propor um tratamento para inativação dessa enzima durante o processamento do pêssego na indústria de alimentos e acompanhar a concentração e atividade antioxidante dos compostos fenólicos na fruta e nos produtos processados.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A cultura do pêssego biuti

2.1.1 – Características gerais

O pêssego (*Prunus persica* (L). Batsch) é uma fruta pertencente à família das *Rosaceae*. É uma frutífera conhecida e cultivada há 20 séculos antes de Cristo. Surgiu na China, onde dali se difundiu para outras regiões, até chegar ao Brasil por volta de 1532, através de Martin Afonso de Souza com a chegada das primeiras expedições portuguesas (Medeiros *et al.,* 1998).

O pêssego biuti é uma cultivar de meia-estação, cujos frutos servem tanto ao consumo *in natura* como para industrialização. Os frutos são grandes, arredondados e com pequena ponta. A película é amarela, podendo apresentar-se, em parte, coberta por vermelho. A polpa é amarela, firme, de sabor doce-acidulado e pouco aderente ao caroço (Antunes, 1997).

Figura 1 - Frutos do pessegueiro (*Prunus pérsica* (L) Batsch)

O pêssego é uma fruta que não se desenvolve em qualquer região do Brasil, uma vez que para a implantação de um pomar alguns fatores devem ser observados, tais como as condições climáticas, ou seja, o acúmulo de frio hibernal, a radiação, a precipitação pluvial e a ocorrência de ventos fortes e granizo.

Essa fruta, geralmente, atinge melhor qualidade em áreas onde as temperaturas no verão, (principalmente, próximo à colheita) são relativamente altas durante o dia e amenas no período noturno. Essas condições propiciam aumento do teor de açúcares e melhoria da coloração. Muitas cultivares tornam-se adstringentes quando se desenvolvem sob condições de verões frescos, as quais, geralmente, ocorrem em áreas de maior altitude (EMBRAPA, 2005).

Um fator importante durante a cultura do pêssego é a prática de colheita e pós-colheita, as quais visam preservar a qualidade da fruta, desde que sai do pomar até a chegada na mesa do consumidor. A fruta, durante seu trânsito pela cadeia de comercialização, pode sofrer uma perda de qualidade que incidirá em baixos preços de mercado, menor retorno ao produtor e insatisfação do consumidor. Diversas técnicas de colheita e pós-colheita como o uso de índices de maturação, manuseio pós-colheita, transporte e identificação de fisiopatias contribuem para a manutenção da qualidade dos pêssegos durante sua comercialização (Chitarra *et al*., 1990).

O pêssego é um fruto climatérico, portanto, durante o processo de amadurecimento apresenta um pico de produção de etileno, acompanhado pelo aumento da taxa respiratória. É importante saber qual o momento apropriado de colheita dos frutos, a fim de assegurar uma boa conservação, adequada resistência ao transporte e manutenção das condições necessárias para que os mesmos cheguem até o consumidor, com qualidade (EMBRAPA, 1984).

O ponto de colheita, em pêssegos, está baseado no índice de maturação determinado por métodos físicos, químicos, fisiológicos ou combinações entre eles, os quais permitem monitorar o progresso da maturação. Os parâmetros mais

usados em pêssegos são: cor, firmeza da polpa, sólidos solúveis e acidez total titulável (Dodd, 1986).

2.1.2 – Aspectos comerciais

O pêssego é uma fruta muito apreciada no mundo pelo sabor, pela aparência e pelo seu valor econômico no âmbito da cadeia produtiva.

A produção mundial de pêssegos está em torno de 12 milhões de toneladas, crescendo ao redor de 20% a cada 10 anos. A China é o maior produtor mundial, com cerca de 27% de participação na oferta global, seguida da Itália e dos Estados Unidos, que produziram em 1998, 1,4 milhão de toneladas (EMBRAPA, 2005).

China, Itália, Estados Unidos e Espanha juntos produzem 60% da oferta mundial, o que caracteriza uma forte concentração da produção, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1 - Principais países produtores de pêssegos (1000 ton.)

País	1990	%	1998
Mundo	9.244,4	100,0	11.064,5
China	1.129,1	12,2	2.996,4
Itália	1.719,7	18,6	1.428,7
E.U.A.	1.223,8	13,2	1.300,0
Espanha	629,3	6,8	887,5
Grécia	786,9	8,5	480,0
França	491,9	5,3	470,0
Turquia	350,0	3,8	400,0
Chile	196,0	2,1	285,0
Argentina	220,0	2,4	280,0
África do Sul	145,3	1,6	240,0

Fonte: Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas - FIPE

Entretanto foi na União Européia que em 1998 se produziu 30% da fruta consumida no mundo, conforme mostra **Tabela 2**. No âmbito do Mercado Comum do Cone Sul – Mercosul, destacam-se a Argentina e o Brasil com produções de 280 mil e 146 mil toneladas respectivamente. Em termos de América Latina, o Chile é o maior produtor, com produções ao redor de 285 mil toneladas. Outros destaques na produção encontram-se na Europa Oriental, onde os países árabes, a África do Sul e a Turquia têm produção ao redor de 200 mil toneladas (EMBRAPA, 2005).

Tabela 2 - Produção de pêssegos por blocos produtores (1000 ton.).

Regiões	1990	%	1998
Mundo	9.244,4	100,0	11.064,5
Américas	2.056,1	222,4	2.317,9
E.U.A.	1.223,8	13,2	1.300,0
Canadá	46,7	0,5	56,0
México	161,2	1,7	129,0
União Européia	3.755,7	40,6	3.353,0
Europa Ocidental	785,9	8,5	420,6
Países Árabes	294,6	3,2	345,8
Japão	189,9	2,1	175,5
China	1.129,1	12,2	2.996,4
Sudeste Asiático	219,6	2,4	246,8
Mercosul	344,9	3,7	453,1
Brasil	102,8	1,1	146,3
Paraguai	1,9	00	1,9
Uruguai	20,2	0,2	25,0
Argentina	220,0	2,4	280,0
África do Sul	145,3	1,6	240,0
Israel	145,3	0,4	47,6

Fonte: Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas - FIPE

No Brasil, o pêssego é produzido, principalmente, nos Estados do Sul, onde as condições naturais, sobretudo o clima temperado, favorecem a exploração da cultura de modo comercial.

O Rio Grande do Sul é o principal produtor, com cerca de 46% da produção nacional, ocupando uma área superior a 10 mil hectares, conforme **Tabela 3,** (EMBRAPA, 2005).

Tabela 3 - Estados brasileiros produtores de pêssego - 1998

Estados	Área (ha)	Produção	% Participação
Rio Grande do Sul	**13.000,00**	**80.000**	**46,53**
Santa Catarina	**4.187,2**	**30.190**	**17,56**
São Paulo	**3.266,0**	**35.184**	**20,46**
Paraná	**1.985,0**	**18.317**	**10,65**
Minas Gerais	**700,0**	**8.000**	**4,65**
Outros	**26,0**	**254**	**0,15**

Fonte: Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas - FIPE

Toda a produção nacional de pêssego se destina ao mercado interno. O Brasil não exporta esta fruta, sendo considerado um grande mercado para os principais produtores mundiais, principalmente para o Chile, país vizinho, e tradicional exportador da América Latina.

O abastecimento nacional provém de cinco pólos nacionais de produção: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. O período de oferta inicia em setembro com a produção paulista e conclui em fevereiro com a produção gaúcha (EMBRAPA, 2005).

O pêssego, juntamente com outras frutas de caroço, como a nectarina e a ameixa, apresentou nos últimos anos, notável expansão tanto da produção quanto do consumo interno, notadamente ao longo da década de 90, quando a demanda industrial por essa fruta aumentou, sendo esta, utilizada na

preparação de sucos naturais e concentrados, compotas, polpas e geléias (EMBRAPA, 2005).

2.2 – Bioquímica do pêssego

O pêssego apresenta significativo valor nutricional e quando comparado a outros frutos, apresenta valores relativamente elevados de vitamina K, Mg, Vitamina A, B_2 e PP (niacina). A ingestão do fruto auxilia no bom funcionamento dos órgãos digestivos, e é também indispensável para uma boa formação do corpo humano. A composição média por 100g de parte comestível é destacada na **Tabela 4** (IBGE, 1988).

Tabela 4 - Composição média de pêssego por porção (100g de parte comestível)

Quantidade por porção	
Valor energético (kcal)	36
Carboidratos (g)	9,3
Proteínas (g)	0,8
Fibras (g)	1,4
Fósforo (mg)	15
Potássio (mg)	124
Magnésio (mg)	4,0
Vitamina C (mg)	3,3

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, TACO, 2006

A cor é um dos principais fatores que determinam a qualidade de pêssegos processados, sendo este um excelente exemplo de fruta suscetível ao escurecimento enzimático. Este problema de alterações de cor é muito sério

porque, em geral, vem acompanhado de alterações no sabor, textura e diminuição do valor nutricional, os quais estão diretamente relacionados à qualidade dos produtos processados (Zhou *et al.,* 2000).

Observaram-se alterações na cor tanto em frutos *in natura* como também em produtos industrializados, como pêssegos em calda e polpas de frutas (Luh *et al.,* 1972).

Essas reações de escurecimento são associadas à oxidação de compostos fenólicos em presença de oxigênio molecular, principalmente pelas enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (PDO). O escurecimento oxidativo de substratos fenólicos se dá através da polimerização de ortoquinonas formadas durante o estágio inicial das reações catalisadas pelas enzimas (Brandelli *at al.*, 2005).

Reyes *et al.,* (1960) pesquisou as características das enzimas que causam escurecimento em pêssegos variedade Fay Elberta Freestone. Determinou que, não só os frutos processados podem sofrer reações de escurecimento, mas também os frutos congelados, uma vez que o processo de congelamento não inativa as enzimas responsáveis pelo escurecimento, mas nesse caso, a velocidade da reação de escurecimento é baixa.

O grau de escurecimento em muitas variedades de pêssegos pode estar diretamente relacionado a quantidade de taninos oxidáveis encontrados, dentre os compostos fenólicos encontrados, a catequina é um excelente substrato da polifenoloxidase. Um outro importante substrato é o ácido clorogênico.

Brandelli e*t al., (*2005) determinou a atividade de polifenoloxidase, o potencial de escurecimento e a quantidade de compostos fenólicos durante a estocagem de pêssegos variedade Premier durante 15 dias a 12 e 25℃. Determinou-se que a atividade de PPO aumentou durante a estocagem, mostrando um valor máximo a 8 dias de estocagem. A quantidade de fenólicos totais e ácido clorogênico diminuiu durante a estocagem.

Flurkey *et al*., (1978) monitorou a atividade de PPO e PDO de pêssegos variedade Redhaven durante a maturação, utilizando dois métodos de extração das enzimas, sendo um com acetona e outro com tampão fosfato de potássio 0,05 M e pH = 6,2. Observou-se que para a enzima PPO a extração feita com acetona foi mais eficiente, enquanto para PDO, a extração com tampão fosfato se mostrou mais eficaz.

Normalmente, os substratos fenólicos naturais estão separados das enzimas oxidativas por tecidos intactos. Através de danos mecânicos provocados por cortes, retirada da casca ou caroço, essas enzimas entram em contato com os substratos e as reações de escurecimento são iniciadas.

O principal composto fenólico presente na maioria dos cultivares de pêssego, constatado por Lee *et al.* (1990), foi o ácido clorogênico, havendo também concentrações relativamente altas de ácido neoclorogênico, procianidina B_3, e catequina, enquanto que, o conteúdo de ácido caféico foi relativamente baixo. As antocianidinas, cianidinas e delfinidinas foram observadas como traços em alguns extratos e quando ausentes atribui-se ao estágio imaturo de desenvolvimento das amostras do fruto (Senter *et al.,* 1990).

A determinação da atividade enzimática de polifenoloxidase, bem como sua caracterização bioquímica e a quantidade de compostos fenólicos, faz -se necessária para prevenção dessas reações indesejáveis em pêssegos, o que leva a diminuição da qualidade (Flurkey *et al.,* 1978).

2.3 – PEROXIDASE

2.3.1 – Características gerais

A peroxidase (POD) (EC 1.11.17) faz parte de um grande grupo de enzimas chamadas de oxirredutases, as quais são largamente distribuídas na natureza e estão associadas a mudanças deteriorativas no sabor e coloração de frutas e vegetais estocados (Robinson *et al.,* 1991).

A peroxidase é uma enzima resistente a elevadas temperaturas e sua inativação tem sido freqüentemente usada como índice da efetividade do branqueamento, tratamento térmico aplicado em alimentos para inibir a ação das enzimas. A perda da sua atividade enzimática num produto branqueado indica uma perda correspondente da atividade para outras enzimas de deterioração (Zanatta *et al.,* 2005).

Kanehira *et al.,* (1990) verificou em seus estudos que a peroxidase não só está envolvida em reações de escurecimento enzimático por ação dos fenóis, como também catalisam reações de descoloração em antocianinas e outros pigmentos vegetais como a cartamina.

Em extratos vegetais, a atividade da peroxidase tem sido encontrada tanto na forma solúvel, como na forma ligada (ligações com proteínas, gliosídeos, lignina, dentre outros), as quais diferem com relação à estabilidade térmica e propriedades de regeneração (Khan *et al.,* 1993).

Segundo Moulding *et al.,* (1987) as peroxidases ionicamente ligadas em laranjas são mais termoestáveis que as solúveis, o que diferem das peroxidases encontradas em maçãs.

Os tratamentos térmicos comercialmente usados no processo de extração de frutas e vegetais, como por exemplo: temperatura elevada por curto espaço de tempo (HTST - high temperature short time), são pouco efetivos para uma inativação irreversível principalmente da peroxidase. Na produção de sucos de frutas, muitas vezes se inclui a casca da fruta, e isto contribui geralmente para o aumento da atividade da peroxidase no meio (Valderrama *et al.,* 2001).

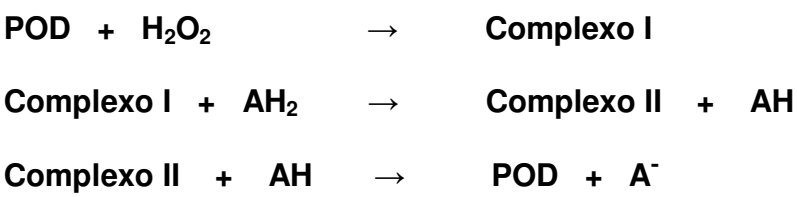
As peroxidases são capazes de agir em temperaturas abaixo de zero, e em baixa atividade de água. O desenvolvimento de sabor desagradável em frutas e vegetais estocados a –18°C e baixa atividade de água estão freqüentemente associados ao efeito da oxidação de lipídeos e compostos fenólicos pela ação da peroxidase presente nos alimentos (Sessa *et al.,* 1981).

Na reação enzimática o peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico, como o peróxido de metila ou o etil hidrogênio, é reduzido, enquanto que um doador de elétrons (AH_2) é oxidado. O doador de elétrons pode ser ascorbato, fenóis, aminas ou outros compostos orgânicos. Em muitos casos o produto da oxidação é colorido e serve como base para a determinação colorimétrica da atividade da peroxidase (Brito *et al.,* 2005).

Em geral, peroxidases são definidas como as enzimas que catalisam as reações abaixo:

Onde ROOH é o aceptor de hidrogênio, AH_2 é o doador de hidrogênio e A^- é um radical livre (Robinson *et al.* 1991).

A ação das peroxidases se dá segundo o seguinte mecanismo:



Essa reação global envolve um ciclo de oxidação e recuperação da enzima. Os radicais livres derivados do substrato doador (A^-) reagem posteriormente, não enzimaticamente, formando dímeros ou polímeros com alto peso molecular. A alta concentração de substratos doadores, a liberação de radicais livres reagindo entre

si formam polímeros do tipo A — A, como no caso de oxidação do guaiacol (Robinson *et al.,* 1991).

Dessa forma, a peroxidase não é uma enzima específica, e pode catalisar a oxidação de um grande número de fenóis com anéis aromáticos que ocorrem em tecidos vivos (Burnette, 1977).

Shanon (1968) cita a dificuldade de se entender os efeitos da atividade de peroxidase em vegetais devido ao grande número de isoperoxidases. Estudos sobre peroxidase de raiz forte demonstraram a existência de um sistema complexo de isoenzimas.

2.3.2 – Inativação e regeneração da atividade da peroxidase

Peroxidases apresentam a propriedade de regenerar sua atividade enzimática após tratamento térmico. A regeneração da atividade de peroxidase foi relatada para vários vegetais e frutas, como por exemplo açaí (Santos, 2001), uva, abacate, maçã e repolho (Clemente, 1998) e manga (Khan e Robinson, 1994).

A taxa de inativação e reativação dessa enzima é dependente de vários fatores, tais como temperatura e tempo de branqueamento, pH e concentração de sais (Robinson *et al.,* 1991).

