



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ESTUDO BIOQUÍMICO DE ALGUMAS
CARACTERÍSTICAS DA PEROXIDASE,
POLIFENOLOXIDASE E PECTINAMETILESTERASE
DE AMORA PRETA
(*Rubus spp*)

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

Daniela Paiva Guimarães

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora

Campinas

2006

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Daniela Paiva Guimarães, aprovado
pela Comissão Julgadora em 15 de
fevereiro de 2006.

Campinas, 15 de fevereiro de 2006.

Hélia Harumi Sato

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca



Folha de Aprovação

Autora: Daniela Paiva Guimarães

Título: Estudo bioquímico de algumas características da peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora preta (*Rubus spp*)

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

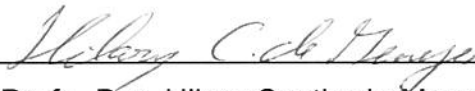
Data de aprovação: __/__/__



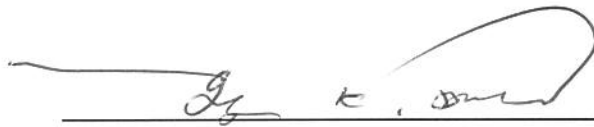
Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes



Prof. Dr. Yong Kun Park

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A meus pais, meus irmãos e minha Tia Adelina, por todo o carinho, suporte e compreensão.

Ao Tomu, pelos onze anos de amor e companheirismo e pela infinita paciência e generosidade demonstradas nos últimos anos, dedicados a esta tese.

À minha orientadora Hélia, pela confiança no meu trabalho e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos.

À Sadia, uma empresa que tem a cultura de valorizar o conhecimento, e em especial ao Sr. Getúlio Takahashi pelo encorajamento.

A todos os colegas de laboratório, a Beatriz e Guilherme , e em especial aos companheiros dos fins de semana, que tornaram mais leve a rotina dos experimentos: Haroldo, Márcia, Luciana Fleury, Luciana Ferracini, Fernanda, Gisele, Vânia, Mariana.

Aos colegas de Sadia, em especial aos companheiros de sala, Marília, Anderson e Dárcio, e a Maria Cristina, por serem bons ouvintes e bons conselheiros.

Às professoras Helena Teixeira Godoy e Hilary Castle de Menezes e ao professor Yong Kun Park.

A todos que contribuíram, de uma forma ou de outra, para a realização deste sonho.

RESUMO

As reações enzimáticas são fatores limitantes para a vida de prateleira de alimentos congelados. Muitas enzimas são capazes de catalisar reações em temperatura de congelamento, levando a alterações de sabor, cor e textura. A inativação térmica destas enzimas é o método usual de controle dos seus efeitos deletérios. O tratamento térmico, entretanto, causa perda do frescor em frutas. O objetivo deste trabalho foi investigar as características bioquímicas das enzimas da amora preta e propor métodos de controle para a sua atividade nas condições de comercialização de produtos congelados. Foi detectada a presença das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase na amora. A peroxidase, presente nas formas solúvel e ionicamente ligada, foi caracterizada bioquimicamente. A fração solúvel de peroxidase de amora apresentou atividade ótima a 35°C e 50°C e pH de 4 a 6. A fração ionicamente ligada apresentou atividade ótima a 40°C e pH 6. Ambas as frações de peroxidase se mostraram estáveis a tratamentos térmicos na faixa de 30 a 70°C por 60 minutos. Os tratamentos térmicos em temperaturas inferiores a 85°C permitiram regeneração parcial da atividade da enzima. O tratamento térmico necessário para sua completa inativação foi de 90°C durante 30 segundos. A peroxidase solúvel de amora foi inibida por metabissulfito de sódio, L-cisteína, ácido ascórbico e MnSO_4 e ativada pela adição de 5 mM de CaCl_2 . O método de planejamento experimental avaliou os efeitos das variáveis temperatura, pH e concentração de inibidor nas atividades de peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora. A atividade de peroxidase de amora foi inibida a 8°C, na faixa de pH estudada (4,0 a 5,5), com adição de 50 ppm de ácido ascórbico. A polifenoloxidase foi inibida, na faixa de pH (4,0 a 5,5) e temperatura (8 a 25°C) estudada, pela adição de 50 ppm de ácido ascórbico. Na ausência de ácido ascórbico, a atividade foi quase completamente inibida em valores de temperatura e pH inferiores a 18°C e 5,5, respectivamente. A pectinametilesterase, a 25°C, pode ser quase completamente inibida, sem adição de ácido ascórbico, pela redução do pH para 4,0 ou pela manutenção da temperatura na comercialização abaixo de 8°C.

ABSTRACT

Enzymatic reactions are frequently responsible for limitations in frozen food shelf-life. Many enzymes are able to slowly catalyse reactions at temperatures below the freezing point. They lead to the development of off-flavors and changes in food color and texture. The most usual way to control the spoilage caused by enzymes is their heat inactivation. However, heat treatment may cause flavor alterations in vegetables and fruits. This work aimed to study some of the biochemical characteristics of the enzymes present in blackberry and indicate alternative methods to control their activity under normal commercialization conditions. The study showed the presence of peroxidase, polyphenoloxidase and pectinmethylesterase in blackberry. Peroxidase, present in both soluble and membrane-bound forms, was characterized. Soluble blackberry peroxidase showed maximum activity at 35°C and 50°C and pH 4 to 6. The membrane-bound fraction showed maximum activity at 40°C and pH 6. Both peroxidase fractions were stable to heat treatments from 30°C to 70°C for 60 minutes. Heat treatment below 85°C allowed for partial regeneration of the enzyme activity. The heat treatment required to promote complete inactivation of both peroxidase forms was 30 seconds at 90°C. The soluble blackberry peroxidase was inhibited by sodium metabisulfite, L-cystein, ascorbic acid and of MnSO_4 . Addition of 5 mM CaCl_2 increased the blackberry peroxidase activity. The experimental design method evaluated the effects of the variables temperature, pH and ascorbic acid content on the activities of peroxidase, polyphenoloxidase and pectinmethylesterase. Blackberry peroxidase activity may be inhibited at 8°C, in the pH range studied (4.0-5.5), by the addition of 50 ppm of ascorbic acid. Polyphenoloxidase may be inhibited in the evaluated pH (4.0-5.5) and temperature (8-25°C) ranges by the addition of 50 ppm of ascorbic acid. In the absence of ascorbic acid, polyphenoloxidase activity was almost completely inhibited at temperature and pH values lower than 18°C and 5.5, respectively. Pectinmethylesterase may be almost completely inhibited at 25°C, without the addition of ascorbic acid, by lowering the pH to 4.0 or by keeping the temperature below 8°C throughout commercialization.

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - AMORA.....	3
2.1.1 – Características gerais	3
2.1.2 – Aspectos comerciais	4
2.1.3 – Aspectos nutricionais e funcionais.....	5
2.2 – AÇÃO DE ENZIMAS EM ALIMENTOS CONGELADOS	6
2.3 - PEROXIDASE.....	8
2.3.1. – Características gerais	8
2.3.2 – Efeitos da atividade de peroxidase em alimentos.....	10
2.3.3 – Reação geral e mecanismo da peroxidase.....	12
2.3.4 – Regeneração da peroxidase.....	12
2.3.5 – Inibidores da atividade da peroxidase.....	14
2.4 - POLIFENOLOXIDASE	18
2.4.1 – Características gerais	18
2.4.2 – Efeitos da atividade de polifenoloxidase em alimentos.....	19
2.4.3 – Efeito de substâncias químicas na atividade de polifenoloxidase: inibidores e ativadores	20
2.5 – PECTINAMETILESTERASE	23
2.5.1 – Características gerais	23
2.5.2 – Reação e mecanismo da pectinametilesterase	24
2.5.3 – Efeitos da atividade de pectinametilesterase em alimentos.....	24
2.5.4 – Inibição e controle da atividade da pectinametilesterase.....	26
2.6 – APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	27

3 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 – EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS PEROXIDASE, POLIFENOLOXIDASE E PECTINAMETILESTERASE SOLÚVEIS E IONICAMENTE LIGADAS DE AMORA	30
3.1.1. – Polpa de amora	30
3.1.2. – Extração das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase solúveis de amora	30
3.1.2.1 – Obtenção das enzimas solúveis por fracionamento com sulfato de amônio	30
3.1.2.2 – Obtenção das enzimas solúveis por precipitação com acetona	31
3.1.3. – Obtenção das enzimas ionicamente ligadas à polpa	32
3.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
3.2.1. – Determinação da atividade de polifenoloxidase (PFO)	33
3.2.2. – Determinação da atividade de peroxidase (POD)	34
3.2.3. – Determinação da atividade de pectinametilesterase (PME)	34
3.3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DA AMORA	35
3.3.1. – Efeito da temperatura na atividade de POD de amora	35
3.3.2. – Efeito do pH na atividade de POD de amora	36
3.3.3. – Efeito da temperatura na estabilidade de POD de amora	36
3.3.4. – Efeito do pH na estabilidade de POD de amora	37
3.3.5. – Efeito de sais e inibidores na atividade de POD de amora	37
3.3.6. – Efeito da concentração de substrato na atividade da peroxidase solúvel de amora	38
3.4 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NA ATIVIDADE DE POD, PFO E PME DE AMORA, ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE PEROXIDASE, POLIFENOLOXIDASE E PECTINAMETILESTERASE	40
4.2 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DE AMORA.....	43
4.2.1 – Efeito da temperatura na atividade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora	43
4.2.2 – Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora	44
4.2.3 – Regeneração da peroxidase de amora após tratamento térmico	48
4.2.4 – Efeito do pH na atividade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora	50
4.2.5 – Efeito do pH na estabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora	52
4.2.6 – Efeito de sais e inibidores na atividade da peroxidase solúvel de amora	54
4.2.7 – Efeito da concentração de substrato na atividade da peroxidase solúvel de amora	57
4.3 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE INIBIDOR NA ATIVIDADE DE POD, PFO E PME DE AMORA, ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL...	59
4.3.1 – Peroxidase	59
4.3.2 – Polifenoloxidase	64
4.3.3 – Pectinametilesterase	69
5 – CONCLUSÕES	74
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Frutos de amora (<i>Rubus spp</i>) comercializada para industrialização	3
FIGURA 2 – Efeito da temperatura na atividade de POD solúvel e ionicamente ligada de amora	43
FIGURA 3 – Estabilidade térmica da peroxidase solúvel (A) (30 a 80°C) e ionicamente ligada (B) (50 a 80°C) de amora	46
FIGURA 4 – Estabilidade térmica da POD solúvel de amora após exposição a 80°C, 85°C, 90°C e a temperatura de ebulição (A) e da POD ionicamente ligada de amora após exposição a 85°C, 90°C e a temperatura de ebulição (B).....	47
FIGURA 5 – Efeito do pH na atividade de POD solúvel de amora a 35°C e 50°C	51
FIGURA 6 – Efeito do pH na atividade de POD ionicamente ligada de amora a 40°C	51
FIGURA 7 – Efeito do pH na estabilidade de POD solúvel de amora.....	53
FIGURA 8 – Efeito do pH na estabilidade de POD ionicamente ligada de amora	53
FIGURA 9 – Efeito dos compostos metabissulfito de sódio, ácido ascórbico e L-cisteína na atividade de POD de amora.....	56
FIGURA 10 – Efeito da adição de sais $MgSO_4$, $CaCl_2$ e $MnSO_4$ na atividade de POD de amora	56
FIGURA 11 – Aplicação do método de Lineweaver-Burk na obtenção das constantes cinéticas K_m e V_{max} para a POD solúvel de amora.....	58

FIGURA 12 – Efeito do pH e da temperatura na atividade da peroxidase de amora, sem adição de ácido ascórbico	61
FIGURA 13 – Efeito do pH e da temperatura na atividade da peroxidase de amora na presença de 50 ppm de ácido ascórbico.....	62
FIGURA 14 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de peroxidase de amora a 8°C.....	63
FIGURA 15 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de peroxidase de amora a pH 5,5.....	63
FIGURA 16 – Efeito do pH e da temperatura na atividade de polifenoloxidase de amora sem adição de ácido ascórbico	67
FIGURA 17 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora em pH 5,5.....	68
FIGURA 18 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora a 25°C.....	68
FIGURA 19 – Efeito do pH e da temperatura na atividade de pectinametilesterase de amora sem adição de ácido ascórbico	71
FIGURA 20 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora em pH 5,5.....	72
FIGURA 21 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora a 25°C.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Características bioquímicas de peroxidases (POD) de frutas e vegetais.....	16
TABELA 2 - Características bioquímicas de polifenoloxidasas (PFO) de frutas e vegetais.....	22
TABELA 3 - Matriz do planejamento experimental para determinação dos efeitos das variáveis pH, temperatura e concentração de inibidores na atividade das enzimas POD, PFO e PME	39
TABELA 4 - Atividade de peroxidase (POD), polifenoloxidase (PFO) e pectinametilesterase (PME) durante o processo de obtenção das enzimas de amora.....	40
TABELA 5 - Regeneração da atividade de peroxidase de amora após tratamento térmico na faixa de 60°C até ebulição, seguido incubação durante 24 horas a 25°C	49
TABELA 6 - Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade da peroxidase de amora	59
TABELA 7 - Análise de variância para o modelo linear para a atividade de POD expresso na Equação 1	60
TABELA 8 - Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora	65
TABELA 9 - Análise de variância para o modelo linear para a atividade de PFO expresso na Equação 2	66
TABELA 10 - Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora	69
TABELA 11 - Análise de variância para o modelo linear para a atividade de PME expresso na Equação 3.....	70

1 - INTRODUÇÃO

Diversas enzimas presentes em frutas e vegetais causam alterações na cor, sabor e textura de alimentos *in natura*, minimamente processados e congelados.

A polifenoloxidase catalisa a oxidação de compostos fenólicos na presença de oxigênio formando compostos escuros. A peroxidase é uma enzima oxidativa que pode provocar alterações de cor, gosto e aroma em frutas e vegetais. A pectinametilesterase promove a desmetoxilação da pectina, liberando álcool metílico e formando ácido pectínico e ácido péctico, alterando a textura de frutas e vegetais.

Estas enzimas estão naturalmente presentes em frutas utilizadas na indústria de alimentos para o processamento de sobremesas, bebidas, geléias, sorvetes, entre outros.

Por outro lado, o tratamento térmico necessário para promover a completa inativação destas enzimas causa, muitas vezes, alterações indesejáveis no gosto, textura e aroma da fruta, como perda de frescor e desenvolvimento de sabores residuais, o que torna necessária a utilização da polpa de fruta fresca, sem tratamento térmico prévio.

Para o desenvolvimento de novos produtos, em especial de sobremesas congeladas a base de frutas, é importante a determinação quantitativa das enzimas deteriorativas presentes, bem como a caracterização bioquímica destas enzimas, como sua suscetibilidade a parâmetros como temperatura, pH, e presença de inibidores químicos, para prevenir as alterações que estas enzimas podem causar no produto acabado.

A amora, por apresentar cor atraente e sabor diferenciado, tem grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, em sobremesas lácteas resfriadas ou congeladas, iogurtes, sorvetes, mousses, coberturas, geléias, gomas de mascar e bebidas. A polpa e o suco de amora podem ser empregados puros ou em combinação com outras frutas vermelhas, como morango, framboesa e groselha.

O cultivo comercial da amoreira preta (*Rubus spp*) vem sendo apresentado como uma alternativa rentável de cultura para pequenas e médias propriedades rurais, devido à sua facilidade de manejo, pouca necessidade de aplicação de defensivos agrícolas, e facilidade de comercialização. Por isto, a área cultivada no Brasil vem crescendo, através inclusive de programas de fomento agrícola por parte da Embrapa.

Recentemente têm sido divulgados estudos que associam a amora à prevenção de doenças crônico-degenerativas. Este efeito funcional está ligado à sua alta concentração de antocianinas, outros flavonóides e carotenóides, e tem contribuído para o aumento da procura por produtos à base de amora, principalmente nos mercados europeu e japonês (ANTUNES, 2002).

Este trabalho visou a caracterização bioquímica das enzimas presentes na polpa de amora preta que apresentam potencial de acarretar alterações de sabor (peroxidase), cor (polifenoloxidase e peroxidase) e textura (pectinametilesterase) nos produtos elaborados a partir da fruta.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - AMORA

2.1.1 – Características gerais

A amora preta é uma fruta pertencente ao gênero *Rubus*, o qual engloba entre 400 e 500 espécies de framboesas e amoras, e encontra-se difundido na América, Europa, África e Ásia (POLING, 1996). O subgênero ao qual pertence a amora preta denomina-se *Eubatus* (ANTUNES, 2002).

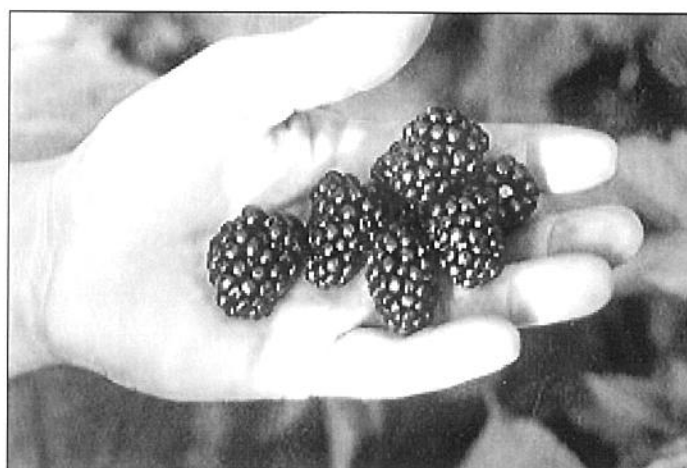
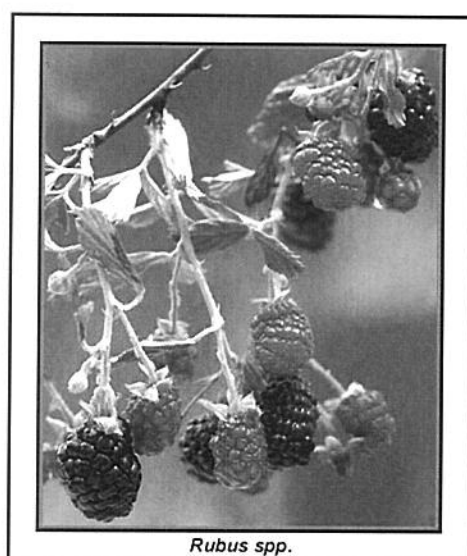


FIGURA 1 – Frutos de amora (*Rubus spp*) comercializada para industrialização

Trabalhos de adaptação ao clima brasileiro e melhoramento genético dos cultivares de amoreira tiveram início no ano de 1972, e foram executados pela EMBRAPA Clima Temperado (RS), a partir de cultivares e *seedlings* provenientes principalmente dos Estados Unidos. A produtividade das cultivares melhoradas pode chegar a 10.000 kg/ha/ano sob condições adequadas. Os frutos da amoreira, denominados mini-drupas, pesam de 4 a 7 gramas, e as principais cultivares comerciais apresentam espinhos (ANTUNES, 2002).

Após a colheita, os frutos podem se preservar por até 7 a 9 dias, se mantidos a 2°C. Os teores de compostos fenólicos totais e pectina total sofrem redução ao longo do armazenamento dos frutos (ANTUNES, 1999).

2.1.2 – Aspectos comerciais

No Brasil, a amoreira *Rubus spp* tem apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos, em especial no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro). Os maiores volumes de produção encontram-se nos municípios de Feliz e Vacaria, onde a cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada, com safra nos meses de novembro a fevereiro. Outras cultivares empregadas no plantio comercial são a Ébano, Negrita, Guarani, Brazos, Comanche e Cherokee (ANTUNES, 2002).

