

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Margarida Maria dos Anjos Magalhães e aprovada pela Comissão julgadora em 01.03.93
Pilar R. de Massaguer.

Estudo Cinético da Inativação Térmica de Enzimas Termorresistentes, com ou sem Adição de Sacarose na Polpa de Mamão "Formosa" (*Carica papaya* L.) Acidificada e o Estabelecimento do Processamento Térmico Requerido

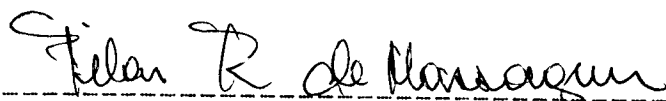
Margarida Maria dos Anjos Magalhães
Engenheira Química

Profª Drª Pilar Rodriguez de Massaguer
Orientadora

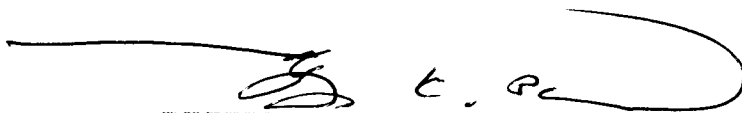
Tese Apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos

1992

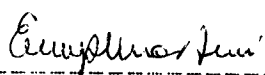
BANCA EXAMINADORA



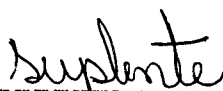
Prof.ª Dra. Pilar Rodríguez de Massaguer
(orientadora)



Prof. Dr. Yong Kun Park
(membro)



Prof.ª Dra. Enny T. Martucci
(membro)



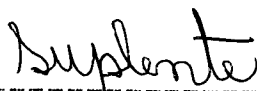
Prof. Dr. Morris W. Montgomery
(membro)



Prof. Dr. José Santo Galdoni
(membro)



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(membro)



Prof.ª Dra. Maria Antonia Martins Galeazzi
(membro)

Campinas, 01 de Maio,

de 1993

À Paulo

À meus Pais

AGRADECIMENTOS

- A Professora Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio e incentivo.
- À Rosa Maria Tosello pela colaboração na parte experimental deste trabalho e principalmente pela amizade demonstrada nos momentos mais difíceis.
- Às amigas Maria de Lourdes, Zilda e Valéria pelo apoio, incentivo e compreensão.
- Aos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências de Alimentos pela amizade e estímulo.
- Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pelo uso da planta piloto e a seus técnicos Valdeci Pereira dos Santos e Angelo Romualdo Bianchi pela colaboração na parte experimental deste trabalho.
- Ao Prof. Ramon Hinojosa Gutierrez pelas sugestões, apoio e incentivo.
- Ao Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da UFRN por permitir o meu afastamento dos encargos acadêmicos para a realização deste trabalho.
- À CAPES/FICD pelo auxílio financeiro.
- À ABIA pelo fornecimento das cópias xerográficas desta tese.
- À Eunir pelo trabalho de digitação desta tese.
- À Hector pela confecção dos gráficos e pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

NOMENCLATURA

- D - Tempo de redução decimal (min), representa o tempo necessário para que a curva de sobreviventes ou a curva de inativação térmica atravessasse um ciclo logarítimo.
- D_L - Tempo de redução decimal da porção termolábil da enzima (min).
- D_R - Tempo de redução decimal da porção termorresistente da enzima (min).
- E_{LO} - Concentração da porção termolábil da enzima no tempo zero.
- E_L - Concentração da porção termolábil da enzima no tempo de aquecimento t.
- E_{RO} - Concentração da porção termorresistente da enzima no tempo zero.
- E_R - Concentração da porção termorresistente da enzima no tempo de aquecimento t.
- E_A - Energia de ativação (Kcal/mol).
- F - Tempo de inativação térmica da enzima e tempo de destruição térmica do microrganismo (min).
- F_p - Valor de pasteurização aplicado ao produto em minutos equivalentes à 77°C.
- I - Taxa de inativação térmica da enzima.
- K - Constante de velocidade de inativação térmica (min^{-1})
- K_F - Constante de velocidade de desnaturação térmica (min^{-1})
- K_L - Constante de velocidade de inativação térmica da porção termolábil da enzima (min^{-1}).
- K_R - Constante de velocidade de inativação térmica da porção termorresistente da enzima (min^{-1}).
- N - Unidades formadoras de colônias/ml e Número mais provável de esporos/ml.
- P - Atividade remanescente da pectinesterase (Unidades de pectinesterase (PEu) $\times 10^4/\text{ml}$)
- PE_u - Número de miliequivalentes de ester hidrolisado/minuto (unidade de pectinesterase)
- P_z - índice de peroxidase de WILLSTATTER (unidades)

- R - Constante Universal dos gases perfeitos ($\text{cal}/^{\circ}\text{K} \cdot \text{mol}$)
- r - Coeficiente de correlação do método dos mínimos quadrados.
- t - Tempo de aquecimento (min), medido desde a imersão das latas no banho de água até o final do aquecimento.
- t_p - Tempo de processo (min), medido desde a imersão das latas no banho até final do resfriamento.
- t_r - Tempo de resfriamento (min), medido desde a imersão das latas no tanque de água fria até o final do resfriamento.
- T - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).
- T_{max} - Temperatura máxima na qual foi realizado o presente estudo cinético (355°K)
- T_{min} - Temperatura mínima na qual foi realizado o presente estudo cinético (350°K)
- U/ml - Unidades enzimáticas/ml definida como a quantidade de extrato enzimático que produz aumento na absorvância de 0,001 unidades/minuto
- UFC/ml - Unidades formadoras de colônias/ml
- Z - Coeficiente térmico ($^{\circ}\text{C}$) - número de $^{\circ}\text{C}$ necessários para que a curva "fantasma" de inativação térmica atravessasse um ciclo logarítimo.
- χ - Número de redução decimais.

ÍNDICE GERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS	01
ÍNDICE DE FIGURAS	05
RESUMO	08
SUMMARY	10
1 - INTRODUÇÃO	12
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Aspectos gerais sobre processamento térmico	15
2.2. Aspectos gerais sobre cinética de inativação enzimática	18
2.3. Aspectos gerais sobre a matéria- prima	27
2.4. Aspectos gerais sobre a microbiologia do mamão	29
2.5. Aspectos gerais sobre o <i>Cl. pasteurianum</i> usado como indicador de esterização em alimentos ácidos	31
3 - OBJETIVO	33
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Matéria prima	34
4.2. Esquema da metodologia para estabele- cimento do processo térmico adequado para a polpa de mamão "formosa" aci- dificada (pH 3,8)	34
4.3. Caracterização do produto	36
4.4. Determinação da atividade da peroxidase	37

4.5. Determinação da atividade da pectinesterase	39
4.6. Determinação da carga microbiana na polpa de mamão "formosa"	40
4.7. Ensaio com o indicador de pasteurização de alimentos ácidos (<i>CI. pasteurianum</i>)	41
I - Ensaio de esporulação	41
II - Ensaio de crescimento do <i>CI. pasteurianum</i> no alimento	44
4.8. Preparo da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) para os testes de laboratório	46
4.9. Preparo da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) para os testes na planta piloto	47
4.10. Ensaio de inativação térmica da pectinesterase	48
4.11. Ensaio para verificar a influência da concentração de sacarose na estabilidade térmica da pectinesterase	49
4.12. Determinação da resistência térmica do <i>CI. pasteurianum</i> na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	50
4.13. Tratamento dos dados e determinação dos parâmetros cinéticos da inativação térmica da pectinesterase	51
4.13.1. Cálculo do tempo de redução decimal (D) e da constante de destruição térmica (K)	51
4.13.2. Cálculo do coeficiente térmico (Z)	52
4.13.3. Cálculo da energia de ativação (E _A)	52
4.14. Ensaio de processamento em planta piloto	53
4.14.1. Determinação do ponto frio da lata	53

4.14.2. Tratamento dos dados e estabelecimento tempo de processo	54
4.15. Ensaaios de processamento com tempo de processo adequado	55
4.16. Ensaaios de processamento com a microflora naturalmente presente e estabelecimento da validade do processo	55
4.17. Ensaio com embalagens inoculadas	55
5.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Ensaaios preliminares	57
5.1.1. Caracterização da polpa de mamão "formosa" e determinação do conteúdo enzimático de peroxidase	57
5.1.2. Conteúdo enzimático da pectinesterase na polpa de mamão "formosa"	60
5.1.3. Ensaaios microbiológicos	62
5.1.3.1. Determinação da carga microbiana da polpa de mamão "formosa"	62
5.1.3.2. Ensaaios com o indicador de pasteurização de alimentos ácidos (<i>Cl. pasteurianum</i>)	64
I - Esporulação do (<i>Cl. pasteurianum</i>)	64
II - Ensaio de crescimento do (<i>Cl. pasteurianum</i>) em polpa de mamão "formosa"	66

5.2. Determinação da cinética de Inativação térmica da enzima pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), determinação do tempo de redução decimal (D) a cada temperatura e o valor do coeficiente térmico (Z)	68
5.3. Ensaios para verificar a influência de sacarose na cinética de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	79
5.4. Determinação da cinética de destruição térmica do (<i>Cl. pasteurianum</i>) na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	107
5.5. Ensaios de processamento na planta piloto	113
5.5.1. Determinação do ponto frio da lata	113
5.5.2. Cálculo do tempo de processo	115
5.6. Ensaios de segurança microbiológica	118
5.6.1. Ensaios de processamento com tempo de processo adequado	118
5.6.2. Ensaios com a microflora naturalmente presente	138
5.6.3. Ensaio de embalagens inoculadas	139
6.0 - CONCLUSÕES	142
7.0 - RECOMENDAÇÃO	146
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 - Caracterização da polpa de mamão "formosa": pH, acidez, sólidos solúveis e atividades da peroxidase	57
2 - Atividade da peroxidase em maçã e pera	59
3 - Caracterização da polpa de mamão "formosa": sólidos solúveis, pH, acidez total e ativi- dade da pectinesterase	61
4 - Contagem total de mesófilos, de bolores e leveduras e de bactérias lácticas na polpa de mamão "formosa" sem acidificar, acidifi- cada com adição de sacarose até 20 ^o e 30 ^o Brix	63
5 - Resultados da produção de esporos do <i>Cl. pasteurianum</i>	65
6 - Resultados do ensaio de crescimento do <i>Cl. pasteurianum</i> em polpa de mamão "formosa" acidificada (pH=3,8)	67
7 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH=3,8) à 75 ^o C.	69
8 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 77 ^o C.	70
9 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 80 ^o C.	71
10 - Valores de D e Z das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	74
11 - Valores de K e E _A das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	76

12 - Resultados do teste à 75°C da inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 1)	80
13 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C (Lote 1)	82
14 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 1)	83
15 - Resultados do teste à 75°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 2)	84
16 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C (Lote 2)	86
17 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 2)	87
18 - Resultados do teste à 75°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 3)	88
19 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C (Lote 3)	90
20 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 3)	91
21 - Resultados do teste à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 1)	92
22 - Equações das curvas de inativação térmica à 80°C (Lote 1)	94

23 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 1)	95
24 - Resultados do teste à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 2)	96
25 - Equações das curvas de inativação térmica à 80°C (Lote 2)	98
26 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 2)	99
27 - Resultados do teste à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 3)	100
28 - Equações das curvas de inativação térmica à 80°C (Lote 3)	102
29 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix (Lote 3)	103
30 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix, em 3 lotes diferentes	104
31 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30° Brix, em 3 lotes diferentes	105
32 - Resultados dos testes de destruição térmica do <i>Cl.pasteurianum</i> na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75°, 77° e 80°C.	108

33 - Valores de D, Z, K e E_A do <i>Cl. pasteurianum</i> na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	110
34 - Valores de D à 75 ^o , 77 ^o e 80 ^o C e o valor de Z do <i>Cl. pasteurianum</i> e da fração termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	112
35 - Valores de F_p para os tempos de aquecimentos de 10, 15 e 10 minutos em banho de água à 97 ^o C.	115
36 - Valores de F_p com tempo de aquecimento de 12,9 minutos em banho de água à 97 ^o C.	118
37 - Análise de variância dos valores de F_p	137

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75 ^o , 77 ^o e 80 ^o C	72
2 - Curvas de inativação térmica modificada para determinação dos parâmetros cinéticos da porção termolábil da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	73
3 - Curvas "fantasma" de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	75
4 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75 ^o C (Lote 1)	81
5 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75 ^o C (Lote 2)	85
6 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75 ^o C (Lote 3)	89
7 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 80 ^o C (Lote 1)	93
8 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 80 ^o C (Lote 2)	97
9 - Curvas de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH=3,8) à 80 ^o C (Lote 3)	101
10 - Curvas de destruição térmica do <i>Cl. pasteurianum</i> na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75 ^o , 77 ^o e 80 ^o C	109
11 - Curva "Fantasma" de destruição térmica à 75 ^o , 77 ^o e 80 ^o C do <i>Cl. pasteurianum</i> na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	111

12 - Perfil de temperatura em função do tempo de processo da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)	114
13 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempos de aquecimento de 10,15 e 20 minutos	116
14 - Relação de SHIGA	117
15 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 1)	119
16 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 2)	120
17 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 3)	121
18 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 4)	122
19 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 5)	123
20 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 1 - Lata 6)	124
21 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 1)	125
22 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 2)	126
23 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 3)	127
24 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 4)	128
25 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 5)	129

26 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 2 - Lata 6)	130
27 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 3 - Lata 1)	131
28 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 3 - Lata 2)	132
29 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 3 - Lata 3)	133
30 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 3 - Lata 4)	134
31 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO nº 3-Lata 5)	135
32 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos (ENSAIO 3 - Lata 6)	136
33 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 15 minutos (ENSAIO 4 - Lata 1)	140
34 - Processamento da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 15 minutos (ENSAIO 4 - Lata 2)	141

- RESUMO

Com a finalidade de se estabelecer o processo térmico requerido pela polpa de mamão "formosa" (*Carica papaya* L.) acidificada (pH 3,8) (processada em latas de 1 kg, 99,5 x 118 mm), foi feito inicialmente o estudo cinético de inativação térmica das enzimas termorresistentes presentes na polpa. Como não foi detectada atividade da peroxidase o estudo se concentrou na pectinesterase. As curvas de inativação térmica à 75°, 77° e 80°C apresentaram uma mudança na inclinação, indicando a existência de duas porções da enzima, uma termolábil e outra termorresistente. Os tempos de redução decimal à 75°, 77° e 80°C da porção termolábil foram 0,8; 0,3 e 0,2 minutos, respectivamente e da porção termorresistente foram 16,7; 7,2; e 3,7 minutos respectivamente. O coeficiente térmico para a porção termolábil foi 9,21°C e para a porção termorresistente 7,82°C. A energia de ativação, na faixa de temperatura estudada, para as porções termolábil e termorresistente da pectinesterase foram 61,73 e 72,71 Kcal/mol, respectivamente, estando dentro da faixa (40-100 Kcal/mol) de energia de ativação reportada para o processo de inativação térmica de enzimas. Foi realizado também, o estudo da influência da sacarose na cinética de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75° e 80°C. A sacarose foi adicionada de maneira a se obter concentrações finais de 20° e 30° Brix. Para cada temperatura foram feitos ensaios com 3 lotes diferentes de mamão. Os tempos de redução decimal aumentaram em média de 3 vezes para a polpa com 20° Brix e de 5 vezes para a polpa com 30° Brix, indicando que a sacarose exerce um efeito protetor na enzima contra o calor. Devido a este fato, optou-se pela não adição de sacarose na polpa a ser processada.

Como o *Clostridium pasteurianum* é um dos indicadores do processo térmico de alimentos ácidos, foi feito o estudo da sua cinética de destruição térmica na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), nas mesmas temperaturas usadas para a pectinesterase. Este microrganismo cresceu e produziu gás nesta polpa. Os tempos de redução decimal à 75°, 77° e 80°C foram 9,7; 7,1 e 2,7 minutos respectivamente e o coeficiente térmico foi 8,8°C. Os resultados mostraram que a porção termorresistente da pectinesterase apresentou uma resistência térmica maior que o *Cl. pasteurianum*. Baseado nestes resultados, foi determinado um $F_{77^{\circ}\text{C}}^{7,8^{\circ}\text{C}}$ de 12,3 minutos, equivalente a 1,7 reduções decimais, usando-se a porção termorresistente da pectinesterase como alvo do processo (98% inativação). Usando-se a relação empírica de SHIGA (1976) estabeleceu-se um tempo de aquecimento de 12,9 minutos, em banho de água à 97°C. Foram feitos três ensaios nestas condições, com 6 latas/ensaio. Os valores de pasteurização variaram de 12,33 a 12,75 minutos equivalentes à 77°C.

A análise estatística dos dados indicaram não haver diferença significativa entre ensaios e entre latas de um mesmo ensaio, a nível de α igual a 0,05 e 0,01. No exame das latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), após o processamento térmico, não se verificou gelatinização, atividade remanescente da pectinesterase e crescimento de microrganismo em nenhuma das

amostras. Este processamento térmico equivalente a 1,7 reduções decimais foi suficiente para inativar a porção termorresistente da pectinesterase e destruir a flora naturalmente presente. Para se ter uma margem de segurança devido a variação da atividade inicial da pectinesterase, o ensaio de embalagens inoculadas foi feito usando-se um valor F de 16,7 minutos equivalentes à 77°C, que corresponde a 2,3 reduções decimais da porção termorresistente da pectinesterase. Este processo térmico aplicado ao produto equivale a um tempo de aquecimento de 15 minutos, em banho de água à 97°C. As latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) inoculadas com 1 ml da suspensão de esporos do *C. pasteurianum* (10^4 NMP esporos/ml), após o período de incubação, não apresentaram sinal de estufamento e na sub-cultura não houve crescimento e não foi detectada atividade da pectinesterase. Isto indica que o processo aplicado ao produto é seguro.

SUMMARY

In order to establish the thermal process required by acidified papaya pulp (pH 3,8)(var. "formosa". processed in 99,5 x 118 mm cans), it was initially carried out a study on the kinetics of thermal inactivation of heat resistant enzymes present in the pulp. Since no peroxidase activity was detected the study was focused on pectinesterase. The heat inactivation curves at 75°, 77° and 80°C showed a change in slope indicating the presence of two different portions of the enzyme, one heat labile and the other heat resistant. The decimal reduction time at 75°, 77° and 80°C for the heat labile portion of pectinesterase were 0,8; 0,3 and 0,2 minutes, respectively and for the heat resistant portion was 16,7; 7,2 and 3,7 minutes respectively. The thermal coefficient for the heat labile portions of the enzyme was 9,2°C and for heat resistant was 7,8°C. The activation energy were 61,7 and 72,7 Kcal/mol for the heat labile and heat resistant portions, respectively and these values were within the range of 40-100 Kcal/mol reported in the literature for the thermal inactivation of enzymes.

The influence of addition of sucrose on the thermal inactivation kinetics for pectinesterase in papaya pulp was studied at 75° and 80°C. Sucrose was added to the pulp up to 20 and 30°Brix. For each temperature 3 different lots of papaya were tested. The decimal reduction time for pectinesterase increased 3 times for the 20°Brix pulp, and 5 times for the 30°Brix pulp showing that sucrose has a protective effect in maintaining the enzyme activity during heating. Due to this fact, no addition of sucrose was used on the formulation of the final product. Since *Cl. pasteurianum* is one of the indicators organisms for acid foods; its thermal destruction kinetics was determined on acidified papaya pulp (pH 3,8) at the same temperatures used for the enzyme inactivation test. This organism showed growth and gas production when inoculated in the acidified pulp. The decimal reduction times were 9,7; 7,1 and 2,7 minutes at 75°, 77° and 80°C respectively, and the thermal coefficient was 8,8°C. These results showed that the heat resistant portion of pectinesterase presented greater thermal resistance than *Cl. pasteurianum*.

Based on these results, and $F_{77^{\circ}\text{C}}^{7,8^{\circ}\text{C}}$ value of 12,3 minutes was determined using the heat resistant portion of the pectinesterase as the target for the process, and applying 1,7 decimal reduction of the activity of the heat resistant enzyme (98% inactivation). Using SHIGA (1976) empirical relationship a heating time of 12,9 min. in water bath at 97°C was established for the process. Three processing tests were carried out with this conditions using 6 cans/test. The processing values varied from 12,33 - 12,75 minutes at 77°C.

Statistical analysis showed no significant difference among tests and among cans a test at the 0,05 and 0,01 level. Upon analysis of the cans after process no gelatination, no activity of remaining enzyme and no microorganism growth were detected. Therefore this process was able to inactivate the heat resistant

portion of pectinesterase and kill the natural microflora present on the pulp. In order to add a safety factor process, considering the initial variation of the pectinesterase activity in the pulp, and $F_{77^{\circ}\text{C}}^{77^{\circ}\text{C}}$ value of 16,7 minutes was applied. This process was equivalent to 15 minutes of heating in water bath at 97°C and corresponds to 2,3 decimal reductions of the activity of heat resistant portion of pectinesterase. An inoculated pack study was performed to verify the microbial safety of such process. Each can of papaya pulp was inoculated with 1ml of a 10^4 spore/ml suspension of *C. pasteurianum*. No swelling of the cans and no growth after subculturing were observed after incubation, and no pectinesterase was detected showing that the process may be safely applied to the pulp.

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de mamão (*Carica papaya L.*), participando com 37% da produção mundial. Outros países como México, Indonésia, Índia e Zaire também são grandes produtores que junto com o Brasil, em 1990, participaram com 74% do montante produzido mundialmente.

O mamão brasileiro é basicamente aproveitado como fruta "in natura" para consumo interno e para exportação. Entre os produtos industrializados podem ser citados a polpa pasteurizada ou congelada, o néctar e a geléia. Na indústria farmacêutica, o mamão verde é usado para extração da papaína e de pectina, que são produtos de alto valor comercial.

A industrialização de frutas tropicais pode ajudar a resolver o problema causado pelas pesadas perdas por ocasião de grandes safras. Nessa época o excesso de oferta ocasiona além disso menores preços. No caso do mamão este problema se torna mais acentuado pelo fato de ser colhido durante o ano todo.

A industrialização do mamão no Brasil assim como em outros países produtores desta fruta, ainda não alcançou os níveis desejados. Os maiores entraves têm sido a heterogeneidade da matéria-prima e a atividade enzimática natural que a fruta apresenta, a qual desenvolve odores desagradáveis com muita facilidade, especialmente durante a primeira etapa de processamento antes de se proceder a inativação enzimática.

Nos produtos de frutas processadas pelo calor às enzimas termorresistentes são geralmente causadoras de geleificação, mudança de sabor e outros fenômenos, sendo as enzimas principais a polifenoloxidase, peroxidase e pectinesterase que estão naturalmente presentes nas frutas.

Nos alimentos ácidos como é o caso das frutas industrializadas, os principais microrganismos deterioradores são bactérias não esporuladas, leveduras e bolores, sendo que o *Clostridium botulinum* devido ao baixo pH, não tem condições de crescer nestes produtos. Os bolores, leveduras e bactérias não esporuladas apresentam resistência térmica menor que as enzimas termorresistentes, então, se o processo térmico for baseado na destruição desses microrganismos, ainda restará uma alta percentagem de atividade enzimática. Por esta razão o processamento térmico aplicado na indústria deve ser baseado no tempo de processo necessário para inativar essas enzimas.

Levando-se em conta os fatos indicados acima, se torna importante o estudo de fatores que influenciam a cinética de inativação das enzimas termorresistentes como peroxidase e pectinesterase.

No caso do mamão, uma fruta de sabor característico, fonte de próvitamina A e vitamina C, o estudo cinético da inativação das enzimas termorresistentes é de grande interesse para preservar ao máximo as características organolépticas e os nutrientes naturais.

Neste trabalho será estudado o efeito da adição de sacarose na cinética de inativação térmica das enzimas termorresistentes e

será estabelecido o processo térmico adequado para a polpa de mamão acidificada (pH 3,8), sem adição de sacarose.

Não se tem conhecimento de trabalhos sobre cinética de inativação térmica enzimática com produtos industrializados de frutas brasileiras. Dados dessa natureza são importantes para o aperfeiçoamento tecnológico do processo industrial que atualmente é baseado em dados empíricos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos Gerais sobre Processamento Térmico

O processamento térmico é um método de larga aplicação na indústria de alimentos e é amplamente usado em combinação com outras técnicas como congelação, fermentação, desidratação, etc.

A função principal da aplicação de calor ao produto é para reduzir ou eliminar microrganismos indesejáveis, inativar enzimas e também produzir mudanças desejáveis na cor, textura e sabor. Mas simultaneamente ocorrem também mudanças indesejáveis tais como a degradação de nutrientes essenciais. Por esse motivo o processo térmico deve ser otimizado para assegurar a máxima retenção de nutrientes e preservação microbiológica do alimento.

O processo denominado de "alta temperatura-curto tempo" (HTST) é muito usado, principalmente na pasteurização de alimentos fluidos (sucos, leite, etc.) por resultar numa maior retenção de nutrientes. Este processo é baseado nas diferentes respostas de velocidade de destruição dos microrganismos e da velocidade de degradação de nutrientes à temperatura, ou seja, diferença nos valores de Z e D dos microrganismos e dos nutrientes.

TEIXEIRA et alii (1969) em trabalhos de simulação com computador, usando dados de morte de bactérias e degradação da tiamina, encontraram que o processo térmico ótimo é dependente dos valores de Z e D dos nutrientes. A retenção de nutrientes com um valor de Z alto poderá ser obtida por um processo de alta temperatura-curto-tempo (HTST) (FARKAS et alii, 1956). Mas em sistemas

de alimentos no qual enzimas naturais termorresistentes podem estar presentes, há limitações na temperatura máxima que pode ser atingida no processo HTST. Este máximo ocorre quando o processo térmico pode fornecer suficiente letalidade para os microrganismos mas insuficiente para a inativação da enzima. Isto é uma consequência da diferente resposta da velocidade de degradação microbiana e enzimática à temperatura.

Quando às temperaturas de processo são relativamente baixas, a velocidade de inativação da enzima é maior que a velocidade de destruição do microrganismo. Mas à medida que a temperatura do processo vai aumentando, a velocidade de destruição do microrganismo aumenta mais rapidamente do que velocidade de inativação da enzima. No entanto, existe uma temperatura na qual a velocidade de inativação da enzima se iguala a velocidade de destruição do microrganismo usado como alvo do processo. Acima dessa temperatura, a inativação de enzima deve ser usada como alvo do processo já que a velocidade de destruição microbiana é maior que a velocidade da inativação enzimática. Se isso não for levado em conta em produtos que contenham enzimas naturais termorresistentes, poderá ocorrer deterioração durante a estocagem devido a atividade enzimática residual. [ANÔNIMO, citado por LUND (1977)].

KAPLAN et alii (1949) e NEBESKY et alii (1950) verificaram que as curvas dos tempos de inativação térmica da enzima seguiam o modelo das curvas de tempos de morte térmica.

NATH and RANGANNA (1980, 1981, 1983) estudaram o processamento térmico de frutas enlatadas (manga, mamão e goiaba) baseado na inativação da pectinesterase, que no caso da goiaba verifica-

ram ser mais termorresistente que a peroxidase. Foram realizados os testes de segurança microbiológica e os resultados indicaram que o processamento térmico baseado na inativação de pectinesterase era microbiologicamente seguro.

A otimização do processamento térmico em alimentos que contenham enzimas naturais termorresistentes, se torna difícil, pelo fato destas enzimas apresentarem uma dependência com a temperatura da mesma ordem de grandeza da dependência dos nutrientes e fatores de qualidade (cor, textura). No caso de enzimas o objetivo do processamento térmico é sua inativação, porém no caso de nutrientes e fatores de qualidade, o objetivo do processamento térmico é sua retenção máxima (LUND, 1977). No cálculo do processo térmico baseado na inativação enzimática, a enzima mais termorresistente, que pode alterar a qualidade do produto durante a estocagem, é usada como parâmetro no estabelecimento do processo (LUND, 1975). Entre esses alimentos encontram-se as frutas, que em geral contém enzimas como peroxidase, pectinesterase e polifenoloxidase que são termorresistentes e responsáveis pelas mudanças indesejáveis nos produtos enlatados dessas frutas.

Nos produtos de origem vegetal a peroxidase se comporta como sendo a enzima mais termorresistente. Contudo nas frutas, devido as condições mais ácidas, a peroxidase se apresenta menos estável embora seja difícil sua inativação (AYLWARD & HAISMAN, 1969).

Além da temperatura outro parâmetro importante no processamento térmico é o tempo. Assim, ao se especificar a temperatura de processo térmico é indispensável que se especifique também o tempo de tratamento.

Produtos pastosos ou semi-sólidos requerem um tempo de processamento térmico maior, pelo fato da transferência de calor ocorrer principalmente por condução, na qual o aquecimento é muito mais lento do que pela convecção. Ao contrário, os produtos que estão em suspensão de salmouras ou xaropes aquecem-se rapidamente por convecção e em igualdade de condições exigem um tempo de processamento térmico mais curto.

Um fator de importância prática no processo térmico é a temperatura inicial do produto. Uma temperatura inicial mais alta diminui o tempo necessário para que o produto atinja a temperatura especificada.

2.2. Aspectos Gerais sobre Cinética de Inativação Enzimática

A cinética de inativação térmica da peroxidase em produtos como milho, batata, couve-flor e "horseradish" têm sido muito estudada, sendo constituída de duas fases, cada uma das quais caracterizada por uma cinética de 1ª ordem (CHANG et alii, 1988; CHENCHIN & YAMAMOTO, 1973; DELGADO et alii, 1984; LEE & HAMMES, 1979; LING & LUND, 1978; LU & WHITAKER, 1974; RESENDE et alii, 1969; VAMOS-VIGYÁZÓL, 1981; YAMAMOTO et alii, 1962). Essas duas fases se devem a existência de isoenzimas de diferentes estabilidades térmicas, as quais podem ser lábeis e resistentes ao calor (CHENCHIN & YAMAMOTO, 1973; LING & LUND, 1978; TAMURA & MORITA, 1975; YAMAMOTO et alii, 1962).

Nas isoenzimas termorresistentes o valor Z pode ser duas ou quatro vezes maior do que o das isoenzimas termolábeis. Uma rea-

ção de desnaturação enzimática caracterizada por uma baixa energia de ativação indica, segundo LUND (1975), que o sítio ativo é dependente, possivelmente, de poucas ligações dissulfídicas ou de pontes de hidrogênio. WHITAKER (1972) indica que quando a proteína é desnaturada são quebradas ligações não covalentes. Estas ligações envolvem interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. O número exato de ligações quebradas não pode ser calculado. E as enzimas termorresistentes apresentam também ligações dissulfídicas e são compostas de cadeias de polipeptídeos simples.