De acordo com Adams (1997), em condições de pH levemente ácido, observa-se que a perda de atividade no tratamento térmico é causada, inicialmente, pela separação do grupamento heme da enzima, enquanto que em meio neutro, a ligação do grupamento heme à enzima é estável, e a desnaturação se dá principalmente pela desnaturação protéica. Por essa razão, a taxa de regeneração é menor quando o tratamento térmico é feito em pH ligeiramente ácido, já que o grupamento heme torna a se ligar à enzima com facilidade, restaurando sua atividade.

A possibilidade de regeneração da enzima é muito importante para a indústria de alimentos, uma vez que a incidência de atividade residual de peroxidase resultante da regeneração após tratamento térmico pode alterar a qualidade de frutas e hortaliças processadas, diminuindo sua vida de prateleira.

Burnette (1977) observou que quando se aplica um tratamento térmico drástico há uma menor probabilidade de ocorrer regeneração da enzima. Porém esse tratamento térmico pode alterar as características organolépticas do vegetal, tornando-o não atrativo ao consumidor.

Outro problema observado por Garrote *at al.,* (1987) é a dificuldade de se obter efetividade no tratamento térmico de certos vegetais devido ao seu tamanho, forma e estrutura, como é o caso do milho em espigas.

Bruemer *et al.,* (1976) em seus estudos sobre pasteurização de suco de laranja, determinou que a perda de atividade da peroxidase durante a pasteurização do suco foi dependente do pH.

Cano *et al.,* (1995) em seus estudos sobre atividade de peroxidase e polifenoloxidase em mamão, observou que houve um aumento da atividade da peroxidase quando a fruta foi armazenada a -18°C. O congelamento produziu um aumento na quantidade de PDO solúvel, possivelmente devido ao rompimento de membranas, liberando a enzima o que catalisa as reações, uma vez que os solutos estão mais concentrados devido ao congelamento.

Segundo Lu *et al.,* (1974), o mecanismo de inativação das peroxidases pode ser obtido a partir dos estudos das variáveis envolvidas no processamento.

2.3.3 – Inibidores da atividade da peroxidase

Vários compostos que atuam como agentes redutores são capazes de inibir a ação da peroxidase. Muitos desses compostos inibem a enzima de forma

irreversível, utilizando para isso, mecanismos que envolvem oxigênio e íon ferro. Acredita-se que isso se dá pela formação de espécie reativa de oxigênio na posição do sítio ativo ocupado pelo íon ferro. Dentre os agentes redutores que apresentam esta propriedade pode ser citado ditiotreitol (DDT), 2-mecaptoetanol e ascorbato (Lee e Soo, 1998).

De acordo com Lin *et al.,* (1996), a atividade da peroxidase pode ser significativamente reduzida pela ação de alguns sais, tais como sulfato férrico ($FeSO_4$), cloreto férrico ($FeCl_3$), cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) e nitrato de prata ($AgNO_3$). Entretanto, a utilização desses sais é proibida na indústria de alimentos, uma vez que são cumulativos e altamente tóxicos ao se humano.

Além dos sais citados acima, Holschuh (2000) relata a ação inibitória dos ácidos ferrúlico, caféico e *p*-cumárico sobre a peroxidase de carambola.

Lu *et al*., (1974) determinaram que a estabilidade da peroxidase de raiz forte é significativamente reduzida em presença de cloreto de sódio. A capacidade de regeneração da enzima, no entanto, não é afetada pela presença do sal.

Guimarães, (2006) cita as características bioquímicas relatadas para peroxidase de algumas frutas e vegetais, como mostra a **Tabela 5.**

TABELA 5 – Características de peroxidase algumas de frutas e vegetais

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temperatura estabilidade	Termoestabilidade ótima	Outras características	Referências
Abacaxi (*Ananás comosus* L.)	4,5	estável na faixa de 3 a 9	45 a 55°C	inativada após 1 min. de tratamento térmico	–	Brito, 2001
Açaí (*Euterpe oleracea*)	5,0	retém 60% de atividade na faixa de 3 a 10	35°C	retém 50% da atividade após 60 min. A 70°C	Km (guaiacol) 2,4 mM	Santos, 2001
Carambola (*Averrhoa carambola* L.)	5,5	6 a 9	50°C	mantém 80% atividade inicial após 24 horas a 40°C (pH 6,0)	–	Holschuh, 2000
Couve – flor (*Brassica oleracea* L.)	6,5	–	40°C	perda de 98% da atividade após 15 min a 50°C	Km (guaiacol) 3,1 mM	Lee et al,
Melão (*Cucumis melo* L)	5,5	–	–	–	Km (ABTS) 0,25 mM Km (H_2O_2) 0,23 mM	Adams, 2000

TABELA 5 – Características de peroxidase algumas de frutas e vegetais (continuação)

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temperatura	Termoestabilidade ótima	Outras características	Referências
Melão (*Cucumis melo* L)	5,5 a 7,5	–	50 a 55℃	perda de 90% da atividade após 5 min. a 80℃	inibida parcial – mente por Mn^{+2}, $CaCl_2$, $NaNO_2$ e ascorbato	Lamikanra e Watson, 2000
Morango (*Fragaria ananassa* Duch.)	5,0	retém 50% da atividade na	30℃	r etém 5% da atividade residual após 5 min. a	atividade de peroxi- dase diminui com o amadurecimento	Civello et al, 1995
Palma Km (guaiacol) 2mM (*E. guineensis*)	5,0	4 a 8	–	mantém 50% atividade a 50℃ por 1 hora		Deepa, 2002
Palmeira de sagu (*Metroxylon sagu*)	5,5 a 6,0	–	–	–	inibida por ascorbato, ác. *p*-cumárico, meta bissulfito e por íons Ca^{+2}	Onsa, et al, 2004
					ativiada	

2.4 – POLIFENOLOXIDASE

2.4.1 – Características gerais

A polifenoloxidase (PPO) (EC 1.14.18.1) é uma enzima que contém íon cobre no sítio ativo, e está presente em fungos e bactérias, na maioria das plantas e em todos os mamíferos (Martinez e Whitaker, 1995).

O escurecimento enzimático de frutas e vegetais, além de indesejável, é responsável por qualidades sensoriais desagradáveis e por perdas de valor nutricional e econômico dos alimentos *in natura* e processados. A polifenoloxidase (PPO) é a principal enzima responsável por essas reações em tecidos vegetais e frutas (Erat *et al*., 2005).

As *o*-quinonas fomadas pela ação da enzima são instáveis e rapidamente se polimerizam dando origem a pigmentos escuros (melaninas) (Serradell *et al*., 2000). A tonalidade de cor escura dos compostos formados pode variar de acordo com os compostos fenólicos presentes num dado tecido, resultando em pigmentos marrons, avermelhados ou negros (Dincer *et al*., 2002).

Essa enzima tem sido muito estudada em várias frutas, tais como maçãs (Coseteng *et al.,* 1987), uvas (Cash *et al.,* 1976), bananas (Galeazzi *et al.,* 1981), cerejas (Pifferi *et al.,* 1974) e pêssegos (Jen *et al.,* 1974), além de batatas, pêras, cogumelos, abacate e berinjela (Eskin *et al.,* 1971; Vamos-vigiázó, 1981; Zawistowski *et al*., 1991 e Nicolas, 1994).

As polifenoloxidases podem receber diferentes denominações tais como catecol-oxidase, catecolases, difenol-oxidase, *o*-difenolase, fenolase e tirosinase, de acordo com a especificidade do substrato. (Gasull *et al.,* 2006).

Segundo Ziyan *et al.,* (2003), a polifenoloxidase catalisa duas reações distintas envolvendo oxigênio molecular: a) a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis ou atividade de cresolase; e b) subseqüente reação de oxidação de *o*-difenóis a *o*-quinona ou atividade de catecolase.

Em tecidos vivos, o substrato e a enzima encontram-se separados dentro das células. Qualquer tratamento que danifique a estrutura celular colocará a enzima em contato com seu substrato, permitindo que a reação ocorra. Além da formação de compostos escuros, as *o*-quinonas formadas também reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais, e conseqüente diminuição do valor nutritivo dos alimentos (Escribano *et al.,* 1997).

De acordo com Ünal *et al.,* (2006), as polifenoloxidases em vegetais podem ser encontradas tanto na forma solúvel quanto ionicamente ligadas. Determinou-se que sucos de uva e vinhos, em presença de ar, sofrem reações enzimáticas e não-enzimáticas de escurecimento, através da oxidação de fenóis, quinonas, aminoácidos e outras substâncias oxidáveis. Porém, primeiramente as reações de escurecimento em uvas e vinhos se dão através da ação da PPO.

Segundo Vámos-Vigiázó *et al.,* (1982), a distribuição e o nível de polifenoloxidase em vegetais dependem da espécie, cultivar, maturação e idade do vegetal.

Harel *et al.,* (1966) ao estudar a atividade da enzima em maçãs, relatou que a atividade da polifenoloxidase aumentou à medida que o fruto foi amadurecendo. Da mesma forma ocorreu com as oliveiras (Bem-Shalom *et al.,* 1977).

De acordo com Serradell *et al*., (2000) as frutas como morango, amora e framboesa também são sucetíveis a ação da polifenoloxidase e nesse caso a enzima pode ser responsável pela degradação das antocianinas, causando perda da cor vermelha dos frutos.

Wang *et al*., (2006) relatou que a atividade de polifenoloxidase em várias frutas apresenta valor máximo em pH próximo a neutralidade e estudando a ação da enzima em mangas, determinou que a temperatura ótima da enzima na casca de diferentes variedades de manga está entre 15 e 30℃.

Segundo Brandelli *et al.,* (2004), o pêssego é um excelente exemplo de fruta suscetível ao ataque da polifenoloxidase e esse é um dos principais problemas encontrados durante o processamento da fruta.

2.4.2 – Inibidores da polifenoloxidase

Como já citado anteriormente, o escurecimento enzimático provoca diminuição da qualidade dos produtos e diversas conseqüências indesejáveis. Dessa forma, diversos estudos sobre as possíveis formas de inativação da enzima têm sido descritos.

A inativação térmica utilizando calor é muito empregada. Porém, em alguns casos, um tratamento térmico drástico pode afetar as características organolépticas, conferindo cor, sabor, textura, dentre outras características indesejáveis ao produto.

Siddiq *et al.,* (1992) estudou a atividade de polifenoloxidase em cinco variedades de ameixa. Ele relatou que a ameixa que apresentou maior atividade foi a variedade Stanley, cuja temperatura e pH ótimos foram, respectivamente, 20℃ e 6.0. A atividade enzimática diminuiu a pH abaixo de 4,5, mas se mostrou estável a temperatura de 70℃. A enzima foi drasticamente inibida por metabissulfito de sódio, L-cisteína e ácido ascórbico.

Um grande número de compostos é conhecido para inibir a atividade da PPO, entretanto sua eficiência no controle das reações de escurecimento depende da natureza e da concentração do inibidor, da fonte da enzima e da

disponibilidade do substrato (O_2, fenólicos), pH e temperatura (Mayer *et al.,* 1979; Vamos-Vigiázó, 1981).

De acordo com Gasull *et al.,* (2006), a atividade da enzima presente em frutas e vegetais pode ser inibida por aquecimento ou remoção de alguns de seus componentes necessários, como oxigênio molecular, o Cu^{+2} ou o substrato. Agentes redutores, antioxidantes e inibidores enzimáticos previnem o escurecimento enzimático através da redução das *o*-quinonas a difenóis, inibindo a atividade da enzima por diminuição do pH, e o seqüestro de Cu^{+2} do alimento.

Segundo Mayer *et al.,* (1979), os inibidores que atuam diretamente sobre a enzima PPO podem ser divididos em dois grupos de acordo com a forma de ação. O primeiro grupo inclui inibidores que interagem com íon cobre e o segundo aqueles que atuam no sítio ativo. Os inibidores que atuam como quelante ou através de interação com íon metálico incluem azida, cianeto, monóxido de carbono, tropolene e dietilcarbamato de sódio, os quais são menos específicos para o cobre. No segundo grupo, encontram-se ácidos aromáticos como carboxílico, benzóico e cinâmico, considerados como inibidores competitivos da PPO, devido à similaridade estrutural com os substratos fenólicos, o que muitos indicam como uma inibição dependente do substrato usado, podendo ser competitivo ou não competitivo ou ambos.

Fujita *et al.,* (1995) estudando as características da POD e PPO de repolho constatou que houve uma redução de 25% da atividade de PPO após um tratamento térmico de 100°C por 10 minutos. A atividade das enzimas foi sensivelmente diminuída pela ação de dietil-ditiocarbamato e cianeto de potássio.

No caso de berinjela, segundo Fujita *et al.,* (1988), a enzima foi totalmente inativada após tratamento térmico à temperatura de 75°C por 30 minutos ou 80°C por 5 minutos. Metabissulfito de sódio, cianeto de potássio e fluoreto de sódio, também inibiram efetivamente a ação da enzima.

Em sucos de frutas, cujo tratamento térmico provoca drástica redução da qualidade do produto, Martinez *et al.,* (1995) relata a inibição da enzima através da remoção de polifenóis, utilizando β-ciclodextrinas e polivinilpirrolidona ou polietilenoglicol insolúveis. Porém, esses tratamentos são caros e nem sempre disponíveis.

O ajuste de pH utilizando-se ácidos orgânicos, como ácido málico, fumárico, para valores abaixo de 4,0 também é empregado para inibir a ação da enzima em sucos e frutas em pedaços. Sendo a enzima dependente de O_2, a utilização de embalagens impermeáveis ao oxigênio, com atmosfera de CO_2 ou N_2, também é prática comum na prevenção do escurecimento (Martinez *et al.,* 1995).

Entretanto, o método mais empregado para inibição da PPO consiste na utilização de agentes redutores, como ascorbato e bissulfito, que promovem a inativação da PPO e atuam também na redução de benzoquinonas a *o*-dihidroxifenóis. O aminoácido L-cisteína atua na inibição da PPO de duas formas: primeiro estendendo a fase lag da PPO, e segundo, combinando-se com quinonas impedindo a polimerização (Martinez *et al.,* 1995).

Por outro lado, alguns compostos podem atuar estabilizando ou ativando a enzima, como é o caso da adição de açúcares como sacarose e glicose que promovem efeito estabilizante, dificultando a inativação térmica da enzima. Efeito semelhante também foi observado quando sais como sulfato de amônio e cloreto de sódio foram adicionados (Kavrayan e Aydemir, 2001). Outros compostos podem atuar ativando a enzima como é o caso de detergentes, como dodecilsulfato de sódio, que, ligando-se ao sítio ativo da enzima, causa mudanças conformacionais.

2.4.3 – Aplicações da polifenoloxidase

Embora a PPO seja vista como um problema para a indústria de alimentos, no caso das reações de escurecimento enzimáticos em vegetais e frutas, em alguns alimentos, a PPO é muito importante para garantir qualidades desejáveis. Esse é o caso do chá preto (Eskin, 1990).

De acordo com Sanderson (1964 a,b) o maior grupo de polifenóis no chá são as catequinas. Durante a fermentação, as catequinas são oxidadas a correspondente *o*-quinonas, as quais sofrem uma segunda oxidação formando teoflavina (TF) e teoflavina-galato (TFG) que são pigmentos amarelos. Esses pigmentos se oxidam formando teorrubidina (TR) que possui coloração marrom responsável pela cor escura do chá.

Jain *et al.,* (1984) em estudo feito sobre as enzimas do chá e seu papel no processamento, relataram a importância da PPO no desenvolvimento do sabor devido às transformações bioquímicas causadas pela presença da enzima nas folhas.

Guimarães, (2006) cita as características bioquímicas relatadas para polifenoloxidase de algumas frutas e vegetais, como mostra a **Tabela 6.**

TABELA 6 – Características de pelifenoloxidase algumas de frutas e vegetais

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temperatura estabilidade	Termoestabilidade ótima	Outras características	Referências
Açaí (*Eutherpe oleracea*)	6,0	6 a 9	40 a 45°C	inativada após 2 min. em ebulição	_	Santos, 2001
Berinjela (*Solanun melongena*)	4,8 – 6,0	_	30°C	_	Km (4-metilcatecol) 3,24 mM	Concellon, *et al*, 2004
Kiwi (*Actinidia chinensis*)	6,8 – 7,3	_	_	perde 88% atividade após 1 min. a 75°C	Km (catequina) 8,7 mM inibida por ac. ascórbico	Park e Luh 1985
Menta (*Brassica oleracea* L.)	7,0	_	30°C	retém 50% da atividade após 1,5 min a 80°C	Km (catecol) 6,25 mM inibida por ac. ascórbico e mertabissulfito	Kavrayan e Aydemir, 2001
Morango (*Fragaria ananassa*)	5,3	4,5 – 7,0	50°C a 65°C	inativada após 30 min. retém 20% da at ividade a 0 e 70°C	Km (pirocatecol) 11,2 nM	Serradell 2000

TABELA 6 – Características de pelifenoloxidase algumas de frutas e vegetais (continuação)

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temperatura estabilidade	Termoestabilidade ótima	Outras características	Referências
Nêspera (*Mespillus germânica*)	6,5	_	35℃	inativada após 30 min. a 80℃	Inibida por L-cisteína e metabissulfito	Dincer *et al,* 2002
Pinha *(Annona squamosa* L.)	_	6,0 a 6,5	_	10 a 30℃	Km (carecol) 7,14 nM	Lima, 1999
Repolho (*Brassica oleracea*)	7,6	6,0 a 11,0	40℃	retém 40% atividade após 10 min. a 100℃	Km (floroglucinol) 6,4 mM Ativada por $MnCl_2$ e Inibida por ácido ascórbico	Fujita *et al,*

2.5 – COMPOSTOS FENÓLICOS E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Segundo Balassundram *et al.,* (2006), compostos fenólicos, estruturalmente compreendem compostos que possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, e podem variar de simples moléculas de fenóis a grandes moléculas de compostos polimerizados. Embora haja esta diversidade estrutural, esse grupo de compostos é denominado polifenóis. A maioria dos compostos fenólicos naturais está conjugada a mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos ou podem também ocorrer como derivados funcionais, tais como, ésteres e metil-ésteres. Apesar da diversidade estrutural resultar em grande número de compostos fenólicos que ocorrem na natureza, esses compostos podem ser classificados de acordo com a Tabela abaixo **(Tabela 7)**. Dentre esses, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são os principais componentes da dieta humana.