O cultivo da amora ocorre também no estado de São Paulo, onde a produção concentra-se na região de Jundiaí. Em Minas Gerais, as qualidades agrônômicas da amoreira vêm sendo trabalhadas como uma das opções para a pequena propriedade agrícola e para a agricultura familiar (ANTUNES *et al*, 2003). A área cultivada neste estado vem se expandindo, principalmente no planalto de Poços de Caldas e na Zona da Mata (ANTUNES, 2002).

O interesse no cultivo da amora reside principalmente no seu baixo custo de produção, facilidade de manejo, rusticidade e na baixa necessidade de utilização de defensivos agrícolas, o que viabiliza, inclusive, a produção de frutos orgânicos (ANTUNES, 2002).

As frutas podem ser utilizadas para consumo *in natura* ou industrializadas, na forma de sucos naturais ou concentrados, frutas em calda, polpa para sorvetes e sobremesas, corantes naturais e produtos gelificados, como geléias e doces cremosos. Além desta versatilidade, a tecnologia de industrialização é simples e acessível (MOREIRA, 1989).

2.1.3 – Aspectos nutricionais e funcionais

A amora apresenta significativo valor nutricional, pois constitui uma boa fonte de vitaminas A e B (ANTUNES, 2002) e minerais como Fe^{2+} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , Ca^{+2} , $(\text{PO}_4)^{-3}$ (THIEM, 2003).

Além das propriedades nutricionais, alguns estudos têm associado propriedades funcionais à amora, demonstrando o seu grande potencial na prevenção de doenças no ser humano (JIAO e WANG, 2000). A fruta pode ser considerada uma boa fonte de antioxidantes naturais, antocianinas e outros flavonóides, e diversos compostos fenólicos. Em sua composição apresenta também hidroxicinamatos como o ácido caféico (HEINONEN *et al*, 1998).

Estudos compararam a quantidade total de compostos fenólicos em várias frutas do gênero *Rubus*, como framboesa, mirtilo, morango, *blueberry* e cerejas, além da amora preta (HEINONEN *et al*, 1998).

Os resultados revelaram que a amora apresenta os maiores teores totais de compostos fenólicos, da ordem de 4 g/kg da fruta. Estes compostos apresentam a propriedade de se ligar a radicais livres produzidos quimicamente, inibindo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e dos lipossomos humanos. A oxidação das LDL é um evento precoce no desenvolvimento de doenças coronárias, e extratos de amora inibiram em 84% a ocorrência de oxidação em teste *in vitro* (HEINONEN *et al*, 1998).

O ácido elágico é um constituinte fenólico presente em várias espécies de frutas, e é encontrado em quantidade bastante significativa na amora preta. Foi demonstrado que o ácido elágico é um potente inibidor dos tumores induzidos por radicais livres gerados quimicamente (WANG, 1994). Estudos mostraram que o ácido elágico inibe a mutagênese causada pela aflatoxina B1 em *Salmonella typhimurium*, e também a hepatocarcinogênese induzida pela N-2-fluorenil-acetamida em ratos (TATE *et al*, 2003).

2.2 – AÇÃO DE ENZIMAS EM ALIMENTOS CONGELADOS

Em alimentos congelados, a taxa das reações catalisadas por enzimas é freqüentemente o principal limitante para se estender o *shelf-life* do produto, devido às alterações sensoriais resultantes de sua atividade, seja em sabor, textura ou cor.

Várias enzimas presentes em frutas e vegetais foram relatadas como causadoras de alterações durante a estocagem congelada de alimentos. Alguns exemplos são lipase, álcool desidrogenase, peroxidase, fosfolipase D, polifenoloxidase, superóxido dismutase, mirosinase, lipoxigenase, protease, xantina-oxidase (CHURCHILL e SCOTT, 1986).

A velocidade das reações enzimáticas em produtos congelados, por sua vez, é influenciada pela temperatura e pelas alterações físicas e físico-químicas que ocorrem com a separação do gelo. As reações catalisadas por enzimas são consideradas limitadas pela capacidade de difusão das moléculas no meio, já que a ocorrência destas reações requer que o substrato entre em contato com a enzima e se reorienta de forma a se enquadrar no seu sítio ativo. Os produtos da reação também devem se difundir e se afastar da enzima, de forma que a reação prossiga (MANZOCCO *et al*, 1999).

As principais alterações globais que ocorrem ao longo do congelamento incluem (FENNEMA, 1975):

- a concentração dos sólidos solúveis
- aumento da força iônica
- mudanças no pH
- alteração da solubilidade de gases como o oxigênio
- mudanças na densidade e na viscosidade
- diminuição da atividade de água e do volume da fase concentrada onde os reagentes estão confinados

O crescimento dos cristais de gelo promove o rompimento das paredes celulares e libera as enzimas de seus compartimentos, o que as aproxima de seus substratos nas células. Além disso, o congelamento age sobre enzimas ionicamente ligadas à parede celular, como peroxidase e polifenoloxidase, promovendo a sua solubilização, o que resulta num aumento da atividade enzimática das frações solúveis ao longo de períodos prolongados de estocagem congelada (CANO *et al*, 1998).

Durante o congelamento, outras alterações podem ser observadas para algumas enzimas específicas, como aglomeração e mudanças conformacionais. Foi relatado que a peroxidase sofre uma mudança conformacional reversível a -10°C , o que ocasiona queda significativa na atividade da enzima quando estocada abaixo desta temperatura (MANZOCCO *et al*, 1999).

As alterações deteriorativas causadas por enzimas em alimentos congelados decrescem exponencialmente com o decréscimo da temperatura de estocagem. A cada 10°C de redução na temperatura de estocagem, a retenção de sabor e cor em morangos aumenta 22 vezes, a retenção do ácido ascórbico em laranja aumenta 16 vezes, e o *shelf-life* de produtos de frango aumenta 3,5 vezes (JACQMAIN, 1977).

2.3 - PEROXIDASE

2.3.1. – Características gerais

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

A atividade de peroxidase está relacionada à presença de isoenzimas catiônicas e/ou aniônicas e uma mesma fruta pode conter ambos os tipos de isoenzimas (HAARD e TOBIN, 1971; LEE *et al*, 1984). A peroxidase de raiz forte, por exemplo, apresenta 15 isoenzimas identificadas (CARVALHO *et al*, 2003). Um mesmo vegetal muitas vezes contém isoenzimas de peroxidase termolábeis e termoresistentes (LEE *et al*, 1984). Avaliações quantitativas de extratos de tecidos de plantas mostraram que a enzima ocorre na forma solúvel e também na forma ionicamente ligada à parede celular (CIVELLO *et al*, 1995; VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

A peroxidase não é uma enzima específica (BURNETTE, 1977). Às custas da redução do peróxido de hidrogênio ou de peróxidos orgânicos, esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de um grande número de substratos doadores de hidrogênio, incluindo aminas aromáticas primárias, secundárias e terciárias (HAARD e TOBIN, 1971; BURNETTE, 1977), fenóis, antocianinas (LOPEZ-SERRANO e BARCELÓ, 1996), lignina (FORSYTH *et al*, 1999), vitamina C (FORSYTH *et al*, 1999; HAARD e TOBIN, 1971; OHYA *et al*, 1997), clorofila (CHAMARRO e MOLINA, 1989; MARTÍNEZ *et al*, 2001), e compostos heterocíclicos como os indóis (HAARD e TOBIN, 1971).

Alguns autores (BURNETTE, 1977) sugerem que o papel metabólico das peroxidases é a oxidação de componentes potencialmente tóxicos, transformando-os em produtos menos prejudiciais à célula. No entanto, vários outros papéis fisiológicos têm sido atribuídos às peroxidases de plantas, como por exemplo a síntese de lignina, biossíntese de etileno, degradação da clorofila, eliminação do peróxido de hidrogênio, proteção contra microrganismos fitopatogênicos e metabolismo do ácido indol-3-acético (CHAMARRO e MOLINA, 1989; KASPERA *et al*, 2001). A enzima também foi associada ao balanceamento hormonal, integridade das membranas e controle dos processos de respiração celular, senescência e degradação fisiológica de frutas e vegetais (HAARD e TOBIN, 1971).

Várias frutas apresentam aumento da atividade de peroxidase ao longo do amadurecimento, como manga, uva, maçã e pêra (HAARD e TOBIN, 1971). Além disso, a atividade de peroxidase aumenta em decorrência de situações de estresse fisiológico (KWAK *et al*, 1996).

Uma característica marcante da peroxidase é sua grande termoestabilidade. A peroxidase é considerada por alguns autores a enzima mais termorresistente dentre aquelas presentes em frutas e vegetais (MÜTFÜGIL, 1985; RODRIGO *et al*, 1996; LEE *et al*, 1984). Por esta razão, e também devido à sua facilidade de detecção, esta enzima é freqüentemente utilizada como índice de efetividade do branqueamento de frutas e vegetais, para prevenir a perda de qualidade na estocagem (RODRIGO *et al*, 1996). Assim, a inativação completa da peroxidase é a medida utilizada para determinar o tempo de branqueamento de vegetais, ao invés de se utilizar um tempo de branqueamento fixo (GANTHAVORN e POWERS, 1988). No entanto, para alguns vegetais como ervilhas e aspargos, enzimas como a lipoxigenase podem ser mais termorresistentes que a peroxidase (GANTHAVORN *et al*, 1991).

2.3.2 – Efeitos da atividade de peroxidase em alimentos

Muitas alterações de sabor em frutas e vegetais crus ou não branqueados podem ser relacionadas à atividade de peroxidase (LAMIKANRA e WATSON, 2000). Existem dados empíricos relacionando a existência de atividade residual de peroxidase à ocorrência de *off-flavors* em alimentos processados (BURNETTE, 1977; CANO *et al*, 1998; KHAN e ROBINSON, 1993; MÜTFÜGIL, 1985; LAMIKANRA e WATSON, 2000; VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

Além dos efeitos no sabor, foi proposto que a peroxidase também pode afetar a textura de alguns tipos de frutas, através da síntese de lignina e da capacidade de catalisar a ligação entre as moléculas de ácido ferrúlico (substituintes na cadeia da pectina) (ADAMS, 1997). Foi relatado que o efeito de lignificação pela ação da peroxidase causa defeitos de textura (endurecimento) em aspargos (FORSYTH *et al*, 1999).

A sua capacidade de oxidar uma grande quantidade de compostos fenólicos distintos, inclusive a clorofila, sugere que a peroxidase também está associada à descoloração dos tecidos de frutas e vegetais (ONSA *et al*, 2004). A atividade de peroxidase está intimamente relacionada à perda de sabor de alimentos estocados, e também a uma série de reações de biodegradação. O escurecimento enzimático de frutas e vegetais se deve à oxidação de compostos fenólicos naturalmente presentes, que resulta na formação de pigmentos marrons, vermelhos ou negros (VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004). O desenvolvimento de cor marrom em morangos processados por apertização foi correlacionado com a atividade residual de peroxidase (LOPEZ-SERRANO e BARCELÓ, 1996). A ocorrência de sabores estranhos em frutas e vegetais enlatados foi atribuída a atividade residual de peroxidase remanescente após o processo térmico (LU e WHITAKER, 1974). A alta resistência a tratamentos térmicos, característica das peroxidases, torna o seu controle mais crítico no processamento de alimentos.

Os tratamentos tipo HTST (High Temperature Short Time), que se tornaram freqüentes na indústria de processamento de sucos, mostram-se menos eficientes no controle e inativação da peroxidase que os métodos tradicionais, que utilizam exposição mais prolongada à temperatura-alvo (CLEMENTE, 1998; VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

Além disso, peroxidases são capazes de agir em temperaturas abaixo de zero, e em baixa atividade de água. Foi relatada atividade residual de peroxidase em sistemas modelo a temperatura de -30°C , estocados durante 100 dias (MANZOCCO *et al*, 1999). A peroxidase de couve-flor apresenta 35% de atividade residual na temperatura de 0°C (LEE *et al*, 1984).

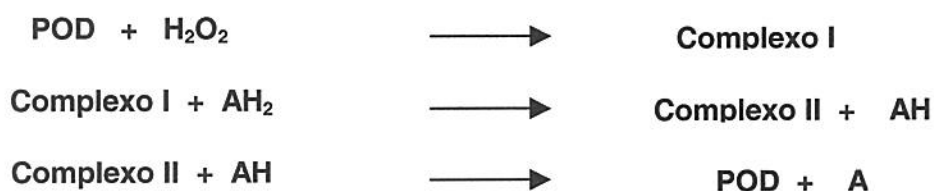
2.3.3 – Reação geral e mecanismo da peroxidase

A reação geral das peroxidases pode ser expressa por:



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

O mecanismo de ação da peroxidase pode ser esquematizado como:



2.3.4 – Regeneração 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 repolho (CLEMENTE, 1998), açaí (SANTOS, 2001), uva, abacate, maçã (CLEMENTE, 1998) e manga (KHAN e ROBINSON, 1994). Foi relatado o reaparecimento de atividade de peroxidase em couve-flor tratada a 80°C e estocada sob congelamento a -18°C (LEE *et al*, 1984).

Tal característica apresenta especial interesse para a indústria de alimentos, visto que a incidência de atividade residual de peroxidase, resultante de regeneração após tratamento térmico, tem potencial para encurtar a vida de prateleira de frutas e vegetais processados.

Este fenômeno é observado quando o tratamento aplicado não é suficiente para inativar irreversivelmente a peroxidase (BURNETTE, 1977), ou seja, quanto mais drástico o tratamento térmico, menor a probabilidade de ocorrer regeneração da enzima. O mecanismo de desnaturação das enzimas pelo calor envolve primeiramente uma etapa em que as moléculas se desenrolam, ou seja, desorganizam sua estrutura terciária, antes que reações secundárias subseqüentes levem à desnaturação permanente da enzima. Nesta fase reside a capacidade de regeneração da peroxidase, que refaz sua estrutura e recupera sua atividade após o resfriamento (ADAMS, 1991).

Um dos fatores que afeta a capacidade de regeneração da peroxidase é o tempo que se leva para atingir a temperatura alvo do tratamento térmico. Tratamentos do tipo HTST resultam em taxas de regeneração superiores às dos tratamentos convencionais, mais longos e com temperaturas menores (RODRIGO *et al*, 1996).

A regeneração da atividade da peroxidase dependerá também do pH do meio em que ocorre o tratamento térmico. 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 de pH neutro, a ligação do grupamento heme à enzima é estável, e a desnaturação se dá principalmente pela desnaturação protéica. Por esta razão, a taxa de regeneração é maior quando o tratamento térmico é feito em pH ligeiramente ácido, já que o grupamento heme torna a se ligar à enzima com facilidade, restaurando a atividade (ADAMS, 1997).

De forma análoga, a regeneração ocorre de forma mais intensa quando a enzima é estocada à temperatura ambiente após o tratamento térmico, e menos intensa quando estocada sob congelamento (BURNETTE, 1977). Foi detectada a presença de atividade enzimática de peroxidase regenerada em morangos enlatados submetidos a processo de apertização (LOPEZ-SERRANO e BARCELÓ, 1996).

A regeneração da enzima também ocorre, em menor velocidade, em alimentos congelados. Estudos realizados em feijões verdes, branqueados a 96°C durante 2 minutos, mostraram regeneração de 1,23% da atividade inicial durante 18 meses de estocagem a -18°C. No entanto, a -22°C a regeneração não foi observada no mesmo período (APARICIO-CUESTA *et al*, 1992).

Alguns autores sugerem que a peroxidase regenerada estruturalmente apresenta capacidade de oxidação lipídica significativa, devido à nova configuração mais aberta adquirida pelo sítio ativo quando da recombinação com o íon ferro, formando uma holoenzima com o íon ferro mais exposto (ADAMS *et al*, 1996).

2.3.5 – Inibidores da atividade da peroxidase

Vários agentes redutores são capazes de inibir a ação da peroxidase. Alguns deles são capazes de inativar irreversivelmente a enzima, através de mecanismo que parece envolver oxigênio e o íon ferro. Supõe-se que ocorra a formação de espécie reativa de oxigênio na posição do sítio ativo ocupada pelo íon ferro. Dentre os agentes redutores que apresentam esta propriedade, pode ser citado ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol (LEE e SOO, 1998) e ascorbato (LEE e SOO, 1998; LAMIKANRA e WATSON, 2000).

A atividade enzimática da peroxidase pode ser significativamente reduzida em presença de alguns sais. Dentre eles, podem ser citados FeSO_4 , FeCl_3 , HgCl_2 , e AgNO_3 (LIN *et al*, 1996). Estes sais, entretanto, não são permitidos para aplicação como aditivos em alimentos. Foi relatado efeito inibidor causado pela adição de Mn^{+2} , NaNO_2 e CaCl_2 (LAMIKANRA e WATSON, 2000).

Também foi relatada a ação inibitória dos ácidos ferrúlico, caféico e p-cumárico sobre a peroxidase de carambola (HOLSCHUH, 2000). O ácido cítrico, quando combinado com outros tratamentos, acelera a inativação da peroxidase (PLAZA *et al*, 2003).

A estabilidade térmica da peroxidase de raiz forte é significativamente reduzida em presença de cloreto de sódio (LU e WHITAKER, 1974). A capacidade de regeneração da enzima, no entanto, não é afetada pela presença do sal.

Foi relatado o aumento da atividade de peroxidase em presença de radicais livres, e redução na presença de substâncias quelantes destes radicais (LAMIKANRA e WATSON, 2000).

A **Tabela 1** ilustra as características bioquímicas relatadas para peroxidases de frutas e vegetais.

TABELA 1 - Características bioquímicas de peroxidases (POD) de frutas e vegetais

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temp. ótima	Termoestabilidade	Outras características	Referência
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	4,5	Estável na faixa de 3 a 9	45 a 55°C	Inativada após 1 minuto de tratamento a 90°C	-	BRITO, 2001
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	5,0	Retém 60% de atividade na faixa de 3 a 10	35°C	Retém 50% da atividade após 60 minutos a 70°C	Km (Guaiacol) = 2,4 mM	SANTOS, 2001
Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	5,5	6 a 9	50°C	Mantém 80% da atividade inicial após 24 horas a 40°C (pH 6,0)	-	HOLSCHUH, 2000
Couve-flor (<i>Brassica oleracea</i> L.)	6,5	-	40°C	Perda de 98% da atividade após 15 min a 50°C	Km (Guaiacol) = 3,1 mM	LEE <i>et al</i> , 1984
Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	5,5	-	-	-	Km (ABTS) = 0,25 mM Km (H ₂ O ₂) = 0,23 mM	ADAMS, 1997
Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	5,5 a 7,5	-	50 a 55°C	Perda de 90% da atividade após 5 minutos a 80°C	Inibida parcialmente por Mn ⁺² , CaCl ₂ , NaNO ₂ e ascorbato	LAMIKANRA e WATSON, 2000

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temp. ótima	Termoestabilidade	Outras características	Referência
Morango (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	6,0	Retém 50% da atividade na faixa de 4-11	30°C	5% de atividade residual após 5 minutos a 60°C	Atividade de peroxidase decresce a medida em que o fruto amadurece	CIVELLO et al, 1995
Palma (<i>E. guineensis</i>)	5	Estável na faixa de 4 a 8	-	Retém 50% da atividade a 50°C por 1 hora	KM (Guaiacol) = 2mM	DEEPA, 2002
Palmeira de sagu (<i>Metroxylon sagu</i>)	5,5-6,0	-	-	-	Inibida por ascorbato, ácido <i>p</i> -cumárico, metabissulfito; ativada por íons Ca ⁺²	ONSA et al, 2004
Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)	-	6-9	-	10% de atividade residual após 5 minutos a 80°C	Catalisa oxidação de alcalóides	POMAR, 1997
Quiabo (<i>Hibiscus esculentum</i>)	-	-	30-35°C	10% de atividade residual após 8 minutos a 70°C	Atividade para guaiacol, catequina, catecol, pirogalol e 4-metil catecol	YEMENI-CIOGLU, 1998
Repolho (<i>Brassica oleracea</i>)	6,4	Estável na faixa de 6 a 11	45°C	Retém 50% da atividade após 10 minutos a 70°C	Inibida por ácido ascórbico e por MnCl ₂	FUJITA et al, 1997

2.4 - POLIFENOLOXIDASE

2.4.1 – Características gerais

A polifenoloxidase (monofenol, dihidroxi-L-fenilalanina oxigênio oxidoredutase 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 (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995).