Por ser muito termorresistente, a atividade da peroxidase é muito usada como indicador de branqueamento e de outros tratamentos térmicos envolvendo vegetais e frutas. No entanto, a peroxidase apresenta o problema de regeneração quando não é totalmente inativada. Esta regeneração é devido ao fato da enzima ter sido inativada de maneira reversível, com alterações apenas na sua estrutura secundária e terciária (WHITAKER, 1972). Muitos são os fatores que afetam a regeneração da atividade enzimática, tais como, o método de determinação dessa atividade, a severidade do tratamento térmico combinado com o tempo de processo e as condições de estocagem antes da regeneração (BURNETTE & FLICK, 1978; JOFFE & BALL, 1962; REED, 1975; RESENDE et alii, 1969).

Um fator que interfere na estabilidade térmica da peroxidase é a adição de certos aditivos ao alimento. O açúcar aumenta a resistência da peroxidase da maçã e da pera à inativação pelo calor enquanto o vinagre diminui a resistência da peroxidase do pickles à essa inativação. No entanto, a adição de 2% de sal não apresen-

ta efeito na estabilidade térmica na peroxidase em picles (CHANG et alii, 1988; NEBESKY et alii, 1950).

NATH and RANGANNA (1983) nos estudos do processamento térmico baseado na inativação enzimática da goiaba enlatada verificaram que a pectinesterase é mais resistente que a peroxidase. Esses mesmos autores (1980, 1981) em outros experimentos com manga (Totapuri mango) e mamão (Carica papaya L.) não encontraram atividade peroxidase nestas frutas e portanto usaram a pectinesterase como indicador do processamento térmico.

Em experimentos anteriores NANJUNDASWAMY et alii (1973) utilizando manga (Badami, Alfonso) encontraram, a peroxidase como a enzima mais termorresistente.

De maneira semelhante a peroxidase, o estudo cinético da inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja mostrou a presença de isoenzimas com estabilidades térmicas diferentes (VERSTEEG et alii, 1980; WICKER & TEMELLI, 1988; SEYMOUR et alii 1991b).

VERSTEEG et alii (1978) num primeiro estudo extraíram e purificaram, a pectinesterase da laranja "Navel" através da precipitação fracionada com sulfato de amônio e pela filtração com BIOGEL P-100. Na cromatografia em coluna, com ligações cruzadas de pectato, conseguiram separar duas frações de pectinesterase PE I e PE II, que foram caracterizadas. Ambas as frações apresentaram o mesmo peso molecular de 36.200 D e aparentemente eram compostas por uma cadeia simples de polipeptídeo, apresentando diferenças na estrutura primária, por isso podem ser chamadas de isoenzimas. A PE I apresentou ponto isoelétrico de 10,05 e pH

ótimo 7,6, enquanto a PE II apresentou ponto isoelétrico de 11,0 e pH ótimo 8,0, sendo esta última mais ativa a baixas concentrações do substrato e mais fortemente inibida pelo poligalacturonato. Num estudo posterior, VERSTEEG (1979) citado por [VERSTEEG et alii, 1980], usando o mesmo método de extração e purificação conseguiram separar mais uma fração da pectinesterase a PE III. Esta fração apresentou peso molecular de 54.000 D, representando apenas 5% da atividade total da pectinesterase e pH ótimo de 8,0.

SEYMOUR et alii (1991b) encontraram resultados semelhantes aos de VERSTEEG (1978) na purificação de 2 frações, uma termolábil e outra termorresistente, da pectinesterase extraída da polpa de toranja "Marsh", usando a cromatografia de troca iônica e filtração em gel. A fração termolábil representou 90% da atividade da pectinesterase no extrato bruto. O peso molecular das duas frações foram determinados sendo de 37.400 D para a fração termolábil e de 54.000 D para a fração termorresistente, sendo ambas compostas de uma cadeia simples de polipeptídeo. Esses mesmos autores (1991a) verificaram que o conteúdo de carboidratos da fração termorresistente da pectinesterase era 14,2% enquanto que na fração termolábil era de apenas 2%, o que explica a maior estabilidade da primeira. A confirmação deste fato, foi feita pela oxidação da glicose da fração termorresistente da pectinesterase, através de tratamento com periodato. Os resultados mostraram que durante o tratamento, a atividade dessa fração da pectinesterase caiu para 53% da atividade inicial, quando testada à 70°C no suco de toranja (10,8°Brix; pH 3,3). RILLO et alii (1992) verificaram também que a pectinesterase extraída da laranja mandarino era uma

glicoproteína, com peso molecular de 37.000 D e composta de uma cadeia simples de polipeptídeo.

VERSTEEG et alii (1980) nos seus estudos cinéticos de inativação térmica usaram isoenzimas purificadas da pectinesterase na laranja "navel" adicionadas ao suco de laranja a pH = 4,0. Essas isoenzimas PE I, PE II e PE III (alto P.M.) apresentaram estabilidades térmicas diferentes, sendo rapidamente inativadas à 70°C, 60°C e 90°C, respectivamente. Os autores encontraram valores de Z de 6,5°C para PE I e PE III e de 11°C para PE II.

WICKER & TEMELLI (1988) estudando também a cinética de inativação térmica da pectinesterase, na polpa resultante da extração do suco de laranja "valência", mostraram que esta inativação não era linear, indicando a presença de frações da pectinesterase com diferentes estabilidades térmicas. Os valores D à 90°C para a fração termolábil e para a fração termorresistente foram de 0,225 e 32 s, respectivamente. E o valor Z foi de 10,8°C e 6,5°C para as frações termolábil e termorresistente, respectivamente. Estes valores se mostraram compatíveis com os encontrados por VERSTEEG et alii (1980) e confirmados por SEYMOUR et alii (1991a), que em estudos com as duas frações da pectinesterase extraída da polpa de toranja "Marsh" encontraram que as frações termolábil e termorresistente eram completamente inativadas à 65°C e 85°C, respectivamente. Os valores de D à 75°, 80° e 85°C para a fração termorresistente adicionada ao suco de toranja (10,8° Brix; pH=3,3) foram 13,66; 2,77 e 0,3 min, respectivamente e o valor Z foi 6°C.

As propriedades cinéticas das isoenzimas da pectinesterase são dependentes da temperatura e pH (VERSTEEG et alii, 1980). Em geral, quando se deseja inativar a pectinesterase usa-se tratamento térmico ou/e combinação de calor e pH (BISSET et alii, 1953; EAGERMAN & ROUSE, 1976; VERSTEEG et alii, 1980). ROUSE & ATKINS (1952, 1953) estudaram a relação entre tempo e temperatura na inativação térmica da pectinesterase no suco de laranja, mostrando que a inativação pode ser feita a baixas temperaturas se o pH do suco for reduzido.

NATH & RANGANNA (1981) usaram nos seus experimentos amostras enlatadas mamão em pedaços com pH - 3,8 e 4,0 e encontraram que a taxa de inativação da pectinesterase era maior a pH 3,8 do que a pH 4,0. OWUSU et alii (1988) usaram nos seus experimentos suco de laranja concentrado e congelado, reconstituído com água e suplementado com pectinesterase cítrica comercial, para se ter uma atividade de 1,5 unidades PE/ml suco. Os autores conseguiram a inativação da pectinesterase com o abaixamento do pH até 2,0 em lugar do tratamento térmico. Esta diminuição do pH foi obtida pelo tratamento do suco com resina de troca catiônica e pela adição de HCl concentrado. O tratamento com resina diminui o pH do suco de 3,75 para 2,0 e inativa completamente a pectinesterase, após 20 min de contato. No tratamento com HCl concentrado também há uma queda da atividade de 1,4 unid. PE/ml à níveis não detectáveis após 20 min. Esse abaixamento do pH parece ser suficiente para inativar as três formas de pectinesterase.

A inativação da pectinesterase é de grande importância na indústria de sucos cítricos concentrados. A pectinesterase atua

sobre a pectina naturalmente presente nestes sucos, resultando na formação da pectina com baixa metoxilação, que se combina com íons polivalentes formando pectatos gelatinosos e clarificando o suco. A inativação térmica da pectinesterase deve ser cuidadosamente controlada para evitar modificações indesejáveis no sabor destes sucos (ROUSE & ATKINS, 1953).

Nos estudos de inativação térmica da pectinesterase no suco de laranja a inativação da enzima foi mais rápida no suco concentrado (40° - 50° Brix) do que no suco natural (12° Brix) (BISSETT et alii, 1953; CARROL et alii, 1957; McCOLLOCH et alii, 1956). Já MARSAHLL et alii (1985), encontraram que a velocidade de inativação térmica da pectinesterase em sucos de laranjas com 10°, 20°, 30° e 35° Brix não apresentavam diferenças significativas. Contudo os sucos com 40° e 50° Brix pelo contrário, apresentavam um decréscimo na sua velocidade de inativação e não obedeciam a cinética de 1ª ordem, indicando que a concentração de sólidos solúveis atuava como um efeito protetor da enzima.

CHANG et alii (1965), estudaram o retardamento da gelatinização do purê de mamão, causada pela ação da pectinesterase quando se aumenta a concentração de sacarose. Este aumento da concentração de sacarose afeta apenas a velocidade de hidrólise e não o grau de hidrólise ao mesmo tempo que, dificulta a inativação da pectinesterase, atuando a sacarose como um agente protetor. Os autores sugerem que o mecanismo de proteção da pectinesterase pela sacarose é muito complexo, envolvendo vários fatores como: meio com baixa atividade de água, interação pectina-protetor e interferência no sítio ativo da enzima.

Os estudos no purê de mamão foram realizado na faixa de pH 6,0 à 9,0, e não foram realizados estudos sobre a cinética de inativação da pectinesterase.

Vários autores estudaram a ação de açúcares (glicose, sacarose) e poliois (sorbitol, glicerol) na estabilização de proteínas, como, alfa-quimiotripsina, quimiotripsinogênio, lisozima, ovalbumina, conalbumina (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1982; BACK et alii, 1979; LEE & TIMASHEFF, 1981).

Estes autores, verificaram que a sacarose não induzia mudanças na estrutura conformacional das proteínas estudadas. Dessa maneira, o seu efeito estabilizante foi explicado como sendo devido ao aumento da temperatura, na qual a velocidade de desnaturação era máxima. LEE & TIMASHEFF, 1981, verificaram também haver uma relação linear entre a concentração de sacarose e a temperatura de velocidade de desnaturação máxima.

A adição de sacarose aumenta a barreira energética (energia de ativação) entre o estado nativo e o desnaturado da proteína, tornando o primeiro, termodinamicamente mais favorável. O aumento da energia de ativação de desnaturação pode ser devido a mudanças nas propriedades físico-químicas do sistema (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1982; BACK et alii, 1979; LEE & TIMASHEFF, 1981).

As proteínas são estabilizadas geralmente pela combinação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. A contribuição das interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio no efeito estabilizante da sacarose é mínima. Já as interações hidrofóbicas podem ser consideradas as responsáveis pela estabilização das proteínas. Os autores mostraram

que a interação hidrofóbica entre pares de grupos hidrofóbicos é mais forte nas soluções de sacarose e glicerol do que na água pura. Este é o mecanismo pelo qual o açúcar e o poliol, em geral, podem estabilizar as proteínas na desnaturação térmica (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1982; BACK et alii, 1979).

A cinética da desnaturação das proteínas estudadas mostraram que, para uma dada temperatura o K_f é uma função da concentração de sacarose, decrescendo com o aumento de concentração da mesma (LEE & TIMASHEFF, 1981).

LEVI et alii (1985) trabalhando com produtos de mamão, com atividade de água intermediária, verificaram que o branqueamento dos pedaços de mamão usando água em ebulição inativava quase totalmente a pectinesterase. Enquanto que, ao se fazer branqueamento com xarope de sacarose em ebulição observava-se ainda uma alta atividade da pectinesterase, indicando um possível efeito protetor do açúcar.

Como a atividade da enzima nas frutas varia consideravelmente, pode-se utilizar no processamento térmico um lote com atividade mais alta do que a usada nos estudos do tempo de inativação térmica (TIT), o que levaria ao cálculo de um tempo de processo inferior ao necessário para inativar completamente a enzima. Isto se deve ao fato do valor D da enzima apenas reduzir de 90% a atividade enzimática, independentemente da atividade inicial (NATH & RANGANNA, 1980, 1981, 1983).

2.3. Aspectos gerais sobre a Matéria-Prima

Entre as frutas tropicais, o mamão é considerado uma das melhores, devido particularmente as suas propriedades organolépticas, suculência, paladar delicado, fácil digestão, fonte de pró-vitamina A e principalmente vitamina C, sendo consumido "in natura" ou na forma de produtos industrializados. A parte comestível do mamão contém vitamina C na faixa de 46,6 - 125,9 mg/100g e um conteúdo de vitamina A, calculada como beta-caroteno, na faixa de 1600-6347UI/100g (CZYHRINCIW, 1969; MEDINA et alii, 1980; PAL et alii, 1980; SALUNKHE & DESAI, 1984; SELVARAJ et alii, 1982; SELVARAJ & PAL, 1982; JAGTIANI et alii, 1988).

O mamão "formosa" é um fruto alongado, resultante do cruzamento do mamão "Sunrise Solo" com um tipo de mamão da Costa Rica, de polpa vermelha, pesando em média 900g. Sua polpa é vermelho-alaranjada e de ótimo sabor, se prestando bem para a obtenção de produtos industrializados (LUNA, 1986).

Um outro fator importante para o processamento industrial, que se deve destacar é a baixa acidez que o mamão apresenta em relação as frutas em geral. A polpa apresenta valores de pH entre 4,5 e 6,0. Os ácidos málico e cítrico são os principais ácidos que caracterizam quimicamente esta fruta, havendo no entanto um decréscimo na concentração do ácido málico durante a maturação (AUNG & ROSS, 1965; CHANG et alii, 1971; SELVARAJ et alii, 1982; SELVARAJ & PAL, 1982; JAGTIANI et alii, 1988).

Os principais carboidratos presentes no mamão são açúcares (sacarose, glicose e frutose), e uma quantidade mínima de amido

(SELVARAJ & PAL, 1982). No mamão maduro o açúcar predominante é a sacarose (48,3%) seguido pela glicose (29,0%) e frutose (21%) (SALUNKHE & DESAI, 1984).

O mamão contém enzimas como ácido ascórbico oxidase, catalase, invertase, papaína, peroxidase e pectinesterase sendo as duas últimas termorresistentes (AYLWARD & HAISMAN, 1969). A atividade de algumas enzimas resulta na perda do ácido ascórbico pelo ácido ascórbico oxidase, a inversão da sacarose pela invertase, e o desenvolvimento de aromas indesejáveis pela ação da peroxidase (AYLWARD & HAISMAN, 1969; CHANG et alii, 1973; CHANG & KWOK, 1975; CZYHRINCIW, 1969).

GARCES (1963) citado por CZYHRINCIW (1969) indica a peroxidase como sendo uma das enzimas presente no mamão, porém em quantidade pequena quando comparada com a de outras frutas. A atividade da peroxidase expressa como PZ é no mamão maduro de 0,003-0,009, no abacaxi maduro 0,05, na maçã 0,06, e na casca de laranja amarela 0,084.

PAL & SELVARAJ (1987) se referem também a presença da peroxidase no mamão, mostrando haver um aumento de atividade da enzima durante o amadurecimento. Por outro lado, DRAETA et alii (1975); AUNG & ROSS (1965); SALUNKE & DESAI (1981) e LEVI et alii (1985) indicam que a peroxidase está ausente no mamão.

NATH & RANGANNA (1981) trabalhando com mamão acidificado também não encontraram peroxidase.

A pectinesterase tem um papel vital no amadurecimento das frutas, mas por outro lado atua nos grupos metóxidos da pectina retirando-os e transformando-a em ácido péctico, que se liga ao

cálcio presente na polpa de mamão geleificando-a. A atividade dessa enzima pode ser controlada pelo abaixamento do pH e/ou por aquecimento (AYLWAND & HAISMAN, 1969; CHANG & KWOK, 1975; CZYHRINCIW, 1969).

NATH & RANGANNA (1981) trabalharam com mamão acidificado (pH 3,8 - 4,8) determinando a curva de tempo de inativação térmica e o tempo de redução decimal da pectinesterase no xarope homogeneizado e na polpa. Os resultados mostraram que em pH 4,0 o valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ da enzima é de 0,80 min enquanto à pH=3,8 o valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ é de 0,69 min. Este fato é bem explicado já que quanto mais próximo do pH ótimo (7,0 - 8,0) mais ativa está a enzima, sendo mais difícil sua inativação.

2.4. Aspectos gerais sobre a Microbiologia do Mamão

Na grande maioria das frutas, os microorganismos de importância, como agentes potenciais de deterioração, são os bolores, leveduras e algumas bactérias não esporogênicas, particularmente as bactérias láticas (DASTUR et alii, 1968; LEITÃO, 1973; NANJUNDASWAMY et alii, 1973).

Todos esses microorganismos, salvo raras exceções, apresentam como característica comum, uma baixa resistência térmica. Este fato aliado ao pH ácido das frutas faz com que os tratamentos térmicos, visando a preservação dos produtos de frutas, sejam realizados a temperatura máxima de 100°C (DASTUR et alii, 1968; LEITÃO, 1973).

No caso do mamão, o resultado de exames microbiológicos feitos na polpa congelada e na polpa com conservantes, mostrou a presença de bolores, leveduras e uma elevada contagem de bactérias lácticas (LEITÃO, 1973).

PERALTA et alii (1973) estudaram as características morfológicas e fisiológicas de microorganismos isolados de latas de mamão em pedaços acidificado, que sofreram subprocessamento térmico. Foram obtidos 3 isolados de várias latas, examinadas após um mês de estocagem à 30°, 37° e 55°C ou até o aparecimento de sinais de deterioração. Dos três isolados, dois eram bastonetes Gram positivos, não esporulados, microaerófilos, móveis e não produtores de catalase. E o outro, era de cocos, Gram positivos, não esporulados, microaerófilos, móveis e produtores de catalase. No estudo da resistência térmica desses micrororganismos isolados, se observou que o valor de D em tampão fosfato (0,25-2,55 min) era maior que no mamão em pedaços (0,29-0,70 min).

NATH e RANGANNA (1981) confirmaram, através de testes microbiológicos, que a flora naturalmente presente nas latas de mamão em pedaços acidificado, subprocessadas (97°C, 4 min) era composta de cocos Gram positivos e Gram negativos e de bacilos Gram positivos não esporulados.

2.5. Aspectos gerais sobre *Clostridium pasteurianum* usado como indicador de esterilização em alimentos ácidos

O *Cl. pasteurianum* juntamente com *Clostridium butyricum* pertencem ao grupo dos anaeróbios butíricos, sendo mesófilos, não proteolíticos e formadores de esporos. Fermentam carboidratos (açúcares, amido, pectina) produzindo ácidos butírico e acético, além de gases como dióxidos de carbono e hidrogênio. Não são patogênicos, mas podem causar grandes perdas econômicas em alimentos ácidos termoprocessados, como tomate e certas frutas. O desenvolvimento do *Cl. pasteurianum* e do *Cl. butyricum* nesses produtos é caracterizado por odor butírico e produção de gases, que levam ao estufamento das latas (INGRAN, 1969; LAKE & LYNT, 1984).

O *Cl. pasteurianum* é uma bactéria muito encontrada no solo, apresentando alta tolerância ao açúcar e ao meio ácido. Os alimentos são contaminados através de resíduos do solo e não durante o processamento. A água pode algumas vezes ser o transportador dessa bactéria.

Os *Clostridium* anaeróbios butíricos são capazes de esporular e se desenvolverem em alimentos com pH de 3,7 e acima. Existem referências sobre seu desenvolvimento em suco de pera com pH 3,55, mas do ponto de vista comercial o pH limitante é considerado 3,7. A resistência térmica é menor do que a dos *Clostridium* anaeróbios proteolíticos (INGRAN, 1969; LAKE & LYNT, 1984; TOWNSEND, 1939).

Os resultados dos testes de resistência térmica dos esporos de *Cl. pasteurianum*, em suco de tomate, mostraram que à 100°C, o suco com pH 4,5 precisava de um tempo duas vezes maior, para des-

truir os esporos que a pH 4,1 e aproximadamente 5 vezes mais que a pH 3,8. Isto demonstra, que a redução do pH da fruta, pela adição de ácido, tem um efeito considerável na resistência térmica dos esporos, reduzindo os tempos necessários para a esterilização. Esta seria uma alternativa para substituir um processo severo que causa consideráveis danos as frutas termossensíveis (TOWNSEND, 1939).

Os esporos de *Cl. pasteurianum* usados por TOWNSEND (1939), em ensaios de resistência térmica foram obtidos a partir de cultivos em meio de fígado incubados à 30°C por 20-26 dias, em condições de anaerobiose. A cultura foi concentrada por centrifugação e estocada à 5°C, em uma alíquota de meio de fígado.

Já BOWEN & SMITH (1955) conseguiram elevadas concentrações de esporos de *Cl. pasteurianum* cultivando-o em caldo de glicose (Dextrose Broth) à 3% (P/V) com 0,8% (P/V) de extrato de levedura e adicionando-se, após 48 horas de incubação à 30°C em anaerobiose, uma solução estéril de CaCO₃ a 1% para tamponar o meio de cultivo na faixa de pH 5,4-5,7, ótima para a esporulação.

PERKINS (1964) e vários pesquisadores [REED et alii, 1951; COLLIER; ZOHA & SADOFF; TSUJI & PERKINS citado por PERKINS (1964)] usaram uma técnica diferente para a esporulação de *Cl. thermosaccharolyticum*, *Cl. roseum*, PA 3679 e *Cl. (para) botulinum*, esta consiste no prolongamento da fase exponencial de crescimento e sincronização da etapa de crescimento, através de uma série de transferências, progressivamente até um volume grande de meio, induzindo dessa maneira uma esporulação abundante. A importância dessa técnica é trazer um grande número de células para maturidade e eventual esporulação quase ao mesmo tempo.

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi estabelecer o processamento térmico requerido, visando a segurança microbiológica do produto enlatado, através do estudo da cinética de inativação térmica das enzimas termorresistentes, presente na polpa de mamão "formosa" (*Carica papaya* L.) acidificada (pH 3,8), com ou sem adição de sacarose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matéria-Prima

A matéria-prima usada neste estudo foi o mamão "Formosa", com maturação uniforme (proporção de amarelo na casca igual a de verde, estabelecida visualmente).

Nos testes de laboratório foi usada:

A) a polpa de mamão acidificada com ácido cítrico (pH 3,8), pois segundo NATH & RANGANNA (1981) neste pH a taxa de inativação da pectinesterase é maior que em outros valores de pH.

B) a polpa acidificada misturada com sacarose de maneira a se obter concentrações de 20^o, e 30^o Brix.

Nos ensaios de planta piloto foi usada a polpa de mamão acidificada com ácido cítrico (pH 3,8), sem adição de sacarose, acondicionada em latas de 1Kg (99,5 x 118mm) com revestimento de verniz epoxi.

4.2. Esquema da metodologia para estabelecimento do processo térmico adequado para a polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8)

A - Caracterização do produto

A1 - Química e bioquímica

- . pH
- . Acidez total
- . Sólidos solúveis (^oBrix)
- . Atividade enzimática da peroxidase
- . Atividade enzimática da pectinesterase

A2 - Microbiológica

- . Determinação da carga microbiana da polpa

Ensaio com o indicador de pasteurização de alimentos ácidos (*CI. pasteurianum*)

B - Preparo da polpa de mamão "formosa" para os ensaios em laboratório e em planta piloto

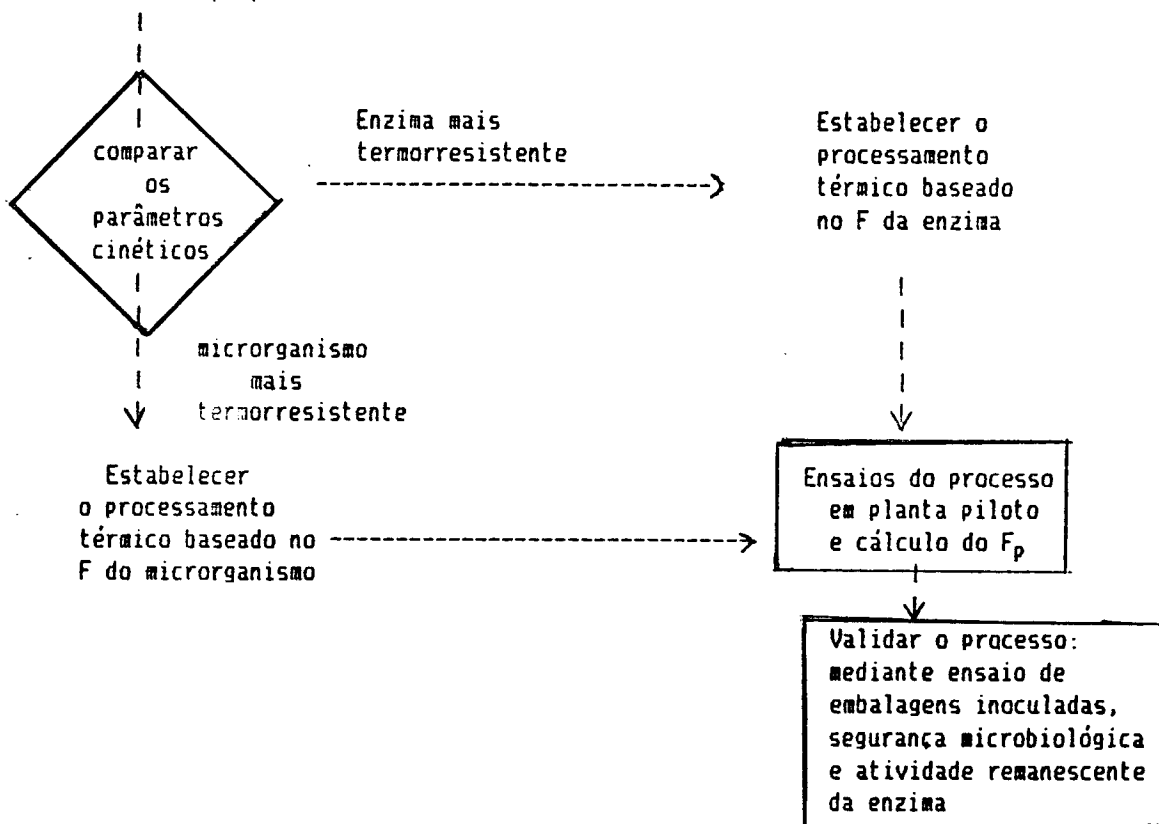
B1 - Determinação da cinética

- De inativação térmica da enzima pectinesterase na Polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8), com ou sem adição de sacarose.
- De destruição térmica do *CI. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8), sem adição de sacarose.

C - Cálculo dos valores D e Z da enzima e do microrganismo indicador e estabelecimento do valor F requerido

Baseou-se na comparação dos parâmetros cinéticos segundo o seguinte esquema

Determinar parâmetros cinéticos do microrganismo e de enzima na polpa



D - Processamento em planta piloto

D.a. - Determinação do ponto frio da lata através do perfil de temperatura de diversas posições dentro da lata

D.b. - Estabelecimento do tempo de processo adequado através do perfil de temperatura, do cálculo da taxa de inativação (I) e do valor de Pasteurização (F_p)

E - Segurança microbiológica

E.a. - Ensaio de processamento na planta piloto com o tempo de processo adequado determinado em D.b.

E.b. - Ensaio de embalagens inoculadas

4.3. Caracterização do Produto

Foram usadas 17 amostras diferentes de polpa de mamão "formosa", preparadas conforme o item 4.8, nas quais foram determinados pH, acidez total, sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$).

Em 7 dessas amostras foi determinada a atividade de peroxidase e nas outras 10 amostras foi determinada a atividade de pectinesterase.

- O pH foi medido diretamente no potenciômetro DIGIMED - DMPH-2.
- A acidez total foi expressa em ácido cítrico, segundo método da A.O.A.C. 22058, 1984.
- Os sólidos solúveis (^oBrix) foram medidos em refratômetro ABE. segundo método A.O.A.C., 22024, 1984
- A atividade de peroxidase foi determinada conforme item 4.4.
- A atividade da pectinesterase foi determinada conforme item 4.5.

4.4. Determinação da atividade da peroxidase

Para verificar a atividade de peroxidase nas amostras de polpa de mamão "formosa" foram usados os métodos propostos por NEBESKY (1950) e por SILVA (1984). Para se checar a eficiência desse métodos, foi determinada a atividade de peroxidase em maçã e pera, frutas com um alto teor de peroxidase. Os resultados dessas determinações foram comparados com os encontrados em SILVA (1984)

a) Método proposto por NEBESKY (1950)

O método qualitativo proposto por NEBESKY (1950) consiste de:

Em um tubo de ensaio contendo 1ml de polpa de mamão "formosa", adicionou-se 9ml de água destilada, 1ml de H₂O₂ à 0,3% e 1ml

de solução de guaiacol à 1% em etanol. O desenvolvimento da cor marrom avermelhada indicava a presença de peroxidase ativa.

b) Método proposto por SILVA (1984)

Preparou-se inicialmente um extrato enzimático que consistia na mistura, em proporções iguais, de polpa de mamão e água destilada gelada.

Em um erlenmeyer de 50ml foram adicionados 20ml de solução tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 e 1ml do extrato enzimático, que a seguir foi deixada à 20°C por 5 minutos até estabilização da temperatura sendo adicionado 1ml de guaiacol à 1% e 1ml de H₂O₂ à 0,5%, homogeneizando-se rapidamente. A seguir procedeu-se a leitura em espectrofotômetro spectronic 20 (BAUSCH LOMB) de amostras de 10ml, efetuando-se 10 leituras sucessivas com intervalos de 1 minuto, à 470nm previamente calibrado. Como controle para a reação enzimática foi utilizado um tubo de espectrofotômetro contendo a mistura reativa com excessão do peróxido de hidrogênio.

Segundo SILVA (1984) uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de extrato enzimático que provocou um aumento na absorvência de 0,001 unidades por minuto.

$$\text{Peroxidase (unidades/ml)} = \frac{\Delta \text{ absorv\~ancia da amostra} \times \text{dilui\~c\~ao}}{0,001 \times \Delta t \times \text{volume da amostra}}$$

t = tempo de leitura em minutos $\Delta t = 10 \text{ min}$

$\Delta \text{ absorv\~ancia} = \text{absorv\~ancia \~a } t = 10 \text{ min} - \text{absorv\~ancia \~a } t = 0 \text{ min}$

4.5. Determina\~c\~ao da atividade da pectinesterase

A atividade da pectinesterase foi medida pelo m\~etodo de KERTESZ (1955). O m\~etodo consiste na titula\~c\~ao dos grupos carbox\~ilicos liberados em 50ml de uma solu\~c\~ao de pectina c\~itrica (Sigma) \~a 1% em NaCl 0,1M, na qual se adicionou 2ml do extrato enzim\~atico. O pH da mistura de rea\~c\~ao foi mantido \~a 7,5 durante 5 minutos pela adi\~c\~ao de NaOH 0,01N, sob agita\~c\~ao cont\~inua. A temperatura da rea\~c\~ao de mistura foi mantida \~a 30°C em banho de \~agua. A unidade (u) de pectinesterase foi definida como o n\~umero de miliequivalentes de \~ester hidrolisado por minuto \~a pH 7,5 e \~a 30°C e a atividade da pectinesterase foi expressa como PEu $\times 10^4$ /ml de extrato enzim\~atico.