Tabela 7 - Classe de compostos fenólicos em vegetais

Classe	**Estrutura**
Fenólicos simples e benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6–C_1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C_6–C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6–C_3
Naftoquinonas	C_6–C_4
Xantonas	C_6–C_1–C_6
Stilbenes, antraquinonas	C_6–C_2–C_6
Flavonóides, isoflavonóides	C_6–C_3–C_6
Lignanas, neolignanas	$(C_6–C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6–C_3–C_6)_2$
Ligninas	$(C_6–C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas ou flavolanas)	$(C_6–C_3–C_6)_n$

Ácidos fenólicos são classificados em dois subgrupos, isto é, ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos **(Figura 2)**. Ácidos hidroxibenzóicos incluem ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico, os quais possuem em comum a estrutura C_6–C_1. Ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com cadeia lateral formada por três carbonos (C_6–C_3), sendo ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico, os mais comuns.

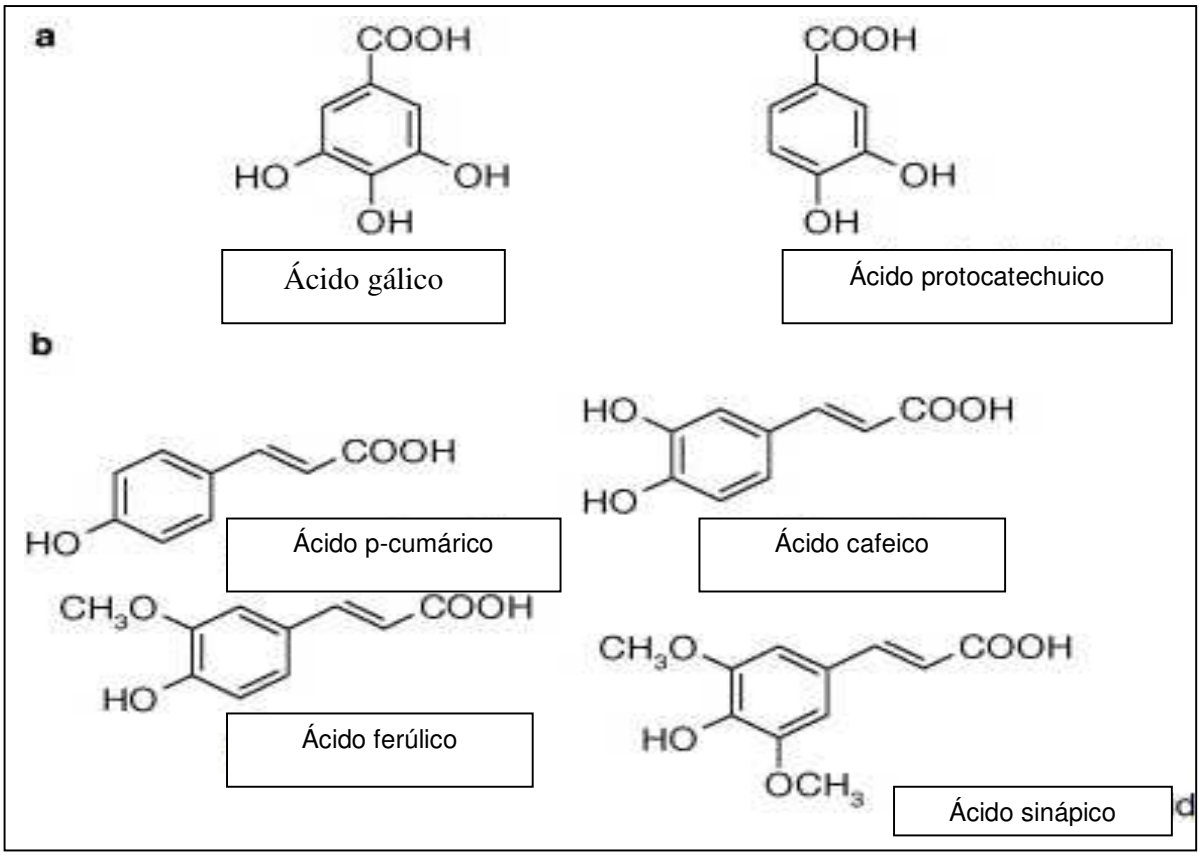


Figura 2 – Exemplos de ácidos hidroxibenzóico (a) e hidroxicinâmico (b)

Flavonóides constituem o maior grupo de fenólicos presentes nos vegetais. Possuem baixo peso molecular contendo quinze átomos de carbono distribuídos numa configuração C_6–C_3–C_6. Essencialmente, a estrutura consiste de dois anéis aromáticos A e B, unidos por 3 carbonos, geralmente na forma de um anel

heterocíclico C **(Figura 3)**. Variações na configuração do anel C resultam em outras classes de flavonóides, isto é, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas (Fig. 4).

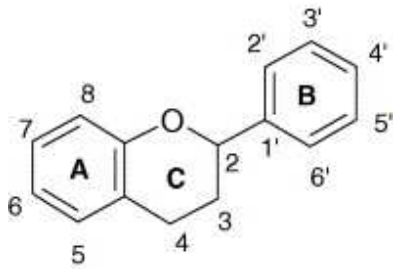


Figura 3 - Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide

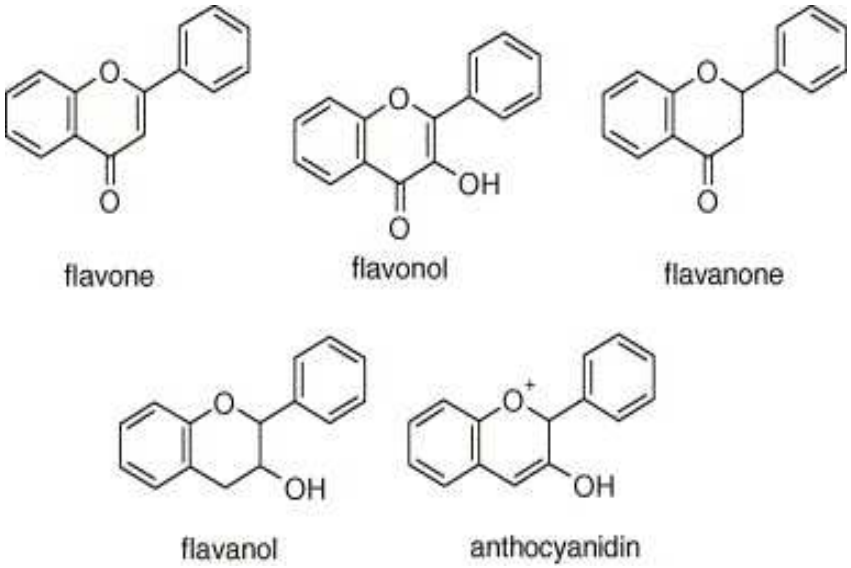


Figura 4 – Estrutura genérica das principais classes de flavonóides

Taninos são compostos de alto peso molecular que constituem o terceiro grupo de compostos fenólicos e podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensáveis.

Estudos têm mostrado que o consumo de frutas, vegetais e seus derivados trazem grandes benefícios à saúde, diminuindo a incidência de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. As propriedades das frutas e vegetais

que trazem esses benefícios à saúde são atribuídas à presença de algumas vitaminas (A, C, E e folatos), fibras alimentares e alguns compostos fitoquímicos presentes nesses alimentos. Entre os fitoquímicos, os polifenóis merecem uma atenção especial, devido a sua capacidade de seqüestrar radicais livres e atividades biológicas que ainda estão sendo estudadas. Os polifenóis em frutas incluem grande número de compostos com atividade antioxidante, os quais são, hidroxicinamatos, flavonóis, carotenóides, derivados do ácido gálico e antocianinas (Gil *et al.,* 2002).

Segundo Mishra *et al.,* (2005), um ponto interessante da atividade farmacológica dos polifenóis naturais é sua eficiência contra estresse oxidativo, pois os polifenóis neutralizam radicais livres reativos gerando moléculas de baixa reação.

De acordo com Beattie (2003), radical livre é uma molécula com um elétron não pareado, muito reativo num orbital externo, que pode iniciar uma cadeia de reações pela remoção de um elétron de outra molécula para completar seu orbital. A produção de radicais livres é uma conseqüência fisiológica de diversos processos metabólicos no organismo, sendo também secundária a uma série de injúrias exógenas como bactérias e outros organismos. As fontes endógenas e exógenas de radicais livres são: luz ultravioleta, raios X, interação com metais de transição (ferro e cobre), metabolismo de fármacos, metabolismo aeróbio e presença de doenças com resposta inflamatória. A transferência, passo a passo, de elétrons para O_2, resulta na formação dos seguintes intermediários, apresentados na **Figura 5**.

A conseqüência mais importante da liberação de radicais livres é o dano ao DNA, tanto mitocondrial como nuclear, resultando em mutações. As células desenvolveram múltiplas formas de se protegerem contra efeitos deletérios dos radicais livres, produzindo enzimas que agem como antioxidantes. As principais enzimas que fazem parte do grupo de antioxidantes enzimáticos são superóxido

dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GP) (Frei, 1999; Beattie, 2003).

Devido à presença de estruturas de anéis conjugados e grupos hidroxila, muitos compostos fenólicos têm função potencial como antioxidantes, seqüestrando ânions superóxidos (Robak *et al.,* 1988), oxigênio singlete (Hunsain *et al.,* 1987) e estabilizando radicais livres envolvidos em processos oxidativos.

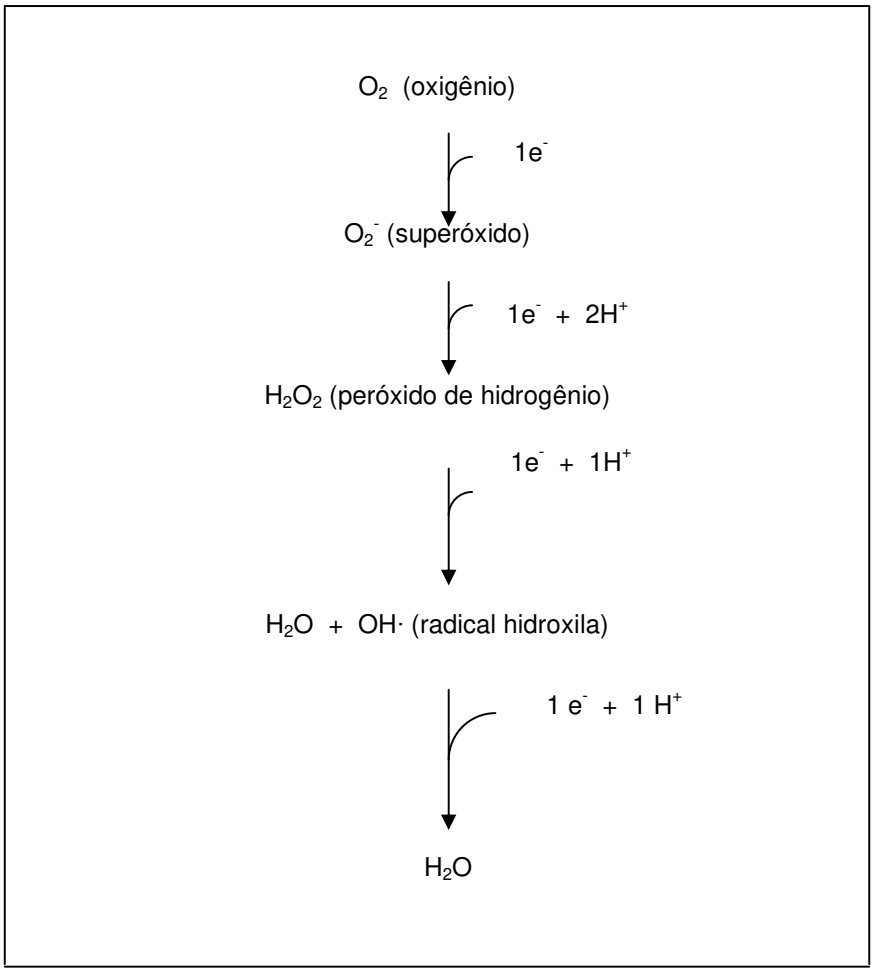


Figura 5 – Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio, superóxido, peróxidos de hidrogênio e radical hidroxila

Um grande número de compostos fenólicos, principalmente, tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos, compostos nitrogenados, carotenóides, e ácido ascórbico estão entre os compostos antioxidantes presentes em frutas e vegetais.

Muitos dos antioxidantes naturais, especialmente, flavonóides, se mostram eficazes na ação antibacteriana, antiviral, antinflamatória, antialérgica, antitrômbica e vasodilatadora (Cook *et al.,* 1996).

Os compostos fenólicos estão associados à qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, contribuindo direta ou indiretamente para formação de sabores agradáveis e desagradáveis. Em baixas concentrações, podem proteger os alimentos de deterioração oxidativa; entretanto, em altas concentrações, eles podem participar no processo de descoloração de alimentos e interagir com proteínas, carboidratos e minerais (Imeh *et al.*, 2002).

Dentro da família dos vegetais, os fenólicos podem variar de acordo com o cultivar, tipo de solo, estágio de maturação e fertilização (Waterman *et al.*, 1994) e influenciar a adstringência, que está relacionada com a presença de taninos no fruto.

Os taninos presentes nos vegetais, segundo Bate-Smith *et al.,* (1962) são compostos fenólicos solúveis em água, tendo pesos moleculares entre 500 e 3000 e ao lado das reações fenólicas comuns, têm propriedades de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas.

A sensação de adstringência surge indubitavelmente da ligação cruzada entre proteínas, glicoproteínas e os taninos (Goldstein *et al.,* 1963). Essa ligação cruzada acontece entre hidrogênio do grupo hidroxila do tanino e o oxigênio da ligação ceto-amina na proteína (— CO. NH —), isto é, da ligação peptídica (Joslyn *et al.*, 1964).

A perda de adstringência é uma das principais mudanças que ocorrem durante a maturação de muitos frutos. Acredita-se que esta mudança esteja relacionada à diminuição dos taninos, embora nem todos os frutos adstringentes

apresentem essa redução com o amadurecimento. Muitos trabalhos têm sido realizados buscando explicações para esse fenômeno (Holland, 1993).

Brandelli *et al*., (2004) estudou a atividade da polifenoloxidase, o potencial de escurecimento e a quantidade de compostos fenólicos em pêssego da variedade Premier. Determinou-se que a atividade da polifenoloxidase aumentou com o tempo de estocagem, assim como a taxa de escurecimento. A quantidade de fenólicos totais diminuiu durante a estocagem, porém a diferença não foi significativa. Nesse caso o potencial de escurecimento está relacionada com a taxa de escurecimento, mas não com a quantidade de fenólicos.

De acordo com Martins *et al*., (2004), as principais causas de perdas após a colheita são a ocorrência de podridões e distúrbios fisiológicos. Estes últimos manifestam em maior intensidade durante o armazenamento refrigerado. O distúrbio fisiológico mais comum é o escurecimento da polpa. Este escurecimento interno está diretamente relacionado com o conteúdo de fenóis e com atividade de polifenoloxidase. Neste estudo utilizaram-se dois cultivares diferentes, Cerrito e Chimarrita, e manejos diferentes dos pomares, utilizando solos com e sem cobertura vegetal. Determinou - se que, embora não significativa, a cultivar Chimarrita, apresentou, tanto na colheita quanto durante o armazenamento, maior atividade de polifenoloxidase e compostos fenólicos do que os de pomar com manejo de solo sem cobertura. Este fato pode estar relacionado à quantidade de nitrogênio do solo.

Scalzo *et al.,* (2005) determinou a quantidade de compostos fenólicos e antioxidantes em morango, maçã, pêssego e damasco, de diferentes cultivares. Determinou-se que a variedade das frutas tem grande influência na quantidade desses compostos nas frutas estudadas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos testes foram: Balança analítica Sartorius; modelo BL 2105; Balança eletrônica digital GEHAKA, modelo BK 4000; Medidor de pH Marte, modelo MB 10; Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J 2 – 21; Espectofotômetro Beckman Coulter, modelo DU 640; Banhos de água calibrados de 10℃ a 100℃ e Bomba de vácuo.