Apresenta a propriedade de catalisar duas reações, ambas com utilização de oxigênio molecular: a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois, pela ação da cresolase e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas, pela atuação da catecolase (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995; KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001).

Para a reação de cresolase, substratos comuns são *o*-cresol, tirosina, *p*-cresol e ácido *p*-cumárico. Para a reação de catecolase, exemplos de substratos (*o*-difenois) são catecol, 4-metil catecol, catequina e epicatequina, ácido clorogênico, dopamina, ácido caféico, ácido gálico, ácido 3-(3,4 dihidroxifenil) propiônico (DHPPA) e *L*-3,4-dihidroxifenilalanina (*L*-DOPA) (PARK e LUH, 1985; DINCER *et al*, 2002).

Em vegetais, foi relatada a existência de polifenoloxidase tanto na forma solúvel quanto na forma ionicamente ligada (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995). Em plantas, a polifenoloxidase localiza-se principalmente nos plastídeos e cloroplastos das células intactas (CONCELLÓN *et al*, 2004). É amplamente aceito o fato de que a atividade da enzima é maior em frutos verdes, diminuindo ao longo do período de maturação da fruta (SERRADELL *et al*, 2000).

Acredita-se que este fato seja causado pela solubilização e proteólise da enzima nos plastídeos durante o amadurecimento e estocagem, razão pela qual a fração solúvel aumenta a medida em que os frutos amadurecem (CONCELLÓN *et al*, 2004).

As quinonas formadas pela polifenoloxidase em plantas constituem o primeiro sinal de resposta fisiológica quando ocorrem danos aos tecidos ou ataque de patógenos, e possuem propriedades antimicrobianas efetivas (SERRADELL *et al*, 2000).

2.4.2 – Efeitos da atividade de polifenoloxidase em alimentos

A polifenoloxidase é responsável pelo escurecimento enzimático indesejável durante a manipulação, estocagem e processamento de tecidos danificados de frutas e vegetais, e até mesmo de alguns produtos de origem animal (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001). As o-quinonas formadas pela ação da enzima são instáveis (CONCELLÓN *et al*, 2004) e rapidamente polimerizam-se dando origem a pigmentos escuros (melaninas) (SERRADELL *et al*, 2000). A tonalidade de cor dos compostos formados pode variar dependendo dos compostos fenólicos presentes num dado tecido, resultando em pigmentos marrons, avermelhados ou negros (DINCER *et al*, 2002). O escurecimento afeta a aceitação do consumidor e é uma das principais causas de rejeição de frutas e vegetais por problemas de qualidade (SERRADELL *et al*, 2000). 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. Isto inclui danos mecânicos e fisiológicos. Alguns vegetais íntegros sofrem danos pelo frio, com rompimento das paredes celulares no interior do vegetal, quando estocados para preservação em temperaturas inferiores a 10°C, mas acima da temperatura de congelamento (CONCELLÓN *et al*, 2004).

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).

Em frutas vermelhas, como morango, framboesa e amora, a atividade de polifenoloxidase também pode ser responsável pela degradação das antocianinas, causando perda da cor vermelha (SERRADELL *et al*, 2000).

2.4.3 – Efeito de substâncias químicas na atividade de polifenoloxidase: inibidores e ativadores

Devido à importância do escurecimento enzimático no processamento de frutas e vegetais, diversos métodos de inibição da atividade da polifenoloxidase têm sido descritos na literatura.

Em alguns casos, é empregada a inativação térmica da enzima. No entanto, para outras aplicações, o emprego de tratamentos térmicos intensos pode produzir alterações de cor, textura, e formação de *off – flavors* (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995).

O ajuste de pH com ácido cítrico, málico e/ou fumárico, para valores abaixo de 4 também é empregado para inibir o escurecimento em sucos e frutas em pedaços. Como a ação da enzima é dependente do oxigênio molecular, a utilização de embalagens não permeáveis ao oxigênio, com atmosfera de CO₂ ou N₂ também é prática comum na prevenção do escurecimento (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995). Polifenóis podem ser removidos dos sucos de frutas por β -ciclodextrinas e polivinilpirrolidona ou polietilenoglicol insolúveis (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995). Estes tratamentos, no entanto, são caros e nem sempre estão disponíveis.

O método mais empregado de inibição da polifenoloxidase consiste na utilização de agentes redutores. O metabissulfito de sódio promove tanto a inativação da PFO como também atua na redução de benzoquinonas a *o*-dihidroxifenóis (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995). O ácido ascórbico é um potente inibidor competitivo da polifenoloxidase de folhas de menta. A ação inibitória do ácido ascórbico sobre a polifenoloxidase também foi relatada em cogumelo (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001) e kiwi (PARK e LUH, 1985). O aminoácido L-cisteína atua na inibição da polifenoloxidase de duas formas. Atua, primeiramente, estendendo a fase lag da PFO, e em segundo lugar, combina-se com as quinonas impedindo a formação de melanina (MARTINÉZ e WHITAKER, 1995). Outros inibidores relatados são cianeto de potássio e ditioneitol, capazes de se ligar ao Cobre presente no sítio ativo da enzima, além de β -mercaptoetanol, azida de sódio, ácido benzóico e glutatona (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001; DINCER *et al*, 2002). No entanto, muitas destas substâncias não são aplicáveis como ingredientes alimentícios.

Por outro lado, a adição de açúcares como a sacarose e a glicose promovem um efeito estabilizante sobre a enzima, dificultando a sua inativação térmica. Este efeito também foi relatado para sais como sulfato de amônio e cloreto de sódio (KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001). Detergentes, como o dodecil-sulfato de sódio, ligam-se ao sítio ativo da enzima, causando uma mudança conformacional que a torna mais ativa (CONCELLÓN *et al*, 2004).

A **Tabela 2** ilustra algumas características bioquímicas da polifenoloxidase de várias frutas e vegetais.

TABELA 2 - Características bioquímicas de polifenoloxidasas (PFO) de frutas e vegetais

Fonte	pH ótimo	pH de estabilidade	Temp. ótima	Termoestabilidade	Outras características	Referência
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	6,0	6-9	40-45°C	Inativada após 2 minutos em ebulição	-	SANTOS, 2001
Berinjela (<i>Solanun melongena</i>)	4,8-6		30°C		Km (4-metilcatecol) = 3,24 mM	CONCELLÓN et al, 2004
Kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>)	6,8-7,3	-	-	Perde 88% da atividade após 1 minuto a 75°C	Km (catequina) = 8,7 mM Inibida por ácido ascórbico	PARK e LUH, 1985
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	7,0	-	30,0	Retém 50% da atividade após 1,5 min a 80°C	Km (catecol) = 6,25 mM Inibida por ác. ascórbico e metabissulfito de sódio	KAVRAYAN e AYDEMIR, 2001
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	5,3	4,5-7,0	50	Inativada após 30 minutos a 65°C	Km (pirocatecol) = 11,2 mM Retém 20% da atividade a 0°C e a 70°C	SERRADELL et al, 2000
Nêspera (<i>Mespilus germanica</i>)	6,5	-	35°C	Inativada após 30 minutos a 80°C	Inibida por L-cisteína e por metabissulfito	DINCER et al, 2002
Pinha (<i>Annona squamosa</i> L.)	-	6,0 a 6,5	-	10 a 30°C	Km (catecol) = 7,14 mM	LIMA, 1999
Repolho (<i>Brassica oleracea</i>)	7,6	6 a 11	40°C	Retém 40% da atividade após 10 minutos a 100°C	Km (floroglucinol) = 6,4 mM Ativada por MnCl ₂ e inibida por ácido ascórbico	FUJITA et al, 1995

2.5 – PECTINAMETILESTERASE

2.5.1 – Características gerais

A pectinametilesterase (PME; EC 3.1.1.11) é uma enzima do grupo das hidrolases e é encontrada em plantas, fungos fitopatogênicos e bactérias.

Sua ação está envolvida nos seguintes mecanismos em vegetais:

- crescimento: a enzima está envolvida no processo de alongamento da parede celular primária durante o crescimento das células vegetais (ASSIS *et al*, 2000)
- abscisão e senescência de frutos (REN e KERMONDE, 2000)
- amadurecimento de frutas: a pectinametilesterase remove grupos metila dos constituintes pécticos da parede celular, promovendo o decréscimo da adesão entre os tecidos e da sua rigidez (ASSIS *et al*, 2000)
- arsenal de ataque de microrganismos fitopatogênicos (REN e KERMONDE, 2000)
- diferenciação celular (REN e KERMONDE, 2000)
- controle do pH entre a matriz das paredes celulares e nos espaços intercelulares (apoplasto) e do processo de expansão celular (ASSIS *et al*, 2000)

A atividade de pectinametilesterase em frutas é detectada principalmente nos primeiros estágios do amadurecimento, e está envolvida no amolecimento da fruta ao longo da maturação (CASTALDO *et al*, 1989).

Usualmente, duas ou mais isoformas de pectinametilesterase, com diferentes valores de pH e temperatura ótima, pontos isoelétricos e pesos moleculares, estão presentes numa mesma espécie de planta e (VERSTEEG *et al*, 1980). Cada isoforma é constituída de uma única cadeia polipeptídica, com peso molecular usual na faixa de 10 a 60 kDa e ponto isoelétrico entre 7 e 11 (ASSIS *et al*, 2002).

2.5.2 – Reação e mecanismo da pectinametilesterase

A pectina, substrato da pectinametilesterase, consiste de uma cadeia de moléculas de ácido homogalacturônico parcialmente metil-esterificadas, unidas por ligação α -(1→4) (região linear), e ramificada com cadeias periféricas de açúcar neutro (NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002).

A enzima pectinametilesterase catalisa a hidrólise dos grupos metil-éster da pectina na posição C6 do ácido galacturônico (NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002). Normalmente esta enzima é uma glicoproteína composta de um único polipeptídeo de baixo peso molecular (ASSIS *et al*, 2002).

2.5.3 – Efeitos da atividade de pectinametilesterase em alimentos

A diminuição do grau de metilação da pectina pode acarretar diferentes consequências sobre a textura e firmeza dos tecidos:

- favorece a formação de ligações cruzadas entre moléculas de pectina e íons Ca^{2+} , causando precipitação de pectato de cálcio insolúvel (ASSIS *et al*, 2000) e (CAMERON *et al*, 1998)

- aumenta o grau de hidratação das posições onde ocorreu saída do grupo metila (ASSIS *et al*, 2002)
- promove o aumento das forças de repulsão devido às cargas elétricas dentro da matriz polimérica da parede celular (ASSIS *et al*, 2002)
- causa diminuição da susceptibilidade das pectinas à β -degradação induzida pelo calor (ASSIS *et al*, 2002)
- aumenta a susceptibilidade à despolimerização promovida pela poligalacturonase (PG) (ASSIS *et al*, 2002)

A degradação da pectina, constituinte da parede celular, causa amolecimento dos tecidos e perda de textura em vegetais e frutas estocados (PLAZA *et al*, 2003). A ação da pectinametilesterase libera ácido poligalacturônico, substrato para a ação da poligalacturonase, enzima despolimerizante, associada à perda de textura em frutas e vegetais estocados (NIELSEN e CHRISTENSEN, 2002).

A interação do ácido pectínico resultante da ação da PME com íons cálcio, com formação de pectato de cálcio insolúvel, causa perda da estabilidade da turbidez, com conseqüente clarificação do suco (ASSIS *et al*, 2000) e (ASSIS *et al*, 2001), perda de componentes de aroma e sabor, a aumento da susceptibilidade à oxidação (ASSIS *et al*, 2002). Para sucos como laranja e limão, a turbidez é característica de qualidade desejável, e a clarificação implica na perda de valor comercial do suco (MACDONALD *et al*, 1993).

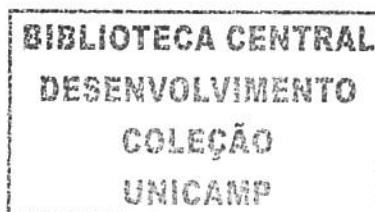
Na produção de sucos concentrados congelados, a medida em que o grau de concentração aumenta, os níveis de pectina desmetoxilada pela ação da pectinametilesterase crescem a ponto de causar a gelatinização do suco, com a formação de uma rede tridimensional de moléculas de pectina que imobiliza o componente aquoso (CAMERON *et al*, 1998; REIN e HEINONEN, 2004).

A pectinametilesterase apresenta especial interesse para a indústria de alimentos, tanto por causar a clarificação de sucos durante o processamento quanto por promover a gelificação de sucos concentrados congelados (ASSIS *et al*, 2002).

2.5.4 – Inibição e controle da atividade da pectinametilesterase

Foi demonstrado que alguns sais podem inibir a ação da pectinametilesterase, enquanto outros potencializam sua atividade. Dentre os sais com efeito inibidor, são mencionados o $MgSO_4$, $CaCl_2$ e $MgCl_2$. Por outro lado, $NaCl$, Na_2SO_4 e K_2SO_4 mostraram efeito ativador sobre a enzima (ASSIS *et al*, 2002).

A inativação térmica é o método empregado com maior frequência no controle da atividade de pectinametilesterase em alimentos. O binômio de tratamento mais empregado na indústria de sucos para inativação da pectinametilesterase de frutas cítricas é de 90°C por um minuto (ASSIS *et al*, 2000; VERSTEEG *et al*, 1980). Este mesmo tratamento também promove a inativação completa da pectinametilesterase proveniente de maçã (CASTALDO *et al*, 1989).



No entanto, em alguns casos são necessários tratamentos térmicos mais rigorosos, como no caso da enzima proveniente da acerola, capaz de manter 13,5% de sua atividade inicial mesmo após 90 minutos a 98°C. Muitas isoformas de pectinametilesterase relatadas na literatura são glicoproteínas, e este fator pode estar relacionado à sua grande termoestabilidade (ASSIS *et al*, 2002).

Para a manutenção das características de suco de laranja concentrado congelado, quando não existe inativação térmica da enzima, é sugerida a estocagem em temperatura igual ou inferior a -20°C para controle da perda de turbidez causada pela pectinametilesterase (VERSTEEG *et al*, 1980).

2.6 – APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Os métodos de planejamento experimental permitem determinar a importância relativa de cada uma das variáveis que influem em um dado processo.

A aplicação desta metodologia possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número reduzido de ensaios, cuja resposta será a verificação e determinação dos efeitos individuais e também dos efeitos de interação de todas as variáveis sobre a resposta. Também são definidas as variáveis mais importantes para o processo, são determinados os erros experimentais e de regressão e são obtidos modelos empíricos dos resultados em função das variáveis escolhidas, através de métodos estatísticos de regressão (BARROS NETO *et al*, 2002).

O método de análise de superfície de resposta consiste num grupo de técnicas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas, medidas analiticamente, e um número de variáveis de entrada controladas. Este método permite responder a questões como:

1. das variáveis testadas, quais efetivamente influenciam de maneira significativa na resposta?
2. cada uma das variáveis testadas influencia a resposta de forma independente, ou as variáveis interagem entre si?
3. foi atingido o ponto ótimo (máximo ou mínimo) do processo, ou um deslocamento dos parâmetros pode levar a uma resposta ainda melhor?
4. qual o conjunto de parâmetros num dado processo que resultará no valor desejado para a resposta?

A metodologia de otimização experimental por análise de superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. O objetivo é atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada, modelando-se e deslocando-se tantas vezes quantas forem necessárias. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento é feito sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO *et al*, 2002).

Para a aplicação desta metodologia, é necessário primeiramente programar os experimentos através de um planejamento fatorial de dois níveis. Este planejamento consiste na seleção de dois níveis (nível +1 e nível -1) para cada variável de entrada (variável independente), e na execução de experimentos para todas as combinações possíveis.

Se n fatores (variáveis controladas pelo experimentador) estão envolvidos no estudo de um certo sistema, o planejamento irá requerer a realização de 2^n ensaios diferentes. Este é o número mínimo, para se ter um planejamento fatorial completo. Acrescentam-se ainda ensaios em triplicata nas condições intermediárias aos dois níveis atribuídos a cada variável (ponto central do planejamento), com o objetivo de se estimar o erro experimental associado aos ensaios (BOX *et al*, 1978).

O planejamento fatorial em dois níveis é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm influência sobre a resposta (variável independente) (BARROS NETO *et al*, 2002).

A partir dos dados assim obtidos, são calculados os efeitos simples e de interação das variáveis sobre a resposta. O valor de cada efeito é comparado com o do erro experimental para estabelecer se este efeito é significativo sobre a resposta. Ajusta-se então um modelo estatístico de primeira ordem correlacionando variáveis e respostas. Caso um modelo de primeira ordem não apresente um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, pode-se completar o planejamento realizando-se ensaios nos pontos axiais para o ajuste de um modelo de segunda ordem (BARROS NETO *et al*, 2002). A validação da qualidade do ajuste do modelo empírico obtido na regressão é feita por meio de análise estatística (Teste F) (BOX *et al*, 1978).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS PEROXIDASE, POLIFENOLOXIDASE E PECTINAMETILESTERASE SOLÚVEIS E IONICAMENTE LIGADAS DE AMORA

3.1.1 – Polpa de amora

Para desenvolvimento do trabalho, foram utilizados frutos íntegros congelados de amora preta (*Rubus spp*), obtidos junto a fornecedores da região de Jundiaí (SP). Os frutos eram transportados e estocados em temperatura de -18°C ou inferior e utilizados com no máximo 7 dias da data de congelamento e embalagem.

Amostras de 200 gramas de amora preta congelada (*Rubus spp*) foram trituradas em liquidificador em alta rotação, durante 3 períodos de 2 minutos, com resfriamento em banho de gelo em cada intervalo.

As amostras de polpa obtidas foram utilizadas para a extração de peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase, como descrito a seguir.

3.1.2 – Extração das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase solúveis de amora

3.1.2.1 – Obtenção das enzimas solúveis por fracionamento com sulfato de amônio

As amostras da polpa de amora, preparadas como descrito no item 3.1.1, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi utilizado para extração das enzimas solúveis, e o precipitado foi utilizado para extração das enzimas ionicamente ligadas à matriz da polpa.

Para obtenção das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase solúveis, foi testado o fracionamento com sulfato de amônio a 40%, 60% e 80% de saturação, a partir de uma alíquota de 100 mL do sobrenadante da polpa de amora. Inicialmente adicionou-se sulfato de amônio até 40% de saturação. A solução foi mantida a 5°C durante 24 horas e então centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos a 5°C. O precipitado foi ressuspenso em pequena quantidade de água e dialisado contra água destilada a 5°C por 48 horas, com troca freqüente da água e a amostra obtida foi utilizada para determinação da atividade enzimática. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir-se 60% de saturação. Após 24 horas a 5°C, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos a 5°C. O precipitado foi dialisado contra água destilada a 5°C por 48 horas, com troca freqüente da água, e a amostra obtida foi utilizada para determinação da atividade enzimática. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir-se 80% de saturação. Após 24 horas a 5°C, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi dialisado contra água destilada a 5°C por 48 horas, com troca freqüente da água e a amostra obtida foi utilizada para determinação das atividades de peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase. O sobrenadante foi descartado.