C\~alculo da atividade de pectinesterase

$$\text{PEu} \times 10^4 / \text{ml} = \frac{\begin{array}{c} \text{miliequivalente} \\ \text{de Na OH} \end{array} / \text{ml} \times \begin{array}{c} \text{volume de} \\ \text{Na OH gastos} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{tempo de} \\ \text{rea\~c\~ao} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{volume de} \\ \text{amostra} \end{array}} \times 10^4$$

4.6. Determinação da carga microbiana na polpa de mamão "formosa"

Foi realizada a contagem do número total de microrganismos mesófilos, de bactérias lácticas e de bolores e leveduras na polpa de mamão acidificada (pH 3,8) e na polpa acidificada misturada com sacarose, segundo o método da A.P.H.A., (SPECK, 1976).

Preparo da amostra - Dez gramas de polpa de mamão foram suspensas em 90ml de água peptonada (0,1% P/V) estéril, a partir desta primeira diluição decimal foram preparadas diluições decimais sucessivas até $1:10^4$ com água peptonada (0,1% P/V) estéril. Foi feito o plaqueamento em profundidade e em duplicata.

a) Contagem total de mesófilos

meio de cultura: AGAR padrão de contagem (PCA)

condições de incubação: 37°C, 48h.

b) Contagem de bactérias lácticas

meio de cultura: MRSbroth + 1,5% AGAR

condição de incubação: 37°C, 48h.

c) Contagem de bolores e leveduras

meio de cultura: AGAR batata glicose acidificado pH = 3,5 (PDA)

condições de incubação: 30°C, 3-5 dias

Os resultados das contagens foram expressos como unidades formadoras de colônias por ml. (UFC/ml)

4.7. Ensaaios com o indicador de pasteurização de alimentos ácidos (*CI. pasteurianum*)

I - Esporulação do *CI. pasteurianum*

A cultura do *CI. pasteurianum* FTPTA 0203 usada foi obtida na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "ANDRÉ TOSELLO" (FTP-TA) liofilizada. Esta foi ativada em meio de infusão de fígado (DIFCO), estratificada com Vaspar estéril e incubada a 30°C por 24 horas e armazenada a 4°C.

Métodos de esporulação

Para se utilizar este microrganismo foi necessário produzir um lote de esporos de alta resistência térmica, sendo testados três métodos de esporulação:

a) Baseado em BOWEN e SMITH (1955)

Meio de cultura - caldo glicosado a 3% (P/V) + 0,8% (P/V) extrato de levedura (10 ml/tubo), após 48 horas de incubação adição ao meio de 1% de CaCO_3 .

Inóculo - Cultura de *CI. pasteurianum* de 24 horas (1 ml/tubo)

Condições de incubação - Jarra de anaerobiose à 30°C

Tempo de incubação - crescimento - 48 horas
- esporulação - 48 horas

b) Baseado em TOWNSEND (1939)

Meio de Cultura - Meio de infusão de fígado (DIFCO) + pregos de ferro não galvanizados
(30ml + 3 pregos de ferro não galvanizados/tubo)

Inóculo - Cultura de *Cl. pasteurianum* de 24 horas (3ml/tubo)

Condições de incubação - Jarra de anaerobiose a 30°C

Tempo de incubação - 20 dias

Recuperação dos esporos - Centrifugação a 2500 RPM/15 min.
- Ressuspensão em água destilada estéril
- Centrifugação a 2500 RPM/15 min.
- Estocagem a 4°C

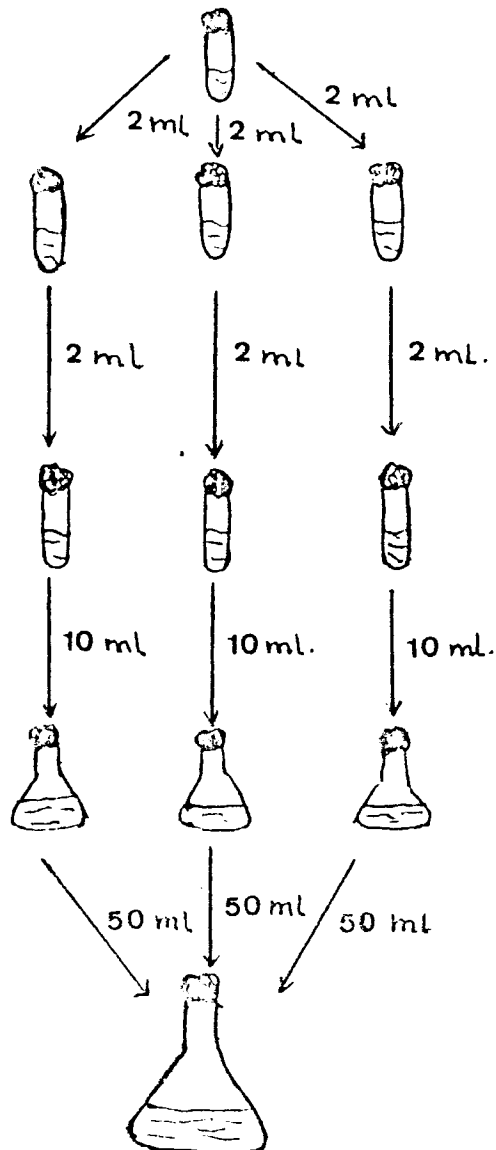
c) Baseado em REED et. al. (1951)

Meio de cultura - Meio de infusão de fígado + pregos de ferro não galvanizados
(10ml/tubo)

Inóculo - Suspensão de esporos do *Cl. pasteurianum* ativados a 100°C/2 min. (TOWNSEND, 1939) (1ml/tubo)

Condições de incubação - Tubos estratificados com vaspar estéril e incubados a 30°C

Transferências



Tubo com 1ml inóculo + 10ml de
meio de infusão de fígado
30°C/24 horas

1º Inoculação em tubos com 10ml
de meio de infusão de fígado +
1 prego de ferro 30°C/24 horas

2º Tubos com 10ml de meio de in-
fusão de fígado + 1 prego de
ferro 30°C/24 horas

3º Erlenmeyer de 250ml com 50ml
de meio de infusão de fígado +
5 pregos 30°C/24 horas

4º Erlenmeyer de 3 litros com 2
litros de meio de infusão de
fígado + 12 pregos de ferro

32°C/1 semana

28°C/2 semanas

Todos os tubos e erlenmeyer foram estratificados com Vaspar
estéril

Recuperação dos esporos - Filtração através de camada de
gase estéril

- Centrifugação a 2500 RPM/15 min.
- Ressuspensão em água destilada estéril e estocagem a 4°C

Métodos de Quantificação dos esporos de *CI. pasteurianum*

Foi utilizado o método do número mais provável (NMP) usando o caldo de infusão de fígado (DIFCO) (9ml/tubo) para quantificar a suspensão de esporos de *CI. pasteurianum* obtida pelos métodos citados em b e c ativada a 100°C/2 min. (TOWNSEND, 1939) e resfriada em banho de gelo.

II - Ensaio de crescimento *CI. pasteurianum* no alimento

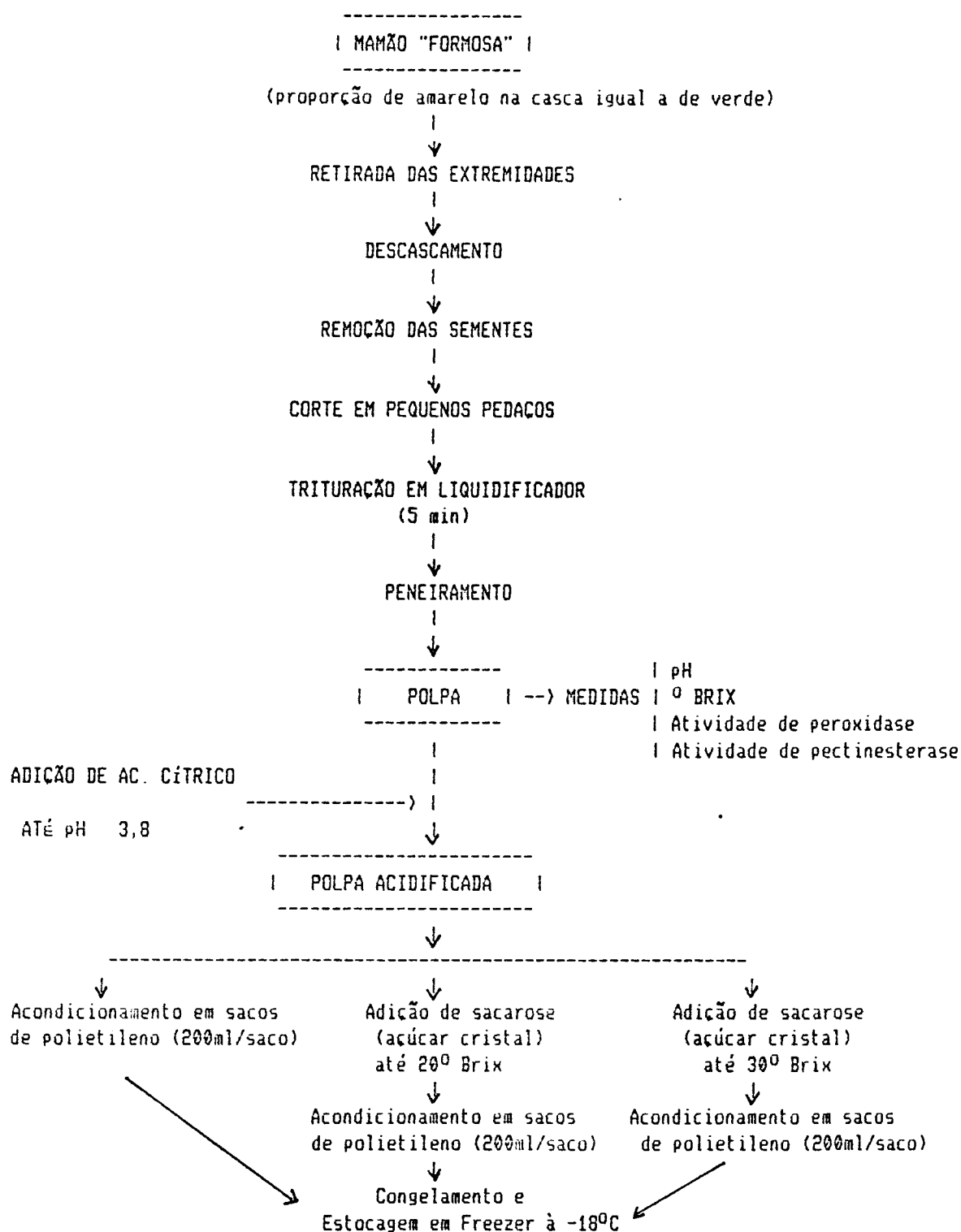
Este ensaio foi realizado para verificar a capacidade do *CI. pasteurianum* crescer na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3.8) e na polpa acidificada com adição de sacarose para se obter concentrações de 20° e 30° Brix

Técnica

- Foram esterilizados à 121°C por 15 min., 9 tubos com 9ml de polpa de mamão preparada de acordo com item 4.8, sendo:
 - * 3 tubos com polpa de mamão sem adição de sacarose

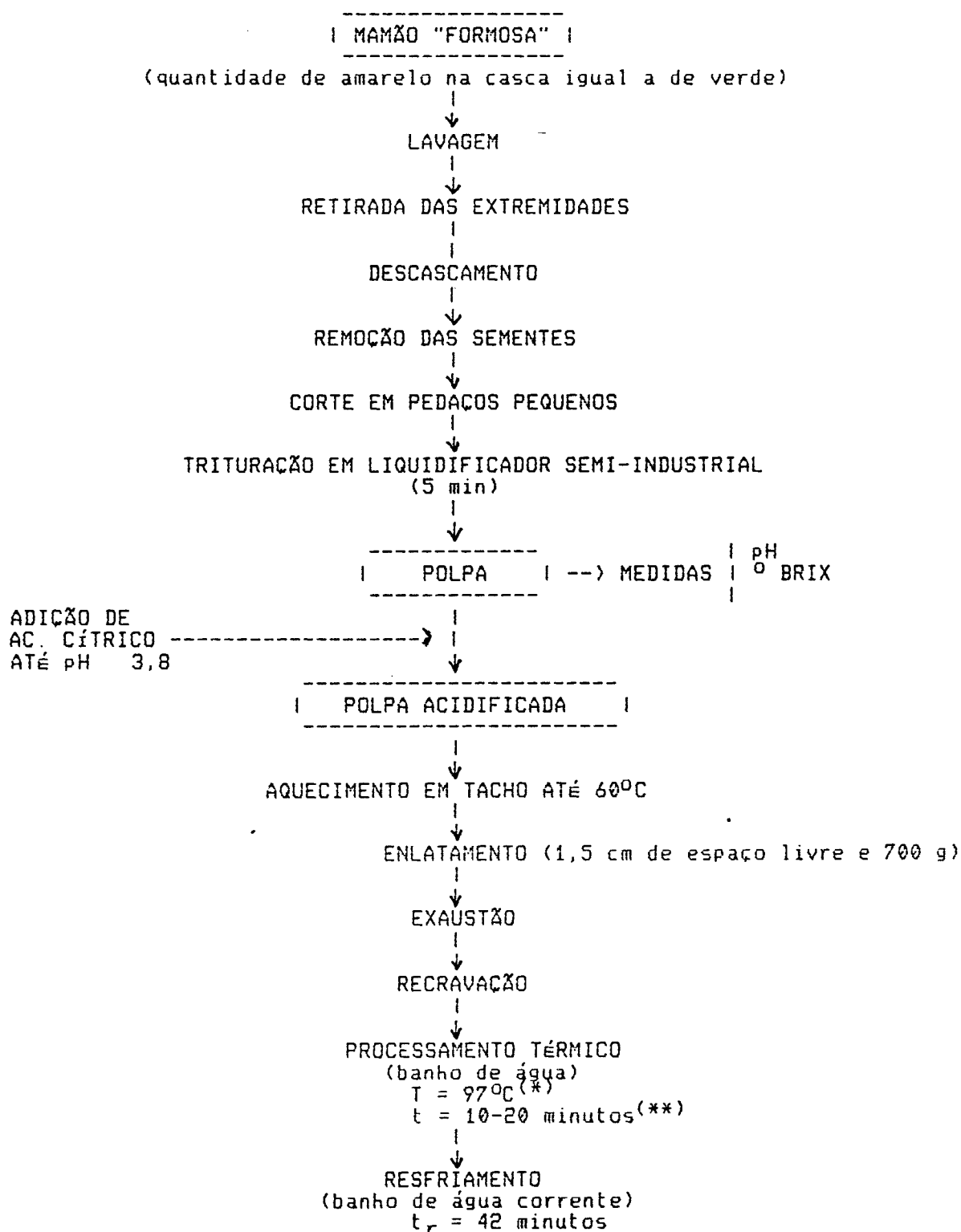
- * 3 tubos com polpa de mamão com adição de sacarose até 20° Brix
- * 3 tubos com polpa de mamão com adição de sacarose até 30° Brix
- Foi feita a exaustão dos tubos com polpa de mamão aquecendo-se à 100°C/10 min. e resfriando-se em banho de água fria para evitar a reabsorção de oxigênio.
- Os tubos foram inoculados com 5ml da suspensão de esporos previamente ativada (100°C/2 min.) (TOWNSEND, 1939) e estratificados com VASPAR estéril antes de incubados à 30°C
- Foi observada a produção de gás a partir de 2 até 15 dias.
- Um tubo com polpa sem inóculo, mas estratificado com VASPAR e incubado à 30°C foi utilizado como controle.

4.8. Preparo da polpa de mamão "Formosa" acidificada (pH 3,8 para os testes de laboratório)



Quando requerida a polpa foi descongelada e usada nos ensaios de laboratório

4.9. Preparo da polpa de mamão "Formosa" acidificada
(pH 3,8) para os testes na planta piloto



(*) Temperatura da água em ebulição em Campinas - SP.

(**) Variando de acordo com processo e medido a partir da imersão no banho de água quente até o final do aquecimento.

4.10. Testes de inativação térmica da pectinesterase

A taxa de inativação térmica da pectinesterase foi determinada pela imersão de tubos TDT não selados (9 x 97mm) em banho de óleo ajustado para a temperatura desejada (precisão $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Os tubos foram calibrados para 2ml e a polpa de mamão "formosa" introduzida nos mesmos, à temperatura de aproximadamente 27°C . O tempo de retardamento térmico ("LAG") foi determinado para atingir cada temperatura testada, colocando-se um termopar ECKLUND tipo agulha no centro geométrico do tubo. Doze tubos similares com 2ml de polpa de mamão "formosa" foram colocados no banho de óleo. Os tubos referentes ao tempo zero foram retirados após a fase de lag e colocados imediatamente em banho de gelo. Após cada tempo de amostragem foram retirados dois tubos TDT e colocados imediatamente em banho de gelo. A polpa de mamão "formosa" de cada tubo foi quantitativamente extraída com 10ml de solução de NaCl à 10% (AUNG & ROSS, 1965) e a atividade da pectinesterase foi determinada no extrato global, utilizando-se o método de KERTESZ (1955), conforme indicado no item 4.5.

As temperaturas dos ensaios de inativação térmica da pectinesterase foram 75°C , 77°C e 80°C e os tempos de amostragem 0,15; 0,30; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 15 minutos. Para cada condição foram feitos três experimentos com cada tempo de amostragem em duplicata

4.11. Ensaio para verificar a influência da concentração de sacarose na estabilidade térmica da pectinesterase

O objetivo desse ensaio foi verificar como a adição de sacarose influenciava o valor D da enzima pectinesterase.

O estudo dessa influência foi feito através da cinética de inativação térmica da pectinesterase. Foram usadas a polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) e a polpa acidificada com adição de sacarose para se obter concentrações finais de 20^o e 30^o Brix.

- . Foi usado o método de tubos TDT não selado, para o estudo de inativação térmica. (ver 4.10.)
- . As temperaturas dos ensaios de inativação térmica da enzima pectinesterase foram 75°C e 80°C.
- . Foram usados os seguintes tempos de amostragem: 0,15; 0,30; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0;; 10,0 e 15 min.
- . Para cada condição foram usados três lotes de mamão.
- . Foi determinado o valor de D da enzima pectinesterase. (ver 4.13.1)

4.12. Determinação da resistência térmica do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8)

Método do frasco de 3 bocas

O trabalho foi feito baseado na metodologia desenvolvida por LEVINE (1920) e descrita por STUMBO (1973).

Utilizou-se um balão de 3 bocas (2.000 ml) com entrada para termômetro, agitador e amostra, contendo 800 ml de polpa de mamão acidificada e suspensão de esporos, previamente ativada. Na ativação usou-se 8ml de suspensão de esporos, colocada em um tubo de ensaio com 10ml de polpa de mamão acidificada, e aqueceu-se à 100°C/2 min.. Quando a polpa de mamão acidificada, no balão, atingiu a temperatura desejada, adicionou-se a suspensão ativada do microrganismo. Imediatamente, retirou-se 1ml da amostra para a contagem inicial, seguindo-se a marcação de tempo para a retirada das amostras. Cada amostra foi imediatamente resfriada, diluída e inoculada em tubos de infusão de fígado para contagem do número mais provável (NMP). Os tubos foram incubados à 30°C e a contagem realizada após 2 a 10 dias.

As temperaturas utilizadas nos ensaios de resistência térmica foram 75°, 77° e 80°C, obtidas em banho com temperatura controlada (precisão $\pm 0,5^\circ\text{C}$) e os tempos de amostragens 1,0; 2,0; 5,0 10,0; 15,0 e 20,0 minutos. Para cada condição foram feitos dois ensaios com tempos de amostragens em duplicata.

4.13. Tratamento dos dados e determinação dos parâmetros cinéticos da inativação térmica da pectinesterase

4.13.1. Cálculo do tempo de redução decimal (D) e da constante de destruição térmica (K)

Durante os ensaios de inativação térmica da pectinesterase foram encontrados dois comportamentos diferentes indicando que uma porção dessa enzima era termolábil e outra termorresistente. Por esse motivo usou-se o modelo descrito por LING & LUND (1978) para se calcular o valor D e K dessas duas porções.

Para a porção termorresistente traçou-se a curva

$$\log (\%P) = \log \frac{K_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} - \frac{K_R t}{2.303}$$

simplificada para tempos de aquecimentos prolongados, quando

e $-K_L t$ tende para zero

$$K_R = - \text{inclinação} \times 2,303$$

$$D_R = \frac{2,303}{K_R}$$

$$A = \frac{K_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}}$$

Para a porção termolábil traçou-se a curva

$$\log (\%P-A) = \log \frac{K_L E_{LO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} - \frac{K_L t}{2.303}$$

simplificada para tempos curtos

$$K_L = - \text{inclinação} \times 2,303$$

$$D_L = \frac{2,303}{K_L}$$

4.13.2. Cálculo do coeficiente térmico (Z)

Para o cálculo do valor Z traçou-se a curva "fantasmas" de inativação térmica das porções termolábil e termorresistente. O valor Z é numericamente igual ao recíproco da inclinação dessa curva, obtida mediante regressão dos dados.

4.13.3. Cálculo da energia de ativação (E_A)

A energia de ativação das porções termolábil e termorresistente foram calculadas baseado em RAMASWAMY (1989) pela seguinte equação:

$$E_A = 2,303 R T_{\max} T_{\min} / Z$$

na qual $T_{\min}$ é a temperatura mínima da faixa estudada e $T_{\max}$ a temperatura máxima da faixa estudada.

4.14. Testes de processamento em planta piloto

As latas de polpa de mamão "formosa" acidificada ($\text{pH} = 3,8$) foram processadas à 97°C em banho de água na planta piloto da FEA-UNICAMP, segundo item 4.9. Utilizou-se a pasteurização em tanque de água aberto por ser um processo simples e de fácil aplicação em pequenas indústrias.

Após o processamento térmico foi feita a determinação da atividade da pectinesterase segundo item 4.5., sólido solúveis e pH segundo item 4.3., nas latas de polpa de mamão.

4.14.1. Determinação do ponto frio da lata

Foram usadas seis latas com polpa de mamão "formosa" acidificada ($\text{pH} = 3,8$) com termopares ECKLUND em três posições diferentes, estes termopares foram acoplados a um registrador de temperatura. A temperatura foi registrada a cada intervalo de 0,86 minutos. A posição do termopar foi como se segue:

2 latas - Termopar no centro geométrico da lata

2 latas - Termopar a 25% do fundo da lata

2 latas - Termopar a 18% do fundo da lata

Foi construído o perfil de temperatura em função do tempo para cada posição do termopar nas latas. A posição que apresentou a penetração de calor mais lenta foi considerada o ponto frio da lata

4.14.2. Tratamento dos dados e estabelecimento do tempo de processo

- a) Durante o processamento das latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8) em banho à 97°C e durante o resfriamento em banho de água corrente, foi registrada a temperatura através do termopar ECKLUND, instalado no ponto frio da lata, acoplado a um registrador de temperatura, em intervalos de 0,86 minutos. Baseado nos valores de temperaturas encontramos a taxa de inativação (I), para a enzima em cada tempo usando a $T_{ref} = 77^{\circ}\text{C}$

$$I = 10^{(T - T_{ref})/z}$$

$$I = 10$$

(Z da enzima pectinesterase)

- b) Os dados obtidos foram analisado pelo MÉTODO GERAL, fazendo-se um gráfico dos valores da taxa de inativação ou da letalidade versus tempo de aquecimento e medindo-se área sob a curva pela regra de integração de SIMPSON, desde o tempo inicial de aquecimento até o final do resfriamento, para se obter o valor de pasteurização (F_p) aplicado ao produto. É necessário a inclusão do tempo de resfriamento no cálculo do valor F_p , pois praticamente toda a inativação da pectinesterase se dá nesta fase.

- c) Foram feitos ensaios usando-se tempos de processo de 10, 15 e 20 minutos, e calculando-se os respectivos valores de F_p . Baseado na relação de SHIGA (1976)

$$(t^2 = a F_p + b)$$

foi construído o gráfico de F_p versus t^2

4.15. Ensaios de processamento com tempo de processo adequado

Encontrado o tempo de processo adequado, baseado na enzima pectinesterase, foram feitos três experimentos de processo nas mesmas condições para checar esse valor. Em cada experimento foram usadas seis latas, com termopar ECKLUND posicionado no ponto frio, conforme determinado no item 4.14.1. A temperatura de aquecimento e resfriamento foi medida através desse termopar acoplado ao registrador de temperatura em intervalos de 0,86 minutos. O valor de F_p foi calculado através do método geral, usando-se a regra de integração de SIMPSON.

4.16. Ensaios de processamento com a microflora naturalmente presente e estabelecimento da validade do processo

Foram processadas 24 latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), em banho de água à 97°C por 12,9 minutos. Estas latas foram incubadas à 30°C por quatro semanas e à 50°C por duas semanas. Caso ocorresse o estufamento era realizado o exame microbiológico de acordo com a metodologia indicada pelo FDA (1984) para alimentos ácidos.

4.17. Ensaio de embalagens inoculadas

Este ensaio foi realizado com objetivo de se verificar se o processamento térmico foi eficiente na destruição térmica do *C. pasteurianum* inoculado nas latas.

Para se ter uma margem de segurança, devido a variação da atividade inicial da pectinesterase, este ensaio foi feito usando-se um $F_{77^{\circ}\text{C}}^{77^{\circ}\text{C}} = 16,7$ min, equivalente a 2,3 D da porção termorresistente da pectinesterase (inativação de 99,5%). Este processo aplicado ao produto corresponde a um tempo de aquecimento de 15 min., em banho de água a 97°C.

Após o enchimento, as 24 latas com polpa de mamão "formosa" acidificada (pH = 3,8) foram inoculadas com uma suspensão de esporos do *Cl. pasteurianum* (10^4 esporos/lata). Essas latas foram recravadas e processadas em banho de água à 97°C por 15 minutos, sendo então incubadas à 30°C por quatro semanas.

Havendo o estufamento das latas eram feitas sub-culturas, em caldo de infusão de fígado, para verificar se havia o crescimento do microrganismo inoculado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaios Preliminares

5.1.1. Caracterização da polpa de mamão "Formosa" e determinação do conteúdo enzimático de peroxidase

Na tabela 1 são apresentados os resultados da caracterização de 7 amostras de polpa de mamão "formosa" preparada conforme item 4.8.

Tabela 1 - Caracterização da polpa de mamão "formosa": pH, acidez, sólidos solúveis e atividade da Peroxidase

AMOSTRA	pH	ACIDEZ TOTAL (g Ac. citrico/ /100g)	SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix)	ATIVIDADE DA PEROXIDASE (a)	
				Método NEBESKY (1950)	Método SILVA (1984)
1	4,9	0,112	11,5	negativo	negativo
2	4,9	0,100	12,0	negativo	negativo
3	4,9	0,108	11,0	negativo	negativo
4	4,9	0,097	11,0	negativo	negativo
5	4,9	0,109	9,0	negativo	negativo
6	4,9	0,106	11,0	negativo	negativo
7	5,3	0,093	10,5	negativo	negativo
Média	4,96	0,104	10,9	--	---

(a) Extrato enzimático (item 4.4.)

A variação entre amostras de pH, acidez total e sólidos solúveis na polpa de mamão "formosa" foi pequena. O pH se manteve em 4,9 para praticamente todas as amostras; os sólidos solúveis variaram de 9,0 a 12,0^oBrix e acidez total variou entre 0,093 e 0,112g ac. cítrico/100g.

NATH & RANGANNA (1981) encontraram, na porção comestível do mamão, uma variação considerável no pH (4,20 - 5,65) e na acidez total (0,80-0,24%). Mas a variação de sólidos solúveis (10,5-12^oBrix) foi semelhante a encontrada no presente estudo.

Baseado nos resultados da Tabela 1 pode-se verificar que as amostras testadas de mamão "formosa" não apresentaram atividade de peroxidase. Estes resultados estão de acordo com DRAETA et alii (1985); AUNG & ROSS (1965); SALUNKHE & DESAI (1984) e LEVI et alii (1985), que indicam a ausência de atividade da peroxidase no mamão. Como GARCES citado em CZYHRINCIW (1969) e PAL & SELVARAJ (1987) se referem a presença de peroxidase no mamão, resolveu-se checar a metodologia usada para se evitar qualquer dúvida sobre a ausência de peroxidase no mamão "formosa". Para tal, foram feitas determinações de atividade de peroxidase em amostras de maçã e pera, frutas que apresentam um alto teor de peroxidase AYLWARD & HAISMAN (1969). Os resultados desse ensaio são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade da Peroxidase em maçã e pera

AMOSTRAS	ATIVIDADE DA PEROXIDASE	
	MÉTODO QUALITATIVO	MÉTODO
	NEBESKY (1950)	SILVA (1984)
Extrato de maçã	Peroxidase ativa indicada pela coloração marrom avermelhada	1,0 U/ml
Extrato de Pera	Peroxidase ativa indicada pela coloração marrom avermelhada	3,7 U/ml

Os resultados encontrados para o extrato de maçã foram próximos do encontrado por SILVA (1984), 1,3 U/ml. Já no caso do extrato de pera, o autor encontrou 0,8 U/ml, valor bem abaixo do encontrado no presente estudo, esta variação é provavelmente devido a diferença de variedade. Estes resultados indicam que ambos os métodos servem para determinar o conteúdo de peroxidase em frutas e que os resultados de ausência de peroxidase no mamão "formosa" não são consequência de um erro de metodologia, mas sim uma característica da variedade da fruta testada.

5.1.2. Conteúdo enzimático de pectinesterase na polpa de mamão "formosa"

Os resultados de 10 amostras diferentes de polpa de mamão "formosa" são apresentados na Tabela 3.

As amostras de polpa de mamão "formosa" usadas nos ensaios para determinação da atividade de pectinesterase apresentaram uma maior variação de Sólidos Solúveis (7,4-12,0°Brix), pH (5,3-4,9) e acidez total (0,123-0,199%) do que as amostras usadas na determinação de atividade da peroxidase.

A atividade da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" apresentou uma grande variação, 26,5 a 57,5 PEu $\times 10^4$ /ml. Esta variação entre as diversas amostras foi compatível com os resultados encontrados por NATH & RANGANNA (1981), 2,67 a 15,0 PEu $\times 10^4$ /ml. Estes autores encontraram valores bem inferiores aos encontrados no presente estudo, mas isso pode ser explicado pela utilização de variedades diferentes de mamão e pelo estado de maturação, pois cada variedade apresenta um conteúdo enzimático próprio.