3.1.2 – Reagentes

Os reagentes utilizados nos testes foram: Fosfato monobásico de potássio, Fosfato bibásico de potássio, Ácido cítrico (Sigma), Tris, Ácido clorídrico, Acetona, Polietilenoglicol 6000, KCl, Catecol, H_2O_2, Guaiacol, Etanol (ECIBRA), Metanol (ECIBRA), L-cisteína, NaCl, Ácido ascórbico (Sigma - Aldrich), Metabissulfito de sódio, EDTA, ß – mercaptoetanol, Clorofórmio, Carbonato de sódio (ECIBRA), Ácido gálico (Sigma- Aldrich), ß – caroteno, Ácido linoléico, Tween 80 (Merck), Reagente Folin – Ciocuteau (Cromoline) e Papel de filtro Whatman nº 1.

3.2. – MÉTODOS

3.2.1 – Coleta das amostras

Para o desenvolvimento dos trabalhos foram utilizados frutos íntegros. Os pêssegos, variedade biuti, foram adquiridos diretamente do produtor, produzidos

na região de São Sebastião do Paraíso – MG e colhidos manualmente em estágio de maturação “maduro”, apropriados tanto para o aproveitamento industrial como para o consumo *in natura*.

Os frutos foram mantidos sob refrigeração até o dia do preparo das amostras, que foi no dia seguinte ao da colheita.

3.2.2 – Preparo das amostras

Foram utilizados para o preparo das amostras, aproximadamente 10 kg de pêssegos, colhidos de diversos pés de dois pomares diferentes. Os frutos foram descascados, partidos ao meio e os caroços foram retirados com o auxílio de facas de aço inox. Em seguida foram cortados em cubos de aproximadamente um cm de aresta. Imediatamente após o corte, os frutos foram colocados em sacos plásticos de 500 g cada, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a – 80℃ para posterior análise.

O pêssego em calda e a polpa de pêssego foram processados em 21 e 25 de fevereiro de 2006 (ambos, dois dias após a colheita), respectivamente, em indústria de processamento de frutas, no sudoeste de Minas Gerais.

O pêssego em calda foi envasado em latas de 400 g (peso líquido) e armazenado à temperatura ambiente. A polpa de pêssego foi envasada em potes de vidro com 500 g e sofreu tratamento térmico à temperatura de ebulição por 20 minutos. Posteriormente foi armazenado à temperatura ambiente.

3.2.3 – Estudos preliminares

3.2.3.1 – Efeito do pH do tampão de extração na atividade de PPO e PDO do extrato de pêssego

Para este estudo foram empregados 100 g de frutos, os quais foram homogeneizados na proporção de 1:2, a 4° C, com os diferentes tampões: tampão citrato – fosfato 0,1 M (pH de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5); tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) e tampão Tris-HCl 0,1 M (pH de 8,5 e 9,0). Cada mistura foi homogeneizada em liquidificador por 3 minutos. Em seguida foi centrifugada a 0℃ por 15 minutos a 10. 000 rpm.

A atividade de polifenoloxidase foi medida a 420 nm e peroxidase a 470 nm, de acordo com os itens 3.2.3.3 e 3.2.3.4.

3.2.3.2 – Precipitação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

O extrato enzimático de pêssego congelado, pêssego em calda e da polpa foi obtido conforme descrito por Flurkey *et al.,* (1976), adaptado para este estudo. Os frutos e seus produtos foram pesados e homogeneizados com tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 a 4℃, na proporção de 1:1. Em seguida, adicionou-se acetona a 4℃ na proporção de 1,5 de volume em re lação ao peso da fruta e 5% de polietileno glicol 6000. Foi feita homogeneização manualmente por 5 minutos a 4℃. A mistura foi filtrada em bomba de vácuo. O pr ocesso acima foi repetido duas vezes com o resíduo da filtração.

O resíduo foi deixado por uma noite para eliminar a acetona residual e armazenado a – 20℃.

Para análise de atividade de PFO e POD, o extrato enzimático foi diluído em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,2 contendo 1 M de KCl , na proporção de 1:100 e mantido sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente.

A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos e filtrada em algodão. No sobrenadante determinou-se a atividade enzimática conforme item 3.2.3.3.

3.2.3.3 – Determinação da atividade de Polifenoloxidase (PPO)

A atividade de polifenoloxidase foi determinada segundo descrito por Oktay *et al.* (1995), adaptado para este estudo.

Para a medida de atividade da PPO foi preparada uma mistura composta por 1,7 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 1,2 mL de substrato catecol 15 mM em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0. Essa mistura foi incubada a 20°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático, perfazendo um total de 3 mL.

Após 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 420 nm foi monitorado até 5 minutos de reação, a 20°C, contra branco, em espectofotômetro. O tubo branco foi preparado pela mistura de 1,8 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 1,2 mL de substrato catecol 15 mM em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0.

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

3.2.3.4 – Determinação da atividade de Peroxidase (POD)

A atividade de peroxidase foi determinada segundo descrito por Khan *et al.* (1994) e Holschuch (2000).

Para a medida de atividade da POD foi preparada uma mistura composta por 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 1,5 mL de substrato guaiacol 1% em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0. Essa mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,4 mL de solução de H_2O_2 (0,33 mL de H_2O_2 em 100 mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 6,0) e 0,1 mL de extrato enzimático, perfazendo um total de 3 mL.

Após 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado até 5 minutos de reação, a 25℃, contra branco, em espectofotômetro. O tubo branco foi preparado pela mistura de tampão de análise com o guaiacol e 0,1 mL de extrato enzimático.

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

3.2.4 – Caracterização bioquímica parcial da polifenoloxidase de pêssego

3.2.4.1 – Efeito da temperatura na atividade de PPO de pêssego

Para determinar a temperatura ótima de atividade de PPO do extrato enzimático de pêssego, obtido de acordo com item 3.2.3.2, foi utilizado o sistema de reação constituído por 1,2 mL da solução do substrato catecol 15 mM em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 1,7 mL da solução tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, submetido a temperaturas de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80℃, por 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm como descrito no item 3.2.3.3.

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

3.2.4.2 – Efeito do pH na atividade de PPO de pêssego

O efeito do pH na atividade de PPO do extrato enzimático de pêssego foi estudado na faixa de 3,0 a 9,0, utilizando os sistemas formados por tampão citrato

– fosfato 0,1 M (pH de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5); tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) e tampão Tris-HCl 0,1 M (pH de 8,5 e 9,0).

Em tubos de ensaio foram preparados sistemas de reação compostos de 0,1 mL de solução enzimática, obtida de acordo com item 3.2.3.2, 1,7 mL da solução tampão citada acima, 1,2 mL da solução do substrato catecol 15 mM em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, perfazendo um total de 3,0 mL. Para o branco foi utilizada a mistura de solução tampão mais solução do substrato. A análise foi conduzida na faixa de temperatura ótima.

3.2.4.3 – Efeito da temperatura na estabilidade da PPO de pêssego

Para o estudo da temperatura de estabilidade da atividade da PPO, foram incubadas, em banho-maria, alíquotas de 2 mL de extrato enzimático nas temperaturas de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80℃, por 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo e a atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.3.3.

3.2.4.4 – Efeito do pH na estabilidade da enzima PPO de pêssego

O efeito do pH na establidade da atividade da PPO foi estudado na faixa de pH de 3,0 a 10,0. Em tubos de ensaio foram preparados sistemas de reação compostos de 0,1 mL de solução enzimática, obtida de acordo com item 3.2.3.2, 1,7 mL da solução tampão [Tampão citrato – fosfato 0,1 M (pH de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), tampão fosfato de potássio 0,025 M (pH de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) e tampão Tris-HCl 0,1 M (pH de 8,5; 9,0; 9,5; 10,0)], 1,2 mL da solução do substrato catecol 15 mM em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, perfazendo um total de 3,0 mL. A mistura foi incubada na temperatura ótima por 20 horas, de acordo com Fujita *et al*., (1988) e Fujita *et al*., (1991).

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.3.3.

3.2.4.5 – Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO de pêssego

O efeito de substâncias químicas inibidoras foi verificado utilizando-se os seguintes compostos: L-cisteína, KCl, NaCl, ácido ascórbico, ácido cítrico, metabissulfito de sódio, EDTA e β-mercaptoetanol, nas concentrações finais de 1, 5 e 10 mM.

Sistemas de reação constituídos de PPO, obtida conforme item 3.2.3.2., e soluções dos reagentes nas concentrações de 1,0, 5,0 e 10,0 mM, na proporção de 1:1, foram incubadas a temperatura ótima durante 5 minutos, de acordo com Sidiqq *et al.,* (1992).

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.3.3.

3.2.5. – Estudo da inativação da enzima PPO

3.2.5.1 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas

A partir dos resultados obtidos em 3.2.4.5., os inibidores que se apresentaram mais efetivos na inativação da enzima, foram testados em concentrações diferentes e incubados a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80℃.

Sistemas de reação constituídos de PPO, obtida conforme item 3.2.3.3., e soluções dos reagentes nas concentrações determinadas, foram incubadas a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80℃, por 20 minutos. Esse tempo é

o utilizado nos tratamentos térmicos nas indústrias processadoras de pêssego. A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.3.3.

3.2.5.2 – Efeito de compostos químicos e tratamento térmico na inativação da enzima PPO

Os tratamentos foram selecionados de acordo com a utilização em indústrias de frutas e hortaliças (Lima, 1999).

O estudo do efeito do uso de compostos químicos e/ou tratamento térmico com a finalidade de controlar a atividade de PPO foi realizado incubando alíquotas de extrato enzimático preparado conforme item 3.2.3.2, na proporção de 1:1 com o respectivo composto químico à temperatura indicada nos tratamentos, conforme **Tabela 8**.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.3.3.

Tabela 8 – Aditivos, tempo e temperatura aplicados para inativação da enzima PPO

Tratamento	Aditivo	|aditivo|	Tempo (min)	Temp. (°C)
T_1	ausência de inibidor		sem tratamento térmico	
T_2	Ac. ascórbico	0,1%	sem tratamento térmico	
T_3	Ac. cítrico	0,1%	sem tratamento térmico	
T_4	Metabissulfito de sódio	0,05%	sem tratamento térmico	
T_5	ausência de inibidor		2	70
T_6	Ac. ascórbico + Ac. cítrico	0,1%	sem tratamento térmico	
T_7	Ac. ascórbico + Ac. cítrico + Metabissulfo de sódio	0,1% 0,05%	sem tratamento térmico	
T_8	Ac. ascórbico + EDTA	0,1% 30 ppm	sem tratamento térmico	
T_9	Ac. ascórbico + Metabissulfito de sódio	0,1% 0,05%	sem tratamento térmico	
T_{10}	Ac. ascórbico	0,1%	2	70
T_{11}	Ac. cítrico + Metabissulfito de sódio	0,1% 0,05%	sem tratamento térmico	
T_{12}	Ac. cítrico + EDTA	0,1% 30 ppm	sem tratamento térmico	
T_{13}	Ac. cítrico	0,1%	2	70
T_{14}	Ac. ascórbico + Ac. cítrico + EDTA	0,1% 30 ppm	sem tratamento térmico	
T_{15}	Ac. ascórbico + Ac. cítrico + Metabissulfito de sódio	0,1% 0,05%	2	70
T_{16}	EDTA	30 ppm	sem tratamento térmico	
T_{17}	ausência de inibidor		5	90

3.2.5.3 – Determinação do efeito das variáveis: pH, temperatura e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

Foi aplicado um planejamento fatorial em dois níveis para verificar a influência das variáveis independentes, pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de pêssego.

Os valores da variável pH, nos níveis -1 e +1, foram escolhidos com base nos valores típicos encontrados nos produtos de pêssego processados. Os valores de temperatura, na faixa de 85 a 100℃, rep resentam as condições usuais trabalhadas nas indústrias de processamento de pêssegos. O inibidor ácido ascórbico foi escolhido com base na resolução 386, de 05 de agosto de 1999, a qual se refere ao "REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ADITIVOS UTILIZADOS SEGUNDO AS BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO E SUAS FUNÇÕES" (ANVISA). A resposta foi a atividade residual da polifenoloxidase.

A **Tabela 9** mostra as variáveis e os níveis para o delineamento experimental.

Tabela 9 – Variáveis e níveis para delineamento experimental

Variáveis	Níveis				
	-1,68	- 1	0	+1	+1,68
X – pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Y – Temperatura (℃)	79	85	92	100	105
Z – Concentração de ácido ascórbico (%)	0	0,01	0,0175	0,025	0,035

A **Tabela 10** mostra a matriz do planejamento com os valores codificados e reais para os ensaios realizados. Os valores entre parênteses mostram a ordem de realização dos experimentos, determinada aleatoriamente, por sorteio.

Tabela 10 – Delineamento experimental para 3 variáveis em valores codificados

Ensaio	X	Y	Z	pH	Temperatura (℃)	Concentração Inibidor ac. ascórbico (%)
1 (5)	-1	-1	-1	3,5	85	0,01
2 (7)	+1	-1	-1	4,5	85	0,01
3 (10)	-1	+1	-1	3,5	100	0,01
4 (2)	+1	+1	-1	4,5	100	0,01
5 (6)	-1	-1	+1	3,5	85	0,025
6 (16)	+1	-1	+1	4,5	85	0,025
7 (13)	-1	+1	+1	3,5	100	0,025
8 (1)	+1	+1	+1	4,5	100	0,025
9 (3)	- 1,68	0	0	3,0	92	0,0175
10 (8)	+1,68	0	0	5,0	92	0,0175
11 (12)	0	- 1,68	0	4,0	79	0,0175
12 (4)	0	+1,68	0	4,0	105	0,0175
13 (11)	0	0	- 1,68	4,0	92	0
14 (15)	0	0	+1,68	4,0	92	0,035
15 (9)	0	0	0	4,0	92	0,0175
16 (17)	0	0	0	4,0	92	0,0175
17 (14)	0	0	0	4,0	92	0,0175

X = pH

Y = Temperatura (℃)

Z = Concentração de ácido ascórbico (%)

3.2.5.4 – Determinação do efeito das variáveis: pH e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

Diante dos resultados obtidos no planejamento anterior, e baseado no fato de que na indústria de processamento de pêssego a temperatura de tratamento térmico utilizada é a temperatura de ebulição (aproximadamente 95°C), aplicou-se um planejamento, no qual fixou-se a temperatura em 95°C, e variou-se o pH e a concentração de ácido ascórbico.

A **Tabela 11** mostra as variáveis e os níveis para o delineamento experimental.

Tabela 11 – Variáveis e níveis para delineamento experimental

Variáveis	Níveis				
	-1,41	- 1	0	+1	+1,41
X – pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Y – Concentração de ácido ascórbico (%)	0	0,006	0,0125	0,019	0,025

A **Tabela 12** mostra a matriz do planejamento com os valores codificados e reais para os ensaios realizados. Os valores entre parênteses mostram a ordem de realização dos experimentos, determinada aleatoriamente, por sorteio.

Tabela 12 – Delineamento experimental para 2 variáveis em valores codificados e reais

Ensaio	X	Y	pH	concentração do inibidor ac. ascórbico (%)
1 (7)	-1	-1	3,5	0,006
2 (4)	+1	-1	4,5	0,006
3 (10)	-1	+1	3,5	0,019
4 (8)	+1	+1	4,5	0,019
5 (5)	-1,41	0	3,0	0,0125
6 (11)	+1,41	0	5,0	0,0125
7 (3)	0	-1,41	4,0	0
8 (2)	0	+1,41	4,0	0,025
9 (6)	0	0	4,0	0,0125
10 (9)	0	0	4,0	0,0125
11 (1)	0	0	4,0	0,0125

X = pH

Y = Concentração de ácido ascórbico (%)

3.2.6 – COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi monitorada durante quatro meses na fruta congelada, no pêssego em calda e na polpa de pêssego a fim de se constatar se há variação dessas quantidades durante a vida de prateleira desses produtos.

A extração dos compostos fenólicos e antioxidantes foi feita de três formas diferentes a fim de se obter a melhor forma de extração, ou seja, a que extrair maior quantidade desses compostos.

3.2.6.1 – Extração dos Compostos Fenólicos e Antioxidantes

1 – Extração com etanol

A extração dos compostos fenólicos foi feita segundo Brandelli *et al.,* 2005. Foram pesadas 50 g de fruta e homogeneizadas com 100 mL de solução de etanol (80% v/v) em almofariz. Em seguida, a mistura foi aquecida por 5 minutos em recipiente tampado. Filtrou-se o extrato em papel de filtro.

Esse extrato foi misturado com 100 mL de solução de etanol e aquecido novamente por 10 minutos. As soluções foram misturadas e resfriadas. O volume final foi acertado para 250 mL.

2 – Extração com metanol

A extração dos compostos fenólicos foi feita segundo Chitindigui *et al.,* (2006).

Foram pesados 2 g de fruta. Em seguida foram homogeneizadas 2 vezes com 10 mL de solução aquosa de metanol 50%. As soluções obtidas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Posteriormente foram armazenadas a -20℃.