3.1.2.2 – Obtenção das enzimas solúveis por precipitação com acetona

Uma amostra de 200 g de polpa de amora, preparada como descrito no item 3.1.1, foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi estocado a -18°C durante 4 horas, quando foi feita a extração das enzimas ionicamente ligadas.

Para a obtenção das frações solúveis, foi adicionada acetona resfriada a -5°C ao sobrenadante, mantido a 5°C, na proporção de 2:1 (v:v). A amostra foi mantida sob agitação a 5°C durante 3 minutos e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi transferido para placas de vidro, que foram colocadas em câmara de fluxo laminar até eliminação da acetona por evaporação. O precipitado foi ressuspenso em água destilada para o volume de 20 mL, que corresponde a 10% do volume inicial de polpa de amora.

As atividades de polifenoloxidase, peroxidase e pectinametilesterase foram determinadas no concentrado protéico obtido, conforme será descrito no item 3.2.

3.1.3 – Obtenção das enzimas ionicamente ligadas à polpa

Para a extração das enzimas ionicamente ligadas à polpa de amora, o precipitado obtido da polpa (item 3.1.1) foi inicialmente lavado para retirada dos resíduos de enzimas solúveis pela adição de 3 vezes o seu peso em água destilada a 4°C, seguida de centrifugação a 10.000 rpm, durante 15 minutos a 5°C e homogeneizado em liquidificador, durante 10 minutos, com tampão de extração a 4°C. A relação entre a quantidade de precipitado e tampão de extração foi de 1:3 (g/mL). Foram testados dois tampões de extração, com diferentes valores de pH e força iônica, para a extração das enzimas ligadas à polpa:

- Tampão acetato-borato 50 mM, pH 8,3, adicionado de 0,60M de NaCl (ARBAIASH *et al*, 1996)
- Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5, adicionado de 2M de NaCl (ASSIS, 2002)

Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi descartado. O sobrenadante foi concentrado por fracionamento com sulfato de amônio (40, 60 e 80% de saturação) e também por adição de acetona, conforme descrito para as enzimas solúveis nos itens 3.1.1.1 e 3.1.1.2. As atividades de polifenoloxidase, peroxidase e pectinametilesterase foram determinadas nos extratos enzimáticos obtidos conforme será descrito no item 3.2.

3.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.2.1 – Determinação da atividade de polifenoloxidase (PFO)

A atividade de polifenoloxidase foi determinada como descrito por Oktay *et al* (1995) e Lima (1999).

A mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, foi pré-incubada a 25°C durante 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático.

Após 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 420 nm foi monitorado até 5 minutos de reação, a 25°C ou na temperatura indicada, contra o branco, em espectrofotômetro (Beckman modelo DU 70). O tubo branco foi preparado pela mistura de 2,9 mL de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 0,1 mL de 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.

3.2.2 – Determinação da atividade de peroxidase (POD)

A atividade de peroxidase foi determinada como descrito por Khan e Robinson (1994) e Holschuch (2000).

A mistura de reação foi composta de:

- 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão fosfato 0,05M, pH 6,0
- 1,2 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 6,0
- 0,4 mL de H₂O₂ em tampão (0,33 mL H₂O₂ em 100 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 6,0)

Esta mistura foi previamente equilibrada a 25°C durante 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático. Decorridos 15 segundos de reação o aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante 5 minutos de reação a 25°C ou na temperatura indicada, contra o branco em espectrofotômetro (Beckman modelo DU 70). O tubo branco foi preparado pela mistura de 1,5 mL de guaiacol 1% em tampão fosfato 0,05M, pH 6,0, 1,6 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 6,0 e 0,1 mL do extrato enzimático.

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

3.2.3 – Determinação da atividade de pectinametilesterase (PME)

A atividade de pectinametilesterase foi determinada conforme descrito por Hagerman e Austin (1986) e Cano (1997). O método se baseia na variação de pH causada pela ação da enzima sendo que a atividade é determinada espectrofotometricamente pela variação de cor do indicador azul de bromotimol.

A mistura de reação foi composta de:

- 2 mL de pectina cítrica (0,5% em água destilada)
- 0,15 mL de azul de bromotimol (0,01% p/v) em tampão fosfato de potássio 0,003M pH 7,5
- 0,83 mL de água destilada

A mistura foi equilibrada a 25°C, ou na temperatura indicada, por 10 minutos. A absorbância inicial foi medida a 620 nm. Em seguida foram adicionados 20 µL de extrato enzimático e a diminuição na absorbância a 620 nm foi monitorada durante 5 minutos.

Os valores de pH da solução de pectina cítrica, da água destilada e do extrato enzimático foram ajustados para 7,5 com NaOH 2N imediatamente antes do início de cada experimento.

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

3.3 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DA AMORA

3.3.1 – Efeito da temperatura na atividade de POD de amora

A mistura de reação utilizada na determinação de atividade de peroxidase, descrita no item 3.2.2 foi pré-incubada em tubos de ensaio nas temperaturas entre 5°C e 70°C (com variação de 5°C) durante 10 minutos para equilíbrio da temperatura. Decorrido este tempo, os reagentes foram transferidos para a cubeta do espectrofotômetro Beckman DU 70.

Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático e a atividade foi determinada conforme descrito no item 3.2.2. A temperatura da mistura de reação durante a leitura de atividade foi mantida constante, por meio do sistema de controle de temperatura da cubeta do espectrofotômetro.

A temperatura ótima de atividade de peroxidase, determinada conforme descrito, foi utilizada nas etapas subseqüentes de caracterização da enzima, exceto quando especificado.

3.3.2 – Efeito do pH na atividade de POD de amora

O efeito do pH na atividade da peroxidase de amora foi determinado como descrito no item 3.2.2, a 35°C e 50°C (enzima solúvel) ou 40°C (enzima ligada). Foram utilizados os sistemas tamponantes: tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5, 3,0 e 3,5); tampão acetato 0,1M (pH 4,0, 4,5 e 5,0); tampão fosfato 0,1M (pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5); tampão ácido bórico-bórax 0,1M (pH 8,0, 8,5 e 9,0); tampão bórax-NaOH 0,1M (pH 9,5 e 10,0).

3.3.3 – Efeito da temperatura na estabilidade de POD de amora

Alíquotas de 2 mL de extrato enzimático contendo 700 U/mL de atividade de peroxidase foram incubadas nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C durante 10, 20 e 60 minutos, a 80, 85, 90°C e em ebulição por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, para teste de inativação térmica. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo. A atividade residual de peroxidase foi determinada conforme descrito no item 3.2.2, e expressa como percentagem da atividade enzimática da enzima controle, sem tratamento térmico.

3.3.4 – Efeito do pH na estabilidade de POD de amora

O efeito do pH na estabilidade da peroxidase foi determinado na faixa de 2,5 a 10,0. Foram utilizados os seguintes sistemas tamponantes 0,1 M: tampão glicina-HCl (pH 2,5, 3,0 e 3,5); tampão acetato (pH 4,0, 4,5 e 5,0); tampão fosfato (pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5); tampão ácido bórico-bórax (pH 8,0, 8,5 e 9,0); tampão bórax-NaOH (pH 9,5 e 10,0).

Misturas contendo 1 mL de extrato enzimático contendo 700 U/mL de atividade de peroxidase e 1 mL das diferentes soluções tampões 0,1M foram incubadas por 24 horas a 5°C e também por 4 horas a temperatura ambiente (25°C). Após incubação, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0, e a atividade enzimática residual de peroxidase foi determinada conforme descrito no item 3.2.2. Os resultados foram expressos em percentagem da atividade enzimática da enzima controle no início do experimento.

3.3.5 – Efeito de sais e inibidores na atividade de POD de amora

Foram determinados os efeitos dos sais minerais MnSO_4 , MgSO_4 e CaCl_2 nas concentrações finais de 1, 5 e 10 mM na atividade de POD solúvel e ligada de amora.

Foi também avaliado o efeito dos inibidores ácido ascórbico, metabissulfito de sódio e L-cisteína, nas concentrações finais de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm na atividade de peroxidase de amora.

3.3.6 – Efeito da concentração de substrato na atividade da peroxidase solúvel de amora

O efeito da concentração de substrato na atividade de peroxidase solúvel de amora foi determinado a 35°C como descrito no item 3.2.2, utilizando-se guaiacol na faixa de 0,1 a 2,3 mM. Os parâmetros cinéticos K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima de reação) foram determinados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

3.4 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NA ATIVIDADE DE POD, PFO E PME DE AMORA, ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi empregado um planejamento fatorial em dois níveis para verificar a influência das variáveis independentes pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico nas atividades de peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora.

A **Tabela 3** mostra a matriz do planejamento com os valores reais e codificados para os ensaios realizados. Os valores entre parênteses mostram a ordem de realização dos experimentos, determinada aleatoriamente, por sorteio.

As respostas medidas (variáveis dependentes) foram as atividades residuais das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase (POD, PFO e PME), expressas em percentuais da atividade das enzimas em suas condições ótimas (controle).

Os valores das variáveis de pH, nos níveis -1 e +1, foram escolhidos com base nos valores típicos encontrados nos sabores frutais em sobremesas lácteas congeladas. Os valores de temperatura, na faixa entre 8°C e 25°C, representam as condições usuais de exposição no ponto de venda e comercialização de sobremesas resfriadas.

TABELA 3 - Matriz do planejamento experimental para determinação dos efeitos das variáveis pH, temperatura e concentração de inibidores na atividade das enzimas POD, PFO e PME

ENSAIO	X	Y	Z	pH	Temperatura (°C)	Concentração do inibidor ácido ascórbico (ppm)
1 (8)	-1	-1	-1	4,0	8°C	0
2 (3)	+1	-1	-1	5,5	8°C	0
3 (4)	-1	+1	-1	4,0	25°C	0
4 (11)	+1	+1	-1	5,5	25°C	0
5 (6)	-1	-1	+1	4,0	8°C	50
6 (2)	+1	-1	+1	5,5	8°C	50
7 (7)	-1	+1	+1	4,0	25°C	50
8 (1)	+1	+1	+1	5,5	25°C	50
9 (10)	0	0	0	4,7	16°C	25
10 (5)	0	0	0	4,7	16°C	25
11 (9)	0	0	0	4,7	16°C	25

4 –RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE PEROXIDASE, POLIFENOLOXIDASE E PECTINAMETILESTERASE

Os extratos enzimáticos foram obtidos conforme descrito no item 3.1.

A **Tabela 4** e o **Fluxograma 1** e ilustram as atividades das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PFO) e pectinametilesterase (PME) nas diferentes frações.

TABELA 4 - Atividade de peroxidase (POD), polifenoloxidase (PFO) e pectinametilesterase (PME) durante o processo de obtenção das enzimas de amora

AMOSTRA		FRAÇÃO	POD	PFO	PME
			UNIDADES / mL		
POLPA DE AMORA	A	Extrato bruto de enzimas solúveis	0	0	0
	B	Extrato bruto de enzimas ligadas	0	0	0
EXTRATO BRUTO DE ENZIMAS SOLÚVEIS	C	fracionamento c/ sulfato de amônio 40%	0	0	0
	D	fracionamento c/ sulfato de amônio 60%	6	5	0
	E	fracionamento c/ sulfato de amônio 80%	13	0	0
	F	precipitação c/ acetona	1773	12	0
EXTRATO BRUTO DE ENZIMAS LIGADAS	G	fracionamento c/ sulfato de amônio 40%	0	0	0
	H	fracionamento c/ sulfato de amônio 60%	0	0	0
	I	fracionamento c/ sulfato de amônio 80%	0	15	0
	J	precipitação c/ acetona	864	180	97

O extrato bruto de enzimas solúveis (A), obtido por centrifugação da polpa de amora, não apresentou atividade detectável de POD, PFO e PME nas condições testadas. Assim, testou-se a concentração da enzima através de fracionamento com sulfato de amônio e precipitação com acetona.

O concentrado obtido por precipitação com acetona (F) apresentou maior atividade de POD (1773 U/mL) e PFO (12 U/mL), quando comparado com o concentrado obtido por fracionamento com sulfato de amônio. O concentrado F não apresentou atividade de PME.

O extrato (B) obtido do tratamento do resíduo de centrifugação da polpa de amora com solução tampão, para extração das enzimas ligadas, não apresentou atividades de POD, PFO e PME detectáveis nas condições testadas. Assim sendo, testou-se a concentração das enzimas através da precipitação com sulfato de amônio ou acetona.

A fração de enzimas ligadas obtidas por precipitação com acetona (J) apresentou atividade de POD (864 U/mL), PFO (180 U/mL) e PME (97 U/mL).

Estes resultados indicam que a amora contém peroxidase nas formas solúvel e ligada, polifenoloxidase nas formas solúvel e ligada e pectinametilesterase na forma ligada (extraída com tampão).

Observou-se que cerca de 67% da peroxidase total de amora se encontra na forma solúvel e 33% na forma ligada. A proporção da fração solúvel em relação à peroxidase total é de 96,8% para pimenta e 85% para tomate. Já no caso de morangos, a quantidade de peroxidase ligada à polpa é de 100 a 1000 vezes maior que a fração solúvel (POMAR *et al*, 1997).

A atividade de peroxidase em amora preta fresca foi estimada considerando-se que não houve desnaturação da enzima durante o processo de extração. Foram obtidos 177,3 U/g de peroxidase solúvel e 88,4 U/g de peroxidase ligada, e o total de 265 U/g de peroxidase em amoras frescas. Frutos de açaí frescos apresentam 769 U/g de peroxidase (SANTOS, 2001). A carambola fresca apresenta atividade de peroxidase de 360 U/g (HOLSCHUH, 2000). Algumas variedades de abacaxi apresentam de 3200 a 4000 U/g de peroxidase, e variedades comerciais, como a Pérola, têm atividade ainda maior, da ordem de 5600 U/g (BRITO, 2001).

4.2 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DE AMORA

4.2.1 – Efeito da temperatura na atividade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora

A Figura 2 mostra o perfil de atividade das peroxidases solúvel e ionicamente ligada de amora, em função da temperatura de reação.

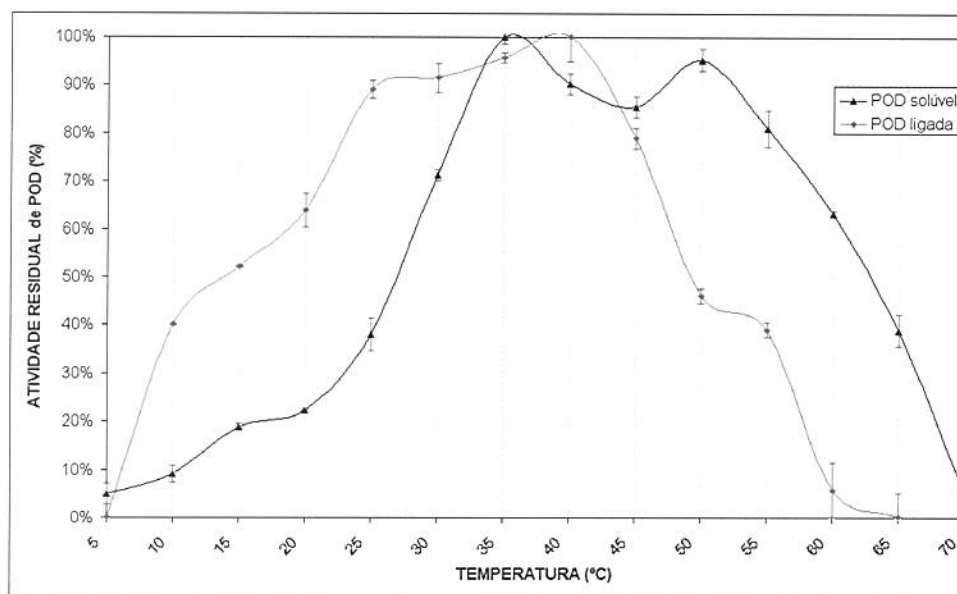


FIGURA 2 – Efeito da temperatura na atividade de POD solúvel e ionicamente ligada de amora

(as barras verticais mostram o desvio padrão ($\pm$) das repetições, sempre que este exceder o tamanho do símbolo)

A fração de peroxidase solúvel de amora apresentou dois picos de maior atividade, a 35°C e a 50°C. A fração ligada da enzima apresentou cerca de 90% ou mais de atividade residual na faixa entre 25°C e 40°C e atividade máxima a 40°C.

Peroxidases de frutas podem apresentar atividade ótima em ampla faixa de temperatura, desde valores próximos à temperatura ambiente até temperaturas mais elevadas, entre 50°C e 65°C. As peroxidases de morango (CIVELLO *et al*, 1995) e açaí (SANTOS, 2001) têm atividade ótima a 30°C e 35°C, respectivamente. As peroxidases de melão (RODRÍGUEZ-LÓPEZ *et al*, 2000) e abacaxi (BRITO, 2001) apresentam temperatura ótima a 50°C.

A presença de mais de um pico de atividade ótima normalmente se deve à presença de isoenzimas de POD. Foi relatada a presença de isoenzimas com diferentes temperaturas ótimas para morango (CIVELLO *et al*, 1995), maçã (VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004) e laranja (CLEMENTE, 1998).

4.2.2 – Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora

As **Figuras 3A e 3B** ilustram a estabilidade térmica das peroxidases solúvel e ionicamente ligada de amora, na faixa de 30°C a 80°C. As **Figuras 4A e 4B** mostram a estabilidade das enzimas na faixa de 80°C até temperatura de ebulição.

As peroxidases solúvel e ligada de amora mostraram-se relativamente estáveis após 60 minutos de tratamento na faixa de 30°C a 70°C, mantendo mais de 70% (peroxidase solúvel) e 60% (peroxidase ligada) de atividade residual.

A peroxidase solúvel foi quase completamente inativada após 60 minutos de tratamento a 75°C (8% de atividade residual). Após 10 minutos a 80°C, tanto a enzima solúvel quanto a ligada retiveram em torno de 3% de atividade residual. O tratamento a 90°C, durante 30 segundos, inativou completamente ambas as enzimas.

A grande estabilidade térmica é uma característica comum às peroxidases de várias frutas. Alguns autores atribuem esta grande estabilidade térmica à presença de açúcares na molécula da enzima (POMAR *et al*, 1997). Também foi relatado que a presença de um grande número de resíduos de cisteína na cadeia polipeptídica contribui para a termoestabilidade das peroxidases (DEEPA, 2002).

A peroxidase parcialmente purificada de açaí mantém 20% da atividade enzimática após 5 minutos a 90°C, ou 3 minutos em temperatura de ebulição (SANTOS, 2001) mostrando-se mais termoresistente que a de amora. O mesmo pode ser observado para a peroxidase de maçã, que mantém até 80% (isoperoxidases catiônicas) e 20% (isoperoxidases aniônicas) de sua atividade inicial quando tratada a 80°C por 10 minutos (VALDERRAMA e CLEMENTE, 2004).