Tabela 3 - Caracterização da polpa de mamão "formosa": Sólidos Solúveis, pH, acidez total e atividade da pectinesterase

AMOSTRA	SÓLIDOS SOLÚVEIS (a) (°Brix)	pH (a)	ACIDEZ TOTAL (a) (g Ac cítrico/100g)	ATIVIDADE DA PECTINESTERASE (b) (PEUx X 10 ⁴ /ml)
1	11,0	4,9	0,174	35,50
2	10,0	4,9	0,179	32,50
3	12,0	5,1	0,129	31,10
4	9,0	5,0	0,145	26,50
5	8,0	5,0	0,140	47,50
6	8,0	5,1	0,125	57,50
7	10,0	5,3	0,123	42,50
8	7,4	5,1	0,133	51,75
9	11,6	4,9	0,170	51,25
10	9,9	4,9	0,189	35,75
média	9,7	5,0	0,151	41,18
(a) polpa de mamão "formosa" (preparada de acordo item 4.8)				
(b) Extrato enzimático da polpa de mamão (item 4.4.10.)				
Média de duas determinações/amostra				

5.1.3. Ensaio Microbiológicos

5.1.3.1. Determinação da carga microbiana da polpa de mamão "formosa"

Os resultados das contagens de duas amostras diferentes de polpa de mamão "formosa" (no pH da fruta "in natura" 5,0), na polpa acidificada (pH 3,8) e na polpa acidificada com adição de sacarose até 20° e 30°Brix são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Contagem total de Mesófilos, de bolores e leveduras e de bactérias lácticas na polpa de mamão "formosa" sem acidificar, acidificada (pH = 3,8) e acidificada com adição de sacarose até 20°C e 30°Brix.

Polpa de mamão "formosa"	Amostra	contagem total de Mesófilos (UFC/ml)		contagem de bolo- res e leveduras (UFC/ml)		contagem de bactérias lácticas (UFC/ml)	
		N	N médio	N	N médio	N	N médio
Sem	1	$1,2 \times 10^4$		$3,3 \times 10^2$		$2,7 \times 10^3$	
acidificar			$2,95 \times 10^4$		$1,85 \times 10^2$		$3,95 \times 10^3$
(pH = 5,0)	2	$4,7 \times 10^4$		40		$5,2 \times 10^3$	
	3	$5,6 \times 10^3$		$2,8 \times 10^2$		$1,8 \times 10^3$	
Acidificada			$3,55 \times 10^3$		$2,6 \times 10^2$		$1,65 \times 10^3$
(pH = 3,8)	4	$1,5 \times 10^3$		$2,4 \times 10^2$		$1,5 \times 10^3$	
	5	$4,3 \times 10^3$		$2,5 \times 10^2$		$1,7 \times 10^3$	
Acidificada			$2,95 \times 10^3$		$2,25 \times 10^2$		$2,3 \times 10^3$
lc/ adição de	6	$1,6 \times 10^3$		$2,0 \times 10^2$		$2,9 \times 10^3$	
sacarose							
((20°Brix)							
	7	$2,7 \times 10^3$		$2,8 \times 10^2$		$3,6 \times 10^3$	
Acidificada			$2,4 \times 10^3$		$2,3 \times 10^2$		$3,55 \times 10^3$
lc/ adição de	8	$2,1 \times 10^3$		$1,8 \times 10^2$		$2,0 \times 10^3$	
sacarose							
((30°Brix)							

Verificou-se que, ao se acidificar a polpa de mamão "formosa" à pH 3,8 houve uma redução de dez vezes no número de mesófilos. A adição de sacarose a polpa de mamão não afeta a flora microbiana presente. LEITÃO (1973) trabalhando com a polpa de mamão sem conservante encontrou também valores de 10^3 semelhantes aos encontrados no presente estudo para a polpa acidificada, com e sem adição de sacarose. Na contagem de bolores e leveduras e bactérias lácticas não houve diferença na ordem de grandeza dos valores obtidos com a polpa sem acidificar, acidificada, com ou sem adição de sacarose, estes resultados são consistentes considerando-se a tolerância das bactérias lácticas a meios de crescimento ácidos. Comparando-se estes resultados com os obtidos pelo autor, verificou-se que a contagem de bolores e leveduras foi da mesma ordem de grandeza, no entanto, a contagem de bactérias lácticas foi dez vezes maior do que a encontrada no presente estudo.

5.1.3.2. Ensaio com o indicador de Pasteurização de alimentos ácidos (*CI. pasteurianum*)

I - Esporulação do *CI. pasteurianum*

Os resultados obtidos usando-se três métodos de esporulação com esporos ativados à 100°C por 2 minutos (ativação ótima) são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da produção de esporos do *Cl. pasteurianum*

Método	Esporulação		Método de quantificação dos esporos	Produção de Esporos
	meio	condições de incubação		
BOWEN & SMITH (1955)	caldo glicosado (3% P/V) + 0,8% extrato de levedura + 1% P/V CaCO ₂	30°C 4 dias	- Observação do campo esporulado em lâmina	< 10%
TOWNSEND (1939)	caldo de infusão de fígado + pregos de ferro	30°C 20 dias	- Observação do campo esporulado em lâmina - número mais provável em caldo de fígado	> 60% 2,8 x 10 ⁴ NMP de esporos/ml
REED (1951)	caldo de infusão de fígado + pregos de ferro (4 transferências sucessivas)	30°C 26 dias	- Observação do campo esporulado em lâmina - número mais provável em caldo de fígado	> 80% 7,6 x 10 ⁶ NMP de esporos/ml

Apesar de BOWEN & SMITH (1955) e TOWNSEND (1939) apresentarem resultados que indicam uma boa esporulação do *Cl. pasteurianum* utilizando caldo glicosado e caldo de fígado, respectivamente, no presente trabalho não se conseguiu uma esporulação abundante com esses métodos. Na verdade a literatura indica que não é fácil se obter lotes de esporos anaeróbios, em altas concentrações, pois esses microrganismos precisam de um potencial redox muito baixo para esporularem (PERKINS, 1964; STUMBO, 1973).

Quando se utilizou o método baseado em REED et alii (1951) usado para esporulação do PA 3679, se conseguiu uma esporulação abundante ($7,6 \times 10^6$ NMP esporos/ml) do *Cl. pasteurianum*. No entanto, na literatura revisada não foi encontrada qualquer referência da utilização deste método para o *Cl. pasteurianum*.

II - Ensaio de crescimento do *Cl. pasteurianum* em polpa de mamão "formosa"

Os resultados do ensaio de crescimento após a inoculação do *Cl. pasteurianum* em polpa de mamão "formosa" acidificada (pH=3,8) e na polpa acidificada com adição de sacarose até 20° e 30° são apresentados na Tabela 6. O microorganismo cresceu na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) e na polpa acidificada com adição de sacarose até 20° e 30° Brix após 15 dias de incubação.

Tabela 6 - Resultados do teste de crescimento do *CI. pasteurianum* em polpa de mamão "formosa" acidificada

Polpa de	número	
de mamão "formosa"	de tubos	crescimento
acidificada (pH=3,8)	inoculados	
sem adição de		3 tubos positivo, produção
sacarose	3	de gás, odor butírico
(11°Brix)		
com adição de		3 tubos positivo, produção
sacarose até	3	de gás, odor butírico
20°Brix		
com adição de		3 tubos positivo, produção
sacarose até	3	de gás, odor butírico
30°Brix		

Como os resultados do teste de crescimento foram positivos, concluiu-se que pode se usar o *CI. pasteurianum* como indicador de pasteurização da polpa de mamão "formosa" acidificada e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

5.2. Determinação da cinética de inativação térmica da enzima pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), determinação do tempo de redução decimal (D) e da constante de velocidade de inativação térmica (K) a cada temperatura e o valor do coeficiente térmico (Z) e da energia de ativação (E_A)

Os resultados dos ensaios de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75°C, 77°C e 80°C são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9. As curvas de inativação térmica [$\log(\%$ atividade de pectinesterase remanescente) versus tempo de aquecimento] são apresentadas nas figuras 1 e 2.

Tabela 7 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" (a) acidificada (pH 3,8) à 75°C

Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)			X Atividade de pectinesterase remanescente (XP)	X inativação pectinesterase	D (min)	K (min ⁻¹)
	I (b)	II (b)	III (b)				
0,0	42,0	42,0	42,0	100	0,0	porção termolábil	porção termolábil
0,5	25,0	25,0	25,0	59,6	40,4		
1,0	20,3	20,0	20,3	48,2	51,8	0,80	2,88
2,0	15,0	15,0	15,3	35,9	64,1	porção termorresistente	porção termorresistente
5,0	7,0	7,0	7,0	16,7	83,3		
10,0	4,7	4,5	5,0	11,3	88,7	16,72	0,14

(a) Polpa de mamão "formosa"

pH inicial = 4,95 Acidez (X Ac. cítrico) = 0,171X

110Brix

(b) Média de 2 amostras

Equação da curva de inativação térmica da pectinesterase à 75°C

Porção termorresistente

Curva 1 : $\log (XP) = 1,6159 - 0,0598t$
(fig. 1) $r = -0,9465$

Tabela 8 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" (a) acidificada (pH 3,8) à 77°C

Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)				X Atividade de pectinesterase remanescente (XP)	X inativação pectinesterase	D (min)	K (min ⁻¹)
	I (b)	II (b)	III (b)	Média				
0,0	42,0	42,0	42,0	42,00	100	0,0	porção termolábil	porção termolábil
0,5	15,3	15,5	15,7	15,50	36,9	63,1	0,35	6,50
1,0	12,3	12,5	12,0	12,27	29,2	70,8		
2,0	9,0	9,3	9,5	9,27	22,1	77,9	porção termorresistente	porção termorresistente
5,0	3,5	3,3	3,3	3,37	8,0	92,0		
10,0	0,7	0,7	0,7	0,70	1,7	98,3	7,24	0,32
15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100		
(a) Polpa de mamão "formosa"								
pH inicial = 4,95 Acidez (X Ác. cítrico) = 0,171%								
11°Brix								
(b) Média de 2 amostras								
Equação da curva de inativação térmica da pectinesterase à 77°C								
Porção termorresistente								
Curva 2 : $\log (XP) = 1,67077 - 0,1382t$								
(fig. 1)								
$r = -0,9979$								

Tabela 9 - Resultados do teste de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" (a) acidificada (pH 3,8) à 80°C

Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)			X Atividade de pectinesterase remanescente (XP)		D (min)	K (min)
	I (b)	II (b)	III (b)	Média			
0,0	42,0	42,0	42,0	42,00	100	0	
0,15	7,3	7,5	7,4	7,40	17,6	0,22	10,31
0,30	4,4	4,5	4,5	4,47	10,6		
0,5	3,3	3,3	3,3	3,35	8,0		
1,0	2,3	2,4	2,3	2,23	5,3		
2,0	1,2	1,1	1,1	1,15	2,7		
3,0	0,7	0,7	0,7	0,70	1,7		
5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		

(a) Polpa de mamão "formosa"

pH inicial = 4,95 Acidez (X Ác. cítrico) = 0,171X 110Brix

(b) Média de 2 amostras

Equação da curva de inativação térmica da pectinesterase à 80°C

Porção termorresistente

Curva 3 : $\log (XP) = 1,0086 - 0,2685t$

(fig. 1)

$r = -0,9936$

FIGURA 1- CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
NA POLPA DE MAMÃO 'FORMOSA' ACIDIFICADA (pH 3,0)
A 75°, 77° e 80°C

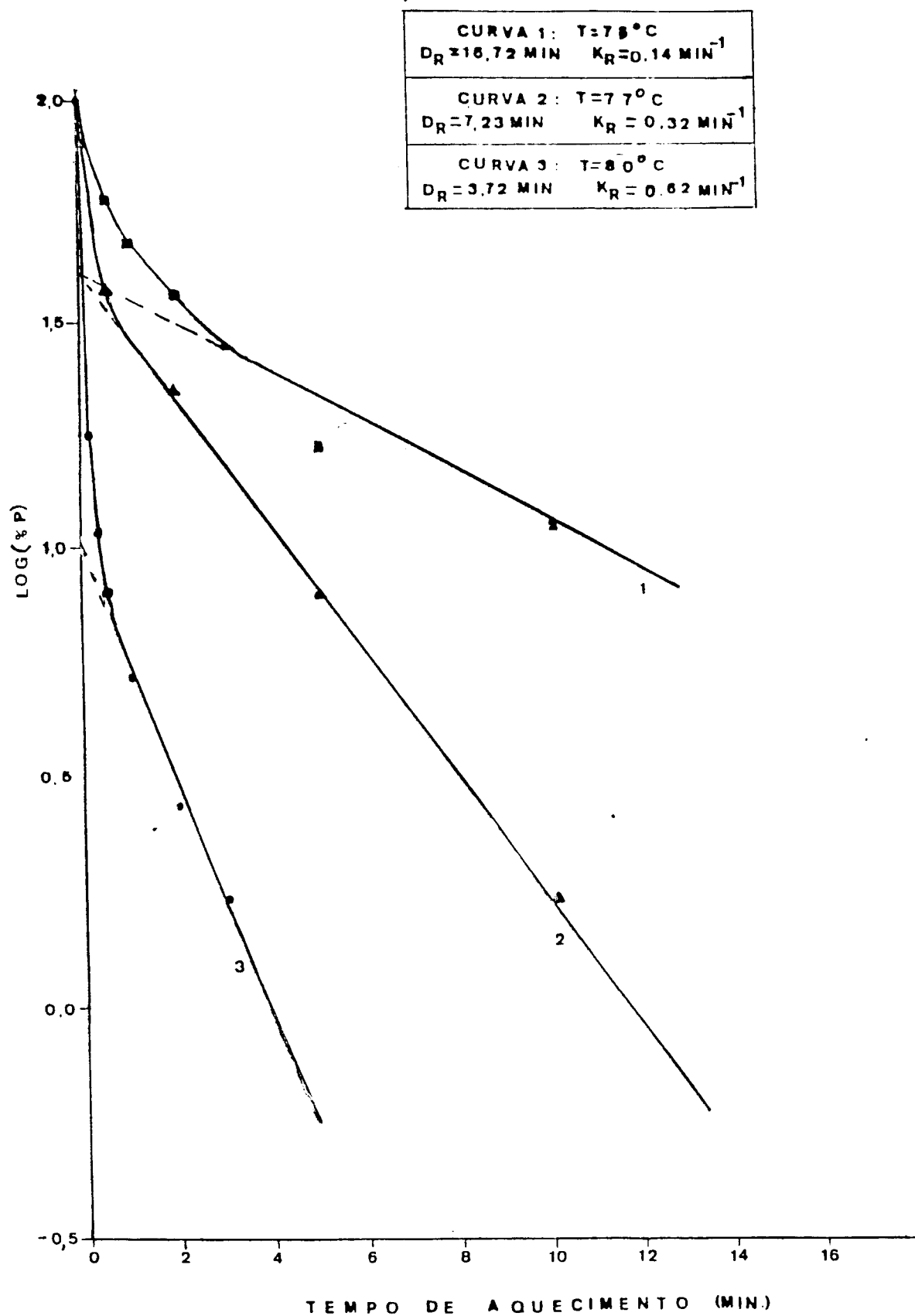
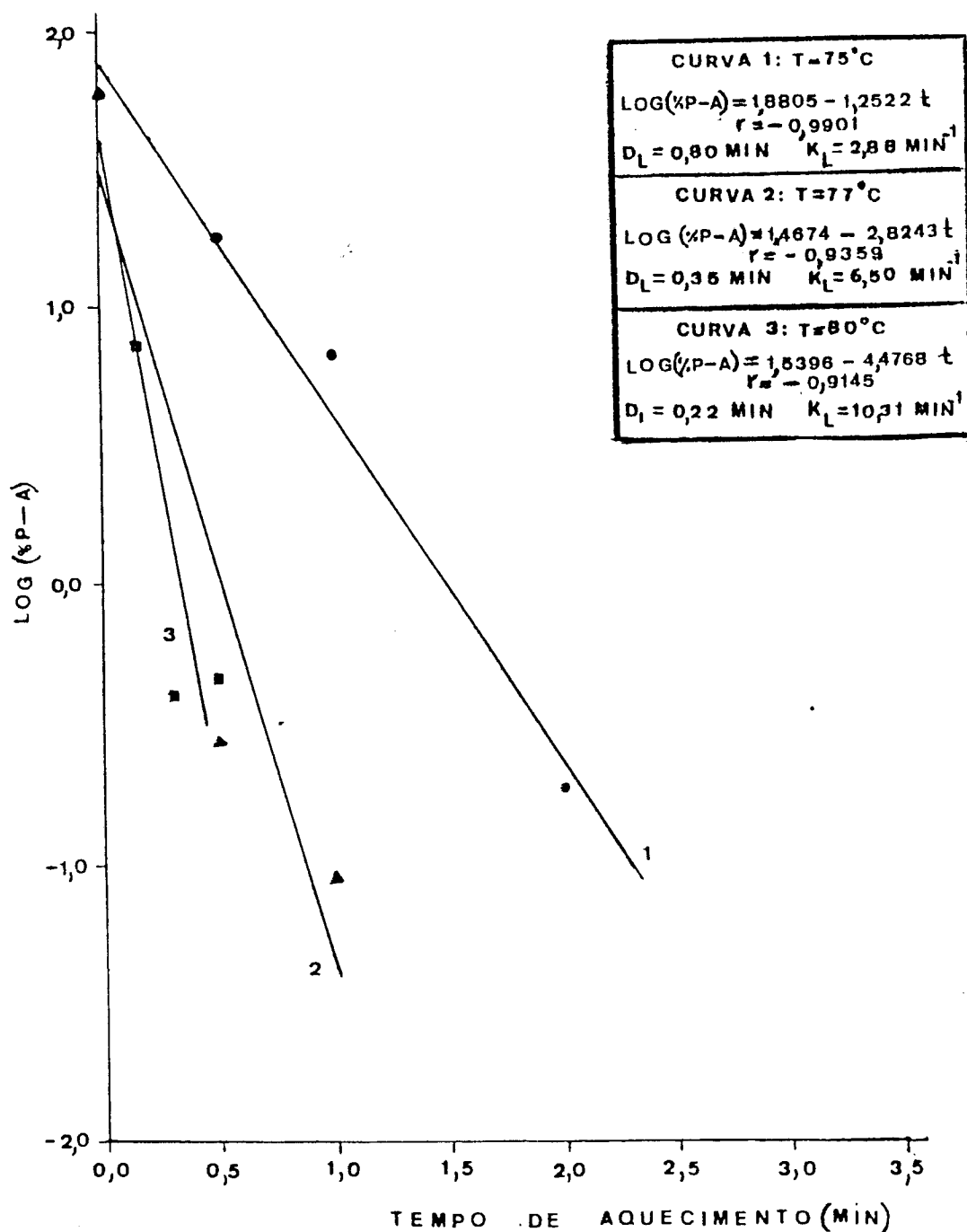


FIGURA 2. CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA MODIFICADAS PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA PORÇÃO TERMO-LÁBIL DA PECTINETERASE NA POLPA DE MAMÃO FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3,8).



Baseado nos valores D e K para as temperaturas de 75°, 77° e 80°C, encontramos o valor de Z e da Energia de ativação (E_A). Os resultados são apresentados nas tabelas 10 e 11 e na figura 3.

Tabela 10 - Valores de D e Z das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa da mamão formosa acidificada (pH 3,8).

Temperatura do teste (°C)	D (min)		Z (°C)	
	porção termolábil	porção termorresistente	porção termolábil	porção termorresistente
75	1,08	16,72		
77	0,35	7,23	9,21	7,82
80	0,22	3,72		

FIGURA 3 - CURVAS 'FANTASMAS' DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE NA POLPA DE MAMÃO 'FORMOSA' ACIDIFICADA (pH 3,8).

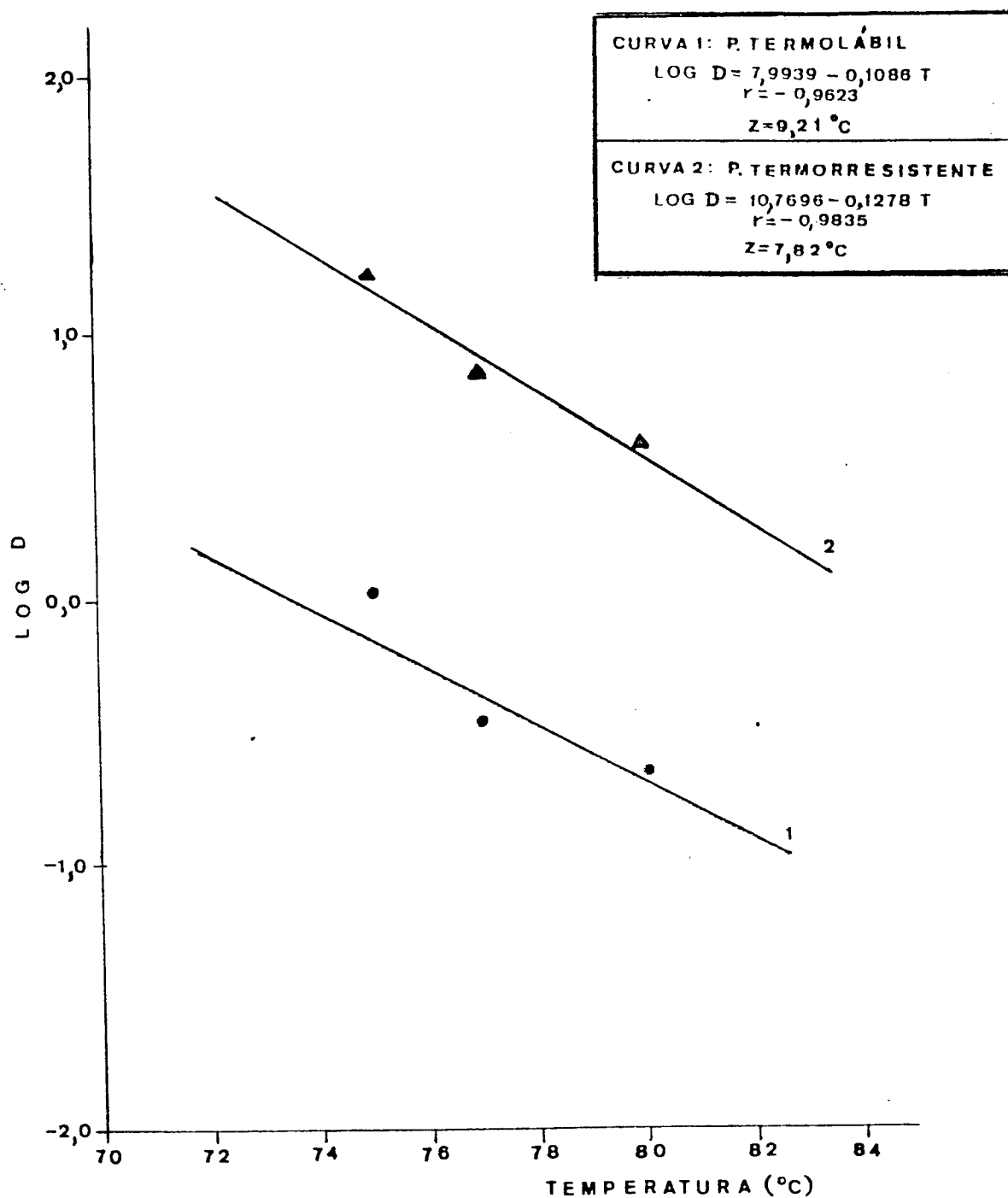


Tabela 11 - Valores de K e E_A das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)

Temperatura do teste (°K)	K (min ⁻¹)		E _A (Kcal/mol)	
	Porção termolábil	Porção termorresistente	Porção termolábil	Porção termorresistente
	(a)	(a)		
350 (75°C)	2,88	0,14		
352 (77°C)	6,50	0,32	61,73	72,71
355 (80°C)	10,31	0,62		

As curvas de inativação térmica da pectinesterase para as três temperaturas apresentaram uma mudança na inclinação, indicando a presença de duas porções, uma termolábil e outra termorresistente. Esses resultados estão de acordo com os reportados por VERSTEEG et alii (1978,1980), WICKER & TEMELLI (1988) e por SEYMOUR et alii (1991b) que ao trabalharem com a pectinesterase extraída do suco e da polpa de laranja, e da polpa branca de Toranja, encontraram mais de uma fração da enzima, com estabilidades térmicas diferentes. VERSTEEG et alii (1978,1980) purificaram três frações da pectinesterase do suco de laranja PE I, PE II e PE de alto peso molecular, sendo esta última a termorresistente,

enquanto WICKER & TEMELLI (1988) encontraram uma fração termolábil e outra termorresistente. De maneira semelhante, SEYMOUR et alii (1991b) encontraram também duas frações na pectinesterase extraída da polpa branca de toranja, sendo uma termolábil e outra termorresistente. No entanto AUNG & ROSS (1965) e NATH & RANGANNA (1981) que trabalharam com mamão, não se referem a presença de mais de uma porção da pectinesterase.

Observando-se os valores de D à 75° e 80°C (13,66 min e 2,77 min) para a fração termorresistente da pectinesterase extraída da polpa branca de toranja encontrados por SEYMOUR et alii (1991a), apesar de ser outra fruta, verificou-se que esses valores estão próximos dos encontrados neste trabalho, para a pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) (16,72 e 3,72 min). O fato dos valores encontrados pelos autores serem menores, pode ser explicado pelo pH mais baixo do suco de toranja (3,3) e também pelo fato da enzima purificada ser mais facilmente inativada pelo calor.

Comparando-se ainda os valores de D à 77°C encontrados por vários autores, verificou-se que o $D_{77^{\circ}\text{C}} = 10,30$ min para a pectinesterase na polpa de mamão acidificada (pH 4,2) encontrados por AUNG & ROSS (1965), não se afasta muito do encontrado no presente trabalho, $D_{77^{\circ}\text{C}} = 7,23$ min para a fração termorresistente da pectinesterase. No entanto NATH & RANGANNA (1981) encontraram valores maiores, $D_{77^{\circ}\text{C}} = 13,97$, min para a pectinesterase da polpa de mamão acidificada (pH 4,0).

No presente trabalho encontrou-se um $Z = 7,82^{\circ}\text{C}$ para a porção termorresistente da pectinesterase, já AUNG & ROSS (1965) en-

contraram um $Z = 6,1^{\circ}\text{C}$, enquanto NATH & RANGANNA (1981) encontraram $Z = 14,8^{\circ}\text{C}$. Baseado nestes resultados, verificou-se que os valores encontrados estão dentro da faixa esperada para polpa de mamão acidificada. Estas diferenças podem ser explicadas devido as diferentes variedades de mamão usadas nos trabalhos.

Outros autores, como VERSTEEG et alii (1980) encontraram valores de Z de $6,5^{\circ}\text{C}$ para PE I e PE alto peso molecular (fração termorresistente) e de 11°C para PE I (fração termolábil) e WICKER & TEMELLI (1988) encontraram um $Z = 10,8^{\circ}\text{C}$ para a fração termolábil e $6,5^{\circ}\text{C}$ para a fração termorresistente. Neste trabalho os valores de Z encontrados para as porções termolábil e termorresistente foram $9,21^{\circ}\text{C}$ e $7,82^{\circ}\text{C}$, respectivamente, não muito afastados dos resultados encontrados por esses autores.

Os valores de energia de ativação encontrados no presente trabalho, para as porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada ($\text{pH}=3,8$), foram 61,73 e 72,71 Kcal/mol, respectivamente, estando portanto dentro da faixa citada por REED (1975) para o processo de inativação térmica de enzimas (40-100 Kcal/mol).

5.3. Ensaio para verificar a influência da concentração de sacarose na cinética de inativação térmica da pectinesterase da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)

Os resultados dos ensaios de inativação térmica da pectinesterase à 75° e 80°C com a polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix, são apresentados nas tabelas 12 a 31 e nas figuras 4 a 9.