3 – Extração com acetona

A extração dos compostos fenólicos foi feita segundo Chaovanolikit *et al.,* (2004).

Foram pesados 10 g de fruta. A fruta foi misturada manualmente com 20 mL de acetona por 10 minutos. Em seguida filtrou-se em papel Whatman nº 1 em funil de Büchner, com o auxílio de bomba de vácuo. Posteriormente, utilizando 10 mL de solução de acetona 70%, o processo de extração foi repetido duas vezes. Em

seguida foi filtrado e misturado a 80 mL de clorofórmio e centrifugado por 20 minutos a 10 000rpm.

Evaporou-se a fase aquosa a baixa pressão a 40℃ por 15 minutos (evaporação da acetona). O extrato aquoso (25 mL) foi acidificado com solução de HCl 0,01% e estocado a – 70℃.

3.2.6.2 – Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de fenóis totais nas amostras de pêssego foi analisado colorimetricamente, segundo a metodologia proposta por Brandelli *et al.,* (2005). Uma alíquota de 1 mL de extrato diluído foi misturada a 10 mL de água destilada. Foram adicionados 2 mL de reagente Folin-Ciocalteau. Após 5 minutos, adicionaram - se 2 mL de carbonato de sódio 7,5%. Após 2 horas de estabilização da coloração, a leitura foi feita em espectofotômetro a 750 nm. As amostras foram analisadas em triplicata.

Como branco foi utilizado, no lugar do extrato de pêssego, água destilada. Os valores foram expressos em mg de ácido gálico por mL de extrato de pêssego, através da construção de uma curva padrão.

3.2.6.3 – Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do ß-caroteno e ácido linoléico, segundo metodologia descrita por Haemmerschinidt *et al.,* (1978), adaptado para este estudo.

Foram pesados 5 mg de β-caroteno e dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. A mistura foi transferida para um balão de fundo redondo contendo 111 µL de Ácido Linoléico 60% e 185 µL de Tween 80. Após remoção do clorofórmio em um evaporador rotatório a 40ºC, 50 mL de água deionizada e oxigenada foram adicionadas ao balão sob rigorosa agitação para emulsificação. A emulsão foi diluída na proporção 1:10.

Foram adicionadas alíquotas de emulsão e do extrato de pêssego na proporção 1:1 em tubos de ensaio. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm imediatamente após adição da amostra a emulsão. Os tubos foram incubados a 40ºC e a leitura feita em intervalos de 15 a 105 minutos.

Foram utilizados controles que continham água no lugar da amostra. Foram preparados também tubos contendo padrão ácido gálico no lugar da amostra, para posterior comparação da atividade antioxidante da fruta.

A taxa de branqueamento do β-caroteno foi determinada pela diferença entre a absorbância inicial e final, a 470 nm, dividido pelo tempo de incubação (horas). O índice de antioxidação foi calculado pela razão entre o branqueamento controle e a taxa de branqueamento da amostra, segundo Pratt *et al.,* (1979).

Expressões: $Tb = \frac{Absi - Absf}{Tempo\ (h)}$ $Iox = \frac{Tb\ controle}{Tb\ amostra}$

Onde: Tb – Taxa de branqueamento
Absi – Absorbância inicial
Absf – Absorbância final
Iox – Índice de oxidação

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Efeito do pH do tampão de extração na atividade de PPO e PDO do extrato de pêssego

A extração das enzimas PPO e PDO foi realizada conforme item 3.2.3.1. As análises foram feitas em triplicata e as atividades de PPO e PDO obtidas estão ilustradas na **Tabela 13.**

Tabela 13 – Atividades de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (PDO) obtidas a partir de diferentes soluções-tampão.

Solução tampão	pH	Atividade PDO (U/mL)	Atividade PPO (U/mL)
citrato-fosfato 0,1M	3,0	659 ± 8,7	52 ± 4,9
	3,5	682 ± 7,4	606 ± 6,8
	4,0	726 ± 7,9	1817 ± 13,2
	4,5	1385 ± 12,3	2304 ± 16,4
	5,0	1410 ± 12,5	2778 ± 18,1
	5,5	1929 ± 15,6	3305 ± 19,9
fosfato de potássio 0,025 M	6,0	2267 ± 18,5	2908 ± 17,9
	6,5	969 ± 9,6	2530 ± 16,7
	7,0	937 ± 8,9	2513 ± 16,9
	7,5	723 ± 6,9	2409 ± 14,8
	8,0	707 ± 7,1	2236 ± 13,8
Tris – HCl 0,1M	8,5	692 ± 7,6	2089 ± 12,5
	9,0	650 ± 6,7	2052 ± 10,7

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que a solução de extração que apresentou maior atividade de PDO foi a de fosfato de potássio 0,025 M na faixa de pH 6,0.

No caso da polifenoloxidase foi encontrada maior atividade na solução de citrato – fosfato 0,1M e pH 5,5.

4.2 – Obtenção dos extratos enzimáticos de polifenoloxidase e peroxidase

Os extratos enzimáticos do pêssego congelado, pêssego em calda e da polpa foram obtidos conforme item 3.2.3.2., e as análises foram feitas em triplicata. Na fruta os resultados foram 2557 (± 8,6) U/mL de PPO e 1175 (± 7,8) U/mL. No pêssego em calda e na polpa de pêssego não foram encontradas atividades de PDO e PFO.

De acordo com os resultados acima, observa-se que o pêssego congelado apresentou maior atividade enzimática de polifenoloxidase que de peroxidase, com aproximadamente 46% a mais de atividade.

Esse resultado confirma os estudos de Brandelli *et al*., (2004), no qual afirma-se que a polifenoloxidase é a principal enzima responsável pelas reações de escurecimento em pêssegos.

Toralles *et al.,* (2004) estudou a capacidade de escurecimento enzimático em quatro variedades brasileiras de pêssegos (Granada, Jade, Esmeralda e Maciel) e observou que a enzima PPO era responsável pelo escurecimento enzimático da fruta. Esta enzima apresenta cobre em sua estrutura molecular, atividade principalmente para o catecol e catalisam reações de oxidorredução em que a própria PPO funciona como receptor de elétrons.

Observou-se que em pêssegos em calda e polpa não havia atividade enzimática, o que significa que o tratamento térmico feito na indústria foi efetivo e capaz de inativar essas enzimas, dentro do prazo de validade.

4.3 – Caracterização bioquímica parcial da polifenoloxidase de pêssego

4.3.1 - Efeito da temperatura na atividade de PPO de pêssego

A **Figura 6** mostra o perfil de atividade da polifenoloxidase em função da temperatura no pêssego *cv*. biuti.

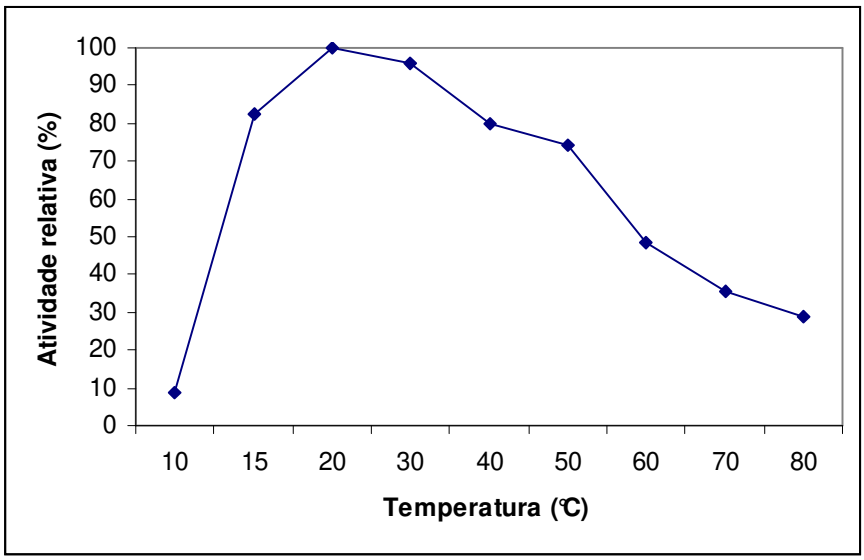


Figura 6 – Efeito da temperatura na atividade de PPO em pêssego biuti

O efeito da temperatura na atividade de polifenoloxidase foi determinado numa faixa entre 10 e 80°C. O resultado mostrado na figura 13 indica que a enzima apresentou atividade acima de 80% entre 15 e 30°C, sendo a atividade máxima a 20°C. Abaixo de 15°C houve uma queda acentuada sendo obtida uma atividade enzimática inferior a 10%. Acima de 40°C houve queda menos acentuada, porém a atividade enzimática permaneceu na faixa de 30% a 80°C.

Polifenoloxidases em frutas podem apresentar atividade ótima em ampla faixa de temperatura, desde valores próximos à temperatura ambiente até temperaturas mais elevadas, entre 50 e 65°C.

Unal *et al*., 2006, determinou a temperatura ótima para atividade de PPO em uvas cv.Emir e constatou que a máxima atividade da enzima obtida foi a 25℃, acima da qual a atividade enzimática apresentou queda gradativa. Entre 10 e 60℃, a enzima manteve 80% de sua atividade. Acima de 60℃ houve um declínio mais acentuado, sendo que, a 80℃ apenas 47,5% da atividade foi mantida.

Valores similares foram encontrados para PPO de outras variedades de uvas, por exemplo, 25 a 30℃ para uva *cv*. Concorde, 25℃ para Ravat e Niagara, 30℃ para Koshu e 25 a 30℃ para Muscat Bailey.

Estudos feitos com polpa de manga *cv*. "Tainong", mostrou atividade ótima para PPO a 30℃ e uma ampla faixa com atividade próxima a máxima entre 20 e 50℃. A atividade de PPO diminuiu gradativamente com o aumento da temperatura e mostrou pequena atividade a 70℃ (Wang *et al*., 2006).

O efeito da temperatura na atividade enzimática da PPO de banana *cv*. Anamur mostrou atividade máxima a 30℃. A atividade enzimática declinou rapidamente com o aumento da temperatura acima de 40℃ (Unal, 2007).

Cash *et al*, (1976) determinou a temperatura ótima para PPO de ameixa cv. Stanley na faixa d 30℃. Porém, temperatura ótima elevada para atividade de PPO, na faixa de 50℃, foi encontrada em estudos feitos com morangos (Serradell *et al,* 2000).

4.3.2 - Efeito da temperatura na estabilidade da PPO de pêssego

A **Figura 7** mostra a estabilidade térmica da polifenolxidase na faixa de 10 a 80℃.

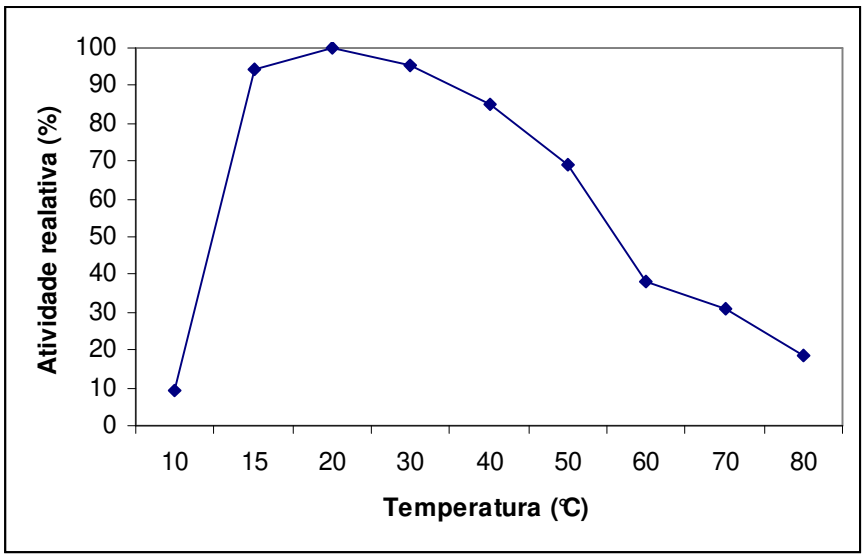


Figura 7 – Estabilidade térmica da poifenoloxidase em pêssego biuti

Polifenoloxidase se mostrou relativamente estável após 30 minutos de tratamento térmico na faixa de 15 a 40℃, mantendo acima de 80% de sua atividade.

A temperatura abaixo de 15℃, atividade enzimática ficou abaixo de 10% e acima de 40℃, a atividade decresceu atingindo apro ximadamente 20% após 30 minutos de tratamento a 80℃.

Estudos feitos com PPO de repolho, mostraram alta estabilidade da PPO, onde 40% da atividade enzimática se manteve após 10 minutos de tratamento a 100℃. Resultado semelhante foi encontrado em estud os feitos com kiwi, manga e alface (Fujita *et al.*, 1995).

Fujita *et al.*, 1988, determinou a estabilidade térmica berinjela. Determinou-se que mais de 50% da atividade enzimática permaneceu pós 5 minutos de tratamento térmico a 70℃. Porém a enzima ficou com pletamente inativada após 30 minutos a 75℃ ou 5 minutos a 80℃.

Em alcachofra *cv*. Jerusalém, foi estudada a estabilidade térmica da PPO na casca e na polpa. Aproximadamente 80% da atividade enzimática da polpa diminuiram após tratamento térmico de 75°C por 60 m inutos. Entretanto, a PPO da casca foi totalmente inativada nesse tratamento térmico. A PPO de pêssegos *cv*. Clingstone, cerejas *cv*. Royal Ann e pêras *cv*. Baelett são caracterizados por apresentarem alta estabilidade térmica (Ziyan *et al*., 2003).

4.3.3 - Efeito do pH na atividade da PPO de pêssego

O efeito do pH na atividade da PPO foi determinado conforme item 3.2.4.2. O pH ótimo da polifenoloxidase foi determinado a 20°C, sua temperatura de maior atividade. Os resultados podem ser observados na **Figura 8**.

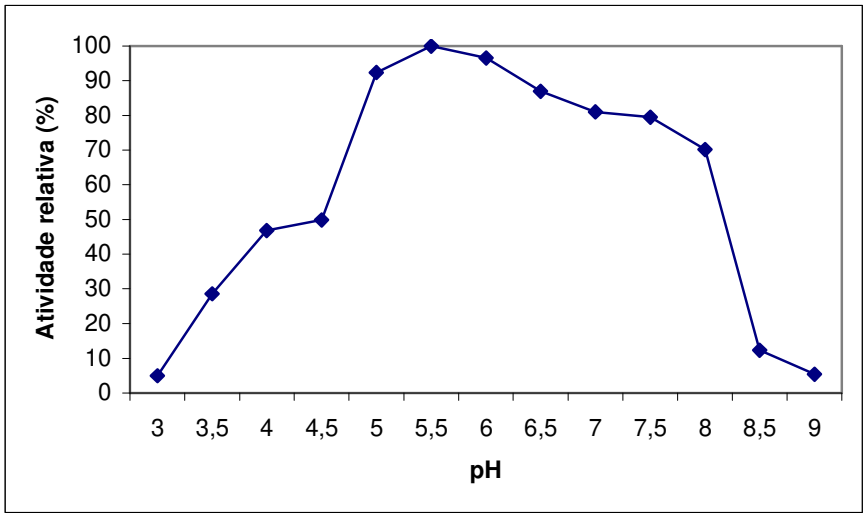


Figura 8 – Efeito do pH na atividade da PPO de pêssego biuti

A polifenoloxidase apresentou maior atividade em pH 5,5 e na faixa de pH de 5,0 a 7,0 apresentou atividade superior a 80%.

Observa-se que na faixa de pH de 4,0 a 4,5 a atividade enzimática da PPO é de aproximadamente 50%. Esta faixa de pH é a que normalmente se trabalha na indústria de alimentos.

Segundo Luh *et al*., (1972) em estudos feitos com pêssego *cv.* Halford, determinou que o pH ótimo da PPO nessa cultivar é de 6,2. Esses resultados confirmam os estudos de Vámos-Vigiázó *et al.,* (1982), no qual é relatado que a distribuição e o nível de polifenoloxidase em vegetais dependem da espécie, cultivar, maturação e idade do vegetal.

Siddiq *et al.,* (1993) caracterizou a PPO de duas cultivares de pêras (Red e Bosc) e determinou que o pH ótimo da PPO em pêras Red é 5,5, enquanto a Bosc é 5,0.