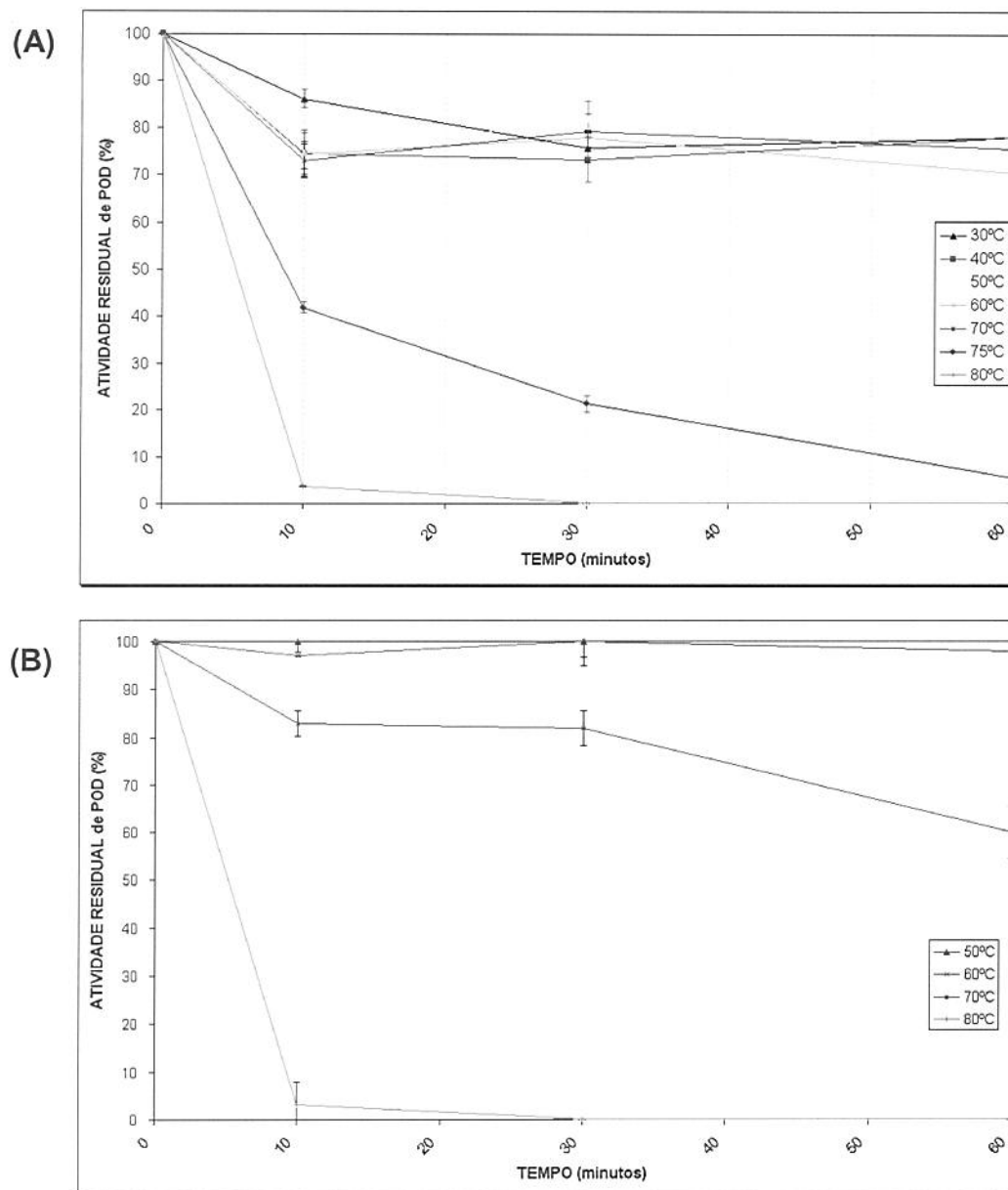


FIGURA 3 – Estabilidade térmica da peroxidase solúvel **(A)** (30 a 80°C) e ionicamente ligada **(B)** (50 a 80°C) de amora

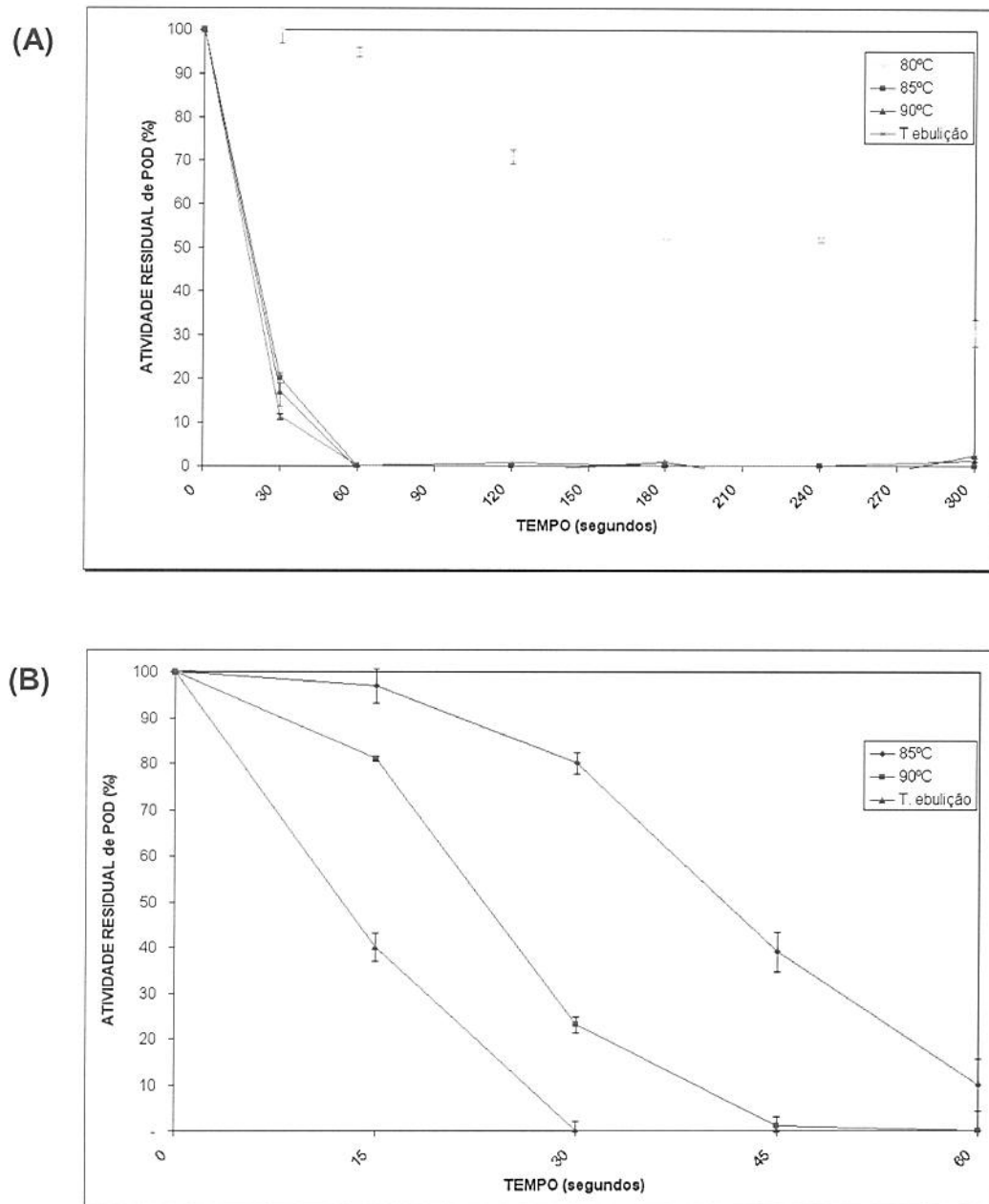


FIGURA 4 – Estabilidade térmica da POD solúvel de amora após exposição a 80°C, 85°C, 90°C e a temperatura de ebulição **(A)** e da POD ionicamente ligada de amora após exposição a 85°C, 90°C e a temperatura de ebulição **(B)**

A peroxidase parcialmente purificada de tomate mostrou-se menos termo-resistente que a de amora, sendo completamente inativada após 10 segundos a 72°C (ANTHON *et al*, 2002). O mesmo pode ser observado para a peroxidase de pimenta, que mantém apenas 10% da atividade enzimática inicial para o tratamento a 80°C durante 5 minutos (POMAR *et al*, 1997), enquanto que a amora apresenta atividade residual de 30% nas mesmas condições. A peroxidase parcialmente purificada de morango perde quase que completamente a atividade enzimática quando tratada a 60°C durante 5 minutos (CIVELLO *et al*, 1995).

Os tratamentos térmicos usualmente empregados para branqueamento de frutas e vegetais íntegros contemplam temperaturas entre 70 e 100°C, e tempo de 2 a 3 minutos (FORSYTH *et al*, 1999). O tratamento térmico necessário para completa inativação da peroxidase de amora (90°C durante 30 segundos) se encontra contido nesta faixa.

4.2.3 – Regeneração da peroxidase de amora após tratamento térmico

As amostras submetidas a tratamentos na faixa de 70°C - 90°C foram posteriormente mantidas durante 24 horas a 25°C, para avaliar a capacidade de regeneração da atividade enzimática após tratamento térmico.

A **Tabela 5** mostra a atividade residual de peroxidase imediatamente após o tratamento térmico e após 24 horas em repouso.

Após tratamento a 80°C (1, 2, 3, 4 e 5 minutos) e posterior incubação durante 24 horas a 25°C, observou-se regeneração parcial da atividade de peroxidase, de cerca de 5% a 23%.

Quando o extrato foi exposto a 85°C durante 30 segundos, não foi detectada atividade de peroxidase logo após o tratamento térmico. Entretanto após 24 horas de incubação a 25°C foi observado 20% de regeneração da atividade enzimática.

TABELA 5 - Regeneração da atividade de peroxidase de amora após tratamento térmico na faixa de 60°C até ebulição, seguido incubação durante 24 horas a 25°C

Temperatura	Tempo de exposição	% Atividade residual	% Atividade após regeneração	% Regeneração da atividade
60°C	120 minutos	100	100	0
70°C	60 minutos	91	100	9
70°C	120 minutos	97	93	0
80°C	30 segundos	100	100	0
80°C	1 minuto	95	100	5
80°C	2 minutos	71	94	23
80°C	3 minutos	52	61	9
80°C	4 minutos	52	75	23
80°C	5 minutos	30	37	7
85°C	30 segundos	0	20	20
90°C	30 segundos	100	100	0
90°C	1 minuto	0	0	0
90°C	2 minutos	0	0	0
90°C	3 minutos	0	0	0
Ebulição	15 segundos	76	100	24
Controle	Sem tratamento	100	100	0

A peroxidase tratada a 90°C durante 1, 2 e 3 minutos não apresentou capacidade de regeneração. O tratamento em ebulição durante 15 segundos desnaturou parcialmente a enzima, e esta recuperou totalmente a atividade após 24 horas a 25°C.

A peroxidase de couve-de-bruxelas regenerou 45% da atividade enzimática inicial, após tratamento a 60°C por 2 minutos, e posterior incubação a 30°C durante 2,5 horas. Dentre as 4 isoenzimas estudadas, as espécies aniônicas apresentaram capacidade de regeneração muito superior àquela apresentada pelas isoenzimas catiônicas (FORSYTH *et al*, 1999).

A peroxidase de raiz forte, após ser tratada a 70°C por 1 hora, foi capaz de regenerar 30% da atividade inicial após incubação a 30°C por 20 horas. A taxa de regeneração atingiu 57% quando a solução foi neutralizada para pH 7,0 logo após o tratamento térmico (ADAMS, 1997).

4.2.4 – Efeito do pH na atividade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora

O efeito do pH na atividade da peroxidase solúvel de amora foi determinado a 35°C e 50°C. O pH ótimo da peroxidase ionicamente ligada foi determinado a 40°C, sua temperatura de maior atividade. Os resultados podem ser observados nas **Figuras 5 e 6**.

A peroxidase solúvel de amora apresentou maior atividade na faixa de pH de 4,0 a 6,0, tanto a 35°C quanto a 50°C. Os resultados parecem indicar a presença de isoenzimas com maior atividade em pH 4 - 5 e pH 6. É importante ressaltar também que o pH natural da polpa de amora comercial encontra-se na faixa de 3,5 a 4,0, e observa-se que a enzima é ativa nesta faixa.

A peroxidase ionicamente ligada de amora, por sua vez, apresentou maior atividade em pH 6,0.

As peroxidases parcialmente purificadas de morango (CIVELLO *et al*, 1995) e de palmito (ONSA *et al*, 2004) apresentam pH ótimo igual a 6,0. A peroxidase de melão apresenta pH ótimo em 5,5 (RODRÍGUEZ-LÓPEZ *et al*, 2000). Para a enzima proveniente de abacaxi, o valor ótimo relatado é de 4,5 (BRITO, 2001), e para a peroxidase de açaí, na faixa de 4,0 a 5,0 (SANTOS, 2001).

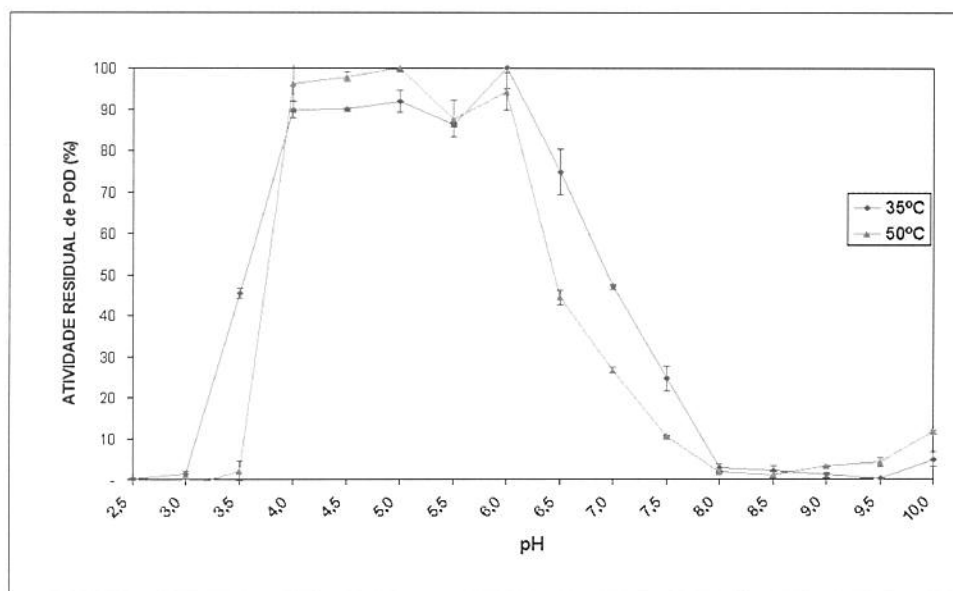


FIGURA 5 – Efeito do pH na atividade de POD solúvel de amora a 35°C e 50°C

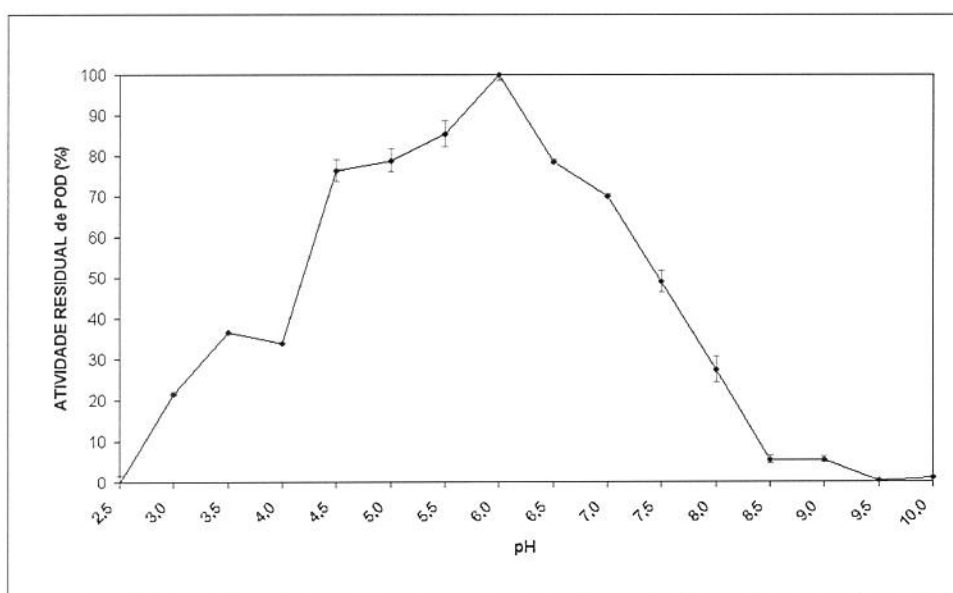


FIGURA 6 – Efeito do pH na atividade de POD ionicamente ligada de amora a 40°C

4.2.5 – Efeito do pH na estabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora

As **Figuras 7** e **8** ilustram respectivamente a estabilidade da peroxidase solúvel e ionicamente ligada de amora.

A escolha das condições de temperatura para avaliação do pH de estabilidade foi baseada nas condições mais comuns de exposição para comercialização de sobremesas, sob refrigeração (5°C) e a temperatura ambiente (25°C). Os tempos de exposição foram baseados no tempo médio de permanência do produto em expositor, antes do consumo total.

A **Figura 7** ilustra que a atividade da peroxidase de amora na fração solúvel foi reduzida cerca de 40% a 75% após incubação durante 4 horas a 25°C ou 24 horas a 5°C, na faixa de pH 3,0 a 10,0, em relação à atividade da preparação enzimática inicial. A peroxidase solúvel não apresentou uma faixa distinta de pH de maior estabilidade.

A **Figura 8** mostra que a peroxidase ionicamente ligada de amora mostrou-se razoavelmente estável na faixa de pH de 3,0 a 10,0, mantendo mais que 50% da atividade inicial após incubação durante 4 horas a 25°C ou 24 horas a 5°C. A peroxidase ionicamente ligada de amora também não apresentou uma faixa distinta de pH de maior estabilidade.