Tabela 12 - Resultados do ensaios à 75°C da inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

Lote 1

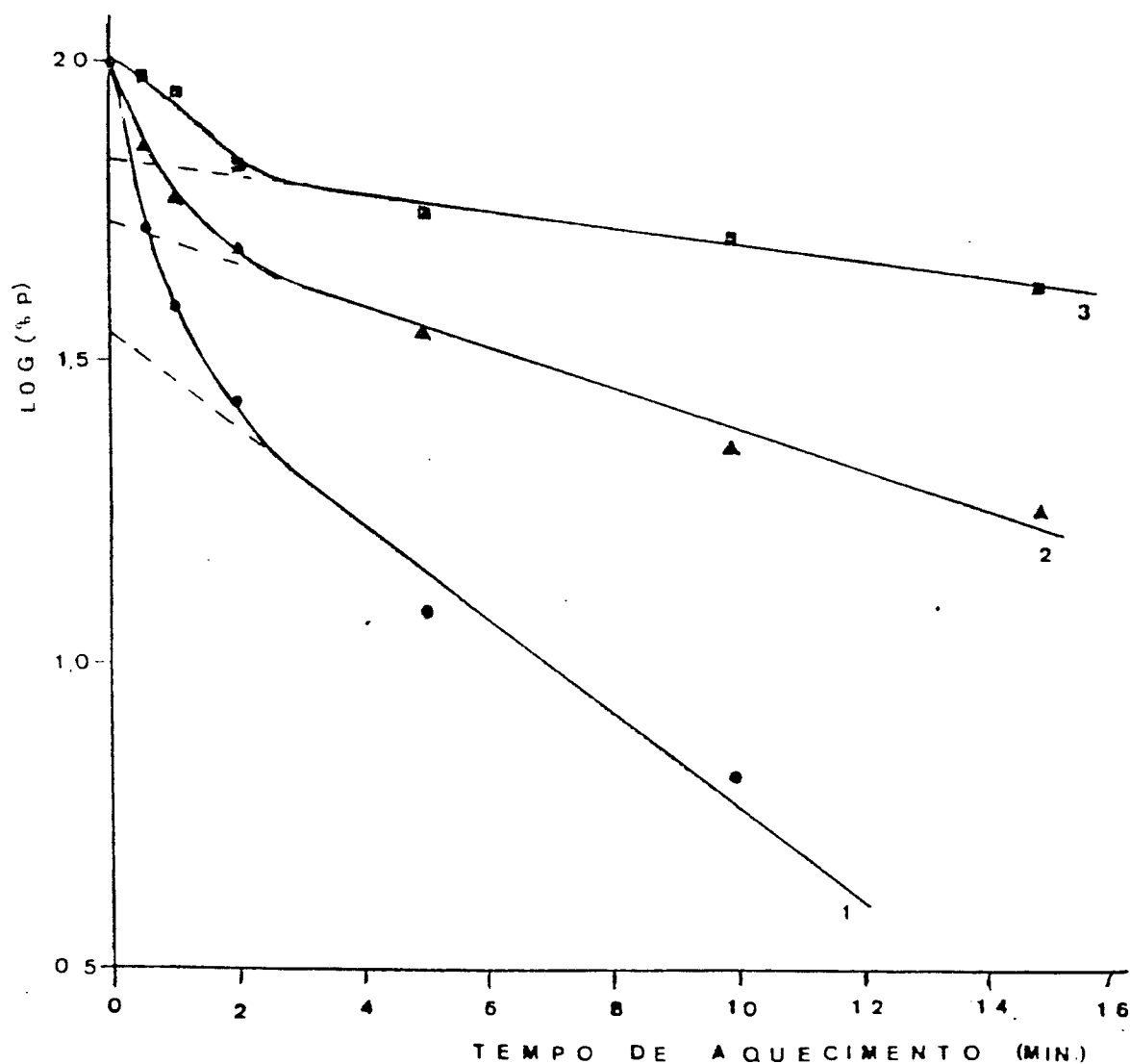
Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (%P)	% inativação da pectinesterase
sem adição de sacarose (11°Brix)	0,0	31,5	100	0
	0,5	16,5	52,4	47,6
	1,0	12,3	38,9	61,1
	2,0	8,5	27,0	73,0
	5,0	3,8	11,9	88,1
	10,0	2,0	6,3	93,7
com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	28,0	100	0
	0,5	20,0	71,4	28,6
	1,0	16,0	57,1	42,9
	2,0	13,5	48,2	48,2
	5,0	10,0	35,7	64,3
	10,0	6,3	22,3	77,7
	15,0	5,0	17,8	82,2
com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	29,0	100	0
	0,5	28,0	96,5	3,5
	1,0	26,0	89,6	10,4
	2,0	19,0	65,5	34,5
	5,0	16,0	55,2	44,8
	10,0	14,5	50,0	50,0
	15,0	12,5	41,4	58,6
(a) Média de 2 amostras				

FIGURA 4 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
DA POLPA DE MAMÃO FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3.0) (a)

$\Delta 75^{\circ}\text{C}$

LÔTE 1

CURVA 1: SEM ADIÇÃO DE SACAROSE (11°B) $D_R = 13,1 \text{ MIN}$ $K_R = 0,18 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 2: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (20°B) $D_R = 29,9 \text{ MIN}$ $K_R = 0,08 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 3: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (30°B) $D_R = 69,7 \text{ MIN}$ $K_R = 0,03 \text{ MIN}^{-1}$



(a) Equações correspondentes ver Tabela 13

Tabela 13 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C

Lote 1

Polpa de			
mamão	Porção termolábil	Porção termorresistente	
"formosa"			
Sem adição	$\log (X_P-A) = 1,8976-1,3505t$	$\log (X_P) = 1,5361 - 0,0766 t$	
de sacarose			
(11°Brix)	$r = -0,9970$	$r = -0,9768$	
Com adição	$\log (X_P-A)=1,7661-1,2054 t$	$\log (X_P) = 1,7251 - 0,0335 t$	
de sacarose			
(20°Brix)	$r = -0,9965$	$r = - 0,9867$	
Com adição	$\log (X_P-A)=1,5243-0,5709 t$	$\log (X_P) = 1,8330 - 0,0143 t$	
de sacarose			
(30°Brix)	$r = -0,9249$	$r = -0,9853$	

Tabela 14 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 1

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,74	3,11	13,1	0,18
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,83	2,77	29,9	0,08
Com adição de sacarose até 30°Brix	1,75	1,31	69,7	0,03

Tabela 15 - Resultados do ensaio à 75°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

Lote 2

Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (%P)	% inativação da pectinesterase
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,0	34,0	100	0
	0,5	15,5	45,6	54,4
	1,0	11,3	33,1	66,9
	2,0	7,5	21,9	78,1
	5,0	5,5	16,2	83,8
	10,0	3,8	11,0	89,0
	15,0	2,3	6,6	93,4
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	32,0	100	0
	0,5	22,5	70,3	29,7
	1,0	19,0	59,4	40,6
	2,0	16,8	52,3	47,7
	5,0	12,5	39,1	60,9
	10,0	9,5	29,7	70,3
	15,0	6,8	21,1	78,9
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	31,0	100	0
	0,5	29,0	93,5	6,5
	1,0	27,0	87,1	12,9
	2,0	24,0	77,4	16,2
	5,0	21,0	67,7	32,3
	10,0	19,0	61,3	38,7
	15,0	16,5	53,2	46,8

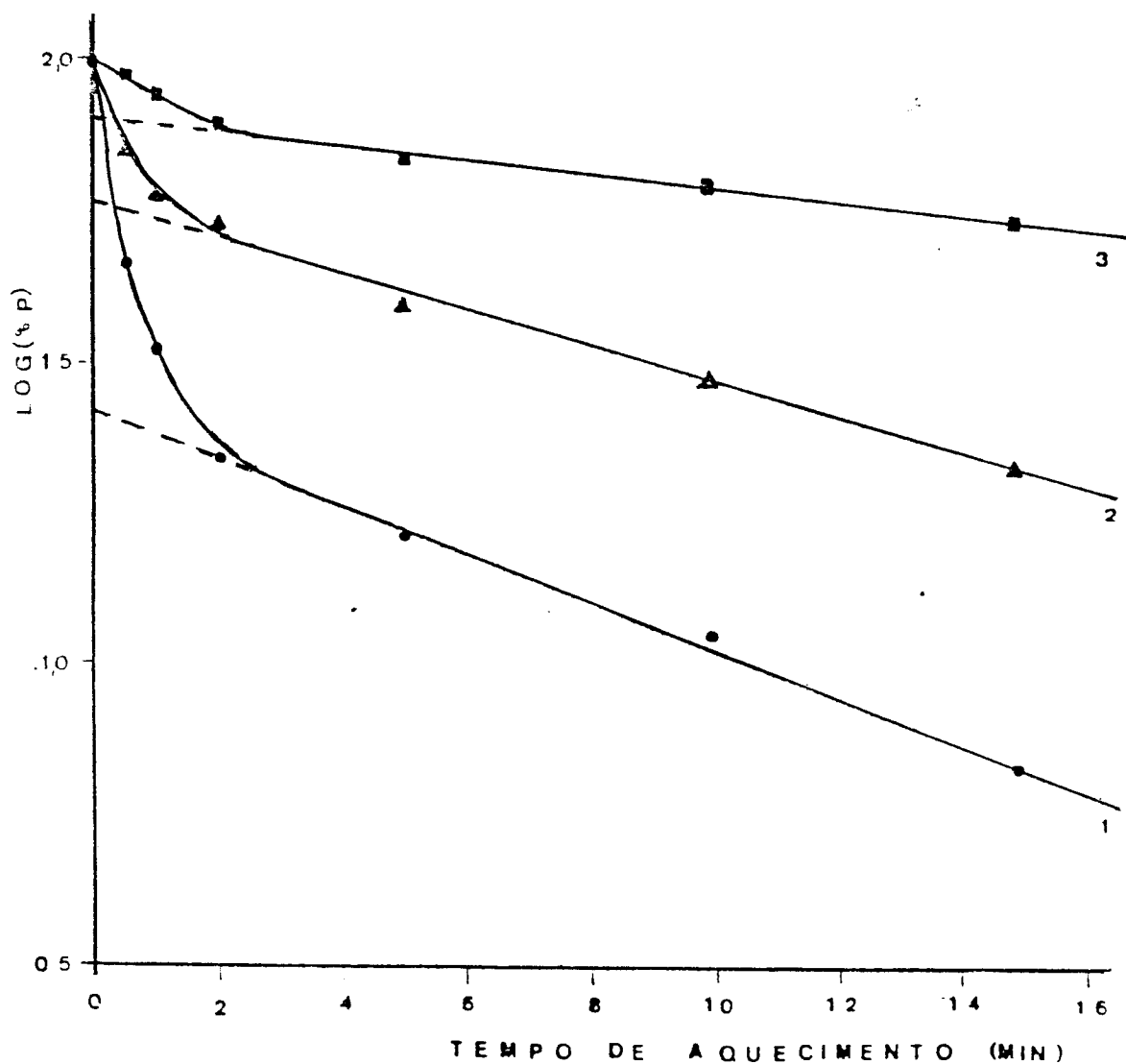
(a) Média de 2 amostras

FIGURA 5 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
DA POLPA DE MAMÃO FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3,2) (a)

λ 75°C

LOTE 2

CURVA 1: SEM ADIÇÃO DE SACAROSE (11°B)
$D_R = 25,4 \text{ MIN}$ $K_R = 0,09 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 2: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (20°B)
$D_R = 34,1 \text{ MIN}$ $K_R = 0,07 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 3: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (30°B)
$D_R = 83,9 \text{ MIN}$ $K_R = 0,03 \text{ MIN}^{-1}$



(a) Equações correspondentes ver Tabela 16

Tabela 16 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C.

Lote 2

Polpa de			
mamão	Porção termolábil	Porção termorresistente	
"formosa"			

Sem adição	$\log (XP-A)=1,9305-1,2448 t$	$\log (XP) = 1,4180 - 0,0394 t$	
de sacarose			
(11 ⁰ Brix)	$r = -0,9951$	$r = -0,9984$	

Com adição	$\log (XP-A)=1,6074-1,2036 t$	$\log (XP) = 1,7613 - 0,0293 t$	
de sacarose			
(20 ⁰ Brix)	$r = -0,9926$	$r = -0,9953$	

Com adição	$\log (XP-A)=1,1987-0,4993 t$	$\log (XP) = 1,9036 - 0,0119 t$	
de sacarose			
(30 ⁰ Brix)	$r = -0,9418$	$r = -0,9904$	

Tabela 17 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 2

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,80	2,87	25,4	0,09
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,83	2,77	34,1	0,07
Com adição de sacarose até 30°Brix	2,00	1,15	83,9	0,03

Tabela 18 - Resultados do ensaio à 75°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

Lote 3

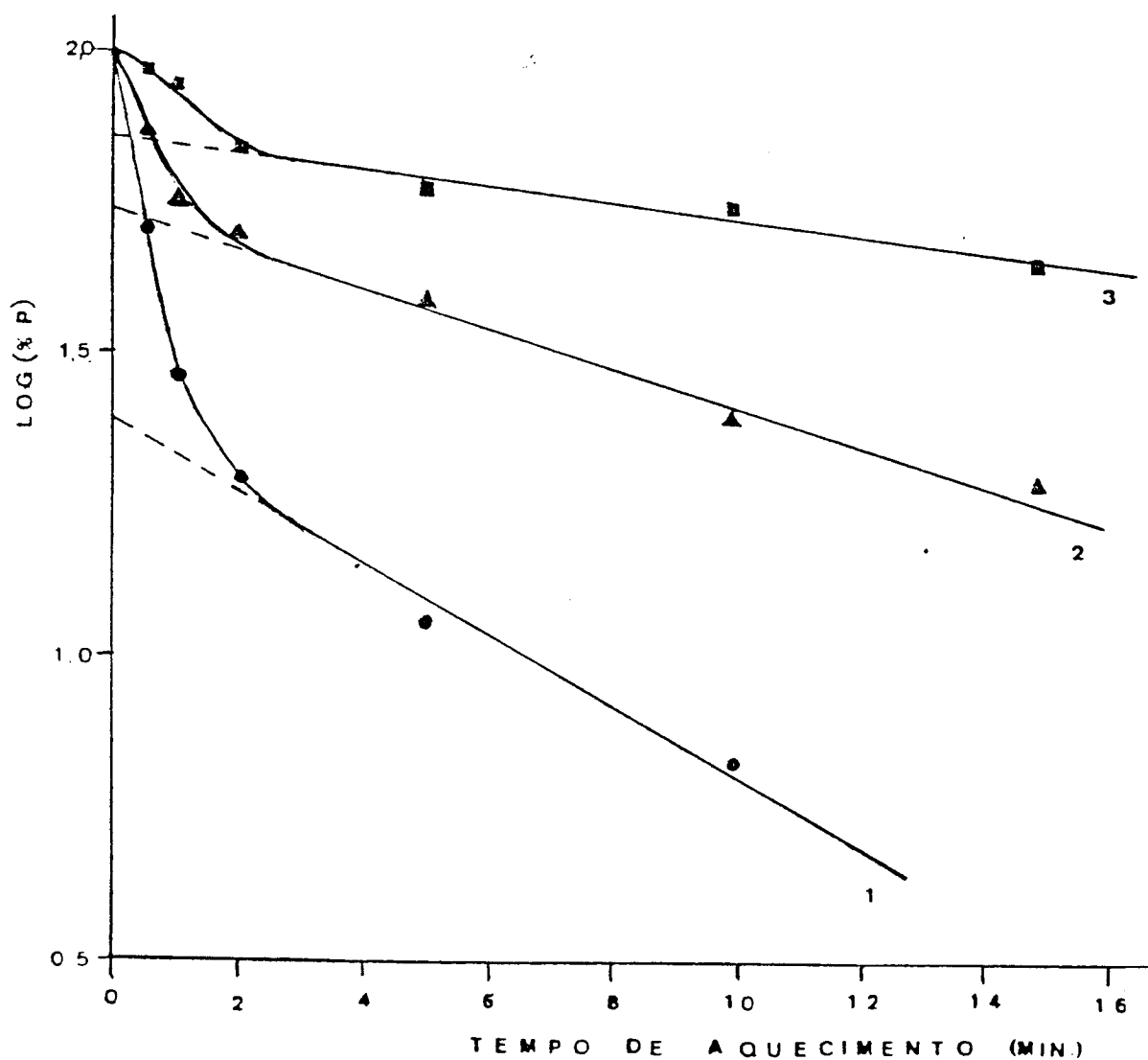
Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (%P)	% inativação da pectinesterase
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,0	30,5	100	0
	0,5	15,8	51,6	48,4
	1,0	9,0	29,5	70,5
	2,0	6,0	19,7	80,3
	5,0	3,5	11,5	88,5
	10,0	2,0	6,6	93,4
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	28,5	100	0
	0,5	21,0	73,7	26,3
	1,0	16,0	56,1	43,9
	2,0	14,3	50,0	50,0
	5,0	10,5	38,8	63,2
	10,0	7,3	25,4	74,6
	15,0	5,5	19,3	80,7
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	26,0	100	0
	0,5	24,5	94,2	5,8
	1,0	23,0	88,5	11,5
	2,0	18,0	69,2	30,8
	5,0	15,5	59,6	40,4
	10,0	14,5	55,8	44,2
	15,0	11,8	45,2	54,8
(a) Média de 2 amostras				

FIGURA 6 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
DA POLPA DE LARANJA FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3,8) (a)

λ 75 °C

LOTE 3

CURVA 1: SEM ADIÇÃO DE SACAROSE (11°B) $D_R = 17,2 \text{ MIN}$ $K_R = 0,13 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 2: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (20°B) $D_R = 31,8 \text{ MIN}$ $K_R = 0,07 \text{ MIN}^{-1}$
CURVA 3: COM ADIÇÃO DE SACAROSE (30°B) $D_R = 76,0 \text{ MIN}$ $K_R = 0,03 \text{ MIN}^{-1}$



(a) Equações correspondentes ver Tabela 19

Tabela 19 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°C.

Lote 3

Polpa de			
mamão	Porção termolábil	Porção termorresistente	
"formosa"			

Sem adição	$\log(\%P-A)=1,9764-1,3049 t$	$\log \%P = 1,3882 - 0,0582 t$	
de sacarose			
(11°Brix)	$r = -0,9967$	$r = -0,9910$	

Com adição	$\log(\%P-A)=1,6472-1,2376 t$	$\log(\%P) = 1,7405 - 0,0315 t$	
de sacarose			
(20°Brix)	$r = -0,9691$	$r = -0,9924$	

Com adição	$\log(\%P-A)=1,4137-0,5507 t$	$\log (\%P) = 1,8594 - 0,0131 t$	
de sacarose			
(30°Brix)	$r = -0,9199$	$r = -0,9778$	

Tabela 20 - Valores de D e K à 75°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 3

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,77	3,00	17,2	0,13
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,81	2,85	31,8	0,07
Com adição de sacarose até 30°Brix	1,82	1,27	76,3	0,03

Tabela 21 - Resultados do ensaio à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

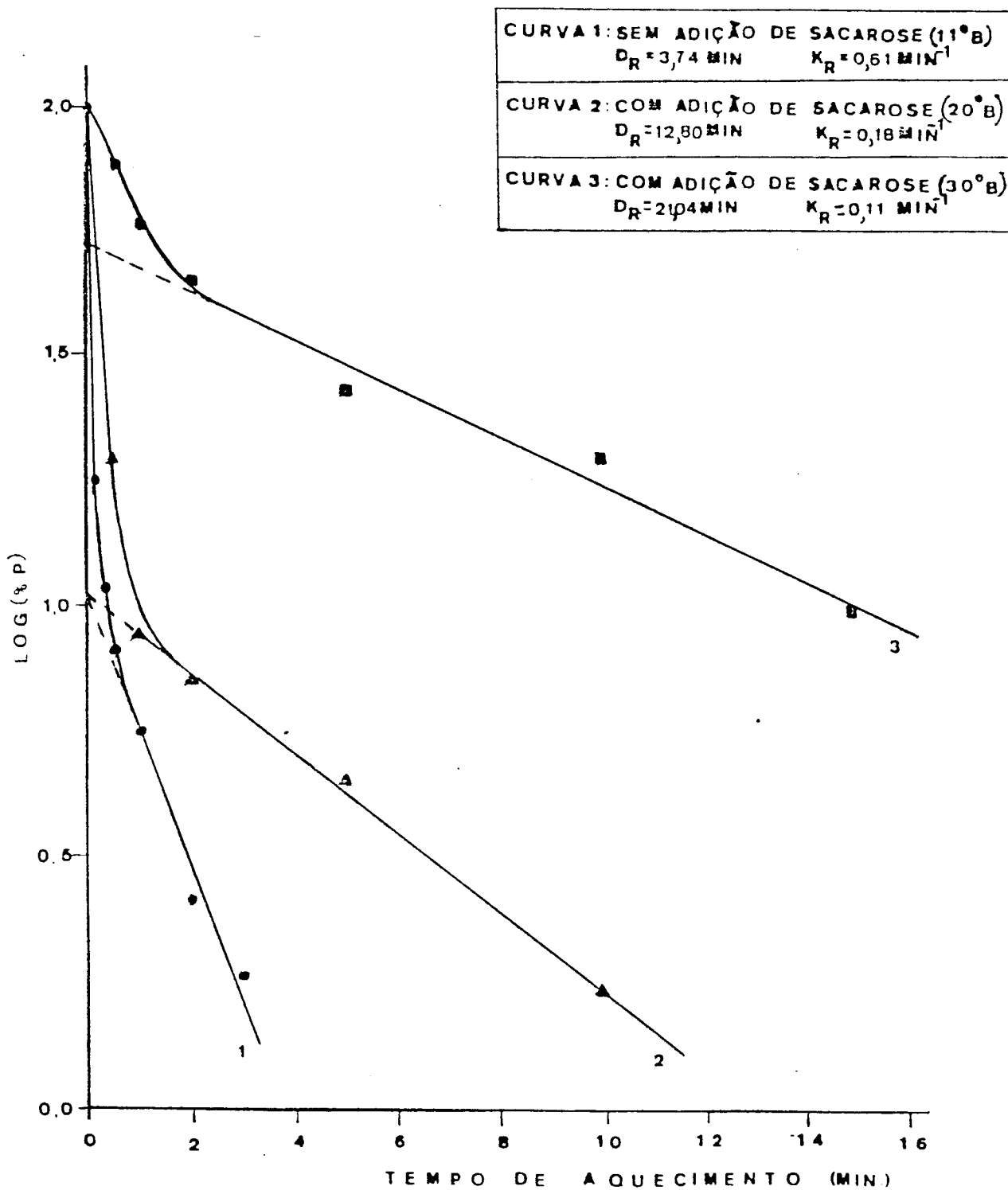
Lote 1

Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (XP)	% inativação da pectinesterase
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,00	33,5	100	0
	0,15	5,95	17,8	82,2
	0,30	3,55	10,6	89,4
	0,50	2,70	8,1	91,9
	1,00	1,85	5,5	94,5
	2,00	0,85	2,5	97,5
	3,00	0,60	1,8	98,2
	5,00	0,0	0,0	100
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	28,5	100	0
	0,5	5,5	19,3	80,7
	1,0	2,5	8,8	91,2
	2,0	2,0	7,0	93,0
	5,0	1,3	4,4	95,6
	10,0	0,5	1,7	98,3
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	28,0	100	0
	0,5	21,0	75,0	25,0
	1,0	16,3	57,1	42,9
	2,0	12,5	44,6	55,4
	5,0	7,5	26,8	73,2
	10,0	5,5	19,6	80,4
	15,0	2,8	9,8	90,2
a - Média de duas amostras				

FIGURA 7 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
DA POLPA DE MAMÃO FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3.3)(a)

λ 80°C

LOTE 1



(a) Equações correspondentes ver Tabela 22

Tabela 22 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 80°C.

Lote 1

Polpa de			
mamão	Porção termolábil	Porção termorresistente	
"formosa"			
Sem adição	$\log(\%P-A) = 1,6543 - 4,7691 t$	$\log(\%P) = 1,0094 - 0,2670 t$	
de sacarose			
(11°Brix)	$r = -0,9071$	$r = -0,9828$	
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,9777 - 2,1591 t$	$\log(\%P) = 1,0175 - 0,0781 t$	
de sacarose			
(20°Brix)	$r = -0,9917$	$r = -0,9980$	
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,8583 - 1,3270 t$	$\log(\%P) = 1,7204 - 0,0475 t$	
de sacarose			
(30°Brix)	$r = -0,9891$	$r = -0,9866$	

Tabela 23 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 1

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,21	10,98	3,74	0,62
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,46	4,97	12,80	0,18
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,75	3,06	21,04	0,11

Tabela 24 - Resultados do ensaio à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

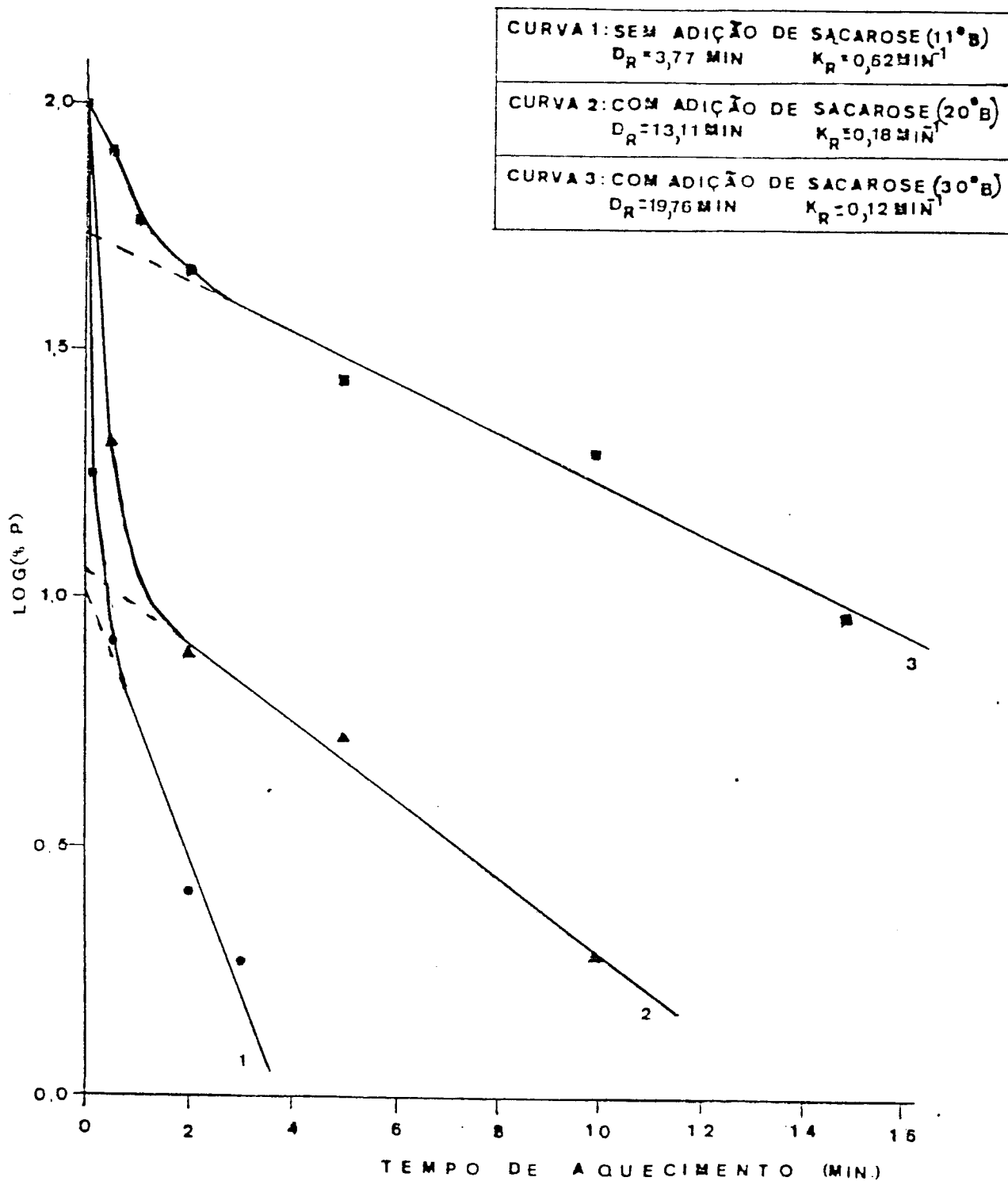
Lote 2

Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (XP)	% inativação da pectinesterase
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,00	42,5	100	0
	0,15	7,45	17,5	82,5
	0,30	4,45	10,5	89,5
	0,50	3,40	8,0	92,0
	1,00	2,35	5,5	94,5
	2,00	1,05	2,5	97,5
	3,00	0,75	1,8	98,2
	5,00	0,0	0,0	100
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	28,5	100	0
	0,5	5,5	19,3	80,7
	1,0	2,5	8,8	91,2
	2,0	2,0	7,0	93,0
	5,0	1,3	4,4	95,6
	10,0	0,5	1,7	98,3
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	28,0	100	0
	0,5	21,0	75,0	25,0
	1,0	16,3	57,1	42,9
	2,0	12,5	44,6	55,4
	5,0	7,5	26,8	73,2
	10,0	5,5	19,6	80,4
	15,0	2,8	9,8	90,2
a - Média de duas amostras				

FIGURA 8 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
DA POLPA DE MAMÃO 'FORMOSA' ACIDIFICADA (pH 3.8) (a)

λ 80°C

LOTE 2



(a) Equações correspondentes ver Tabela 25

Tabela 25 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 80°C.

Lote 2

Polpa de		
maçã	Porção termolábil	Porção termorresistente
"formosa"		
Sem adição	$\log(\%P-A) = 1,6499-4,7626 t$	$\log(\%P) = 1,0054 - 0,2653 t$
de sacarose		
(11°Brix)	$r = -0,9066$	$r = -0,9832$
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,9829-2,2102 t$	$\log(\%P) = 1,0544 - 0,0763 t$
de sacarose		
(20°Brix)	$r = -0,9985$	$r = -0,9968$
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,8109-1,3844 t$	$\log(\%P) = 1,7457 - 0,0506 t$
de sacarose		
(30°Brix)	$r = -0,9873$	$r = -0,9872$

Tabela 26 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 2

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,21	10,97	3,77	0,62
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,45	5,09	13,11	0,18
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,72	3,19	19,76	0,12

Tabela 27 - Resultados do ensaio à 80°C de inativação térmica da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix

Lote 3

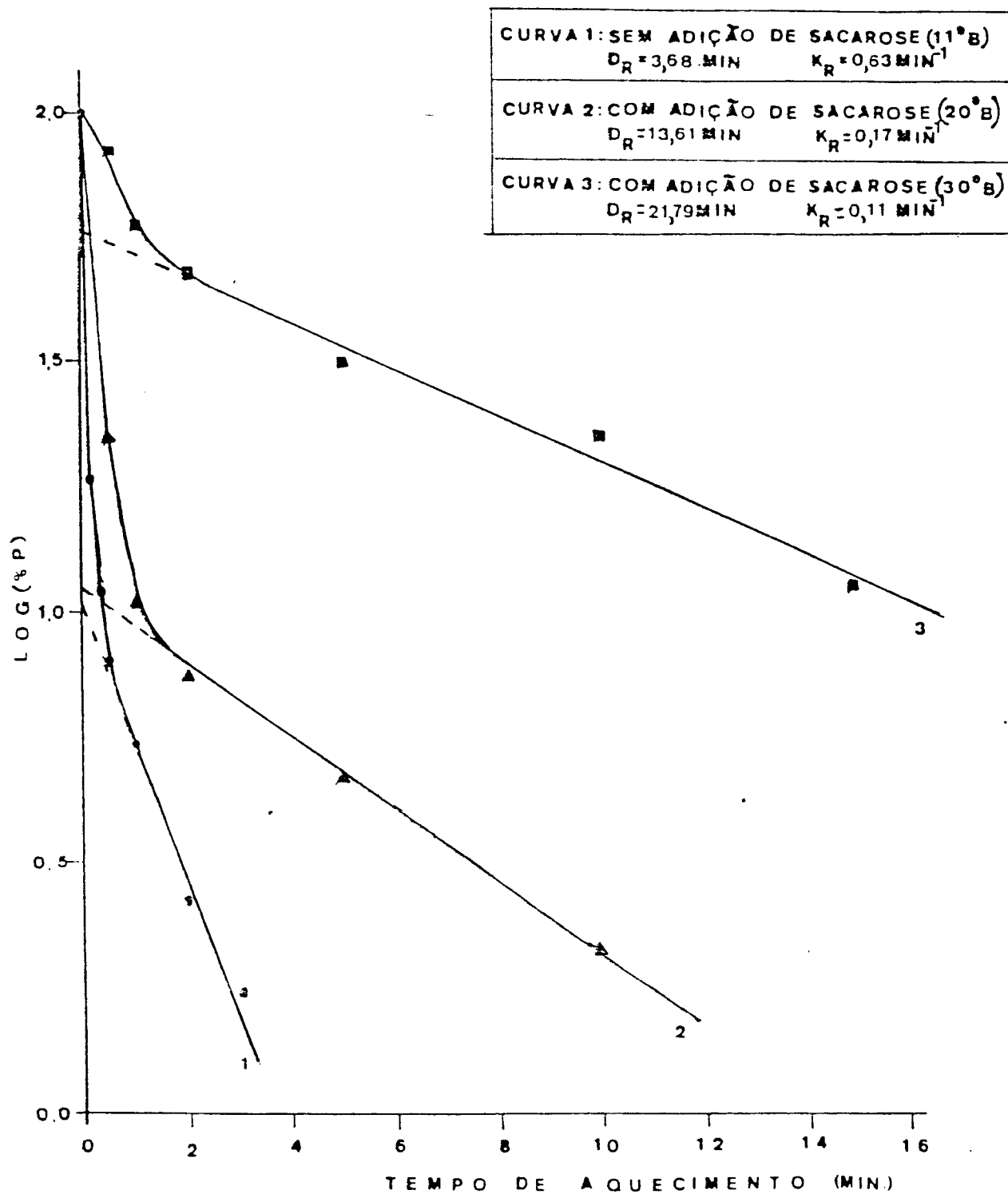
Polpa do mamão "formosa"	Tempo de aquecimento (min)	Atividade da pectinesterase após o aquecimento (P) (PEu x 10 ⁴ /ml)(a)	% atividade de pectinesterase remanescente (XP)	% inativação da pectinesterase
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,00	32,5	100	0
	0,15	5,80	17,8	82,2
	0,30	3,50	10,8	89,2
	0,50	2,60	8,0	92,0
	1,00	1,80	5,4	94,6
	2,00	0,85	2,6	97,4
	3,00	0,55	1,7	98,3
	5,00	0,0	0,0	100
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,0	28,5	100	0
	0,5	5,5	19,3	80,7
	1,0	2,5	8,8	91,2
	2,0	2,0	7,0	93,0
	5,0	1,3	4,4	95,6
	10,0	0,5	1,7	98,3
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,0	28,0	100	0
	0,5	21,0	75,0	25,0
	1,0	16,3	57,1	42,9
	2,0	12,5	44,6	55,4
	5,0	7,5	26,8	73,2
	10,0	5,5	19,6	80,4
	15,0	2,8	9,8	90,2

(a) - Média de duas amostras

FIGURA 9 - CURVAS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PECTINESTERASE
NA POLPA DE MAMÃO FORMOSA ACIDIFICADA (pH 3,0)(a)

80 °C

LOTE 3



(a) Equações correspondentes ver Tabela 28

Tabela 28 - Equações das curvas de inativação térmica da pectinesterase à 80°C.