4.3.4 - Efeito do pH na estabilidade da PPO de pêssego

A determinação do efeito do pH na estabilidade de pêssego biuti foi realizada conforme descrito em 3.2.4.4. Os resultados são mostrados na **Figura 9.**

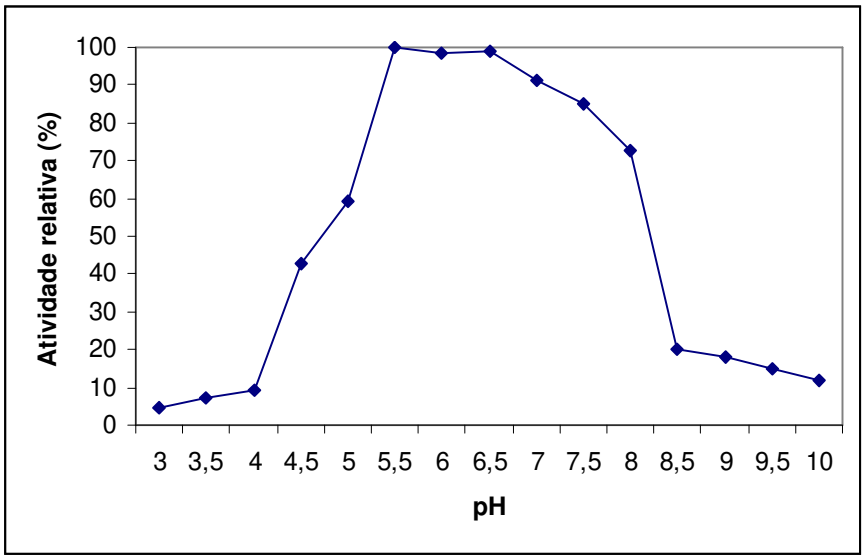


Figura 9 – Efeito do pH na estabilidade da PPO de pêssego biuti

A **Figura 9** mostra que a PPO se apresenta bastante estável na faixa de pH de 5,5 a 6,5, mantendo aproximadamente 100% da sua atividade.

Observa-se que entre pH 5,0 a 5,5 houve uma elevação significativa na atividade da PPO, passando de 60 para 100% de atividade.

Na faixa de pH 7,0 a 8,0 a atividade ainda se manteve a níveis de 70 a 90% de atividade, decrescendo bruscamente a pH 8,5, no qual a atividade foi de aproximadamente 20%.

Fujita *et al.*, (1990) determinou o pH de estabilidade de alface, incubada a 5℃ por 20 horas, e concluiu que a PPO se mostrou e stável na faixa de pH de 5,0 a 8,0, mantendo aproximadamente de 80 a 100% de atividade. Abaixo de pH 5,0 houve uma queda de atividade de aproximadamente 20%, mantendo assim, uma atividade residual de 60% chegando a próxima de 0 a pH 3,0.

Em outro estudo, Fujita *et al.*, (1995) determinou que a atividade de PPO em repolho, incubado a 5℃ por 20 horas, se mostrou estável a pH entre 5,0 e 11,0, mantendo nessa faixa aproximadamente 100% de sua atividade.

A PPO de berinjela apresentou estabilidade na faixa de pH entre 5,0 a 8,0, quando incubada a 5℃ por 20 horas (Fujita *et al.*, 1988). Abaixo de pH 4,0 houve queda acentuada na atividade da PPO, com atividade residual próxima de 0.

4.3.5 - Efeito da presença de inibidores na atividade da enzima PPO de pêssego

O efeito dos inibidores ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA, NaCl, KCl, metabissulfito de sódio, ß-mercaptoetanol e L-cisteína nas concentrações finais de 1,0, 5,0 e 10,0 mM, sobre a atividade de polifenoloxidase se encontram na **Tabela 14.**

Tabela 14 – Efeito dos inibidores na atividade de PPO

Inibidor	Concentração do inibidor (mM)	Atividade relativa (%)	Inibição (%)
Controle	ausente	100	0
EDTA	1,0	87,7	12,3
	5,0	84,6	15,4
	10,0	80,1	19,9
Ac. ascórbico	1,0	5,3	94,7
	5,0	0	100
	10,0	0	100
Ac. cítrico	1,0	80,0	20,0
	5,0	50,4	49,6
	10,0	6,9	93,1
NaCl	1,0	79,1	20,9
	5,0	78,2	21,8
	10,0	76,9	23,1
KCl	1,0	71,3	28,7
	5,0	67,3	32,7
	10,0	71,1	28,9
Metabissulfito de sódio	1,0	0,8	99,2
	5,0	0,2	99,8
	10,0	0	100
ß-mercaptoetanol	1,0	0,5	99,5
	5,0	0	100
	10,0	0	100
L-cisteína	1,0	2,1	97,9
	5,0	1,7	98,3
	10,0	1,0	99,0

Dentre os compostos testados, os inibidores mais eficientes foram: ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, ß-mercaptoetanol e L-cisteína, inibindo aproximadamente 100% da enzima nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM, como é o caso do ácido ascórbico, metabissulfito de sódio e ß-mercaptoetanol. No caso da L-cisteína, houve uma inibição de aproximadamente 98% nas três concentrações.

Ácido ascórbico foi testado como inibidor de PPO em alcachofra, apresentando uma inibição de 85% da atividade enzimática. A L- cisteína se mostrou mais eficiente nesse caso inibindo 100% da atividade da enzima.

Reyes *et al*., (1960), estudou o efeito do ácido ascórbico como inibidor da PPO em pêssego *cv*. Elberta e determinou redução significativa nas reações de escurecimento do fruto.

Na indústria de processamento de pêssego, os principais inibidores utilizados são ácido cítrico, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, ambos na concentração final de 0,1%.

4.4 – Estudo da inativação da enzima PPO

4.4.1 – Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas

A partir dos resultados obtidos em 4.2.4., os inibidores que se apresentaram mais efetivos na inativação da enzima, foram testados em concentrações diferentes (0,001 e 0,005 M) e incubados a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80℃, por 20 minutos.

O ácido cítrico, embora não tenha apresentado inibição satisfatória, foi testado devido a sua grande aplicação na indústria de processamento de pêssego.

Os resultados são apresentados na **Figura 10 e 11**.

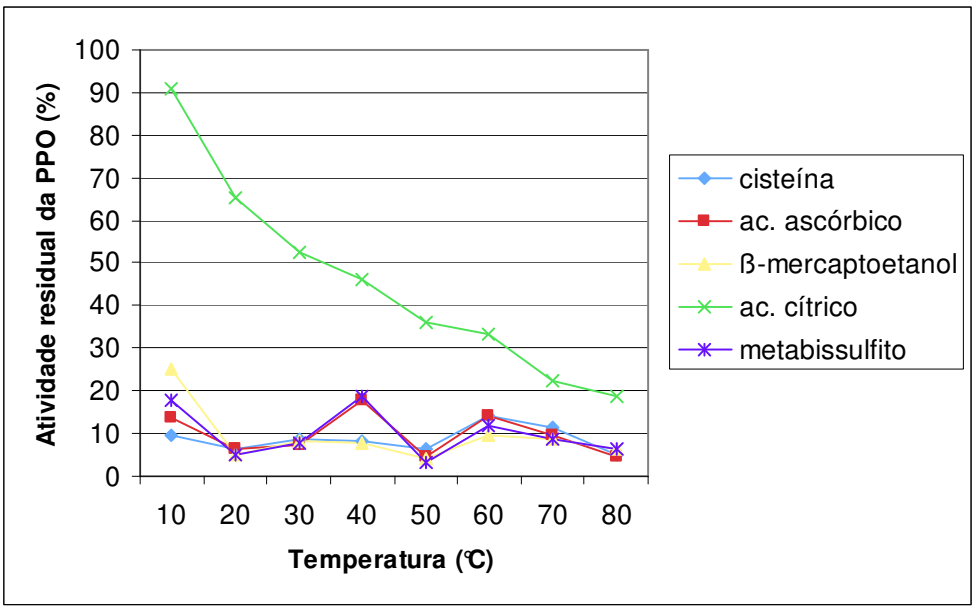


Figura 10 - Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas, na concentração de 1 mM

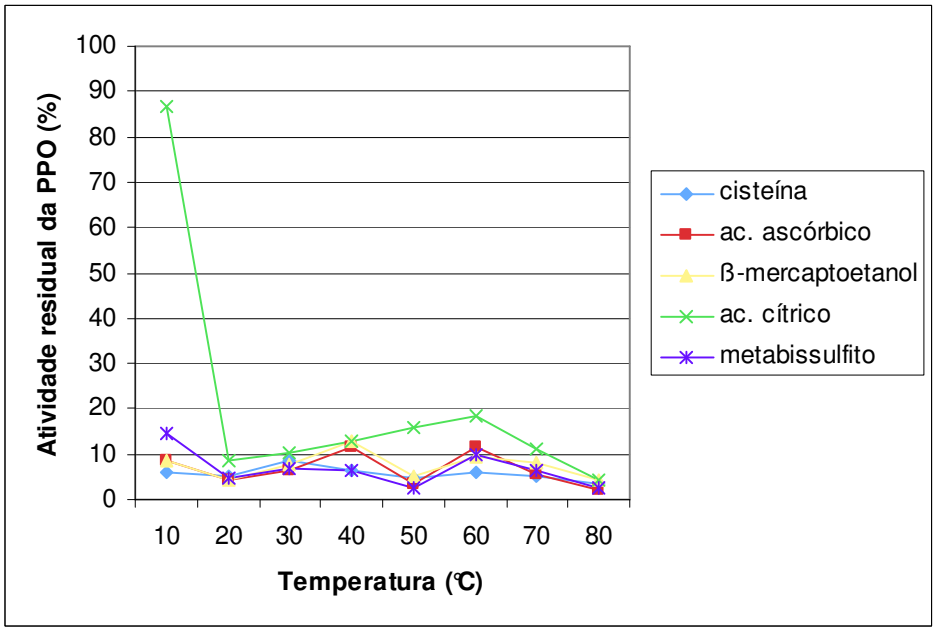


Figura 11 - Efeito dos inibidores mais efetivos na atividade da enzima PPO de pêssego em diferentes temperaturas, na concentração de 5 mM

De acordo com a **Figura 10,** observou-se que, na concentração de 1 mM e 50℃, ácido ascórbico, ß-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e cisteína inativaram a enzima PPO, deixando a atividade enzimática próxima de zero.

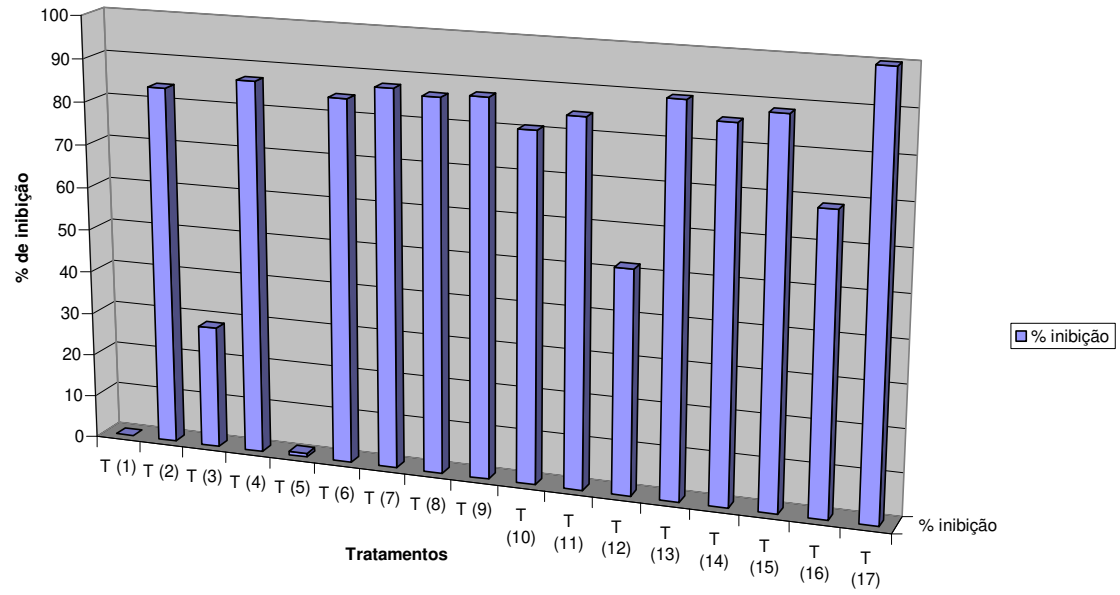
O mesmo resultado se observou a 80℃ com os mesmos inibidores. O ácido cítrico apresentou queda na atividade da enzima com o aumento da temperatura, porém, ainda manteve aproximadamente 20% de atividade a 80℃.

Na concentração de 5 mM, os inibidores apresentaram comportamento semelhante ao de 1 mM, porém se mostraram mais efetivos, sendo que o ácido ascórbico, ß-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e cisteína apresentaram atividade residual próxima de zero a 50 e 80℃. Também mostraram atividade residual baixa, em torno de 5% a 20℃. O ácido cítrico apresentou melhor ação inibitória nessa concentração, porém ainda manteve atividade residual em torno de 10% a 80℃.

4.4.2 – Efeito de compostos químicos e tratamento térmico na inativação da enzima PPO

Estes testes foram realizados com base nos tratamentos que as indústrias de alimentos utilizam no processamento de frutas, a fim de se avaliar a efetividade dos mesmos na inativação da polifenoloxidase.

Os testes são baseados no uso de inibidores associados ao tratamento térmico. Os resultados são mostrados na Figura 12.



	T (1)	T (2)	T (3)	T (4)	T (5)	T (6)	T (7)	T (8)	T (9)	T (10)	T (11)	T (12)	T (13)	T (14)	T (15)	T (16)	T (17)
% inibição	0	83,9	28,5	87	0,8	84,6	87,7	86,5	87,3	80,8	84,6	51,9	89,9	85,8	88,5	68,9	100

Figura 12 – Efeito do uso de inibidores e tratamento térmico na inativação da PPO

De acordo com a **Figura 12**, observou-se que a polifenoloxidase foi totalmente inativada com o tratamento 17, no qual o sistema foi submetido a tratamento térmico por 5 minutos a 90℃.

Houve inativação próxima a 90%, quando utilizou-se ácido cítrico 0,1% associado a tratamento térmico de 70℃ durante 2 mi nutos.

Nos demais tratamentos, com exceção de T_1 (controle), T_3, T_5, T_{12} e T_{16}, todos mostraram inativação acima de 80%.

Os tratamentos menos eficazes foram:

T_3 – ácido cítrico 0,1%;

T_5 – tratamento térmico a 70℃ por 2 minutos;

T_{12} - ácido cítrico 0,1% + EDTA 30 ppm;

T_{16} – EDTA 30 ppm.

Nesses tratamentos a inibição foi inferior a 30%, no caso da utilização de ácido cítrico a 0,1%; próxima de zero com tratamento térmico a 70℃ por 2 minutos; próximo de 50% utilizando-se uma associação de ácido cítrico 0,1% e EDTA 30 ppm e uma inativação entre 60 e 70% quando utilizou-se EDTA 30 ppm.

4.4.3 – Determinação do efeito das variáveis: pH, temperatura e concentração de inibidor sobre a atividade de PPO, utilizando a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

A **Tabela 15** mostra os valores de atividade residual de polifenoloxidase obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2^3 descrito no item 3.2.5.3.

Tabela 15 – Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de pêssego

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	| Ac. ascórbico (%)|	PPO (U/mL)
1	3,5	85	0,01	0
2	4,5	85	0,01	0
3	3,5	100	0,01	0
4	4,5	100	0,01	0
5	3,5	85	0,025	0
6	4,5	85	0,025	0
7	3,5	100	0,025	0
8	4,5	100	0,025	0
9	3,0	92	0,0175	0
10	5,0	92	0,0175	0
11	4,0	79	0,0175	0
12	4,0	105	0,0175	0
13	4,0	92	0	0
14	4,0	92	0,0350	0
15	4,0	92	0,0175	0
16	4,0	92	0,0175	0
17	4,0	92	0,0175	0

De acordo com a **Tabela 15**, observa-se que a enzima polifenoloxidase foi totalmente inativada nas condições estudadas. Diante desses resultados foi realizado um planejamento experimental 2^2, no qual fixou-se a temperatura em 95°C, a qual é comumente empregada nas indústrias de processamento de pêssego durante o tratamento térmico e variou-se o pH e a concentração de ácido ascórbico, conforme descrito em 3.2.5.4.

Os resultados são mostrados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Efeito do pH e concentração de ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de pêssego

Ensaio	pH	|Ac. ascórbico(%)|	PPO (U/mL)
1	3,5	0,006	0
2	4,5	0,006	0
3	3,5	0,019	0
4	4,5	0,019	0
5	3,0	0,0125	0
6	5,0	0,0125	0
7	4,0	0	0
8	4,0	0,025	0
9	4,0	0,0125	0
10	4,0	0,0125	0
11	4,0	0,0125	0

Conforme resultados apresentados nas **Tabelas 16**, a PPO também foi totalmente inativada nas condições estudadas no segundo planejamento experimental.

Embora a polifenoloxidase tenha apresentado inativação em todos os testes realizados, o problema do escurecimento enzimático em produtos de pêssego existe e é comum em várias indústrias, tanto do Sul quanto do Sudeste do país. A variedade de pêssego que provoca maior problema de escurecimento é o biuti. De acordo com informações das indústrias processadoras de pêssego, os produtos devolvidos muitas vezes não pertencem ao mesmo lote, sendo portanto oriundos de datas de fabricação diferentes.

O pêssego que sofre esse processo de escurecimento fica com aspecto indesejável, conforme **Figura 13.**

Figura 13 – Pêssego em calda que sofreu escurecimento enzimático comparado ao pêssego com coloração normal

Esse problema ocorre tanto em pêssegos enlatados quanto em pêssegos acondicionados em potes de vidro. A porcentagem de retorno dos produtos com coloração indesejável acondicionados em embalagem de vidro é maior, possivelmente devido à exposição do produto ao consumidor, o que não ocorre com as latas. Muitos consumidores acabam não devolvendo ao fabricante o produto enlatado com o problema de escurecimento.