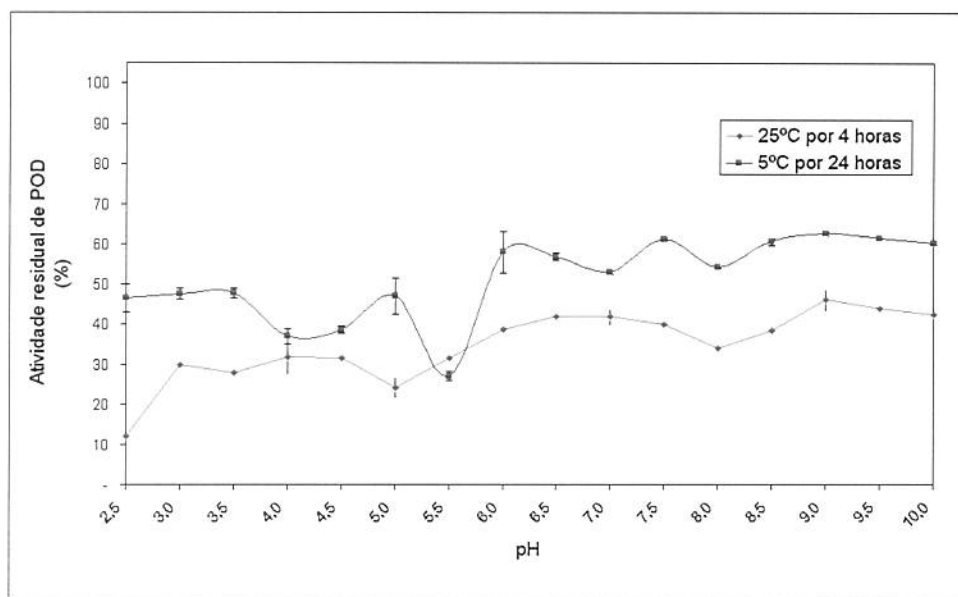


FIGURA 7 – Efeito do pH na estabilidade de POD solúvel de amora

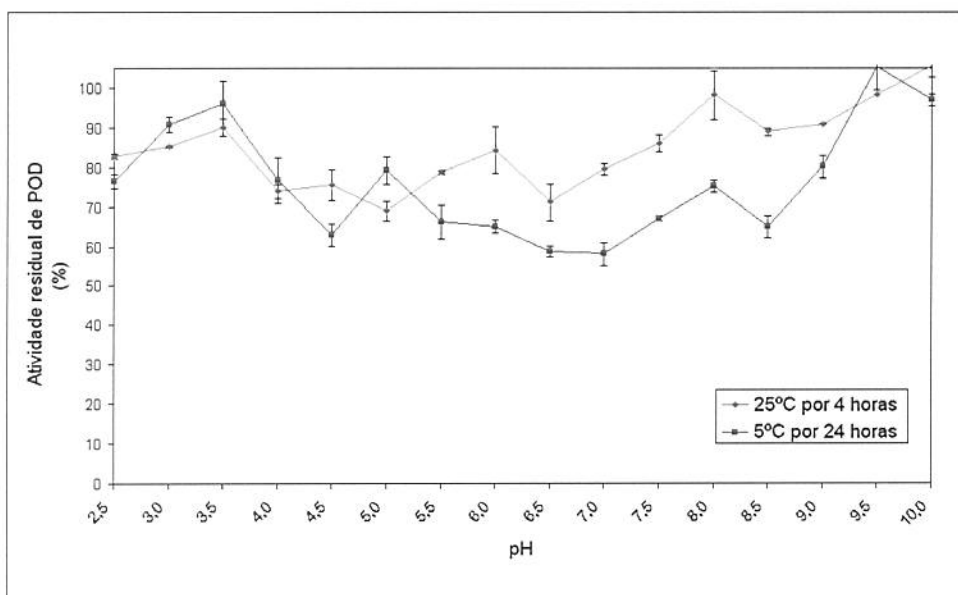


FIGURA 8 – Efeito do pH na estabilidade de POD ionicamente ligada de amora

A peroxidase parcialmente purificada de morango mostrou-se estável na faixa de pH de 4 a 11 durante 30 minutos, a temperatura de 20°C. Em pH igual ou inferior a 3, a enzima perde totalmente sua atividade (CIVELLO *et al*, 1995).

A peroxidase de pimenta (*Capsicum annuum* L.) é estável na faixa de pH de 6,0 a 9,0, quando exposta por 45 minutos, mas é completamente inativada em 5 minutos quando exposta a pH 3,0 (POMAR *et al*, 1997).

A peroxidase bruta de abacaxi mantém quase que integralmente sua atividade enzimática quando exposta a valores de pH na faixa de 3,0 a 9,0, tanto a 5°C por 24 horas quanto a temperatura ambiente por 3 horas (BRITO, 2001).

A peroxidase parcialmente purificada de açaí é estável na faixa de pH de 2,6 a 10,0, quando exposta durante 24 horas a 5°C, mantendo em torno de 90% da sua atividade. Na exposição a temperatura ambiente, por 3 horas, a menor estabilidade ocorreu em torno do pH 4,0, com perda de 40% da atividade enzimática (SANTOS, 2001).

4.2.6 – Efeito de sais e inibidores na atividade da peroxidase solúvel de amora

O efeito dos inibidores ácido ascórbico, L-cisteína e metabissulfito de sódio, nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 150 e 200 ppm, sobre a atividade de peroxidase se encontram na **Figura 9**. O efeito da adição dos sais MgSO₄, CaCl₂ e MnSO₄, nas concentrações de 1, 5 e 10 Mm estão ilustrados na **Figura 10**.

Dentre os compostos testados, o inibidor mais potente foi o ácido ascórbico, que causou a inibição completa da atividade na concentração de 50 ppm. L-cisteína e metabissulfito mostraram-se inibidores efetivos na inibição a partir de 150 ppm.

O ascorbato de sódio também inibiu completamente a atividade da peroxidase do fruto de palmeira de sagu, na concentração de 0,05 mM. Neste caso, a ação do ascorbato foi de um inibidor competitivo, com K_i de 0,01mM, e mostrou-se mais eficiente que o metabissulfito de sódio, L-cisteína, ácido kojico e ácido *p*-cumárico. Este mesmo estudo mostrou que o metabissulfito age como um inibidor não competitivo, e a L-cisteína como inibidor incompetitivo (ONSA *et al*, 2004). O ácido ascórbico, em concentração de 0,05 mM, inibiu quase completamente a atividade da peroxidase de melão. Quando combinado com 1 mM de Mn^{+2} , a inibição da enzima foi completa (LAMIKANRA e WATSON, 2000). O metabissulfito inibiu a atividade de peroxidase de palma na concentração de 1mM (DEEPA, 2002).

O sulfato de magnésio não teve influência sobre a atividade de peroxidase de amora nas concentrações testadas. Já o sulfato de manganês mostrou efeito inibitório, já que a enzima não apresenta atividade na presença de 10mM deste sal. Lamikanra e Watson (2000) verificaram que a presença de Mn^{+2} reduz a atividade de peroxidase de melão em 30% e sugeriram que o mecanismo de inativação da peroxidase por manganês envolve a ligação de duas moléculas Mn^{3+} à enzima, em posição próxima ao grupamento heme, à custa de uma molécula de H_2O_2 .

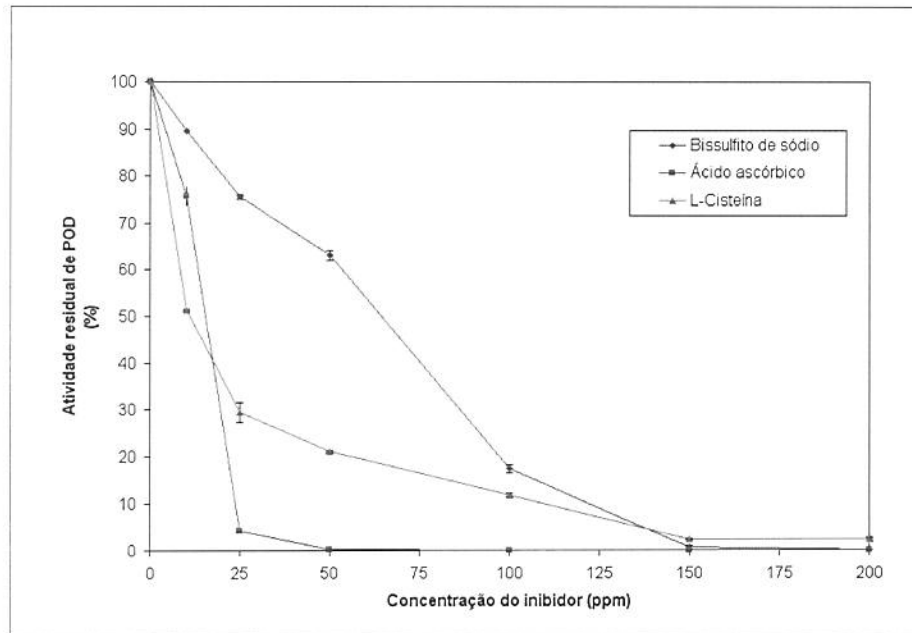


FIGURA 9 – Efeito dos compostos metabissulfito de sódio, ácido ascórbico e L-cisteína na atividade de POD de amora

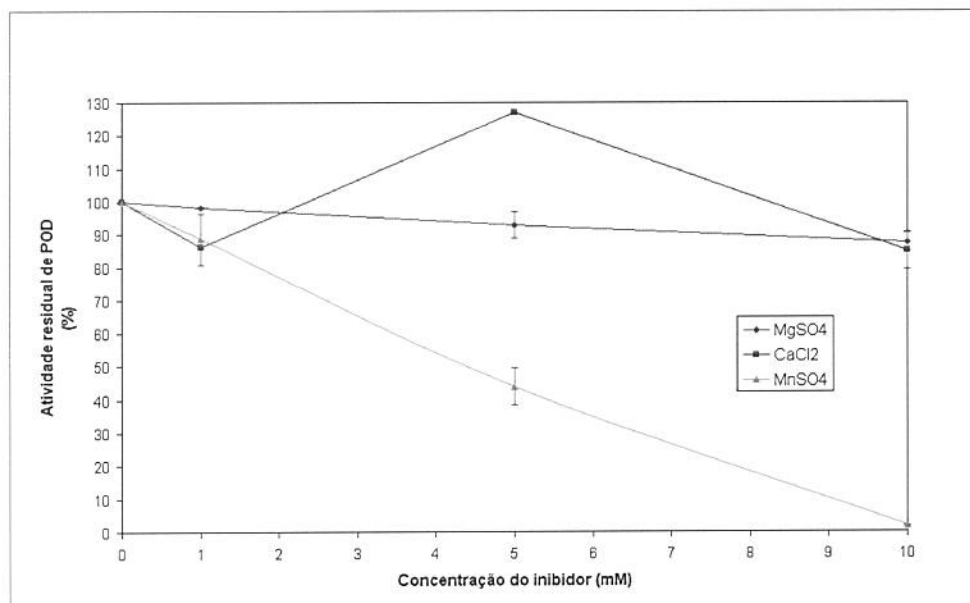


FIGURA 10 – Efeito da adição de sais MgSO₄, CaCl₂ e MnSO₄ na atividade de POD de amora

O cloreto de cálcio, por sua vez, teve o efeito de incrementar em 20% a atividade da peroxidase de amora na concentração de 5 mM.

O efeito da ativação da peroxidase por íons Ca^{2+} foi relatado para outras peroxidases. A atividade das isoenzimas do fruto de palmeira de sagu aumentou em 168% na presença de 10mM de CaCl_2 (ONSA *et al*, 2004). O cálcio é um cofator que atua na manutenção da integridade conformacional do sítio ativo. Este efeito também foi relatado para a peroxidase de abacate (SANCHES-ROMERA *et al*, 1994), tomate (MARANGONI *et al*, 1989), gérmen de trigo (BILLAUD *et al*, 1999; CONVERSO e FERNÁNDEZ, 1996) e batata doce (LAMIKANRA e WATSON, 2000). No entanto, este fenômeno só foi observado para peroxidases catiônicas (POMAR *et al*, 1997).

Este fato é relevante para a aplicação da amora em sobremesas congeladas, pois estas utilizam leite em sua formulação, o que agrega naturalmente íons cálcio no produto, podendo levar a um aumento na atividade e aceleração dos efeitos da enzima na deterioração do sabor ao longo da estocagem.

4.2.7 – Efeito da concentração de substrato na atividade da peroxidase solúvel de amora

O efeito da concentração do substrato na atividade da POD de amora foi avaliado na faixa de 1,25 e 11,75mM de guaiacol. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk, como mostra a **Figura 11**. A peroxidase de amora apresentou valores de K_m e V_{max} iguais a 5,52 mM de guaiacol e 1573 U/mL, respectivamente. A peroxidase de açaí apresentou K_m igual a 2,4 mM de guaiacol (SANTOS, 2001).

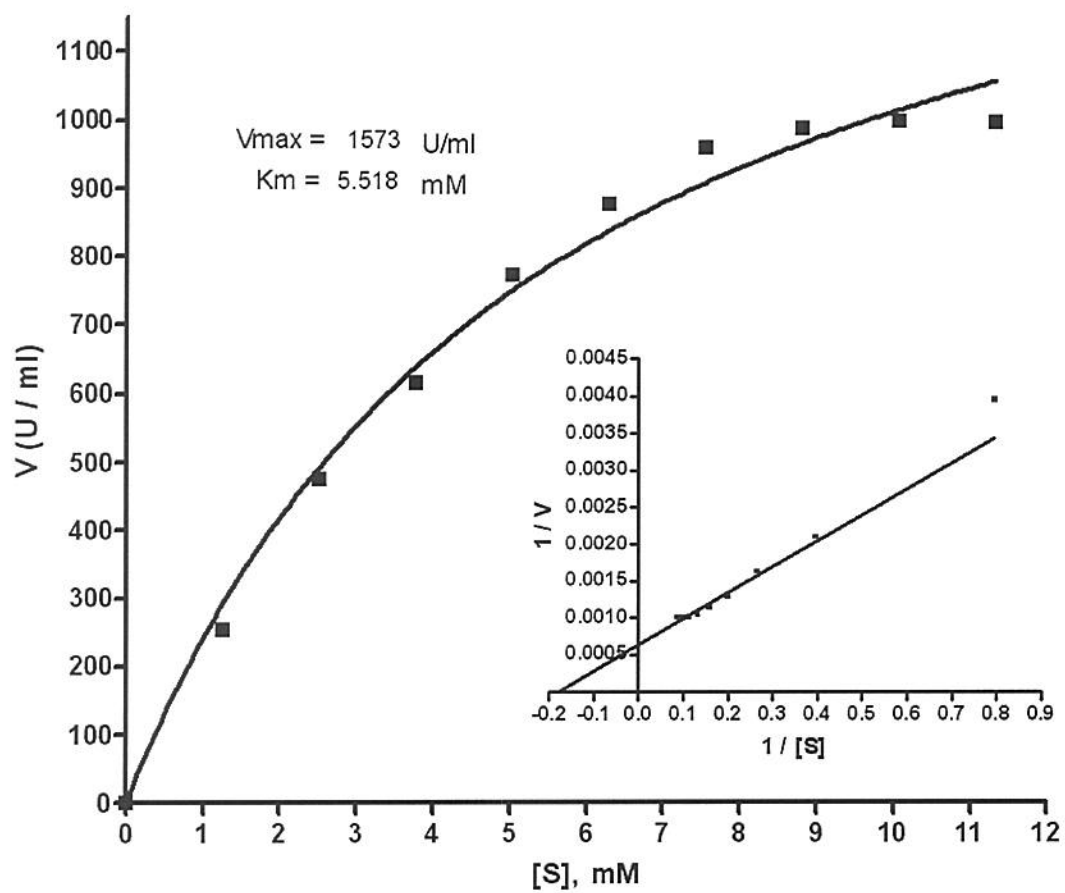


FIGURA 11 – Aplicação do método de Lineweaver-Burk na obtenção das constantes cinéticas K_m e $V_{\max}$ para a POD solúvel de amora

4.3 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE INIBIDOR NA ATIVIDADE DE POD, PFO E PME DE AMORA, ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 – Peroxidase

A **Tabela 6** mostra os valores de atividade de peroxidase obtidos para os experimentos do planejamento fatorial descrito no item 3.4.

TABELA 6 – Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade da peroxidase de amora

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	[Ác. ascórbico] (ppm)	POD (%)
1	4	8	0	25,89
2	5,5	8	0	66,00
3	4	25	0	55,67
4	5,5	25	0	106,92
5	4	8	50	-2,72
6	5,5	8	50	0,18
7	4	25	50	22,95
8	5,5	25	50	15,25
9 (C)	4,75	16,5	25	34,18
10 (C)	4,75	16,5	25	39,44
11 (C)	4,75	16,5	25	39,49
Controle	6	35°C	0	100,00

O modelo linear ajustado para a variação da atividade de peroxidase em função das variáveis temperatura, pH e concentração do inibidor ácido ascórbico é descrito pela **Equação 1**:

$$\text{POD} = -107,7 + 30,4 \cdot \text{pH} + 1,6 \cdot \text{Temp} + 1,9 \cdot \text{ASC} - 0,6 \cdot \text{pH} \cdot \text{ASC} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

POD: Atividade residual de peroxidase

pH: valor do pH

Temp: valor da temperatura, em °C

ASC: Concentração do inibidor ácido ascórbico, em ppm

Foram descartados do modelo os efeitos não significativos estatisticamente. São eles a interação entre temperatura e pH e a interação entre temperatura e concentração de ácido ascórbico.

A significância estatística do modelo foi avaliada por análise de variância, expressa na **Tabela 7**.

TABELA 7 – Análise de variância para o modelo linear para a atividade de POD expresso na Equação 1

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	9631,27	4	2407,82	
Resíduos	194,37	6	32,39	74,33
Falta de Ajuste	175,74	4	43,94	
Erro Puro	18,63	2	9,31	4,72
Total	9825,64	10	982,56	

% de variância explicada: 98,02%

% máxima de variância explicável: 99,81%

F_{0,95; 4;6} = 4,53

F_{0,99; 4;6} = 9,15

É necessário, para que um modelo seja considerado não apenas estatisticamente significativo, mas também útil no sentido de realizar previsões, que o valor de F calculado seja de 3 a 4 vezes maior que o valor de F tabelado, num determinado nível de significância (BARROS NETO *et al*, 2002).

Observamos que o valor de F do modelo ajustado é 8 vezes maior que o valor tabelado para 99% (9,15), o que o modelo expresso na **Equação 1** preditivo em nível de 99% de significância.

As **Figuras 12, 13, 14 e 15** mostram as superfícies de resposta obtidas para a atividade de POD em função das variáveis pH, temperatura e (ou) concentração de inibidor ácido ascórbico.

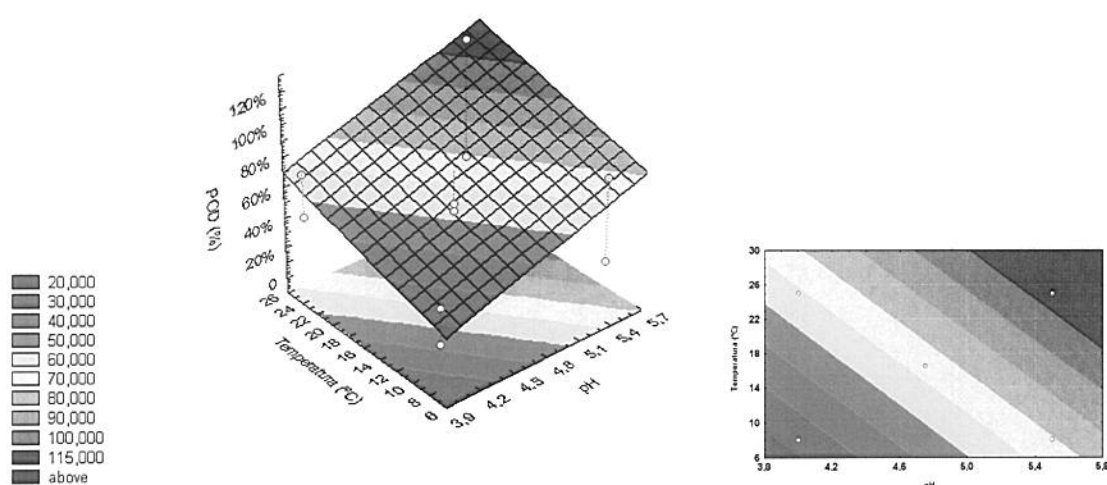


FIGURA 12 – Efeito do pH e da temperatura na atividade da peroxidase de amora, sem adição de ácido ascórbico

Observa-se na **Tabela 6** que em pH igual a 5,5, 25°C e ausência de ácido ascórbico, a enzima apresentou atividade residual maior que a atividade da enzima nas condições controle (pH 6,0 e 35°C). A **Figura 12** e a **Tabela 6** mostram que, a 8°C, a redução do pH de 5,5 para 4,0, causou diminuição da atividade enzimática de POD de 66% para 25,89%. Isto indica que, dentro da faixa estudada (pH 4,0 a 5,5 e 8°C a 25°C), o controle do pH e da temperatura não são suficientes para inibir completamente a peroxidase de amora.