Lote 3

Polpa de			
mação	Porção termolábil	Porção termorresistente	
"formosa"			
Sem adição	$\log(\%P-A) = 1,6773 - 4,7717 t$	$\log(\%P) = 1,0123 - 0,2718 t$	
de sacarose			
(11°Brix)	$r = -0,9290$	$r = -0,9914$	
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,9742 - 1,9850 t$	$\log(\%P) = 1,0463 - 0,0735 t$	
de sacarose			
(20°Brix)	$r = -0,9990$	$r = -0,9952$	
Com adição	$\log(\%P-A) = 1,7474 - 1,4060 t$	$\log(\%P) = 1,7597 - 0,9459 t$	
de sacarose			
(30°Brix)	$r = -0,9737$	$r = -0,9899$	

Tabela 29 - Valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix.

Lote 3

Polpa de mamão "formosa"	Porção termolábil		Porção termorresistente	
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,21	10,99	3,68	0,63
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,50	4,57	13,61	0,17
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,71	3,24	21,79	0,11

Tabela 31 - Comparação dos valores de D e K à 80°C das porções termolábil e termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão formosa acidificada (pH 3,8) sem adição de sacarose e com adição de sacarose até 20° e 30°Brix, em 3 lotes diferentes

Polpa de mamão "formosa"	Porção Termolábil			Porção Termorresistente		
	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)	D (min)	K (min ⁻¹)
	lote 1	lote 2	lote 3	lote 1	lote 2	lote 3
Sem adição de sacarose (11°Brix)	0,21	0,21	0,21	10,97	10,99	3,74
					3,77	3,68
					0,62	0,61
						0,63
Com adição de sacarose até 20°Brix	0,46	0,45	0,50	4,97	5,09	4,57
					12,80	13,11
					13,61	0,18
						0,17
Com adição de sacarose até 30°Brix	0,75	0,72	0,71	3,06	3,19	3,24
					21,04	19,76
					21,79	0,11
						1,12
						0,11

Apesar da adição de sacarose à polpa de mamão "formosa" ter retardado a gelatinização, verificou-se que em todos os ensaios de inativação térmica da pectinesterase, a polpa de mamão com maior concentração de sacarose apresentou uma maior resistência térmica a inativação. Esta adição causou um aumento nos tempos de redução decimal em média de três vezes para a polpa com 20° Brix e de cinco vezes para a polpa com 30° Brix. Isto mostra que realmente a sacarose atua como um agente protetor da enzima contra o calor. Portanto, optou-se pelo preparo da polpa com seu conteúdo natural de açúcares. Nestes testes de inativação térmica confirmou-se também a presença de duas porções da pectinesterase, uma termolábil e outra termorresistente.

Os resultados confirmam os obtidos por LEVI et alii (1985) que no branqueamento de pedaços de mamão usando a água em ebulição verificou que a pectinesterase era quase totalmente inativada, enquanto que, no branqueamento usando xarope de sacarose em ebulição, observava-se ainda uma alta atividade da pectinesterase, indicando um possível efeito protetor do açúcar contra o calor.

ARAKAWA & TIMASHEFF, 1981, e BACK et alii, 1979 atribuem este efeito protetor ao aumento de forças hidrofóbicas que dificultam a inativação da enzima, auxiliando-a a manter sua configuração nativa. No entanto, não é conhecido como a sacarose atua nessas forças hidrofóbicas.

LEE & TIMASHEFF (1981) estudaram a cinética de desnaturação térmica de proteínas (α -quimotripsina, quimotripsogênio, ribonuclease) encontrando que a uma dada temperatura o K_f é uma função

da concentração de sacarose, decrescendo com o aumento da mesma. E os ensaios de inativação térmica da pectinesterase do presente trabalho confirmam esses resultados. Para uma dada temperatura o tempo de redução decimal ($D = \frac{2,303}{K_f}$) varia com a concentração de sacarose adicionada a polpa de mamão "formosa", aumentando com o aumento da concentração da mesma.

Verificou-se ainda, que a variação/lote dos valores de D foram maiores nos ensaios à 75°C do que à 80°C.

5.4. - Determinação da cinética de destruição térmica do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão acidificada (pH = 3,8)

Os resultados do número de sobreviventes são apresentados na Tabela 32 e as curvas de sobreviventes (log N versus tempo de aquecimento) são apresentadas na figura 10. Baseado nessas curvas foi estabelecido o valor D.

Baseado nos valores dos tempos de redução decimal (D) e da constante de velocidade de destruição térmica (K) para as temperaturas de 75°, 77° e 80°C, encontrou-se o valor do coeficiente térmico (Z) e a energia da ativação (E_A) do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) (tabela 33). A curva "fantasma" de destruição térmica (log D versus temperatura) é apresentada na figura 11.

Tabela 32 - Resultados dos ensaios de destruição térmica do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) à 75^o, 77^o e 80^oC

Temperatura do teste (°C)	Tempo de aquecimento (min)	Contagem do número de sobre- vivos (NMP de esporos/ml)(a)	D(min)
75°C	0,0	$7,9 \times 10^4$	9,68
	5,0	$9,2 \times 10^4$	
	10,0	$2,4 \times 10^4$	
	15,0	$9,2 \times 10^3$	
	20,0	$2,4 \times 10^3$	
77°C	0,0	$4,6 \times 10^4$	7,08
	2,0	$7,9 \times 10^4$	
	5,0	$2,8 \times 10^4$	
	10,0	$3,0 \times 10^3$	
	15,0	$1,4 \times 10^3$	
80°C	0,0	$9,3 \times 10^4$	2,69
	1,0	$2,4 \times 10^4$	
	2,0	$1,1 \times 10^4$	
	5,0	$1,1 \times 10^3$	
	10,0	$4,6 \times 10^2$	

FIGURA 10. **CURVAS DE SOBREVIVENTES DO**
CL. PASTEURIANUM NA POLPA DE MAMÃO
'FORMOSA' ACIDIFICADA (pH 3,8)

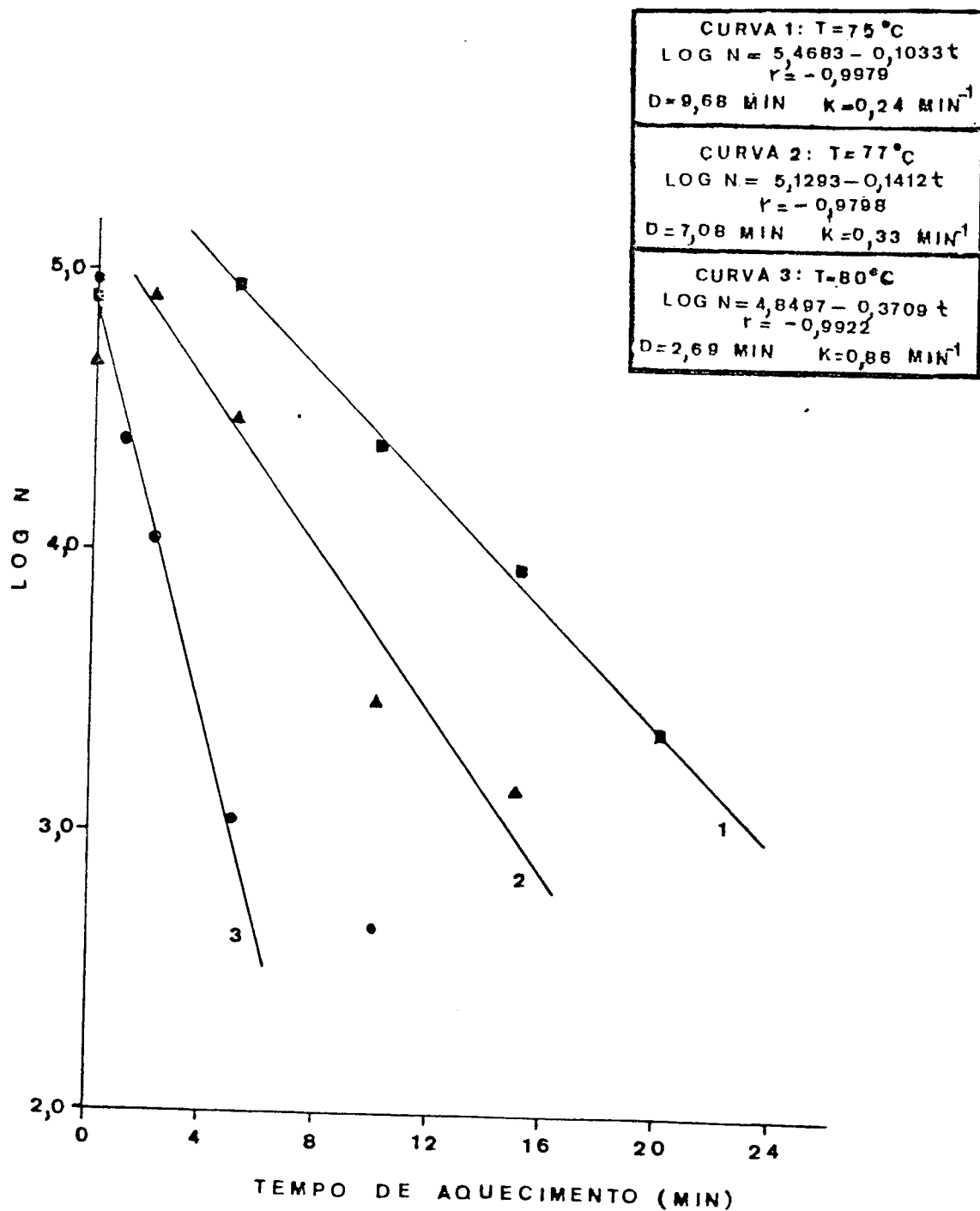


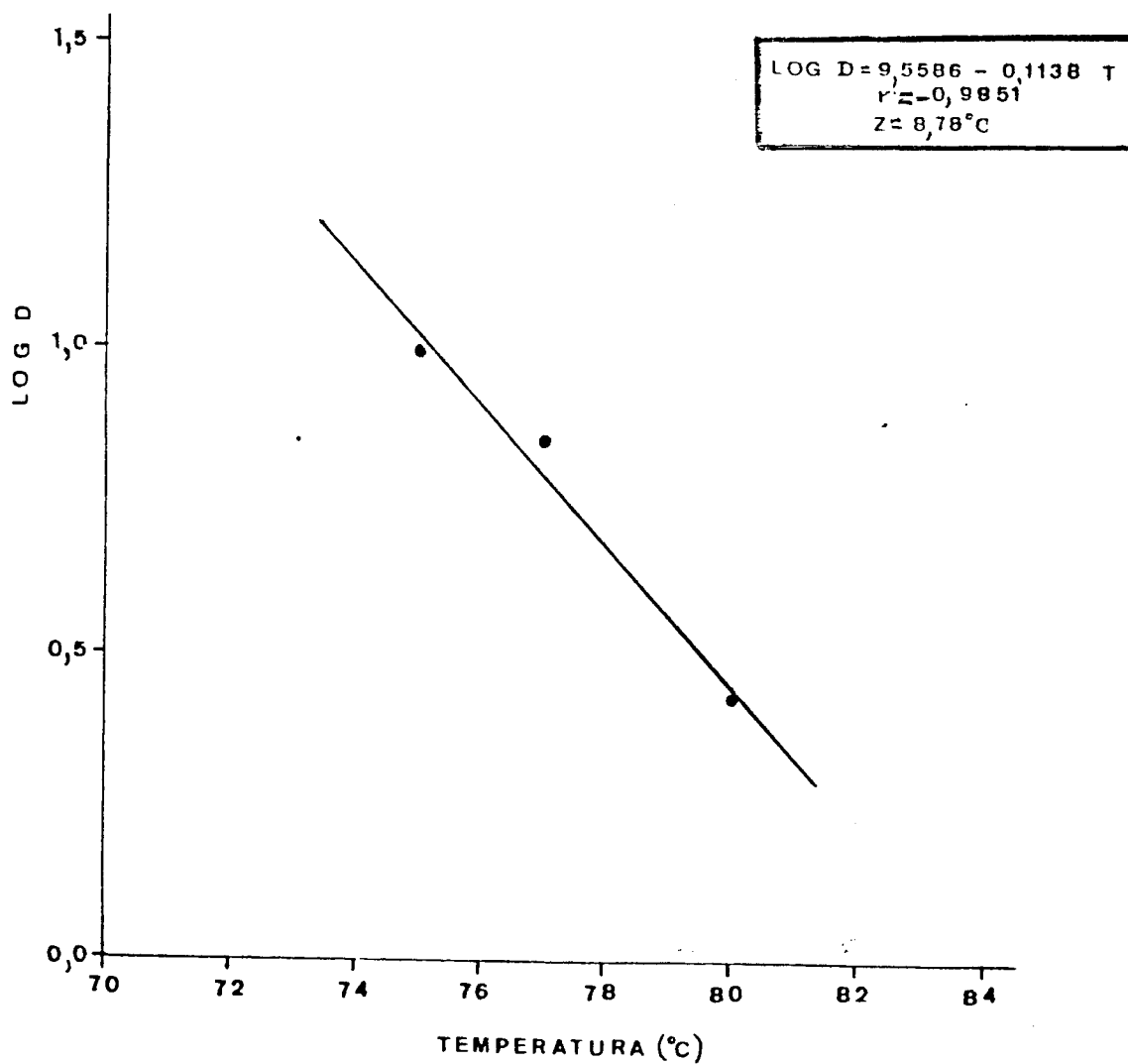
Tabela 33 - Valores de D, Z, K e E_A do *Cl. Pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)

Temperatura				
do	D (min)	Z (°C)	K (min ⁻¹)	E _a (Kcal/mol)
teste				
(°C)				
75°(350°K)	9,69		0,24	
				64,75
77°(352°K)	7,08	8,78	0,33	
80°(355°K)	2,68		0,86	

As equações das curvas de sobreviventes apresentaram uma boa correlação (0,9979 - 0,9798) indicando que a destruição térmica do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) segue uma cinética de 1ª ordem.

Na literatura revisada foi encontrado apenas o valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ (0,1 - 0,5 min) do *Cl. pasteurianum* em tampão fosfato pH - 7,0. Este valor é aproximadamente dez vezes maior do encontrado para o *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), $D_{100^{\circ}\text{C}} = 0,013$ min. Essa grande diferença pode ser devida ao meio ácido que facilita a destruição térmica do *Cl. pasteurianum* (STUMBO, 1973).

FIGURA 11- CURVA 'FANTASMA' DE DESTRUIÇÃO
TÉRMICA DO CL. PASTEURIANUM NA POL-
PA DE MAMÃO 'FORMOSA' ACIDIFICA-
DA (pH 3,8)



O valor do coeficiente térmico ($Z = 8,78^{\circ}\text{C}$) encontrado no presente trabalho é semelhante ao reportado por NATH & RANGANNA (1980) em polpa de manga ($Z = 8,62^{\circ}\text{C}$) e em soro de tomate ($Z = 7,9^{\circ}\text{C}$). O valor de esterilização $F_{100^{\circ}\text{C}}^{8,8^{\circ}\text{C}}$ necessário para causar seis reduções decimais na população do *Cl. pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) foi de 0,08 min. Já NATH & RANGANNA (1980) encontraram para polpa de manga um valor de esterilização $F_{100^{\circ}\text{C}}^{8,6^{\circ}\text{C}} = 0,26$ min e para soro de tomate $F_{100^{\circ}\text{C}}^{7,9^{\circ}\text{C}} = 0,33$ min. No entanto, não foi encontrada na literatura revisada, o valor de esterilização para a destruição do *Cl. pasteurianum*, na polpa de mamão.

Compararam-se os valores de D à 75° , 77° e 80°C e o valor Z para o *Cl. pasteurianum* e a porção termorresistente da pectinesterase, na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), que são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 - Valores de D à 75° , 77° e 80°C e o valor de Z do *Cl. pasteurianum* e da porção termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8)

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	D (min)		Z ($^{\circ}\text{C}$)	
	<i>Cl. pasteurianum</i>	Pectinesterase P. termorresistente	<i>Cl. pasteurianum</i>	Pectinesterase P. termorresistente
75°	9,69	16,72		
77°	7,08	7,23	8,72	7,82
80°	2,68	3,72		

Os valores de D da porção termorresistente, as temperaturas estudadas, se apresentam maiores do que o D do *CI. pasteurianum*, indicando que a enzima é mais termorresistente do que este microrganismo. Dessa maneira podemos usar a fração termorresistente da pectinesterase como indicador do nosso processo térmico como foi feito por NATH & RANGANNA (1981).

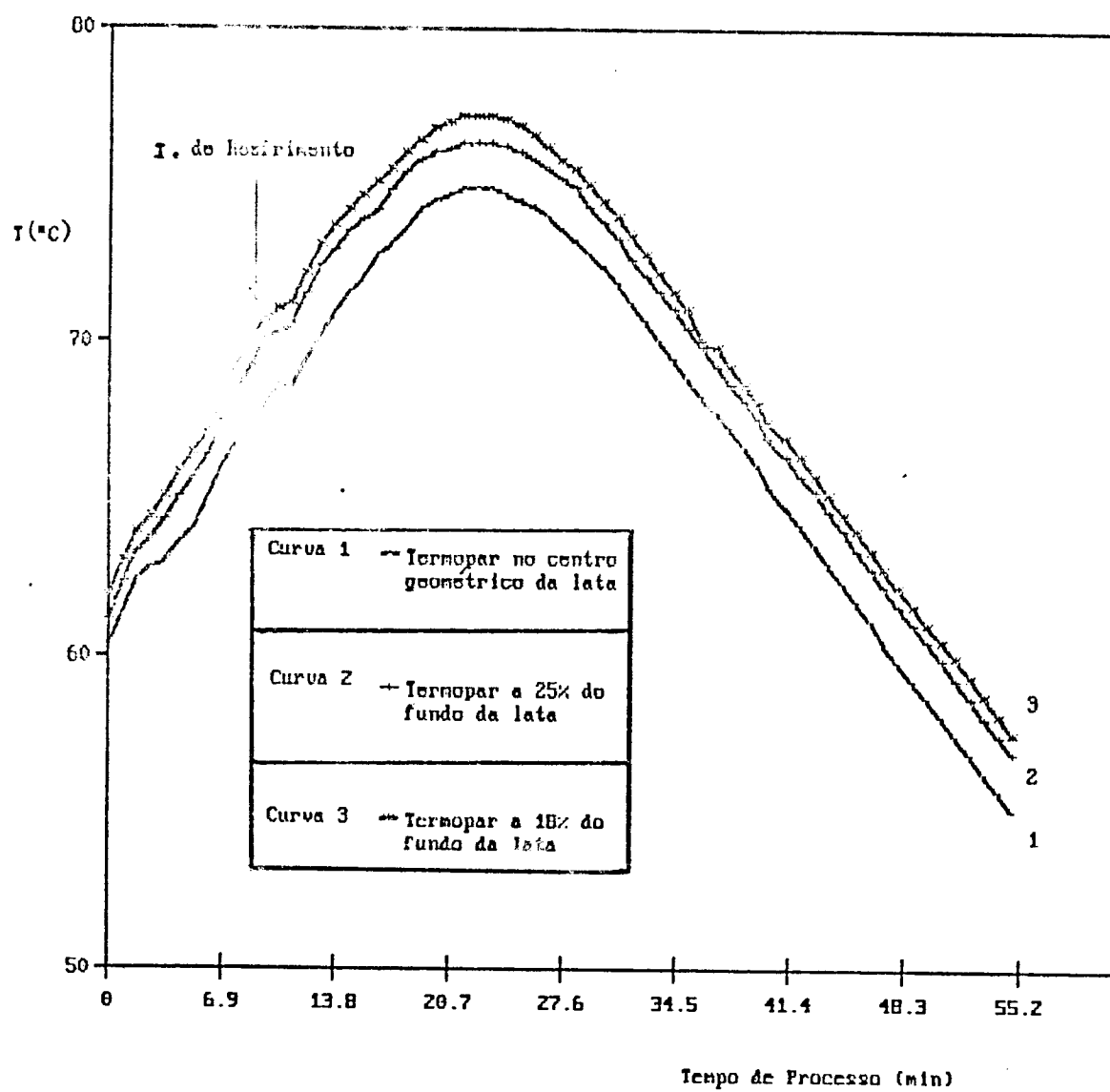
5.5. Testes de processamento na planta piloto

5.5.1. Determinação do ponto frio da lata

Os perfis de temperatura em função do tempo para as latas com termopares no centro geométrico, a 25% e 18% do fundo da mesma, são apresentados na figura 12. Baseado nesses perfis verificou-se que as latas com termopares no centro geométrico são as que apresentam uma penetração de calor mais lenta. Portanto, o centro geométrico da lata é considerado o ponto frio da mesma.

Este resultado é compatível com os dados da literatura (LUND, 1975; MUCCILOLO, 1985; REICHERT, 1988) que consideram o ponto frio da lata, para alimentos aquecidos por condução como é o caso da polpa de mamão "formosa", como sendo o centro geométrico da lata.

FIGURA 12. PERFIL DE TEMPERATURA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8)



5.5.2. Cálculo do tempo de processo

Os perfis de temperatura em função do tempo para as latas com polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) aquecidas por 10, 15 e 20 minutos são apresentados na figura 13. Nesta mesma figura são apresentados os valores de taxa de inativação da pectinesterase em função do tempo. Os valores de pasteurização (F_p) aplicado ao produto, calculados pelo método geral, usando-se a regra de integração de Simpson, são apresentados na tabela 35

Tabela 35 - Valores de F_p para os tempos de aquecimentos de 10, 15 e 20 minutos em banho de água à 97°C e temperatura de enchimento de 60°C

F_p (minutos a 77°C)	Tempo de aquecimento em banho de água à 97°C (min)
8,14	10
16,67	15
24,37	20

FIGURA 13. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM TEMPOS DE AQUECIMENTO DE 10, 15 E 20 MIN. EM TANQUE DE ÁGUA ABERTO À 97° C

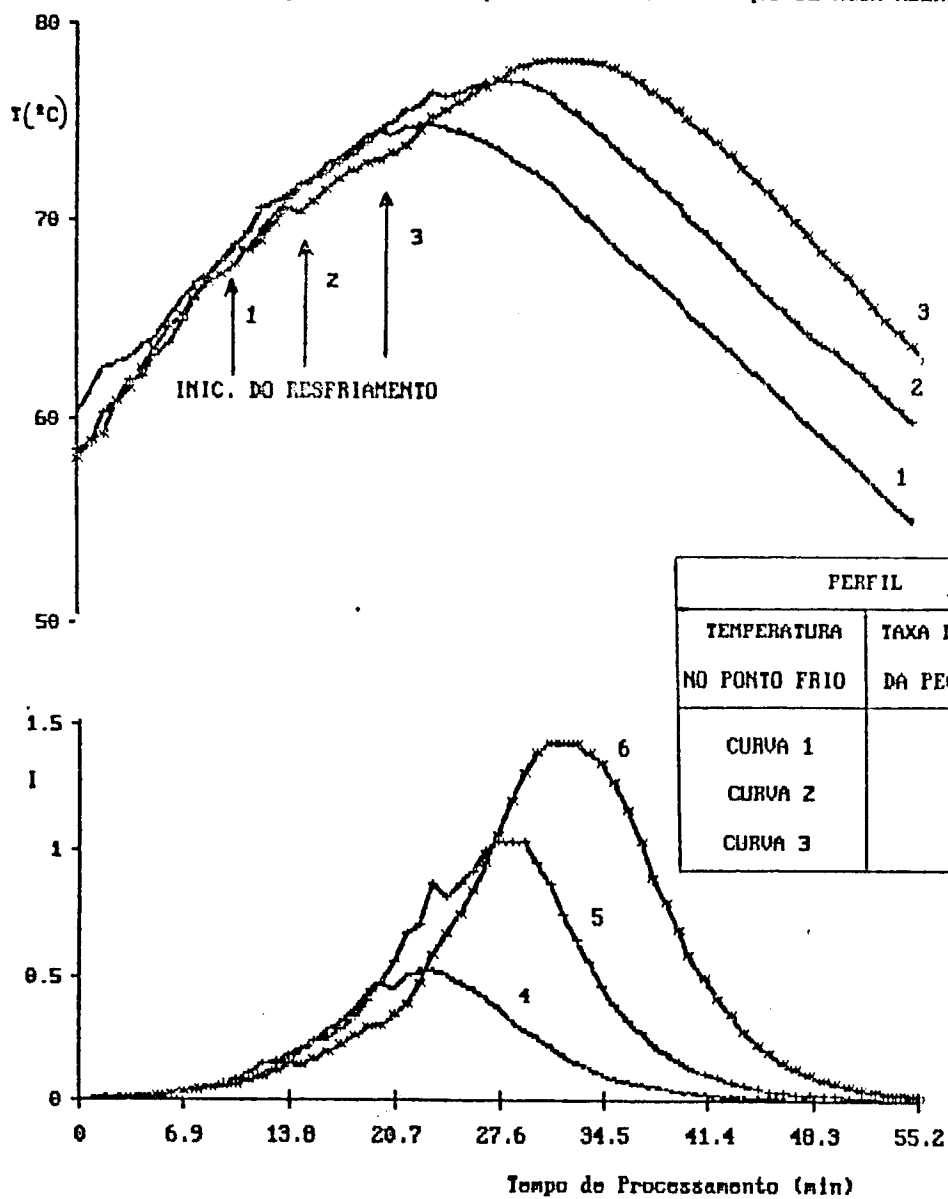
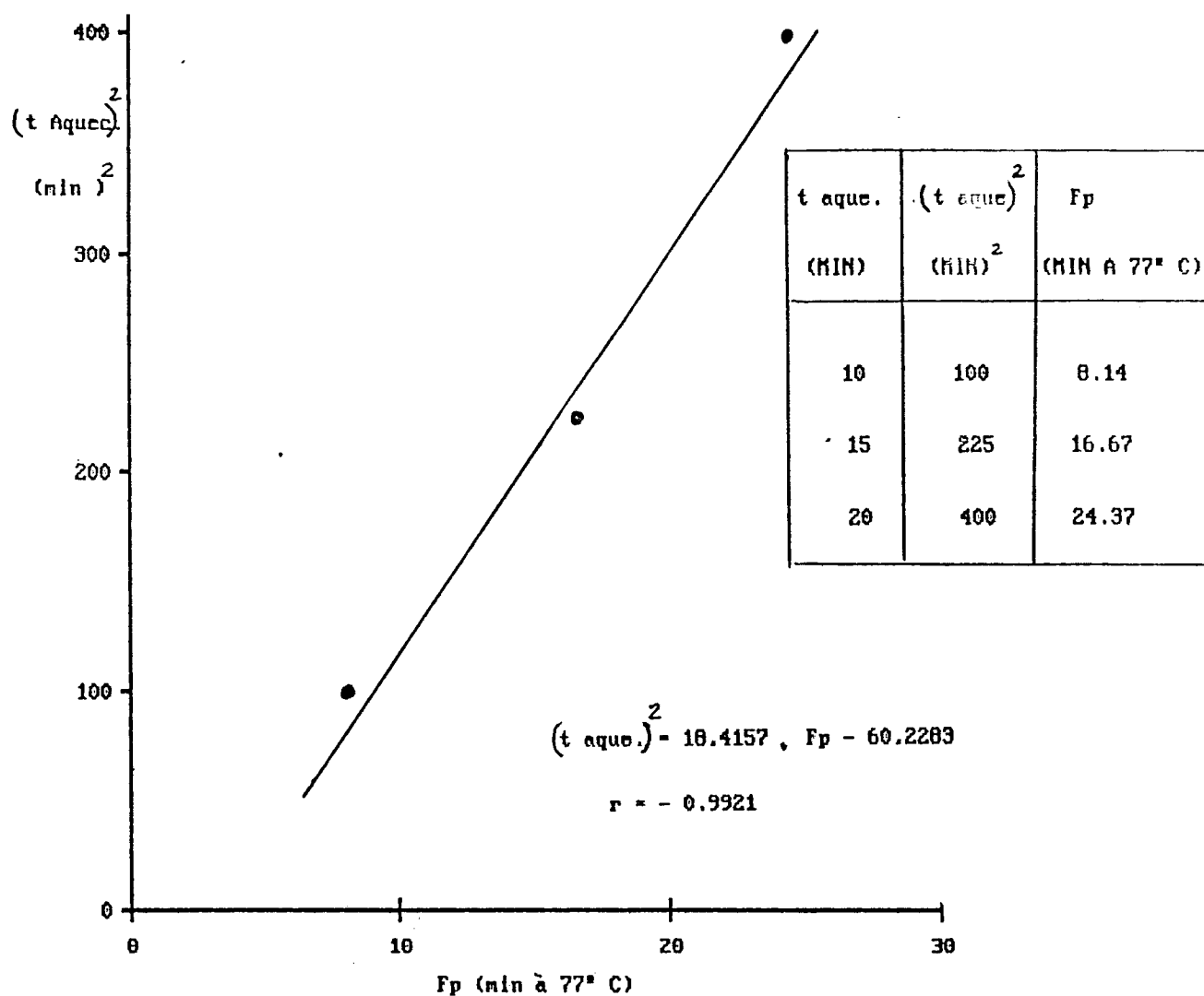


FIGURA 14 - $(\text{TEMPO DE AQUECIMENTO})^2$ VERSUS
O VALOR DE PASTEURIZAÇÃO BASEADO
NA INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE.