De acordo com dados obtidos nas indústrias processadoras de pêssego em calda da região do sudoeste mineiro, a taxa de devolução do produto em embalagens de vidro chegou a 14 % até outubro de 2007.

Uma vez que a enzima PPO foi totalmente inativada com os testes realizados, partiu-se dos produtos escuros, devolvidos à indústria para se fazer a medida de atividade da PPO e PDO. Foram obtidos no pêssego em calda com escurecimento, 1989 (±12,4) U/mL de PPO e 1124 (±10,3) U/mL de PDO. No pêssego em calda com coloração normal não foram encontradas atividades de PPO e PDO.

De acordo com os resultados apresentados acima, observou-se que os produtos devolvidos com problema de escurecimento apresentam tanto a atividade de peroxidase quanto de polifenoloxidase e muito próximas do valor da fruta *in natura*.

Na literatura encontram-se vários estudos relatando a capacidade regenerativa da peroxidase em diversas frutas, como abacaxi (Brito *et al*., 2004), suco de laranja (Bruemmer *et al*., 1976), manga (Khan *et al*., 1993), dentre outras. Porém não se têm relatos de regeneração de polifenoloxidases até o momento.

Dessa forma, duas hipóteses podem ser levantadas: o tratamento térmico empregado na maioria das indústrias é eficiente e portanto capaz de garantir a total inativação da PPO, sendo portanto o escurecimento um problema inerente à técnica de aplicação do processo. Uma segunda hipótese seria que tanto a PDO quanto a PPO encontrada nessa variedade de pêssego apresentam capacidade regenerativa. Para PPO este fato ainda não foi relatado em outras frutas.

No caso da primeira hipótese, o problema estaria no processamento que a indústria executa, ou seja, pode estar havendo falhas no processo de tratamento térmico. Porém, como citado anteriormente, este problema não é peculiar a uma indústria, mas sim a várias indústrias do setor, de diferentes regiões do país, o que torna pouco aceita essa hipótese.

No caso da segunda hipótese, não se pode afirmar sem estudos mais aprofundados essa possível capacidade regenerativa da PPO. Seria necessário que se preparassem os produtos em laboratório (pêssego em calda, por exemplo), com controle efetivo das variáveis de processo, principalmente pH e temperatura. Posteriormente deveria se fazer um acompanhamento periódico da atividade enzimática durante a vida de prateleira desses produtos.

Com relação à variedade biuti, observa-se na indústria de processamento de pêssego que o problema de escurecimento dos produtos processados durante a vida de prateleira é mais acentuado nessa cultivar quando comparada aos demais, sendo apropriado portanto, que os estudos sejam feitos com essa variedade.

Sendo assim, para concluirmos a causa e posterior resolução do problema de escurecimento provocado pela ação da PPO e PDO serão necessários outros estudos.

4.5 – Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

4.5.1 – Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação da quantidade de compostos fenólicos totais foi feita no pêssego congelado (A), pêssego em calda (B) e polpa (C), conforme item 3.2.6.2. Esta avaliação foi realizada em extratos obtidos por três métodos de extração, nos quais foram utilizados três solventes diferentes: acetona, etanol e metanol de acordo com item 3.2.6.1. Esta avaliação foi realizada durante 4 meses consecutivos, a fim de se avaliar a variação da quantidade desses compostos com o tempo. Os resultado são mostrados nas **Tabelas 17, 18 e 19.**

Tabela 17 – Concentração de fenólicos totais da amostra A (pêssego congelado) extraídos com acetona, etanol e metanol

Mês	Fenólicos Totais (mg ac. gálico /mL)		
	acetona	etanol	metanol
1	0,018 ± 0,001	0,053 ± 0,002	0,083 ± 0,001
2	0,018 ± 0,001	0,052 ± 0,001	0,087 ± 0,002
3	0,018 ± 0,002	0,054 ± 0,001	0,085 ± 0,002
4	0,019 ± 0,001	0,052 ± 0,002	0,087 ± 0,002

Tabela 18 – Concentração de fenólicos totais da amostras B (pêssego em calda) extraídos com acetona, etanol e metanol

	Fenólicos Totais (mg ac. gálico /mL)		
Mês	acetona	etanol	metanol
1	0,012 ± 0,001	0,155 ± 0,002	0,039 ± 0,002
2	0,012 ± 0,001	0,153 ± 0,001	0,040 ± 0,002
3	0,013 ± 0,002	0,155 ± 0,002	0,041 ± 0,001
4	0,012 ± 0,001	0,156 ± 0,002	0,039 ± 0,002

Tabela 19 – Concentração de fenólicos totais da amostras C (polpa de pêssego) extraídos com acetona, etanol e metanol

	Fenólicos Totais (mg ac. gálico /mL)		
Mês	acetona	etanol	metanol
1	0,016 ± 0,002	0,208 ± 0,003	0,142 ± 0,003
2	0,015 ± 0,001	0,210 ± 0,002	0,140 ± 0,002
3	0,016 ± 0,002	0,211 ± 0,003	0,145 ± 0,001
4	0,016 ± 0,002	0,212 ± 0,001	0,141 ± 0,001

De acordo com os dados das **Tabelas 17, 18** e **19**, observou-se que a extração feita com acetona foi menos eficiente que a feita com etanol e metanol, para todas as amostras.

No caso da fruta congelada (A), a extração feita com metanol foi a que promoveu maior extração de compostos fenólicos, enquanto que para a fruta em calda (B) e a polpa (C), a extração com etanol obteve resultado maior.

Este resultado foi semelhante ao obtido por Chung *et al.*, (2005) para determinar a quantidade de fenólicos totais em semente de uva. Foram utilizados

vários solventes para a extração, dentre eles acetona e metanol. Observou-se que o metanol promoveu maior extração de fenólicos , seguido pela acetona.

Para determinação de fenólicos totais em grãos de trigo roxo, Li *et al*., (2007) comparou a extração feita com diferentes solventes. Observou-se que o etanol foi mais eficiente que o metanol em todas as frações dos grãos.

Portanto, analisando os resultados obtidos e a literatura, não se conclui qual o solvente mais eficiente na extração dos compostos fenólicos. Cabe ao pesquisador fazer sempre as análises e observar os resultados.

As **Figuras 14, 15 e 16** mostram a variação da concentração de compostos fenólicos com o tempo.

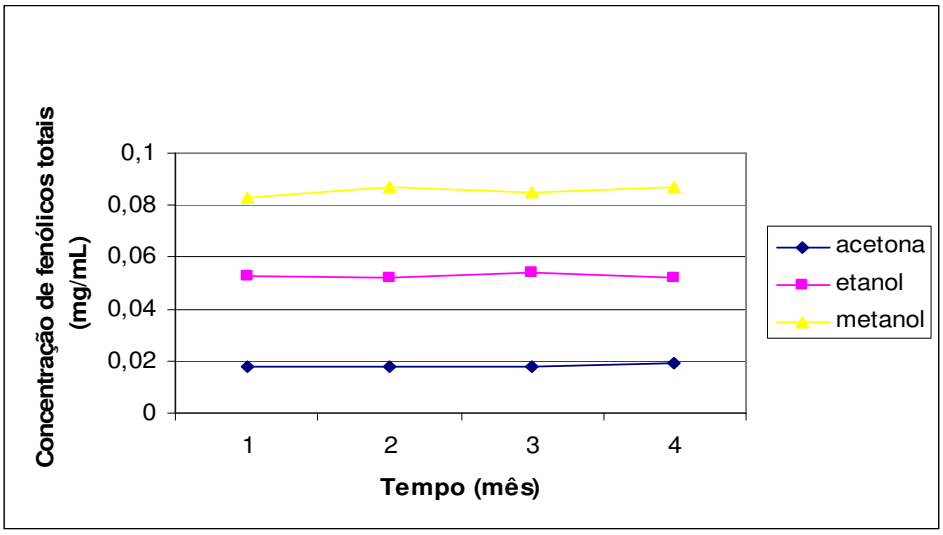


Figura 14 – Variação da concentração de compostos fenólicos no pêssego congelado (A)

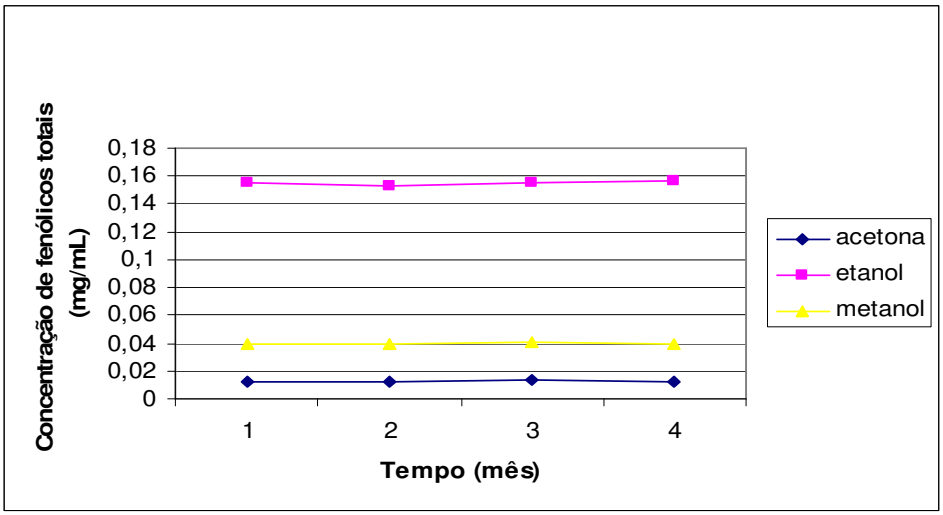


Figura 15 – Variação da concentração de compostos fenólicos no pêssego em calda (B)

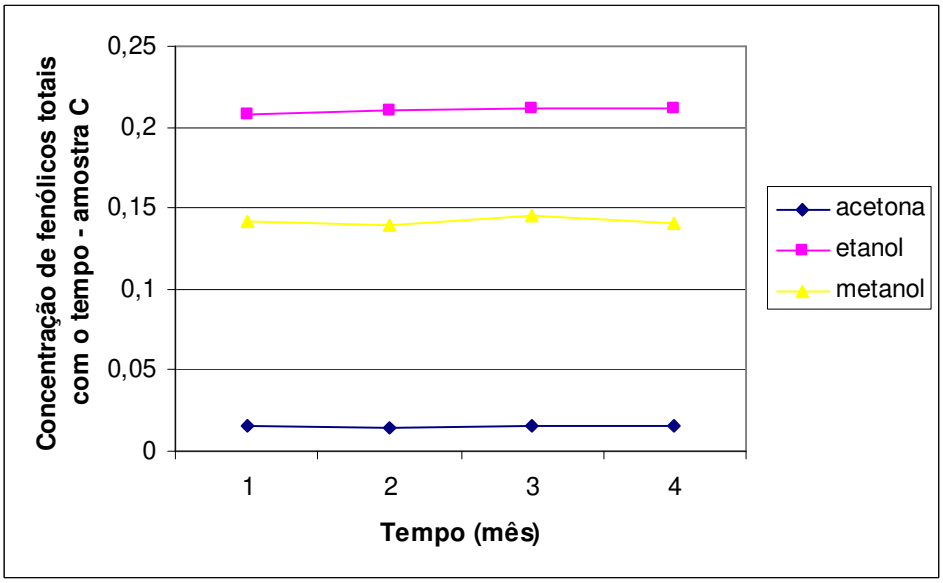


Figura 16 – Variação da concentração de compostos fenólicos na polpa de pêssego (C)

Com relação à variação da quantidade de compostos fenólicos com o tempo, observou-se de acordo com as **Figuras 14, 15** e **16** que, em todas as extrações, a quantidade desses compostos se mantiveram praticamente constantes, indicando que durante a vida de prateleira não há variação desses compostos.

Chaovanalikit *et al*., (2004) comparou a concentração de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante em cerejas *in natura* com cerejas congeladas e enlatadas. Observou – se que houve uma degradação das antocianinas e compostos fenólicos na fruta congelada em relação à fruta fresca. Porém não houve diminuição da capacidade antioxidante, o que levou-o a concluir que produtos da degradação das antocianinas e de polifenólicos mantêm a capacidade antioxidante.

Com relação às cerejas enlatadas, observou-se que o tratamento térmico do processamento não provocou diminuição das antocianinas, compostos fenólicos e antioxidantes, quando os valores das análises das frutas e do xarope foram combinados. Isto pode ser devido ao aumento da eficiência da extração na fruta quando amolecida. Altas temperaturas podem aumentar a permeabilidade das membranas, facilitando a extração de fenólicos.

A variação da concentração de fenólicos em alimentos processados pode estar associada à complexação destes com peptídeos presentes na amostra. No entanto, nos casos de frutas este fenômeno parece não ocorrer o que poderia explicar a taxa de variação ao longo do tempo tão pequena. Esta observação poderia também explicar porquê a atividade de polifenoloxidase ao longo do shelf life é possível, pois encontramos compostos fenólicos disponíveis na amostra.

4.5.2 – Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do ß-caroteno e ácido linoléico. Os extratos foram obtidos a partir de três extrações diferentes de acordo com item 4.2.6.1. As **Tabelas 20, 21** e **22** apresentam os resultados dos índices de antioxidação determinados durante o período de monitoramento dos produtos: fruta congelada (A), pêssego em calda (B) e polpa (C).

Os índices foram calculados pela razão entre a taxa de branqueamento controle e a taxa de branqueamento das amostras.

Tabela 20 – Índice de antioxidação da fruta congelada (A) (extração com acetona, etanol e metanol).

	Índice de antioxidante			
Mês	**acetona**	**etanol**	**metanol**	**ácido gálico**
1	1,18	1,59	1,67	2,67
2	1,00	1,62	1,64	
3	1,27	1,68	1,74	
4	1,23	1,65	1,69	

Tabela 21 – Índice de antioxidação de pêssego em calda (B) (extração com acetona, etanol e metanol)

	Índice de antioxidação			
Mês	**acetona**	**etanol**	**metanol**	**ácido gálico**
1	0,69	1,26	1,11	2,67
2	0,82	1,16	1,09	
3	0,78	1,21	1,06	
4	0,75	1,25	1,09	

Tabela 22 – Índice de antioxidação de polpa de pêssego (C) (extração com acetona, etanol e metanol)

	Índice de antioxidação			
Mês	**acetona**	**etanol**	**metanol**	**ácido gálico**
1	0,98	2,13	1,12	2,67
2	1,02	2,08	1,15	
3	1,04	2,04	1,04	
4	1,03	2,06	1,17	

De acordo com as **Tabelas 20, 21** e **22**, a amostra que apresentou maior atividade antioxidante foi a polpa de pêssego. Porém, a comparação com o padrão ácido gálico foi feita apenas com a fruta congelada, uma vez que tanto a polpa quanto o pêssego em calda têm adição de antioxidantes durante seu processamento. Sendo assim, observou-se que a fruta congelada apresenta em média 63% da atividade antioxidante em relação ao padrão ácido gálico.

A variação da capacidade antioxidante das amostras ao longo do tempo de analise, foi muito pequena, não significativa. No caso das amostras processadas, pode ser devido a adição de antioxidantes do processo. No entanto, com relação à amostra *in natura* congelada, a variação é pequena e pode estar associada também a baixa variação da concentração dos compostos fenólicos.

Com relação a forma de extração, observa-se que a extração com acetona não foi eficiente nas três amostras analisadas. A amostra A (pêssego congelado) apresentou índice de antioxidação maior na fração extraída com metanol, seguido pelo etanol. A amostra B (pêssego em calda) apresentou índice de antioxidação maior na extração com etanol, seguido do metanol. Esse resultado foi semelhante no caso da polpa de pêssego (C).

Wang *et al*., (1996) estudou a capacidade antioxidante de várias frutas (morango, uva e laranja) utilizando acetona como solvente de extração, variando o tempo de extração de 2 minutos, 30 minutos, 2 horas e 4 horas. Concluiu que a quantidade de compostos antioxidantes extraídos de 2 minutos a 4 horas não foram significativamente diferentes.

Comparando a concentração de fenólicos e o índice de antioxidação das amostras pode-se concluir que a ação antioxidante das amostras: pêssego congelado, pêssego em calda e polpa de pêssego se dá pela ação de compostos fenólicos, uma vez que são diretamente proporcionais.

5 – CONCLUSÕES

O pêssego (*Prunus persica* (L). Batsch) *cv*. biuti contém peroxidase e polifenoloxidase.

A partir da extração e precipitação das enzimas com acetona, foi obtida maior fração de polifenoloxidase.

A polifenoloxidase (PPO) do pêssego apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 e temperatura de 20℃.

A enzima se mostrou estável, com atividade superior a 80% após 30 minutos de tratamento térmico na faixa de 15 a 40°C. Na faixa de pH 7,0 a 8,0 a atividade ainda se manteve a níveis de 70 a 90% de atividade, decrescendo bruscamente a pH 8,5.