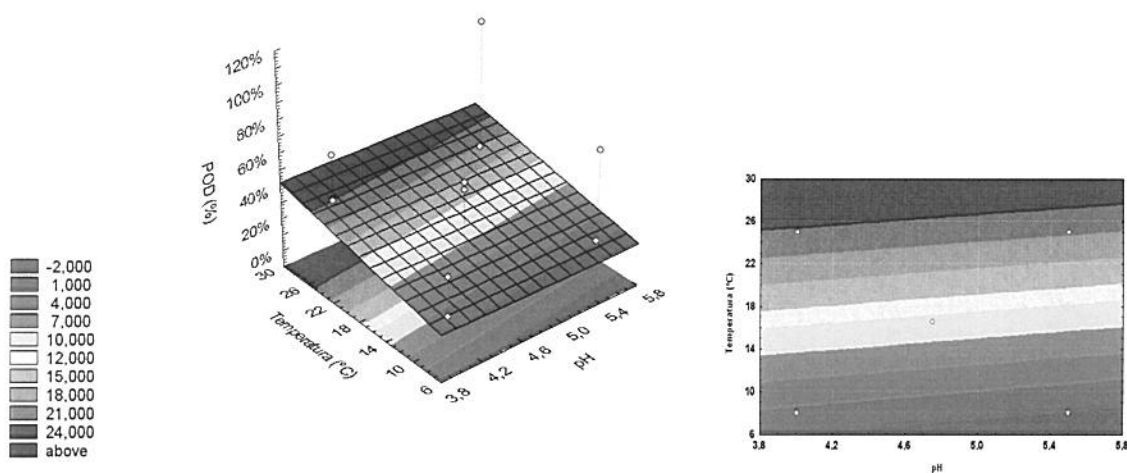


FIGURA 13 – Efeito do pH e da temperatura na atividade da peroxidase de amora na presença de 50 ppm de ácido ascórbico

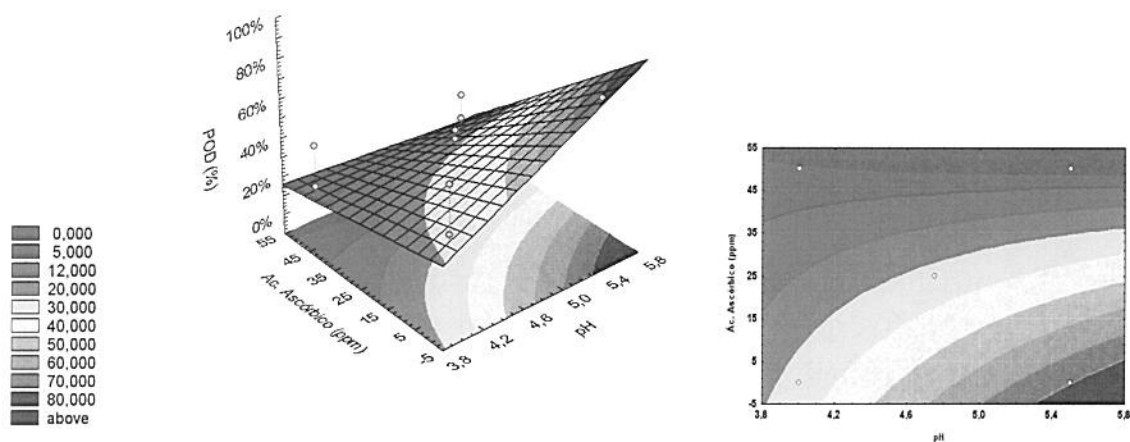


FIGURA 14 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de peroxidase de amora a 8°C

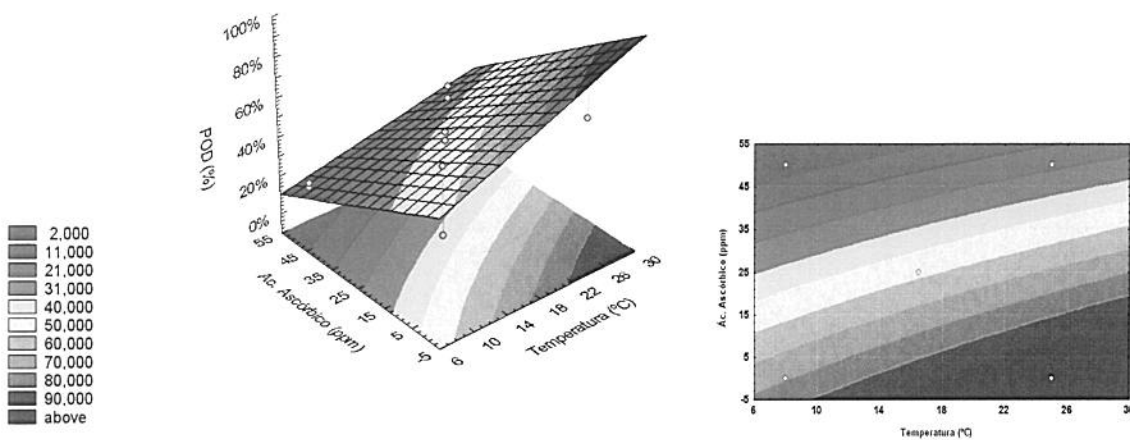


FIGURA 15 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de peroxidase de amora a pH 5,5

A **Figura 14** e a **Tabela 6** mostram que, a 25°C, a adição de 50 ppm de ácido ascórbico causou redução de atividade de peroxidase para 22,95% e 15,25% a pH 4,0 e 5,5, respectivamente. Isto mostra que existe interação entre as variáveis pH e concentração de ácido ascórbico na faixa estudada.

As **Figuras 13, 14** e a **Tabela 6** ilustram que a adição de 50 ppm de ácido ascórbico, em pH 4,0 e 8°C, resulta em inativação completa da peroxidase. A **Figura 15** e a **Tabela 6** ilustram que a atividade residual da peroxidase em pH 5,5, 8°C e na presença de 50 ppm de ácido ascórbico foi de 0,18%. Essas duas condições, dentre as combinações estudadas, foram as que resultaram em melhor controle da atividade da peroxidase de amora.

4.3.2 – Polifenoloxidase

A **Tabela 8** ilustra o efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase de amora, determinado através de planejamento experimental, como descrito no item 3.4.

TABELA 8 – Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	[Ác. ascórbico] (ppm)	PFO (%)
1	4	8	0	0,01
2	5,5	8	0	1,02
3	4	25	0	2,52
4	5,5	25	0	12,50
5	4	8	50	0,00
6	5,5	8	50	-0,22
7	4	25	50	-0,46
8	5,5	25	50	-0,56
9 (C)	4,75	16,5	25	-0,02
10 (C)	4,75	16,5	25	-0,21
11 (C)	4,75	16,5	25	-0,54
Controle	6,0	25	0	100

O modelo linear ajustado para a variação da atividade de polifenoloxidase em função das variáveis temperatura, pH e concentração do inibidor ácido ascórbico é descrito pela **Equação 2**:

$$PFO = -6,78 + 0,72 \cdot pH - 0,43 \cdot Temp + 0,41 \cdot ASC + 0,1782 \cdot pH \cdot Temp - 0,07 \cdot pH \cdot ASC - 0,01 \cdot Temp \cdot ASC$$

Equação 2

onde:

PFO: Atividade residual de polifenoloxidase

pH: valor do pH

Temp: valor da temperatura, em °C

ASC: Concentração do inibidor ácido ascórbico, em ppm

O modelo foi avaliado por análise de variância, conforme expresso na Tabela 9.

TABELA 9 – Análise de variância para o modelo linear para a atividade de PFO expresso na Equação 2

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	126,97	6	21,16	
Resíduos	19,65	4	4,91	4,31
Falta de Ajuste	19,51	2	9,76	
Erro Puro	0,14	2	0,07	139,06
Total	146,62	10	14,66	
% de variância explicada: 86,60%				
% máxima de variância explicável: 99,90%				
$F_{0,75; 6,4} = 2,08$				

Foi observado que o valor de F do modelo ajustado de 4,31 torna o modelo significativo apenas em nível de 75% de significância.

As Figuras 16, 17 e 18 mostram as superfícies de resposta obtidas para a atividade de PFO em função das variáveis pH, temperatura e (ou) concentração de inibidor ácido ascórbico.

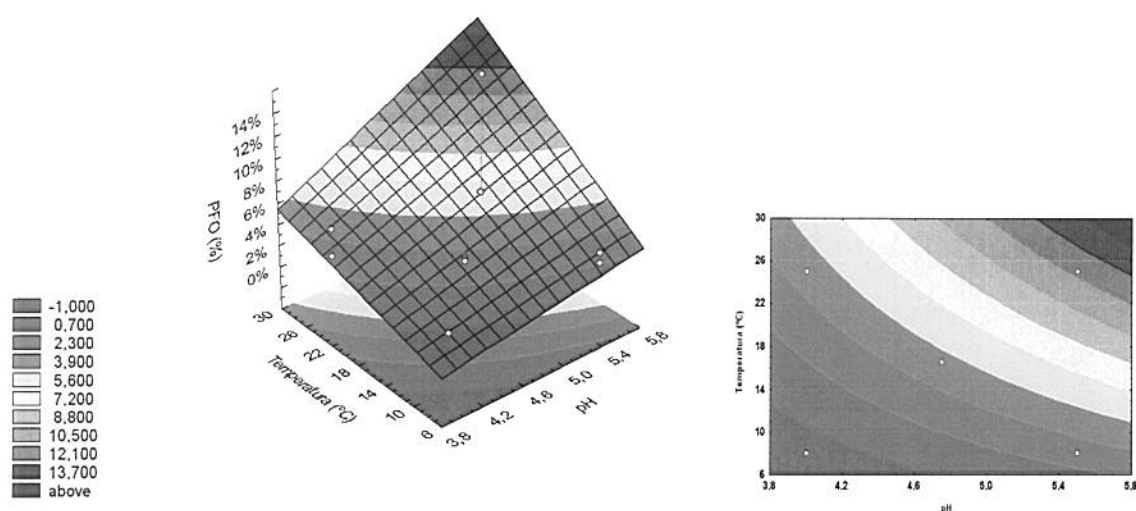


FIGURA 16 – Efeito do pH e da temperatura na atividade de polifenoloxidase de amora sem adição de ácido ascórbico

A **Figura 16** ilustra que a polifenoloxidase de amora, sem adição de ácido ascórbico, foi inibida em temperatura inferior a 18°C e valores de pH inferiores a 5,5, sendo que a atividade residual foi inferior a 0,7%.

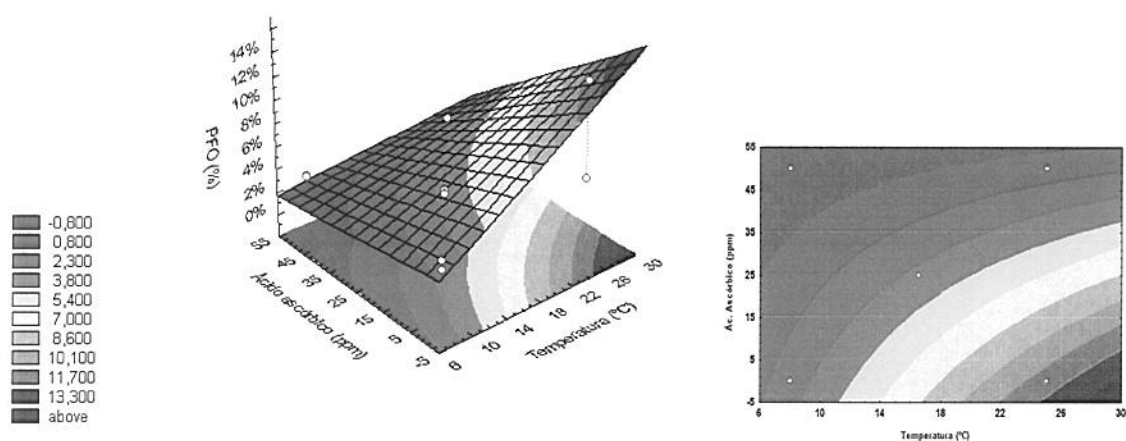


FIGURA 17 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora em pH 5,5

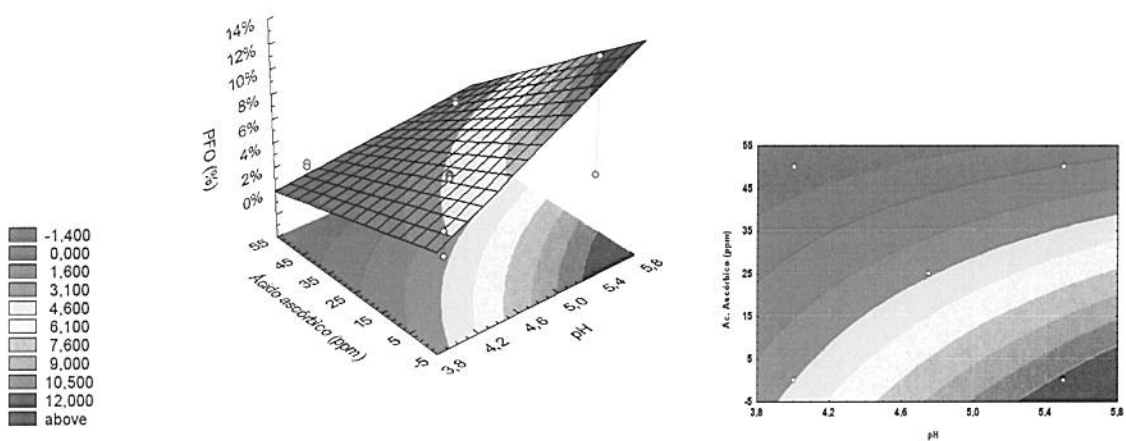


FIGURA 18 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de polifenoloxidase de amora a 25°C

As **Figuras 17 e 18** e a **Tabela 8** ilustram que a polifenoloxidase de amora foi completamente inibida em presença de 50 ppm de ácido ascórbico em valores de pH entre 4,0 e 5,5 e temperatura de 8°C a 25°C.

4.3.3 – Pectinametilesterase

A **Tabela 10** ilustra o efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora determinado através de planejamento experimental, como descrito no item 3.4.

TABELA 10 – Efeito do pH, temperatura e concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	[Ác. ascórbico] (ppm)	PME (%)
1	4	8	0	0,26
2	5,5	8	0	0,00
3	4	25	0	1,15
4	5,5	25	0	58,05
5	4	8	50	0,00
6	5,5	8	50	0,86
7	4	25	50	1,49
8	5,5	25	50	32,00
9 (C)	4,75	16,5	25	0,45
10 (C)	4,75	16,5	25	1,70
11 (C)	4,75	16,5	25	0,58
Controle	7,5	25	0	100

O modelo linear ajustado para a variação da atividade de pectinametilesterase em função das variáveis temperatura, pH e concentração do inibidor ácido ascórbico é descrito pela **Equação 3**.

$$\text{PME} = 27,03 - 9,20 \cdot \text{pH} - 6,35 \cdot \text{Temp} + 0,93 \cdot \text{ASC} + 1,70 \cdot \text{pH} \cdot \text{Temp} - 0,17 \cdot \text{pH} \cdot \text{ASC} - 0,015 \cdot \text{Temp} \cdot \text{ASC}$$

Equação 3

onde:

PME: Atividade residual de pectinametilesterase

pH: valor do pH

Temp: valor da temperatura, em °C

ASC: Concentração do inibidor ácido ascórbico, em ppm

O modelo foi avaliado por análise de variância, expressa na **Tabela 11**.

TABELA 11 – Análise de variância para o modelo linear para a atividade de PME expresso na Equação 3

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3203,66	6	533,94	
Resíduos	350,90	4	87,72	6,09
Falta de Ajuste	349,95	2	174,98	
Erro Puro	0,95	2	0,47	369,93
Total	3554,56	10	355,46	

% de variância explicada: 90,13%

% máxima de variância explicável: 99,97%

$F_{0,75; 6,4} = 2,08$

$F_{0,90; 6,4} = 4,01$

O valor de F do modelo ajustado de 6,09 torna o modelo significativo apenas a 90% de significância, e preditivo com 75% de significância.

As **Figuras 19, 20 e 21** mostram as superfícies de resposta obtidas para a atividade de pectinametilesterase de amora em função das variáveis pH, temperatura e (ou) concentração de inibidor ácido ascórbico.

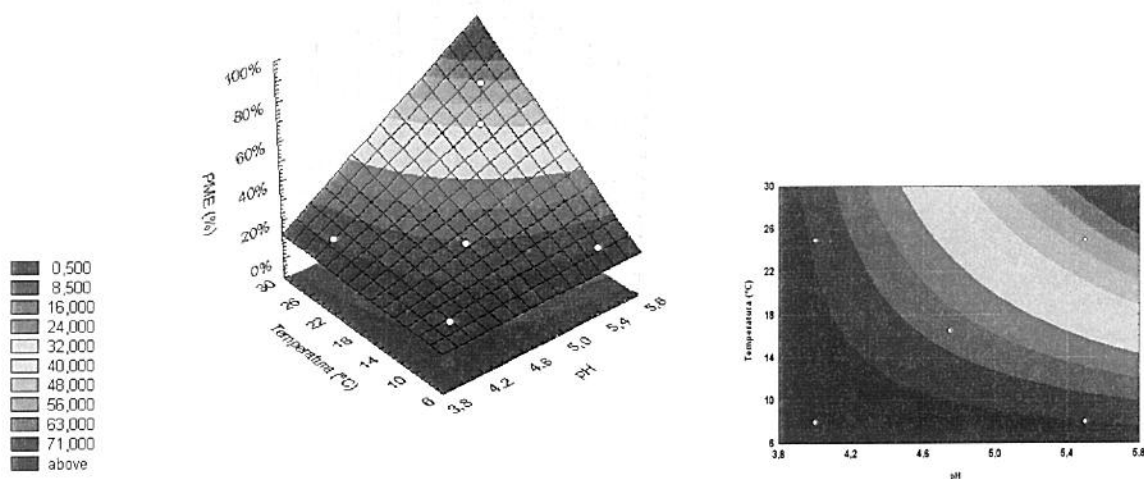


FIGURA 19 – Efeito do pH e da temperatura na atividade de pectinametilesterase de amora sem adição de ácido ascórbico

Observou-se que a atividade de PME de amora é bastante afetada pelas variações de temperatura e de pH. A **Figura 19** e a **Tabela 11** ilustram que a pectinametilesterase de amora foi inibida a 8°C, tanto a pH 4,0 quanto a 5,5 , com atividade residual inferior que 0,5%. A 25°C, a pectinametilesterase de amora reteve cerca de 1,15% e 58,05% de atividade residual em pH 4,0 e 5,5 , respectivamente. Assis *et al* (2002) relataram que as pectinametilesterases de plantas geralmente apresentam pH ótimo de atividade na faixa de 7,0 a 9,0.