Através da relação empírica de SHIGA (1976) encontrou-se um tempo de aquecimento de 12,9 minutos que corresponde a um $F_{77^{\circ}\text{C}}^{7,9^{\circ}\text{C}} = 12,30$ minutos; equivalente a 1,7 reduções decimais da porção termorresistente da pectinesterase, que causa 98% de inativação.

5.6. Ensaio de segurança microbiológica

5.6.1. Ensaio de processamento com o tempo de processo requerido

Os resultados dos ensaios de processamento térmico (perfil de temperatura e taxa de inativação da pectinesterase versus tempo) da polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) com tempo de aquecimento de 12,9 minutos, são apresentados nas figuras 15 a 32. Os valores de F_p calculados pelo método geral, usando-se a regra de SIMPSON, são apresentados na tabela 36.

Tabela 36 - Valores de F_p com tempo de aquecimento de 12,9 min em banho de água à 97°C e temperatura de enchimento de 60°C
(min à 77°C)

Ensaio	1	2	3
Lata			
1	12,62	12,51	12,39
2	12,58	12,62	12,61
3	12,40	12,64	12,58
4	12,61	12,70	12,24
5	12,53	12,33	12,71
6	12,75	12,61	12,55

FIGURA 15. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 01

LATA: 01

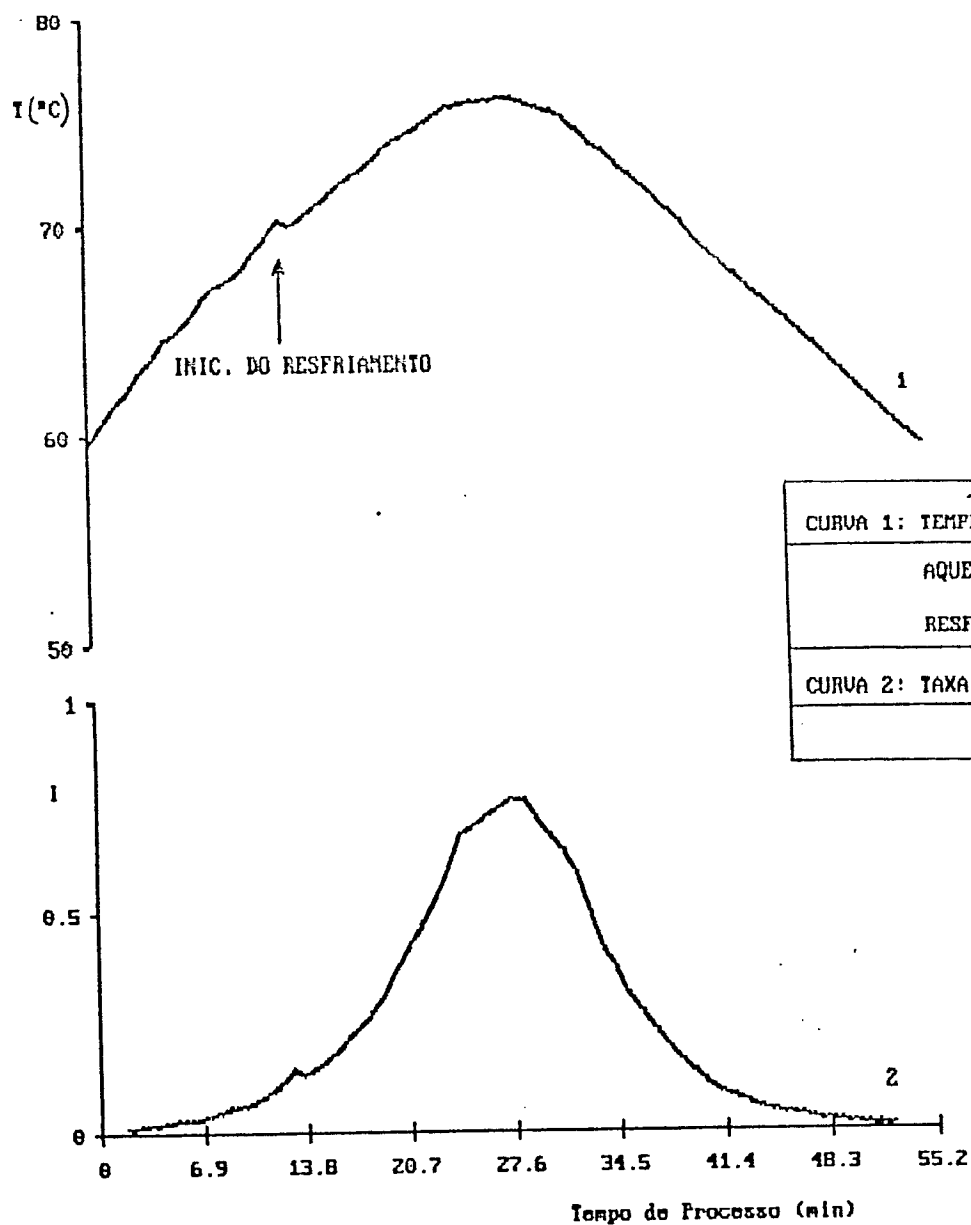


FIGURA 16. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

ENSAIO: 01

LATA: 02

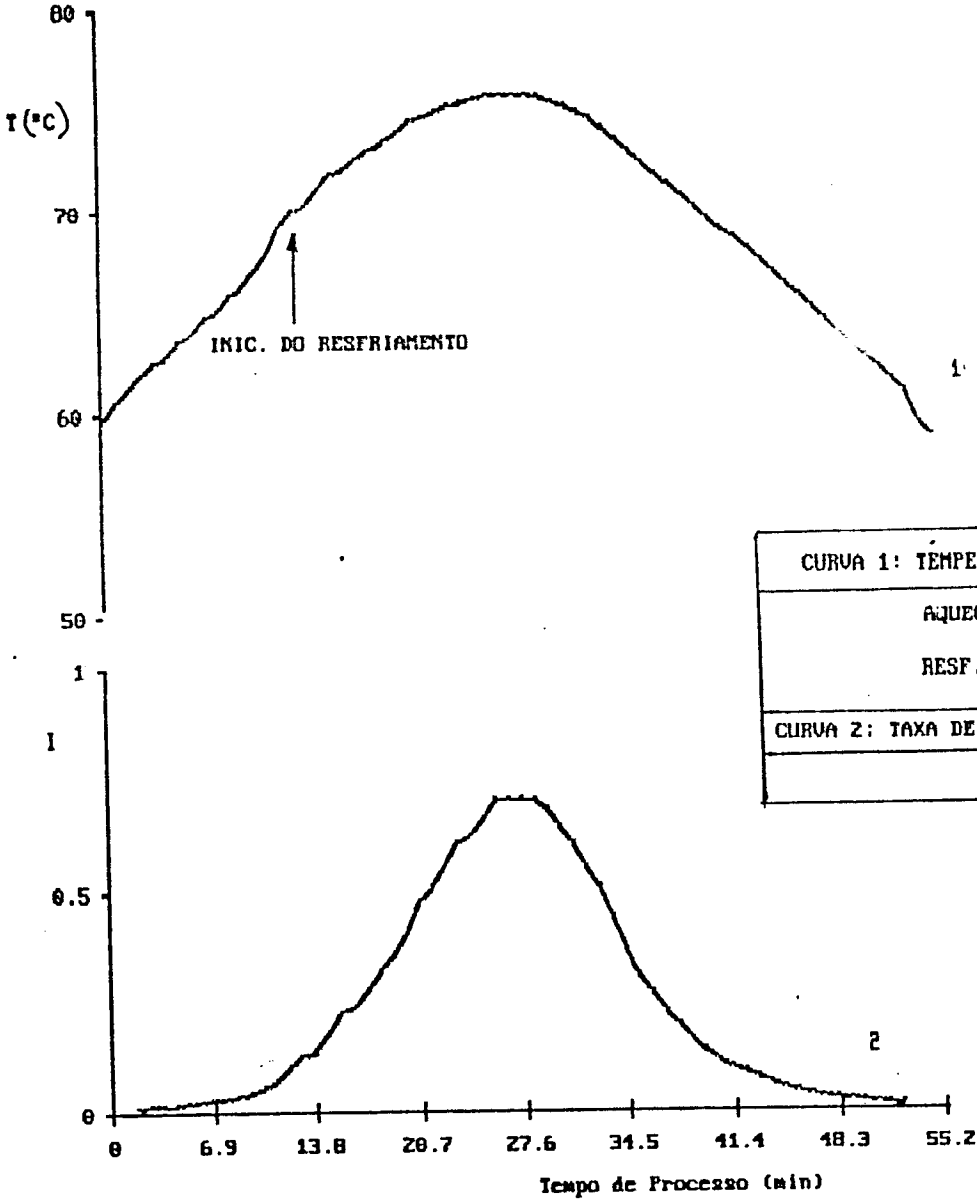


FIGURA 17. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

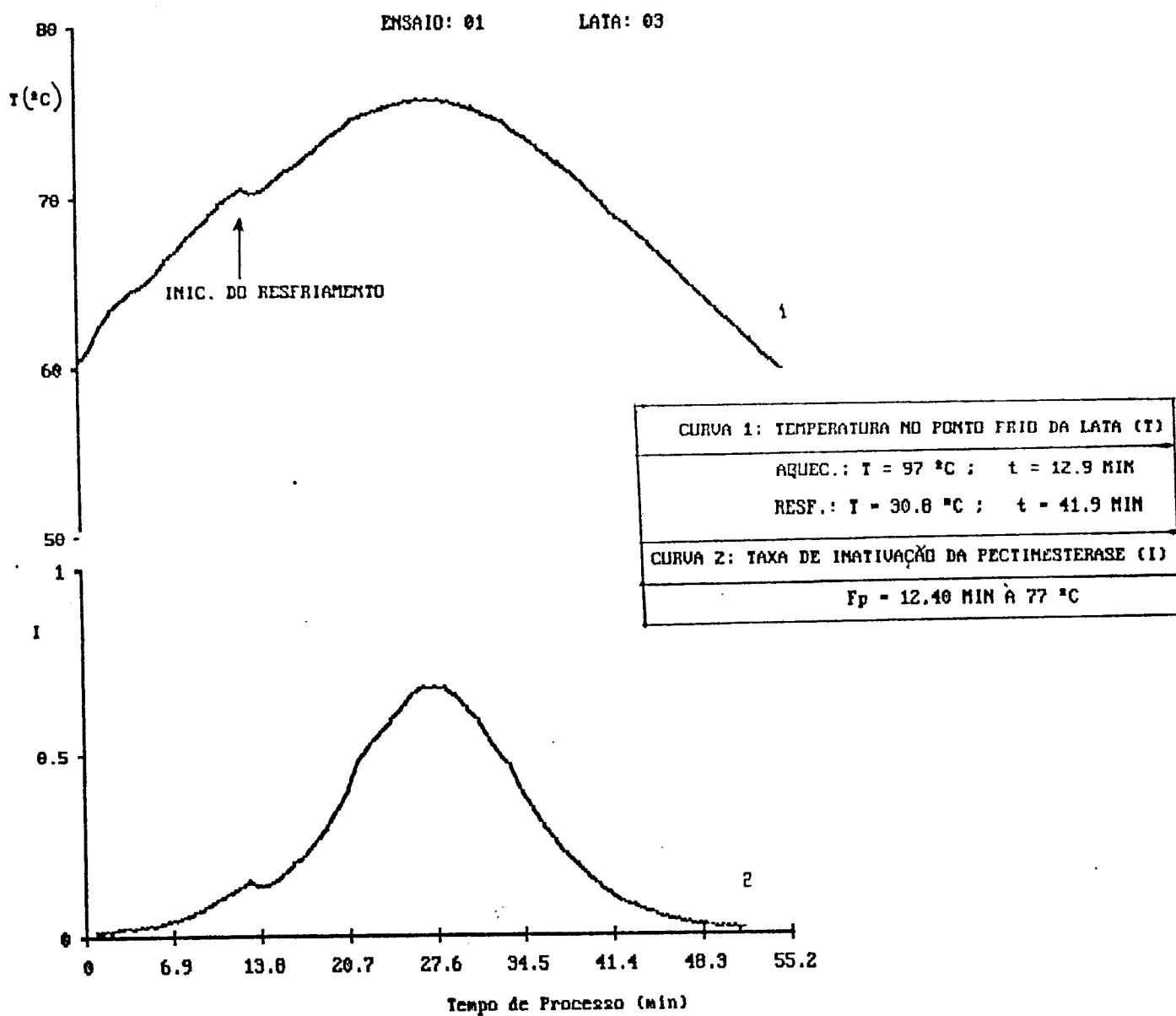


FIGURA 18. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

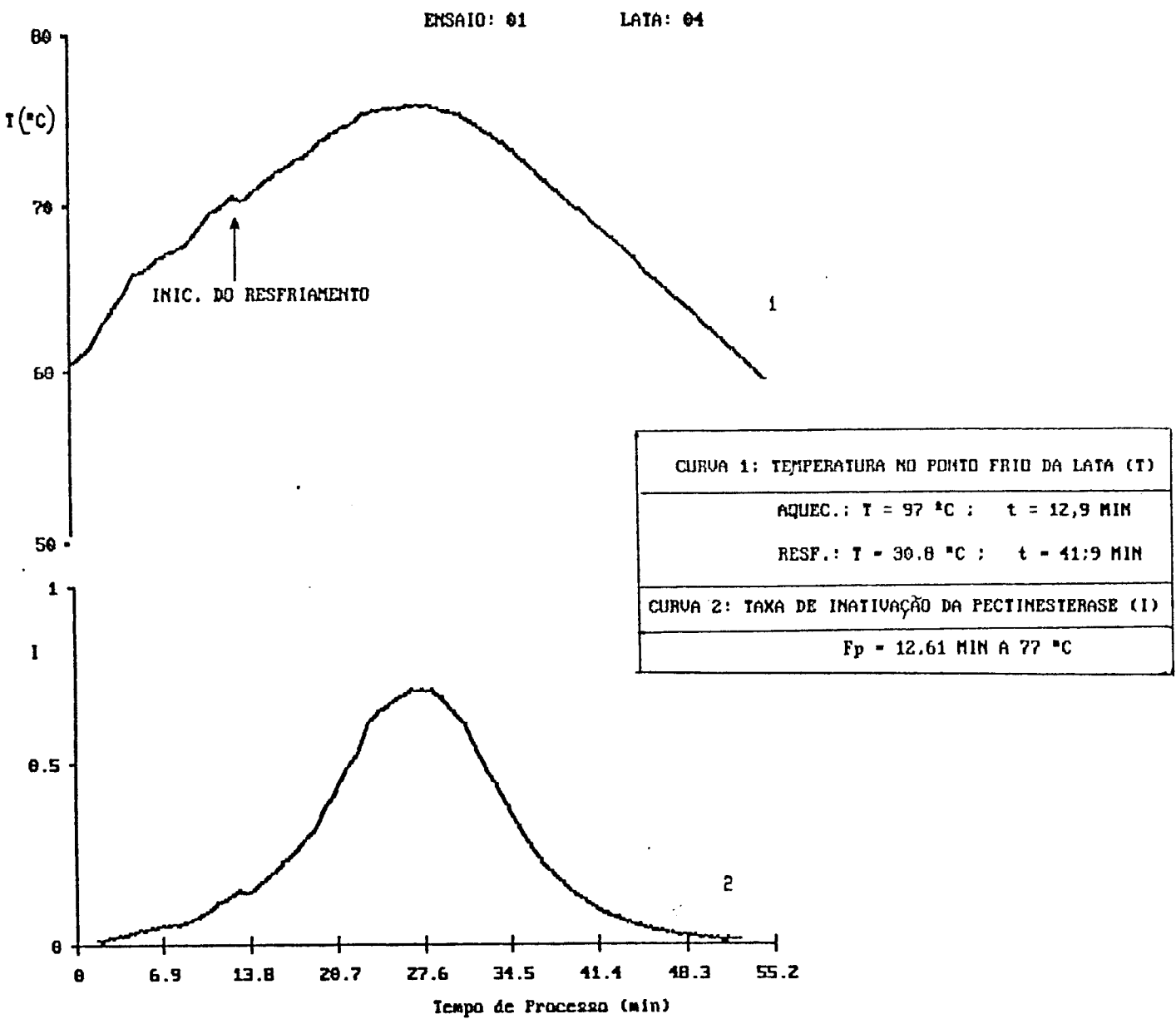
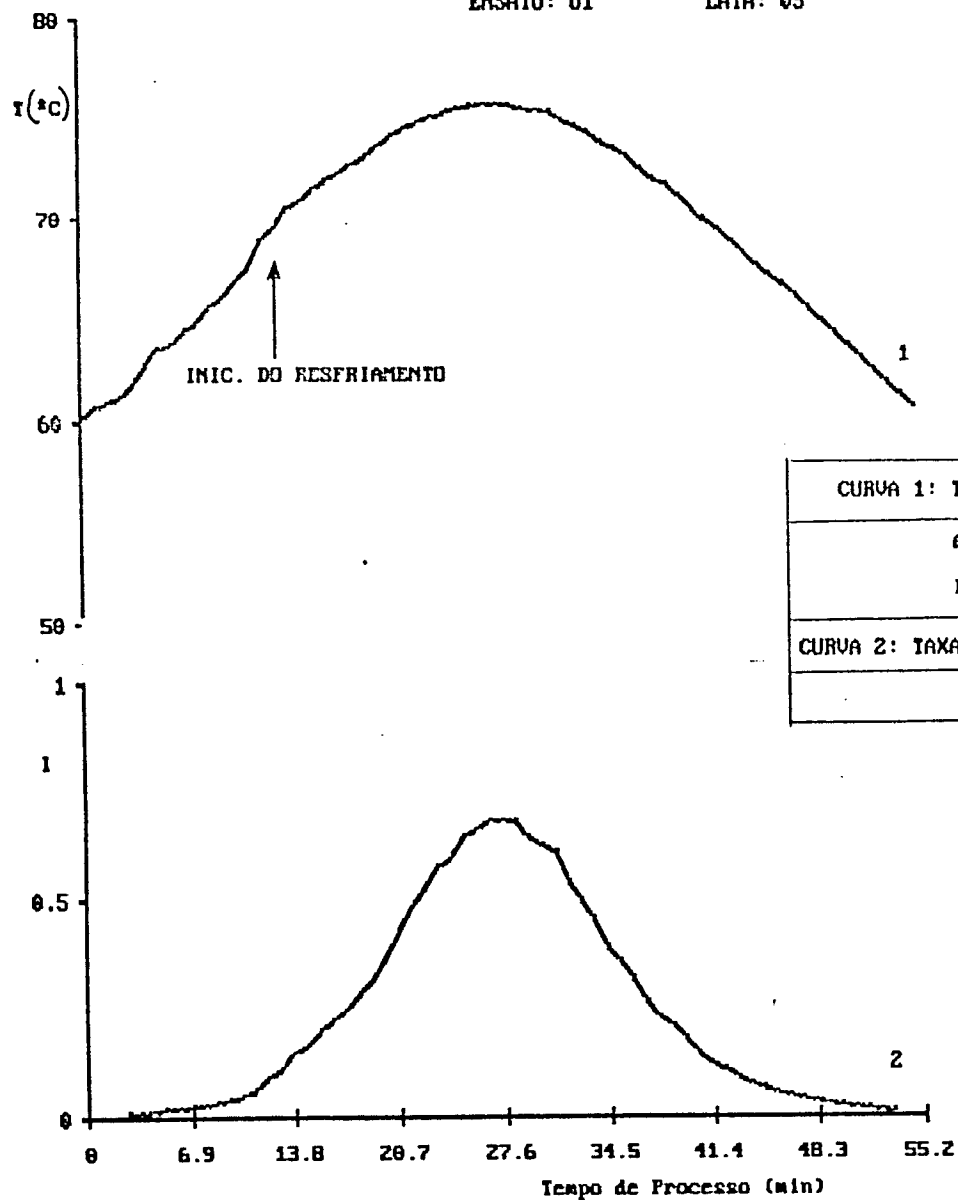


FIGURA 19. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 01 LATA: 05

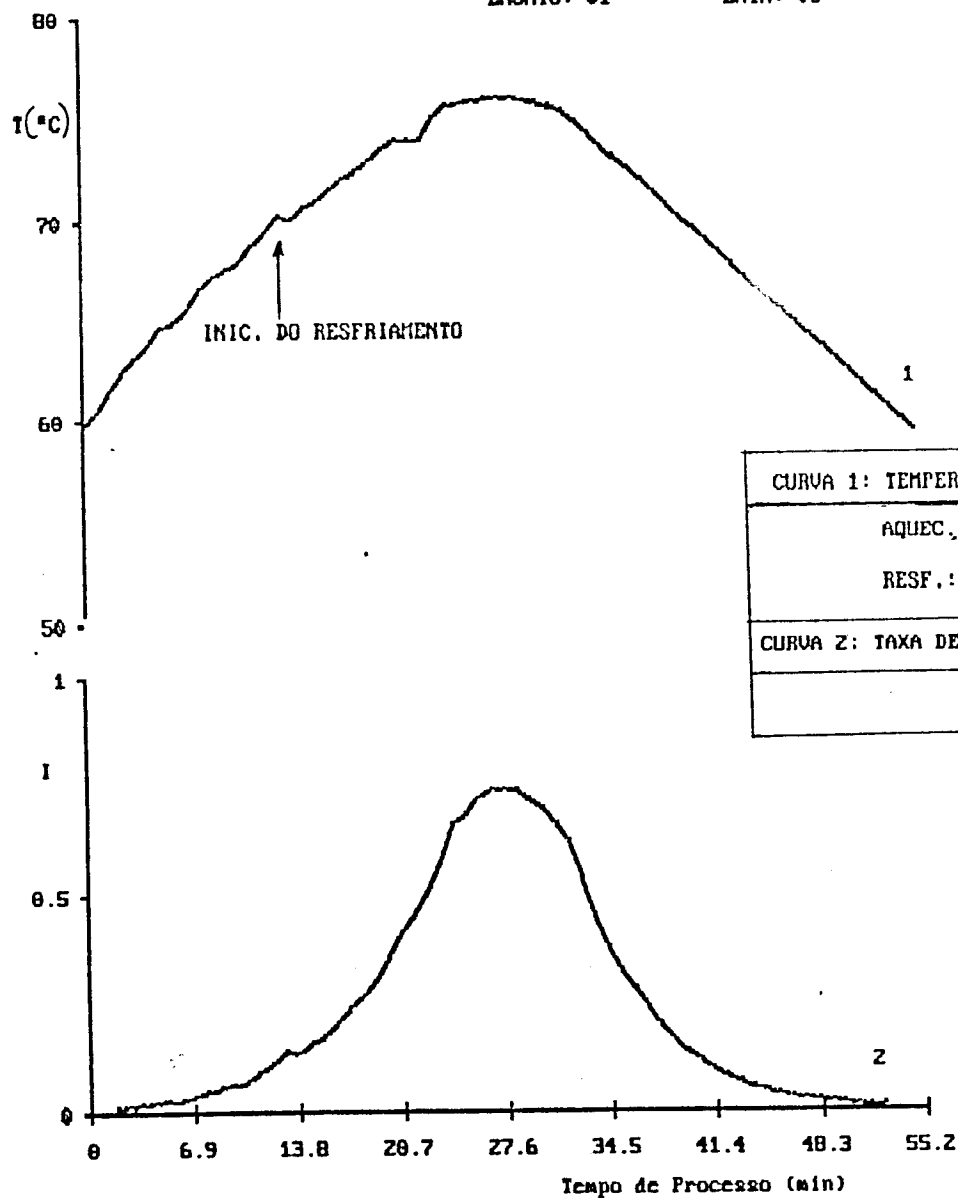


CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN
RESF.: T = 30.8 °C ; t = 41,9 MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)
Fp = 12,53 MIN À 77 °C

FIGURA 20. PROCESSAMENTO DA PULPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 01

LATA: 06



CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)

AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN

RESF.: T = 30.8 °C ; t = 41.9 MIN

CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)

Fp = 12.75 MIN A 77 °C

FIGURA 21. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

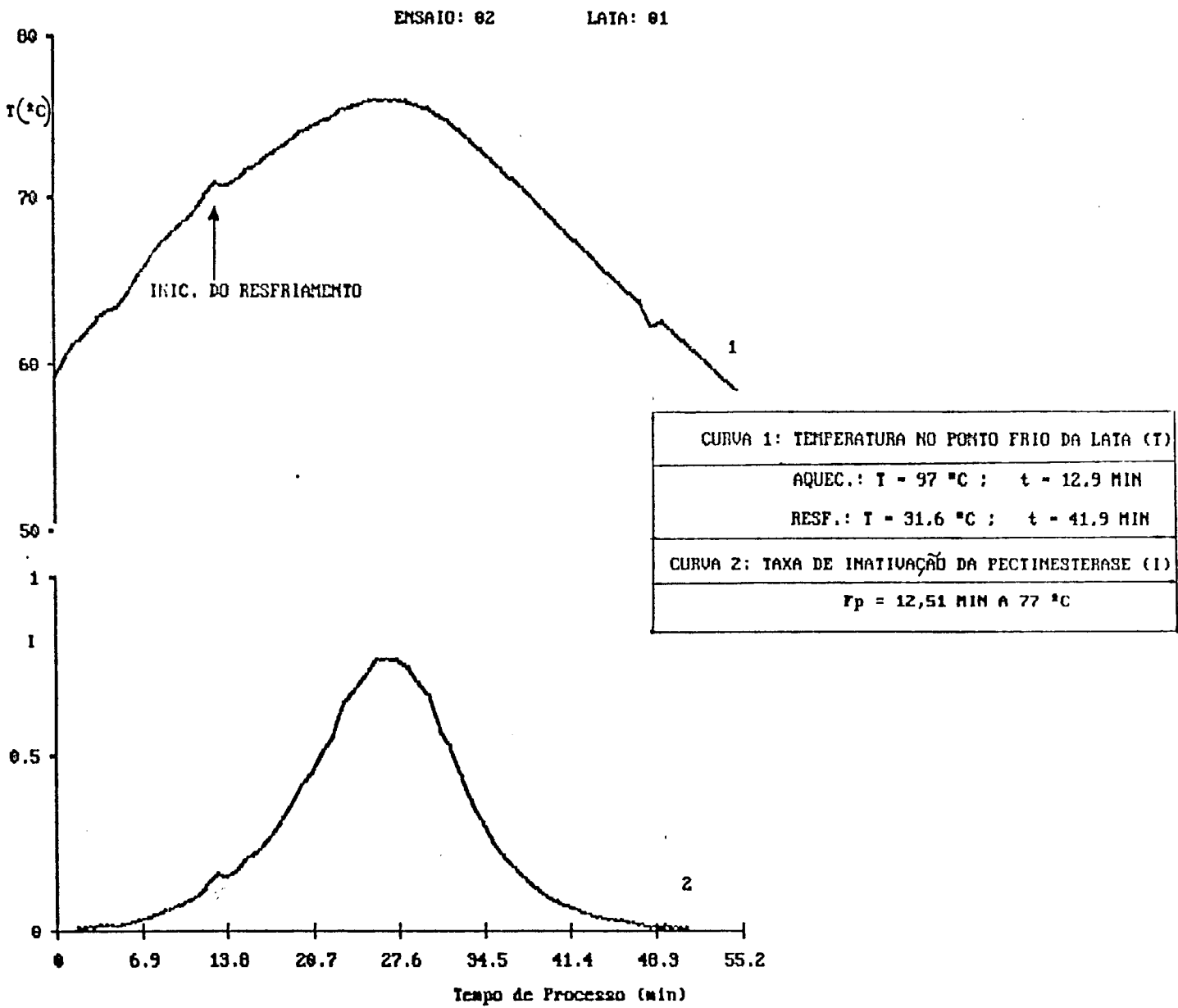
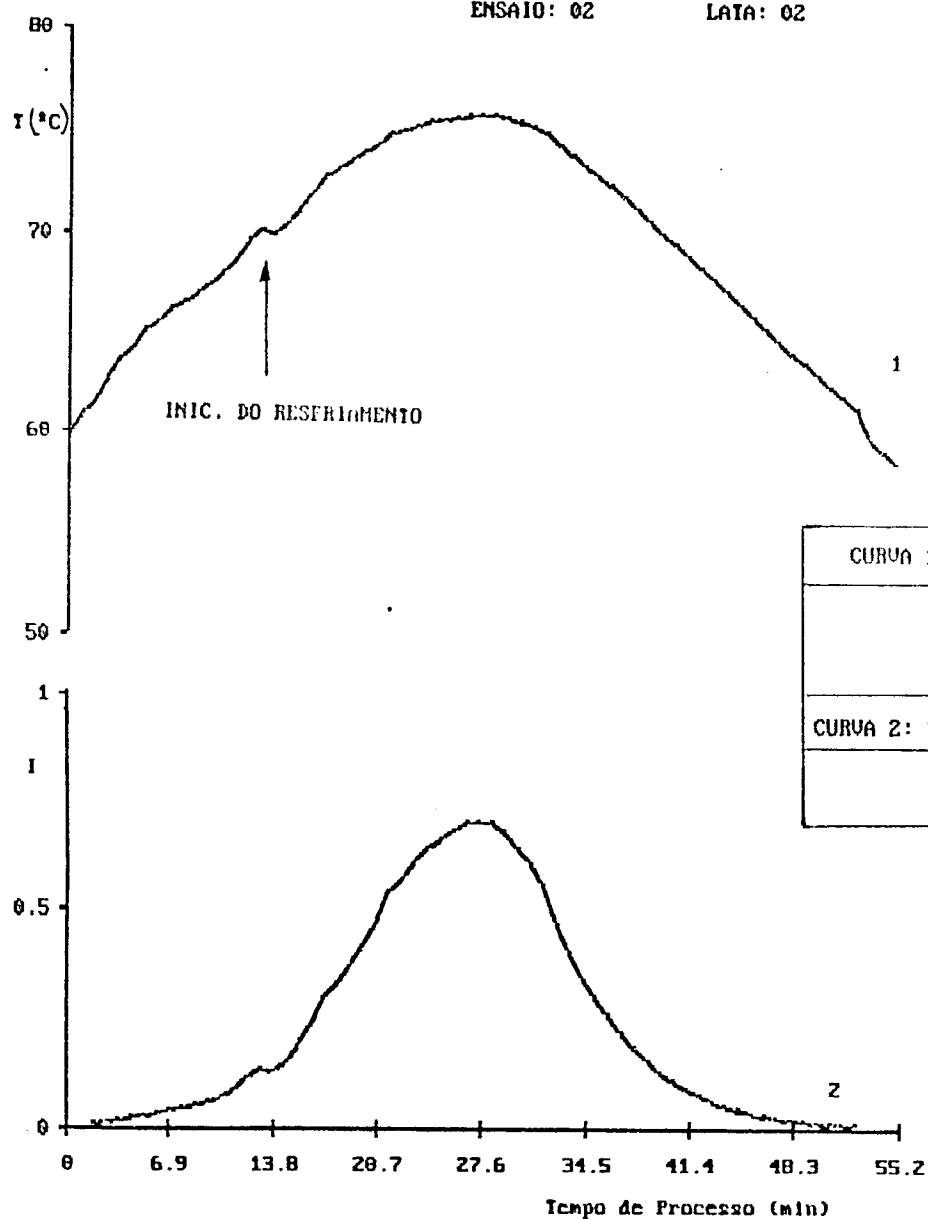