Com relação à ação dos inibidores, dentre os compostos testados, os mais eficientes foram: ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, ß-mercaptoetanol e L-cisteína, inibindo aproximadamente 100% da enzima nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM.

A partir do estudo da inativação enzimática, observou-se que, na concentração de 0,001 M e 50℃, ácido ascórbico, ß-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e L-cisteína inativaram a enzima PPO, foram os mais eficientes deixando a atividade enzimática próxima de zero. Na concentração de 0,005 M, os inibidores apresentaram comportamento semelhante ao de 0,001 M, porém se mostraram mais efetivos, sendo que o ácido ascórbico, ß-mercaptoetanol, metabissulfito de sódio e cisteína apresentaram atividade residual próxima de zero a 50 e 80℃.

A aplicação do método de planejamento experimental para avaliar a interação das variáveis pH, temperatura e concentração de inibidor no

comportamento da atividade da PPO, mostrou que a enzima é totalmente inativada nas condições de processo aplicadas na indústria de alimentos. Isso nos leva a duas hipóteses: o problema do escurecimento enzimático pode ser decorrente de falhas durante a aplicação do tratamento térmico pela indústria ou a PPO do pêssego biuti apresenta propriedades de se regenerar durante a vida de prateleira. Para se ter uma resposta precisa será necessário que outros estudos sejam feitos.

Na avaliação de fenóis totais, concluímos que a fração que apresenta maior concentração desses compostos é a polpa de pêssego, seguida do pêssego em calda e pêssego congelado. A melhor solução de extração é a de etanol, tanto para a polpa de pêssego quanto para o pêssego em calda. No caso do fruto congelado, a melhor solução de extração foi a de metanol.

Observou-se que durante o monitoramento da concentração de compostos fenólicos nas três amostras, que ambas se mostraram estáveis, ou seja, não houve variação das concentrações desses compostos.

A partir da avaliação da ação antioxidante, da mesma forma que a determinação da concentração de fenóis totais, a fração que apresentou maior índice de antioxidação foi a polpa de pêssego, o que nos leva a constatar que ação antioxidante do pêssego biuti se dá por ação de compostos fenólicos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, J. B. Regeneration and kinetics of peroxidase inactivation. **Food Chemistry**. V. 60, nº 2: 201-206, 1997.
2. AMES, B. N.; SHINEGANA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidnts and the degenerative diseases of aging, **Proc. Natl. Acad. Cse**., USA, 90: 7915-7922, 1993.
3. ANTUNES, L. E. C. A cultura do pessegueiro e da ameixeira no Estado de Minas Gerais. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.18. n. 189, p: 14-17, 1997.
4. ANUÁRIO ESTATÍSTICO IBGE: **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -** IBGE (1988).
5. BARROS NETO B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Ed. Unicamp. Campinas, 2001.
6. BATE-SMITH, E. C.; SWAYS, T. In: Mason, H. S.; Flordakin, A. M. Comparative biochemistry. New York, Academic Press, 1962, v. 3, p. 764.
7. BEATTIE, D. S. Bioenergética e metabolismo oxidativo In: DELVIN, T. M. (Coord.) **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 1ª edição, 2003.
8. BEN-SHALOM, N.; KAHN, V.; HAREL, E.; MAYER, A.M. Cathecol oxidase from green olives and partial purification. **Phitochemistry**, 16: 1153-1158, 1977.
9. BOX, G. E. P. HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: **An introduction to designs, data analysis and model building**. Wiley, New York, 1978.
10. BRANDELLI, A.; LOPES, C. H.G.L. Polyphenoloxidase potencial and phenolic content of peaches during postharvest ripening. **Journal of Food Science**. 29: 624-637, 2005.
11. BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Características da Atividade de Peroxidase em Abacaxis (*Ananas comosus*

(L) Merrill) da Cultivar IAC Gomo-de-Mel e do Clone IAC-1. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. 25(2): 244-249, Campinas, 2005.

12. BRUEMMER, J.H.; ROE, B.; BOWEN, E. R. Peroxidase reactions and orange juice quality. **Journal of Food Science**, 41:186-189,1976.

13. BURNETTE, F. S., Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: a review. **Journal of Food Science.** 42: 1-6, 1977.

14. CANO, P. M.; ANCOS, B.; LOBO, G. Peroxidase and Polyphenoloxidase activities in Papaya during postharvest ripening and after freezing/thawing. **Journal of Food Science.** 60: 815-820,1995.

15. CASH, J. N.; SISTRUNK, W. A.; STUTTE, S. A. Characteristic of Concord grape polyphenol oxidase involved in juice color loss. **Journal of Food Science**. 41: 1398-1402, 1976.

16. CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal of Food Science**. 69: 67-72, 2004.

17. CHITARRA,M.I.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990, 293 p.

18. CHITINDIGUI, K.; NASHLALA, A. R.; CHAPANO, C.; BENHURA, M. A.; MUCHUWETI, M. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybrydus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *Panicum maximum* (Guinea grass). **Journal of Food Biochemistry.** 31: 206-216, 2006.

19. CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges, **Phytochemistry**. V. 49, nº 1: 29-36, 1998.

20. COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids, chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Nutrition Biochemistry.** 7:66-76, 1996.

21. COSETENG, M. Y. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. **Journal of Food Science.** 52: 985-989, 1987.

22. DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S. Characterization of polyphenoloxidase from Medlar fruits (*Mespillus germanica* L., Rosacea). **Food Chemistry**. V. 77: 1-7, 2002.

23. DODD,M.C.; HARTMANN,P.E.O.; DE KOCK,V.A. Influence of temperature manipulations on the storage quality of peaches and nectarines. **Deciduous Fruit Grower**, v.36,n. 12,p.517-520, 1986.

24. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado (Pelotas, RS). Sistema de produção. Pelotas. Vol. 4, 2005.

25. EMBRAPA-CNPFT, Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, Pelotas, **A cultura do Pessegueiro**. Pelotas, 156p. (EMBRAPA-CNPFT, Circular Técnica, 10), 1984.

26. ERAT, M.; SAKIROGLU, H.; KUFREVIOGLU, O. I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. **Food Chemistry**. 2005

27. ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. **Journal of Food Chemistry**. 45: 4209-4214, 1997.

28. ESKIN, M. N. A. Biochemistry of food spoilage: Enzymatic Browning. IN: ESKIN, M.N.A. **Biochemistry of Foods**. 2. ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1990. p. 401-432.

29. ESKIN, M. N. A.; HANDERSON, H.M.; TOWNSED, R.J. **Biochemistry of food.** New York: Academic Press, Inc., 1971. p. 239.

30. FREI, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidants action. **FASEB**, 13: 963-964, 1999.

31. FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUDA, T.; HAYASHI, N.;. TONO, T Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal pf Agricultural and Food Chemistry**. 43: 1138-1142, 1995.

32. FUJITA, S.; TONO, T. Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*). **Journal Science Food and Agriculture**. 46: 115-123, 1988.

33. FUJITA, S.; TONO, T; KAWAHARA, H. Purification of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). **Journal of Food Science.** 55: 643-651, 1991.

34. FLURKEY, W.H.; JEN, J.J. Peroxidase and polyphenol oxides activities in developing peaches. **Journal of Food Science**. 43: 1826-1831, 1978.

35. GALEAZZI, M. A. M., SGARBIERI, V. C. Isolation, purification and physico-chemical characterization os polyphenol oxidases from a dwarf cariety of banana (*Musa cavendishii* L.). **Journal of Food Science** 46: 150-155, 1981.

36. GARROTE, R. L.; LUNA, J. A.; SILVA, E. R.; BERTONE, R.A. Prediction of residual peroxidase activity in the blanching-cooling of corn-on-the-cob and its relation to off-flavour development in frozen storage. **Journal of Food Science.** 52:232-235,1987.

37. GASULL, E.; BECERRA, D. Caracterización de Polifenoloxidase Extraída de Pêra (CV. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). Información Tecnológica. 17: 69-74, 2006.

38. GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peachs and Plum Cultivars from California. **Journal Agriculture of Food Chemistry**. 50: 4976-4982, 2002.

39. GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, R. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**. 2: 371-383, 1964.

40. GUIMARÃES, L. Sinal vermelho para o pêssego grego. Gazeta Mercantil, 22,23 e 24 de outubro de 1999 : B 22.

41. HAREL, E.; MAYER, A.M. Cathecol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples. **Journal of Science Food and Agiculture**. 17:389-392, 1966.

42. HAMMERSCHIMIDT, P.A.; PRATT, D.E.. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**. 43, 556-559, 1978.

43. HOLLAND, N. Conservação pós-colheita de pêssegos (cv. BIUTI): Interação entre cálcio e temperatura, Lavras, 1993, 116 p. **Tese de**

mestrado em Ciências de Alimentos – Escola Superior de Agricultura de Lavras – Minas Gerais.

44. HOLSCHUH, H.J. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola L.*), Campinas, 2000, 159 p. **Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

45. HUNSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. 26: 2489-2491, 1987.

46. IMEH, U.; KHOKHAR, S. Distribution of Conjugateds and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 50: 6301-6306, 2002.

47. JAIM, J. C.; TAKEO, T. A review of enzymes of tea and their role in tea making. **Journal of Biochemistry**. 8:243-279, 1984.

48. JEN, J.J.; KAHLER, K. R. Characterization of polyphenoloxidase in peaches grown in the Southeast. **Hortscience**. 9: 590-591, 1974.

49. JOSLYN, M.A. and GOLDSTEIN, I. L. Adstringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. **Advances in Food Research**. New York, 30: 179-209, 1964.

50. KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEIKKI, J. V.; JUSSI-PEKKA, R.; PIHLAJA, K. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 47: 3954-3962, 1999.

51. KANEHIRA, T.; NARUSE, A.; FUKUSHIMA, A.;SAITO, K. Decomposition of carthamin in aqueous solutions: influence of temperature, pH, light, buffer systems, external gas phases, metal ions, and certain chemicals. **European Food Research and Technology**, 1990.

52. KHAN, A. A. and ROBINSON, D. S., The thermoestability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry.** 47: 53-59, 1993.

53. LEE, C.; KAGAN, V.; JAWORSKI, A. W.; BROWN, S. K. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity

among various peach cultivares. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 38: 99-101, 1990.

54. LEE, M. Y.; SOO, K. S. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents. **Phytochemistry**. V. 49, nº1: 23-27, 1998.

55. LIMA, E. D. P. A. Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família anonácea pinha (*Annona squamosa* L.) Campinas, 1999, 132 p. **Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

56. LIN, Z.; CHEN, L.; ZHANG, W. Peroxidase from Ipomoea cairica (L.) SW. Isolation, purification and some properties. **Process Biochemistry.** 31 (5): 443-448, 1996.

57. LU, A. T.; WHITAKER, J. R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horsehadish peroxidase. **Journal of Food Science**. 39: 1173-1178, 1974.

58. MADAIL, J.M.C. **Aspectos da produção de pêssego no Brasil e sua relação com o MERCOSUL**. Pelotas : Embrapa- CPACT, 1994, 34 p.

59. MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology.** 6: 195-200, 1995.

60. MAYER, A. M. & HAREL, E. Review: Polyphenol oxidases in plants . **Phytochemistry**. 18: 193-215, 1979.

61. MARTINS, C. R.; CANTTILANO, R. F. F.; FARIAS R. M.; ROMBALDI, C. V. Atividade de polifenoloxidase e compostos fenólicos em pós-colheita de pêssegos cultivados em pomar com cobertura vegetal e cultura tradicional. **Ciência Rural**, 34:749-754, 2004.

62. MARQUÈS, L.; FLEURIET, A.; NACHEIX, J.J. Fruit polyphenoloxidase, New data to an old problem, **ACS Symp. Ser**. 600, 90-102, 1995.

63. MEDEIROS, C. A. B.; ROSEIRA, M. C. B. **A cultura do pessegueiro.** Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998. 350p.

64. MISHRA, B.; INDIRA-PRIYADARSINI, K.; SUDHERKUMAR, M.; UNNIKRISHHNAN, M. K.; MOHAN, H. Pulse radiolysis studies of mangiferin, A C-glycosyl xanthone isolated from Mangifera indica. **Radiation Physics and Chemistry**. *in press*, 2005.

65. MOULDING, P. H.; GRANT, H. F.; McLELLAN, K.; ROBINSON, D.S. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. **International Journal of Food Science and Technology**. 22: 391, 1987.

66. NICOLAS, J. J. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 34, n.2, p. 109-157, 1994.

67. OKTAY, M.; KÜFREVIOGLU, I.; KOCACALISKANI, S. H. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **Journal of Food Science**. 60: 494-505, 1995.

68. PRATT, D,E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**. 44:1720-1723, 1979.

69. PIFFERI, P. G.; CULTER, R. Enzymatic degradation of anthocyanins: The role of sweet cherry polyphenol oxidase. **Journal of Food Science**. 39: 786-791, 1974.

70. REYES, P. and LUH, B.S. Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. **Food Technology.** 14: 570, 1960.

71. ROBAK, J.; DRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxid anion. **Biochemical Pharmacology**. 37:83-88, 1988.

72. ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids, **A Review Analyst**. 122:11R-22R, 1997.

73. RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento Experimental e Otimização de Processos**. Editora Casa do Pão, 1ª edição, Campinas – SP, 2005.

74. SANTOS, H. R. **Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açaí** (*Euterpe oleracea*), Campinas, 109 p, Tese (Mestre e Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

75. SANDERSON, G. W. Extraction of soluble catechol oxidase from tea shoot tips. **Biochim. Biophys. Acta.** 92:622-624, 1964a.

76. SANDERSON, G. W. Changes in the level of polyphenoloxidase activity in tea flush on storage after plucking. **Journal of Science Food and Agriculture.** 15: 634-638, 1964b.

77. SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLEGRINE, N.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruits. **Nutrition**, 21: 207-213, 2005.

78. SENTER, S. D.; CALLAHAN, A. Variability in the quantities of condensed tanins and other major phenols in peach fruit during maturation. **Journal of Food Science.** 55(6): 1585-1587, 1990.

79. SERRADELL, M. A.; ROZENFELD, P. A.; MARTINÉZ, G. A.; CIVELLO, P. M.; CHAVES, A. R.; AÑON, M. C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80: 1421-1427, 2000.

80. SESSA, D. J. and ANDERSON, R. L. Soybean peroxidases: Purification and some properties. **Journal Agriculture Food Chemistry.** 29: 960-965, 1968.

81. SIDIQQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. **Journal of Food Science**. V. 57, n.5: 1177-1179, 1992.

82. SIDIQQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N.; HANUM, T. Partial purification of polyphenol oxidase from plums (Prunus domestica L., cv. STANLEY). **Journal of Food Biochemistry**. V. 20:111-123, 1996.

83. TORALLES, Ricardo. P.; VENDRUSCOLO, João L.; HAAS, Lírio. I. R.; FERRI, Núbia L.; DEL PINO Francisco A. B. ;ANTUNES, Pedro L. Caracterização parcial do escurecimento enzimático por polifenoloxidase em pêssegos cv. Granada, Jade, Esmeralda e Maciel. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 241-244, abr-jun, 2004.

84. ÜNAI, M. U.; SENER, A. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv Emir). **Journal of Food Science**. 86,p: 2374-2379, 2006.

85. ÜNAI, M. U. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). **Food Chemistry**, 3: 909-913, 2007.

86. VALDERRAMA, P.; MARANGONE, F.; CLEMENTE, E. Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em Maçã (*Mallus comunis*). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. 21(3): 321-325, Campinas, 2001.

87. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Poliphenoloxidase and peroxidase in fruit and vegetables. **CRC – Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 49, 1981.

88. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L.; NÁDUDVARI-MÁRKUS, V. Enzymatic browning, polyphenoloxidase and peroxidase activies in pear cultivars. **Acta Alimentaria.** v. 11, p. 157-160, 1982.

89. VINSON, J. A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIN, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 46: 3630-3634, 1998.

90. VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. **Methods Enzymol**.. 335: 103-114, 2001.

91. WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **In analysis of phenolic plant metabolities**; WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Eds; Backwell Scientific Publications: Oxford, U.K., 1994.

92. WANG,J.; JIANG, W.; BAOGANG, W.; LIU, S.; ZHENGLI, G.; LUO, Y. Partial Properties of Polyphenol Oxidase in Mango (*Mangifra indica* L. *cv*. "Taiong") Pulp. **Journal of Food Biochemistry**, 31: 45-55, 2006.

93. ZAWISTWSKI, J.; BILIADERIS, S. G.; ESKIN, N. M. A. Polyphenol Oxidase. In: ROBINSON, D. S. and ESKIN, N. A.M. **Oxidative Enzymes in Foods**. London e New York: Elsevier Applied Science, 1991. cap. 6, p. 217-273.

94. ZHOU, H.; BEN-ARIE, R.; LURIE, S. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. **Phytochemistry**. 55, p. 191-195, 2000.

95. ZIYAN, E.; PEKYARDIMCI, S. Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichole (*Helianthus tuberosus*). **Turk Journal Chemistry**. 27: 217-225, 2003.