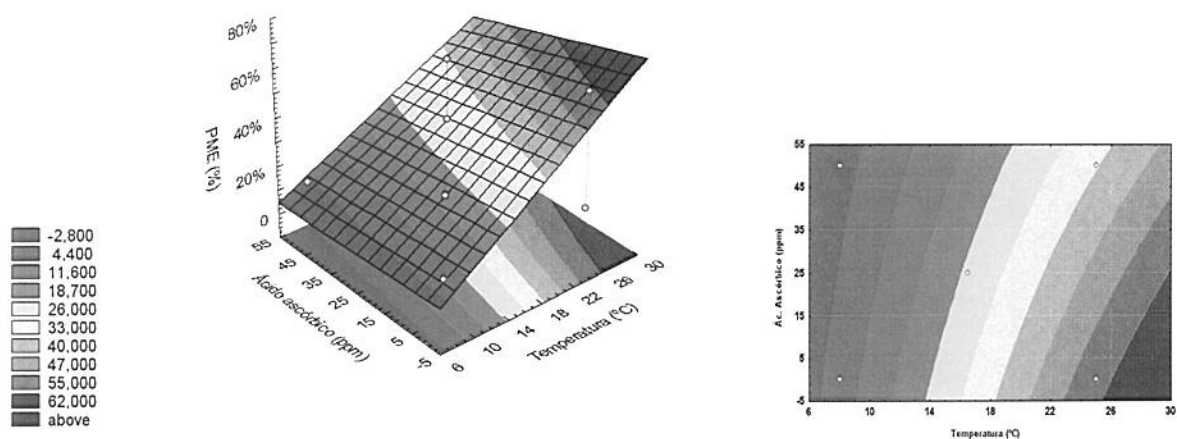


FIGURA 20 – Efeito da temperatura e da concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora em pH 5,5

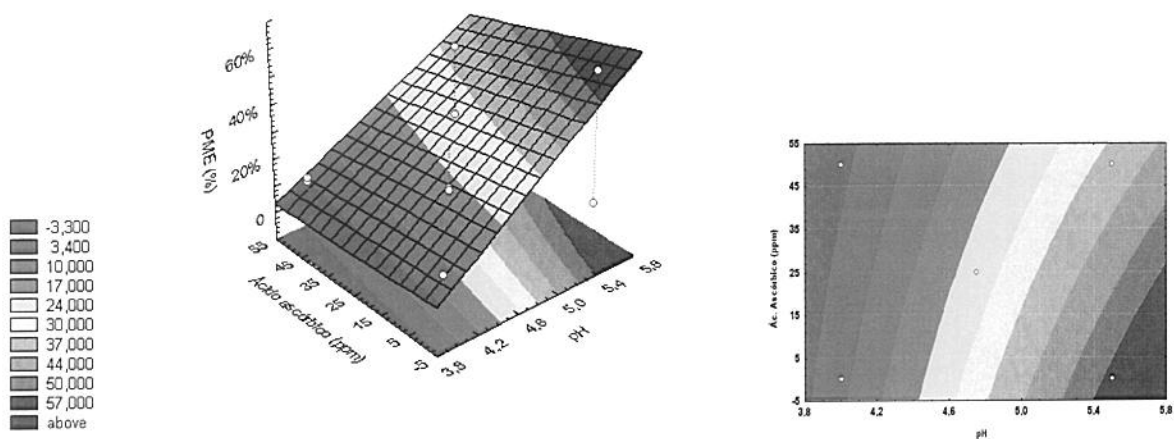


FIGURA 21 – Efeito do pH e da concentração de ácido ascórbico na atividade de pectinametilesterase de amora a 25°C

A **Figura 20** e a **Tabela 10** ilustram que, em pH 5,5, a atividade de pectinametilesterase de amora foi inibida pela diminuição da temperatura.

A **Figura 21** e a **Tabela 10** mostram que, a 25°C e pH 5,5, a atividade de pectinametilesterase foi reduzida de 58,05% para 32,00% pela adição de 50 ppm de ácido ascórbico.

Em resumo, a 25°C a pectinametilesterase pode ser inibida, sem adição de ácido ascórbico, pela redução do pH para 4,0, resultando em atividade residual de 1,15% ou pela manutenção da temperatura na comercialização, abaixo de 8°C, com atividade residual inferior a 0,5% (**Figura 19**).

5 – CONCLUSÕES

A amora preta (*Rubus spp*) contém peroxidase nas formas solúvel e ligada, polifenoloxidase nas formas solúvel e ligada e pectinametilesterase na forma ligada (extraída com tampão).

Foi obtida maior recuperação das enzimas de amora quando concentradas por meio da precipitação com acetona, quando comparada à extração por fracionamento com sulfato de amônio.

A fração de peroxidase solúvel de amora apresentou temperatura ótima de atividade a 35°C e a 50°C. A fração ligada da enzima mostrou atividade ótima em 40°C, e manteve 90% ou mais de atividade na faixa entre 25 e 40°C.

As peroxidases solúvel e ionicamente ligada de amora mostraram-se estáveis após 60 minutos de tratamento nas temperaturas de 30 a 70°C, com retenção de 60% da atividade inicial.

O tratamento térmico mínimo capaz de inativar totalmente ambas as formas da peroxidase de amora é de 90°C durante 30 segundos.

A peroxidase submetida a tratamento térmico a 85°C durante 1, 2, 3, 4 e 5 minutos apresentou capacidade de regenerar a atividade.

A peroxidase solúvel de amora apresentou atividade ótima na faixa de pH 4,0 a 6,0, tanto a 35°C quanto a 50°C, com picos de maior atividade em pH 4,0 - 5,0 e 6,0. A peroxidase ionicamente ligada de amora apresentou maior atividade em pH 6,0.

A peroxidase ionicamente ligada de amora mostrou maior estabilidade do que a peroxidase solúvel após incubação na faixa de pH 3,0 a 10,0 durante 4 horas a 25°C ou 24 horas a 5°C. As peroxidases de amora não apresentaram uma faixa distinta de pH de maior estabilidade.

Nas condições de reação ótimas (30°C e pH 6,0), a peroxidase solúvel de amora foi inibida por metabissulfito de sódio (150 ppm), L-cisteína (150 ppm), ácido ascórbico (50 ppm), e MnSO_4 (10 mM). A atividade não foi afetada por MgSO_4 . A enzima é ativada em presença de CaCl_2 (5 mM).

Os valores de K_m e V_{max} da peroxidase solúvel de amora para o substrato guaiacol foram respectivamente 5,52 mM e 1573 U/mL.

A aplicação do método de planejamento experimental para avaliar o comportamento da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase resultou em um modelo preditivo (99% de significância) para a peroxidase e em modelos estatisticamente significativos para polifenoloxidase (75% de significância) e pectinametilesterase (90% de significância). A atividade de peroxidase de amora pode ser inibida a 8°C, na faixa de pH estudada (4,0 a 5,5), com adição de 50 ppm de ácido ascórbico. A polifenoloxidase pode ser inibida, na faixa de pH (4,0 a 5,5) e temperatura (8 a 25°C) estudada, pela adição de 50 ppm de ácido ascórbico. Na ausência de ácido ascórbico, a atividade foi quase completamente inibida em temperatura inferior a 18°C e pH inferior a 5,5. A pectinametilesterase, a 25°C, pode ser quase completamente inibida, sem adição de ácido ascórbico, pela redução do pH para 4,0 ou pela manutenção da temperatura na comercialização, abaixo de 8°C. Em resumo, as condições que permitiram melhor controle da atividade das três enzimas estudadas foram temperatura inferior a 8°C, pH 4,0 a 5,5 e adição de 50 ppm de ácido ascórbico.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ADAMS, J.B. Review: enzyme inactivation during heat processing of food stuffs, **International Journal of Food Science and Technology** v. 26, p.1-20, 1991
- (2) ADAMS, J.B; HARVEY, A.; DEMPSEY, C. E. Regenerated and denatured peroxidase as potential lipid oxidation catalysts, **Food Chemistry** v. 57, nº 4, p. 505-514, 1996
- (3) ADAMS, J.B. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation, **Food Chemistry** v. 60, nº 2, p.201-206, 1997
- (4) ANTHON, G. E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; BARRETT, D. M. Thermal inactivation of pectin methyl esterase, polygalacturonase and peroxidase in tomato juice, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 6153-6159, 2002
- (5) ANTUNES, L.E.C. Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira preta (*Rubus spp*) no sul de Minas Gerais, Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, 1999
- (6) ANTUNES, L.E.C. Amoreira-preta: nova opção de cultivo no Brasil, **Ciência Rural** v. 32, nº 1, p. 151-158, 2002
- (7) ANTUNES, L.E.C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C.M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta, **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 38, nº 3, p. 1-10, 2003

- (8) APARICIO-CUESTA, M. P.; MATEOS-NOTARIO, M. P.; RIVAS-GONZALO, J. C. Sensory evaluations and changes in peroxidase activity during storage of frozen green beans; **Journal of Food Science** v. 57, p. 1129-1143, 1992
- (9) ARBAIASH, S.M.; ASBI, B.A.; JUNAINAH, A.H.; JAMILAH, B. Determination of optimum conditions for pectinesterase extraction from soursop fruit (*Anona muricata*) using response surface methodology, **Food Chemistry** v. 55, p. 289-292, 1996
- (10) ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Acerola's pectin methyl esterase: studies of heat inactivation, **Food Chemistry** v. 71, p. 465-467, 2000
- (11) ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Activity of pectin methyl esterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development, **Food Chemistry** v. 74, p. 133-137, 2001
- (12) ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; GUAGLIANONID. G.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial purification and characterization of pectin methyl esterase from acerola (*Malpighia glabra* L.), **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 4103-4107, 2002
- (13) BARROS NETO, B.; SCARMINIO, Y. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª edição, Editora da Unicamp, 2002

- (14) BILLAUD, C.; LOUARME, L.; NICOLAS, J. Comparison of peroxidases from barley kernel (*Hordeum vulgare* L.) and wheat germ (*Triticum aestivum* L.): isolation and preliminary characterization, **Journal of Food Biochemistry** v. 23, p. 145-172, 1999
- (15) BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters - an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1978
- (16) BRITO, C. A. K. **Estudo bioquímico das peroxidases de novas variedades de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**, Campinas, 85 p, Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001
- (17) BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **Journal of Food Science** v. 42, p1-6, 1977
- (18) CAMERON, R.; BAKER, R. A.; GROHMANN, K. Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability, **Journal of Food Science** v. 63, nº 2, p.253-256, 1998
- (19) CANO, M.P.; HERNANDEZ, A.; DE ANCOS, B. High pressures and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products, **Journal of Food Science** v. 62, nº 1, p. 85-88, 1997
- (20) CANO, M.P.; LOBO, M.G.; DE ANCOS, B. Peroxidase and polyphenol oxidase in long term frozen stored papaya slices. Differences among hermaphrodite and female papaya fruits, **Journal of Food Science and Agriculture** v. 76, p. 135-141, 1998

- (21) CARVALHO, A. S. L.; MELO, E. P.; FERREIRA, B. S.; PETERSEN, M. T. N.; PETERSEN, S. B.; BARROS, M. R. A. Heme and pH-dependent stability of an anionic horseradish peroxidase, **Arquives of Biochemistry and Biophysics** v. 415, p. 257-267, 2003
- (22) CASTALDO, F.; QUAGLIUOLO I.; SERVILLO, C.; BALESTRIERI, C.; GIOVANE, A. Isolation and characterization of pectin methyl esterase from apple fruit, **Journal of Food Science** v. 54, nº 3, p. 653-673, 1989
- (23) CHAMARRO, J.; MOLINA, I. Oxidation of indoleacetic acid by an apparently homogeneous peroxidase from the flavedo of Washington Navel oranges (*Citrus sinensis*), **Journal of Food Biochemistry** v. 13, p. 361-375, 1989
- (24) CHURCHILL, H. M.; SCOTT, A.O. A study of the biochemical and chemical causes of quality changes in frozen vegetables, **Food Preservation Research Association** v. 426, p1-45, 1986
- (25) CIVELLO, P.M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; AFIÓN, M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties, **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 43, p. 2596-2601, 1995
- (26) CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges, **Phytochemistry** v. 49, nº 1, p. 29-36, 1998
- (27) CONCELLÓN, A.; AÑÓN, M. C.; CHAVES, A. R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature, **Food Chemistry** v. 88, p.17-24, 2004

- (28) CONVERSO, D. A.; FERNÁNDEZ, M. E. Ca^{+2} activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control, **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 333, nº 1, p. 59-65, 1996
- (29) DEEPA, S. S.; ARUMUGHAN, C. Oil palm fruit peroxidase: purification and characterization, **Journal of Food Science and Technology** v. 39, nº 1, p. 8-13, 2002
- (30) DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S. Characterization of polyphenoloxidase from Medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosacea), **Food Chemistry** v. 77, p.1-7, 2002
- (31) ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F.; Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45, p. 4209-4214, 1997
- (32) FENNEMA, O. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems IN **Water relationships of food**, ed. R. B. Duckworth, p. 397-413, Academic Press, 1975
- (33) FORSYTH, J. L.; OWUSU APENTEN, R. K.; ROBINSON, D.S. The thermo stability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. *gemmifera*, **Food Chemistry** v. 65, p. 99-109, 1999
- (34) FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Partial purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 43, p. 1138-1142, 1995

- (35) FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; SAMURA, N.; HAYASHI, N.; TONO, T. Isolation and characterization of two phoroglucinol oxidases from cabbage (*Brassica oleracea* L.), **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 45, p. 59-63, 1997
- (36) GANTHAVORN, C.; POWERS, J. R. Changes in peroxidase activity, hexanal, ascorbic acid and free sulphydryl in blanched asparagus during frozen storage, **Journal of Food Science** v. 53, nº 5, p. 1403-1405, 1988
- (37) GANTHAVORN, C.; NAGEL, C. W.; POWERS, J. R. Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase, **Journal of Food Science** v. 56, nº 1, p. 47-49, 1991
- (38) HAARD, N. F.; TOBIN, L. Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit, **Journal of Food Science** v. 36, p. 854-857, 1971
- (39) HAGERMAN, A. E.; AUSTIN, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 34, p. 440-444, 1986
- (40) HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N.; Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 46, p. 4107-4112, 1998
- (41) HOLSCHUH, H.J. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.), Campinas, 159 p. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000

- (42) JACQMAIN, D. Limitations on storage time of frozen foods, **Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires** v. 32, n° 2, p.40-45, 1977
- (43) JIAO, H.; WANG, S. Y. Correlations of antioxidant capacities of oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry, **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 48, p. 5672-5676, 2000
- (44) KASPERA, R.; McCUE, P.; SHETTY, K. Partial purification of a basic guaiacol peroxidase from fava bean (*Vicia faba* L.): characterization of enzyme stability following elicitor treatment, **Food Biotechnology** v. 15, n° 2, p. 99-111, 2001
- (45) KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*), **Food Chemistry** v 74, p. 147-154, 2001
- (46) KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry** v. 49, p. 407-410, 1994
- (47) KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S. The thermo stability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry** v. 47, p. 53-59, 1993
- (48) KWAK, S.; KIM, S.; PARK, I.; LIU, J. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato, **Phytochemistry** v. 43, p. 565-568, 1996
- (49) LAMIKANRA, O.; WATSON, M. A. Cantaloupe melon peroxidase: characterization and effects of additives on activity, **Nahrung** v. 44, p. 168-172, 2000

- (50) LEE, C. H.; PENNESI, A. P.; DICKSON, M. H. Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme, **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 32, p. 16-21, 1984
- (51) LEE, M. Y.; SOO, K. S. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents, **Phytochemistry** v. 49, nº 1, p. 23-27, 1998
- (52) LIMA, E. D. P. A. Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família Anonácea-Pinha (*Annona squamosa* L.). Campinas, 131 p. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999
- (53) LIN, Z.; CHEN, L.; ZHANG, W. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L.) SW. Isolation, purification and some properties, **Process Biochemistry** v. 31, nº 5, p. 443-448, 1996
- (54) LOPEZ-SERRANO, M.; BARCELÓ, A. R. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries, **Food Chemistry** v. 55, nº 2, p. 133-137, 1996
- (55) LU, T.; WHITAKER, J.R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science** v. 39, p. 1173-1178, 1974
- (56) MACDONALD, H.M.; EVANS, R.; SPENCER, W.J. Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus limon*), **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 62, p. 163-168, 1993

- (57) MANZOCCO, L.; NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PITOTTI, A.; MALTINI, E. Polyphenoloxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties, **Food Research International** v. 31, nº 5, p. 363-370, 1999
- (58) MARANGONI, A. G.; BROWN, A. D.; STANLEY, D. W.; YADA, R. Y. Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization, **Journal of Food Science** v. 54, nº 5, p. 1269-1271, 1989
- (59) MARTINÉZ, M.V.; WHITAKER, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning, **Trends in Food Science and Technology** v. 6, p. 195-200, 1995
- (60) MARTINÉZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; AÑON, M.C. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit **Phytochemistry** v. 58, p. 379-387, 2001
- (61) MOREIRA, J. M. B. Aproveitamento industrial de amoreira preta, **Hortisul** v. 1, nº 0, p. 17-18, 1989
- (62) MÜFTÜGİL, N. The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat, **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 36, p. 877-880, 1985
- (63) NIELSEN, J.E.; CHRISTENSEN, T.M.I.E. Distribution of pectin methyl esterase and acetyl esterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography, **Plant Science** v. 162, p. 799-807, 2002

- (64) OHYA, T.; MORIMURA, Y.; SAJI, H.; MIHARA, T.; IKAWA, T. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish, **Plant Science** v. 125, p. 137-145, 1997
- (65) OKTAY, M.; KÜFREVIDGLU, I.; KOCACALISKAN, L.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. **Journal of Food Science** v. 60, nº 3, p. 494-496, 1995
- (66) ONSA, G. H.; SAARI, N.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*, **Food Chemistry** v. 85, p. 365-376, 2004
- (67) PARK, E. Y.; LUH, B. S. Polyphenol Oxidase of kiwifruit, **Journal of Food Science** v. 50, p.678-683, 1985
- (68) PLAZA, L.; MUÑOZ, M.; ANCOS, B.; CANO, P. Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree, **European Food Research Technology** v. 216, p.514-519, 2003
- (69) POLING, E. B. Blackberries, **Journal of Small Fruit and Viticulture** v. 14, nº 1,2, p. 38-69, 1996
- (70) POMAR, F.; BERNAL, A.; DÍAZ, J.; MERINO, F. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase, **Phytochemistry** v. 46, nº 8, p. 1313-1317, 1997
- (71) REIN, M. M.; HEINONEN, M. Stability and enhancement of berry juice color, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 52, p. 3106-3114, 2004

- (72) REN, C.; KERMONDE, A.R. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds, **Plant Physiology** v. 124, nº 1, p. 231-242, 2000
- (73) RODRIGO, C.; RODRIGO, M.; ALVARRUIZ, A.; FRÍGOLA, A. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase, **Journal of Food Protection** v. 59, nº 10, p. 1065-1071, 1996
- (74) RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; ESPÍN, J. C.; AMOR, F.; TUDELA, J.; MARTÍNEZ, V.; CERDÁ, A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions, **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 48, p. 1537-1541, 2000
- (75) SANCHEZ-ROMERA, C.; GARCIA-GOMES, M.; PLIEGO-ALFARO, F.; HEREDIA, A. Effect of partial deglycosylation on catalytic characterization and stability of an avocado peroxidase, **Physiologia Plantarum** v. 92, p. 97-101, 1994
- (76) SANTOS, H. R. **Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*)**, Campinas, 109 p, Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001
- (77) SERRADELL, M. A.; ROZENFELD, P. A.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M.; CHAVES, A. R.; AÑON, M. C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification, **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 80, p.1421-1427, 2000

- (78) TATE, P.; KUZMAR, A.; SMITH, S. W.; WEDGE, D. E.; LARCOM, L. L.; Comparative effects of eight varieties of blackberry on mutagenesis, **Nutritional Research** v. 23, p. 971-979, 2003
- (79) THIEM, B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review, **Biotechnology Letters** v. 40, n° 1, p. 3-13, 2003
- (80) VALDERRAMA, P.; CLEMENTE, E. Isolation and thermo stability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji, **Food Chemistry** v. 87, p. 601-606, 2004
- (81) VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M.; SPAANSEN, C. H. Thermo stability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange, **Journal of Food Science** v. 45, p. 969-998, 1980
- (82) WANG, S. Y.; MAAS, J. L.; PAYNE, J. A. Ellagic acid content in small fruits mayhalls and other plants, **Journal of small fruits and viticulture** v. 2, n° 4, p. 11-49; 1994
- (83) YEMENICIOGLU, A.; OZKAN, M.; CEMEROGLU, B. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*), **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 46, p. 4158-4163, 1998