FIGURA 22. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 02 LATA: 02



CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
$\dot{T}$ AQUEC.: $T = 97^{\circ}\text{C}$; $t = 12.9$ MIN RESF.: $T = 31.6$ MIN ; $t = 41.9$ MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)
$F_p = 12.62$ MIN A 77°C

FIGURA 23. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

ENSAIO: 82 LATA: 83

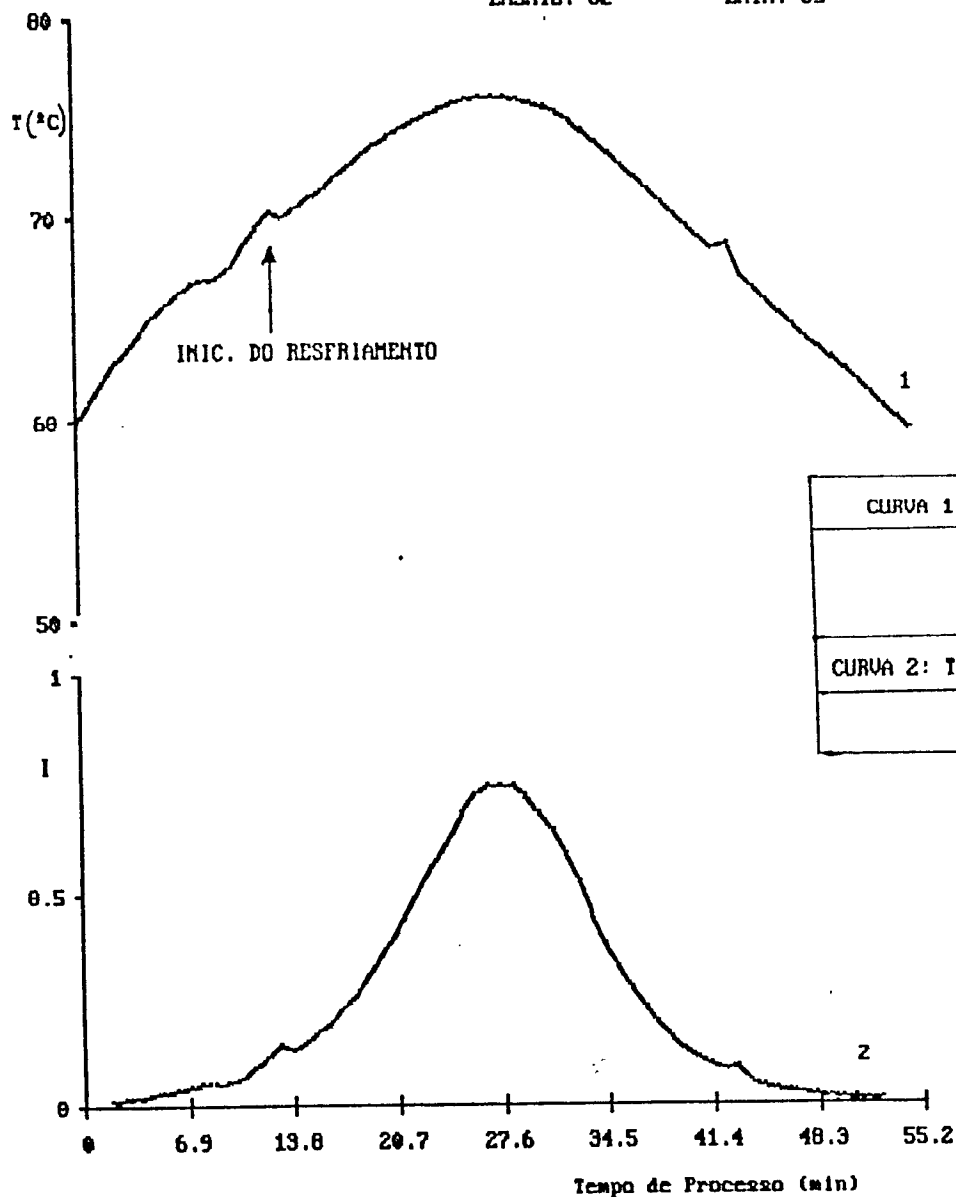


FIGURA 24. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3,8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

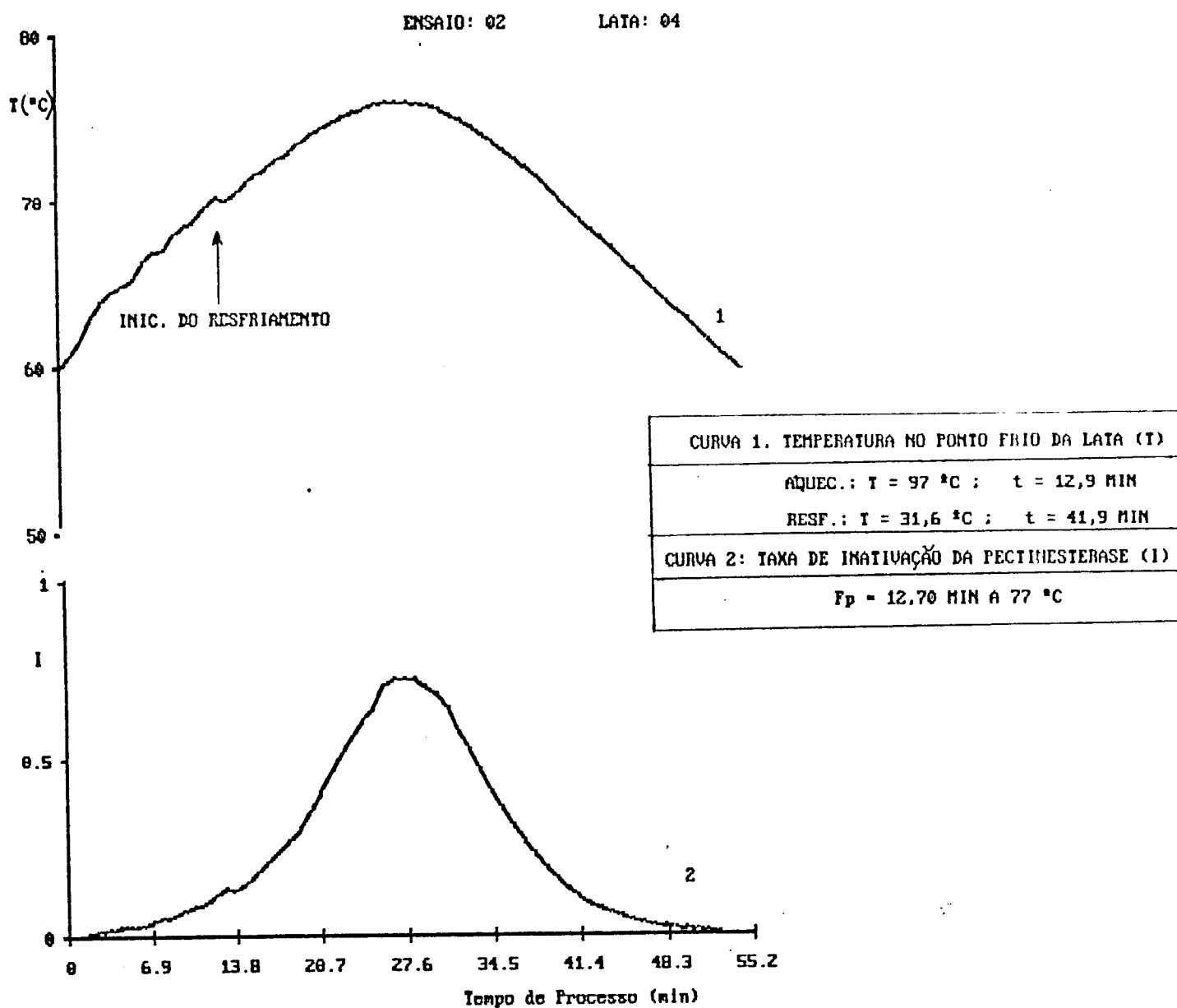
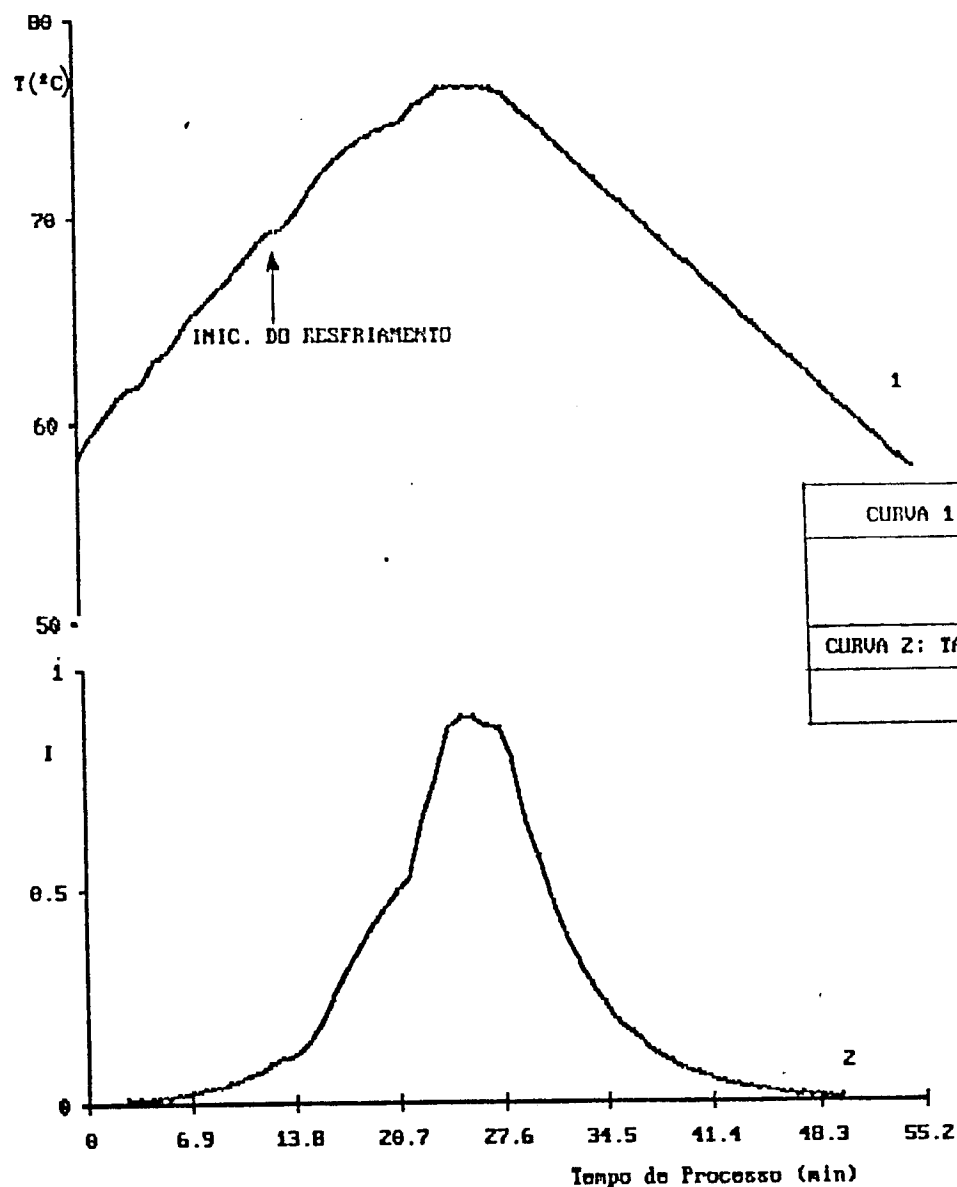


FIGURA 25. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3,8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 02

LATA: 05



CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN
RESF.: T = 31,6 °C ; t = 41,9 MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)
F _p = 12,33 MIN A 77 °C

FIGURA 26. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3,8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 02 LATA: 06

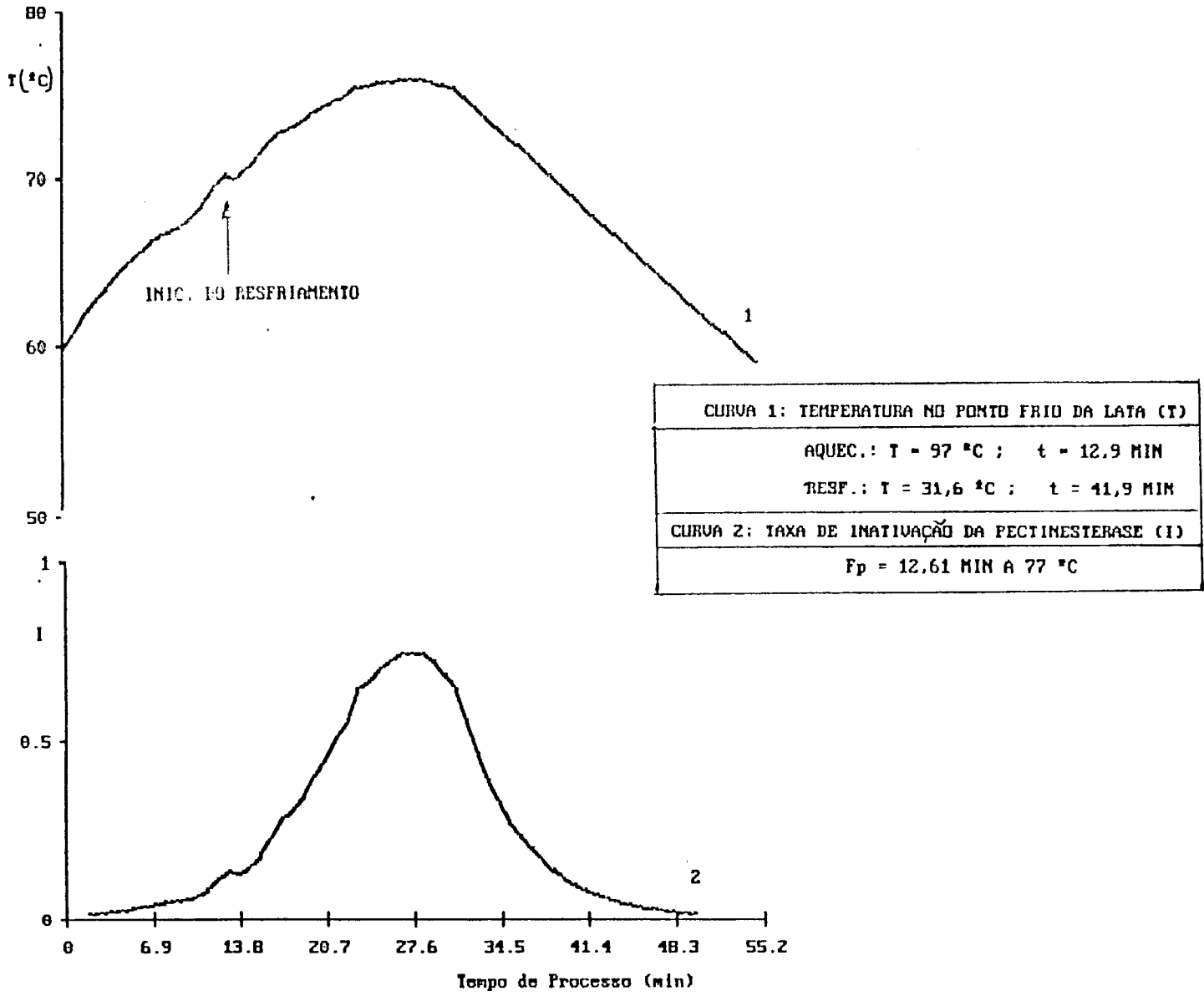
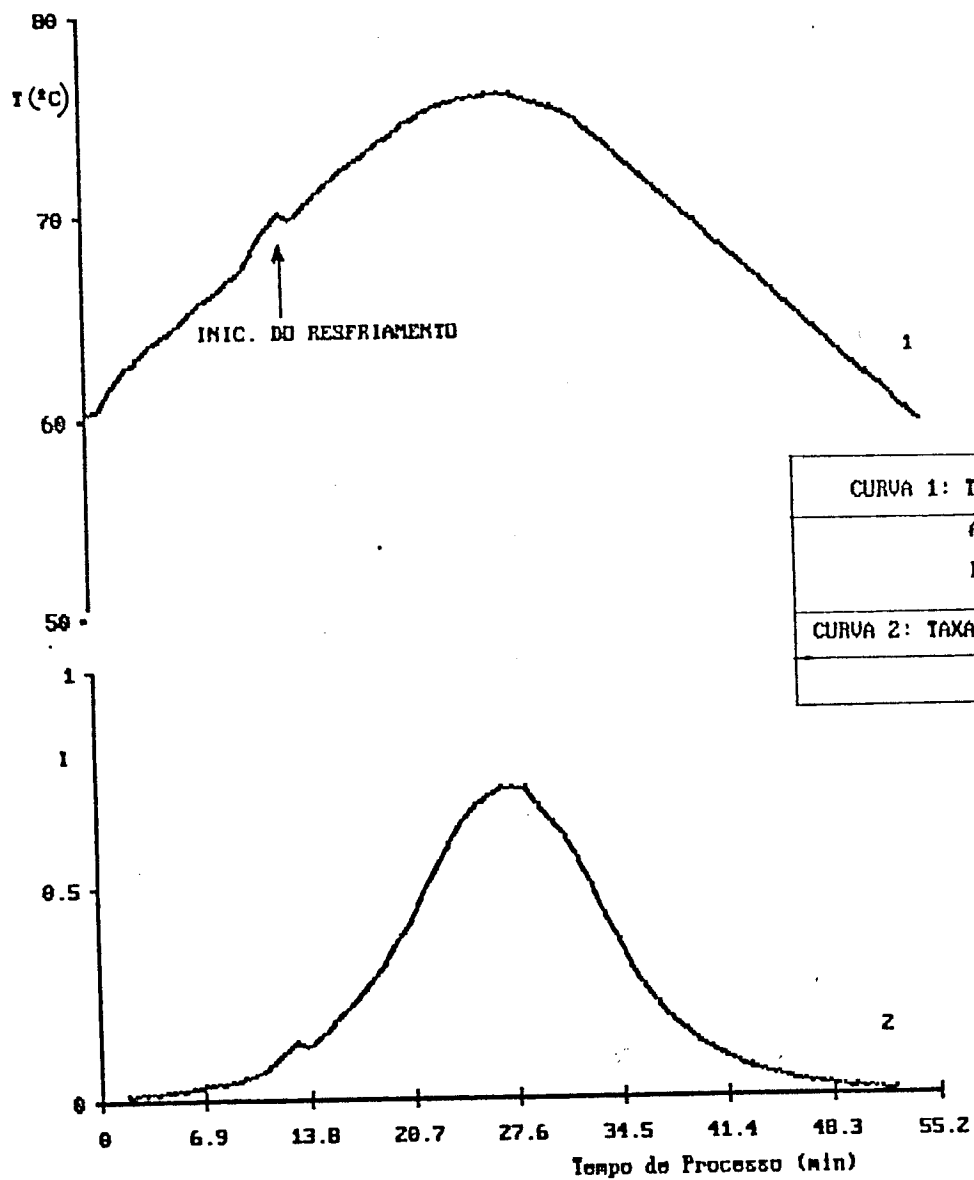


FIGURA 27. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

ENSAIO: 03

LATA: 01



CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN
RESF.: T = 30.5 °C ; t = 41.9 MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (1)
Fp = 12,39 MIN A 77 °C

FIGURA 28. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3,8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 03

LATA: 02

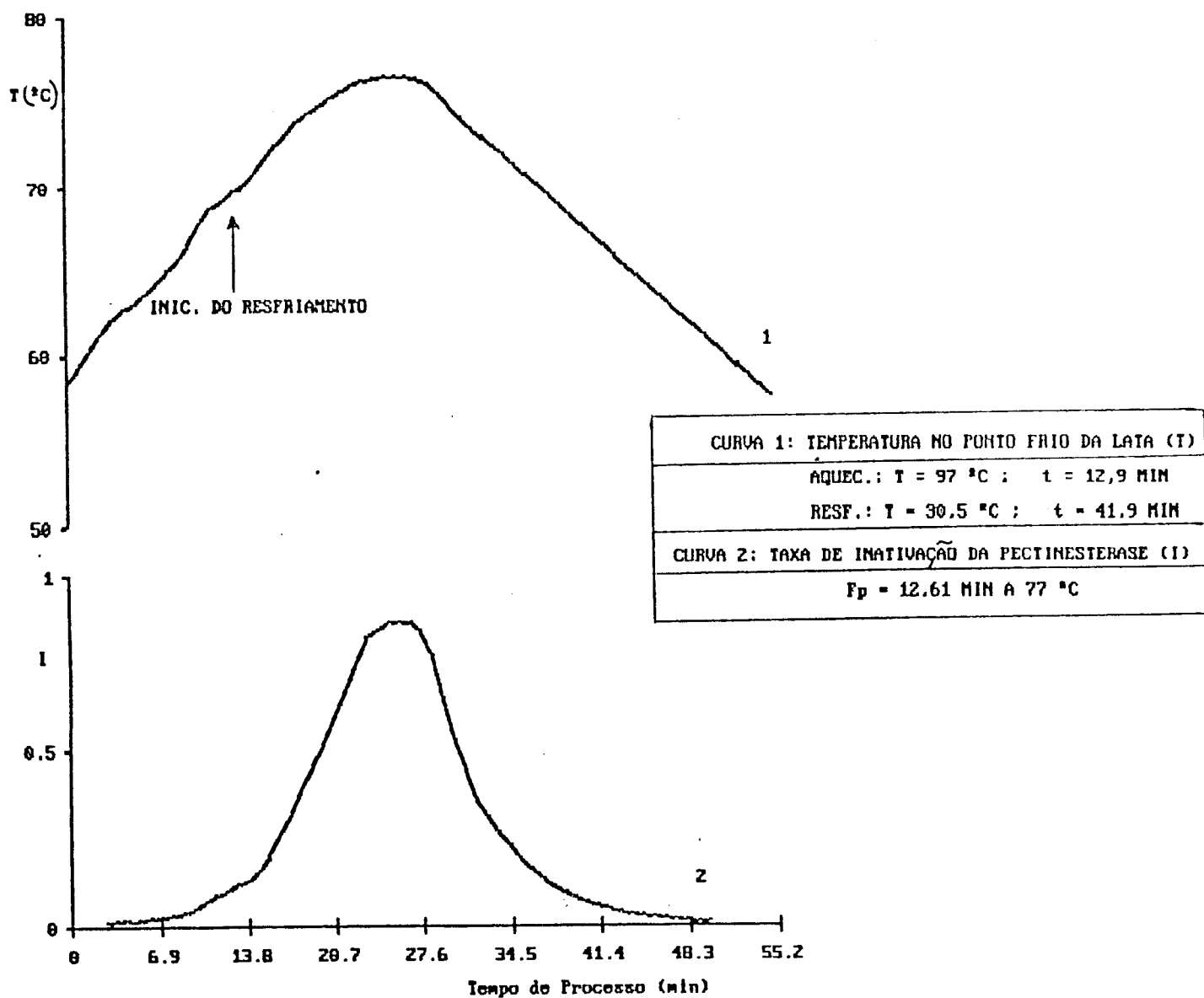


FIGURA 29. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

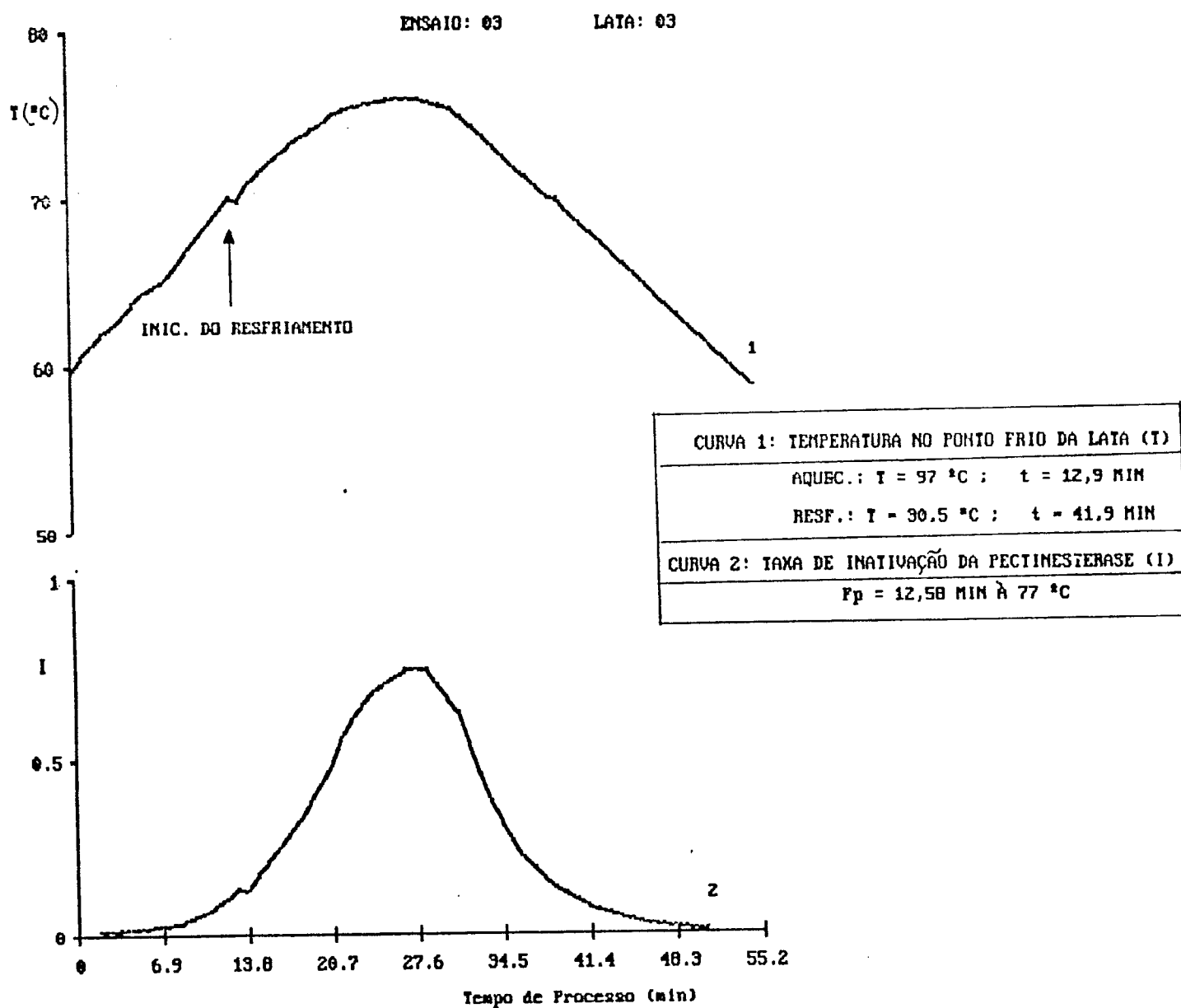


FIGURA 30. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAÇÃ "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

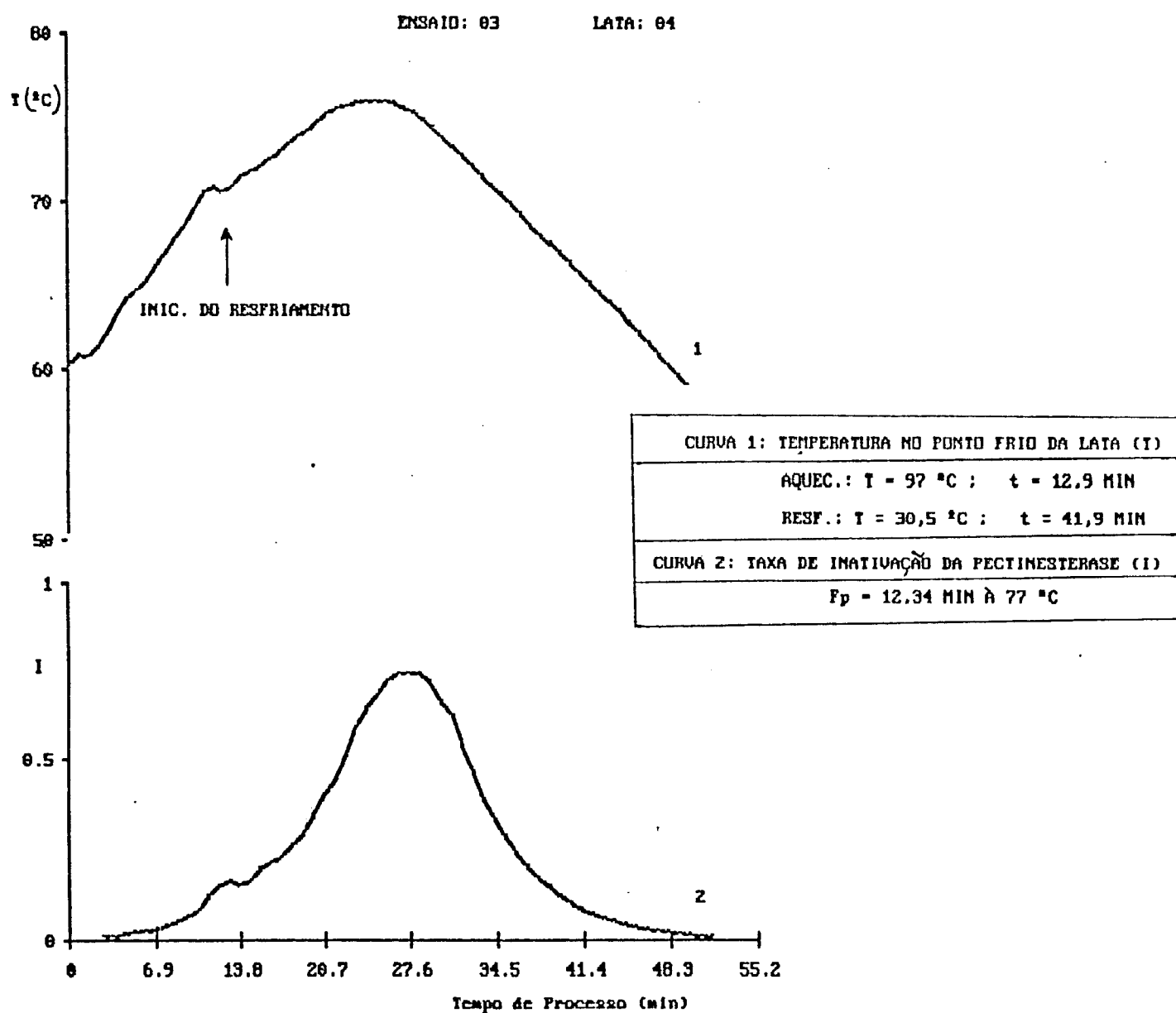
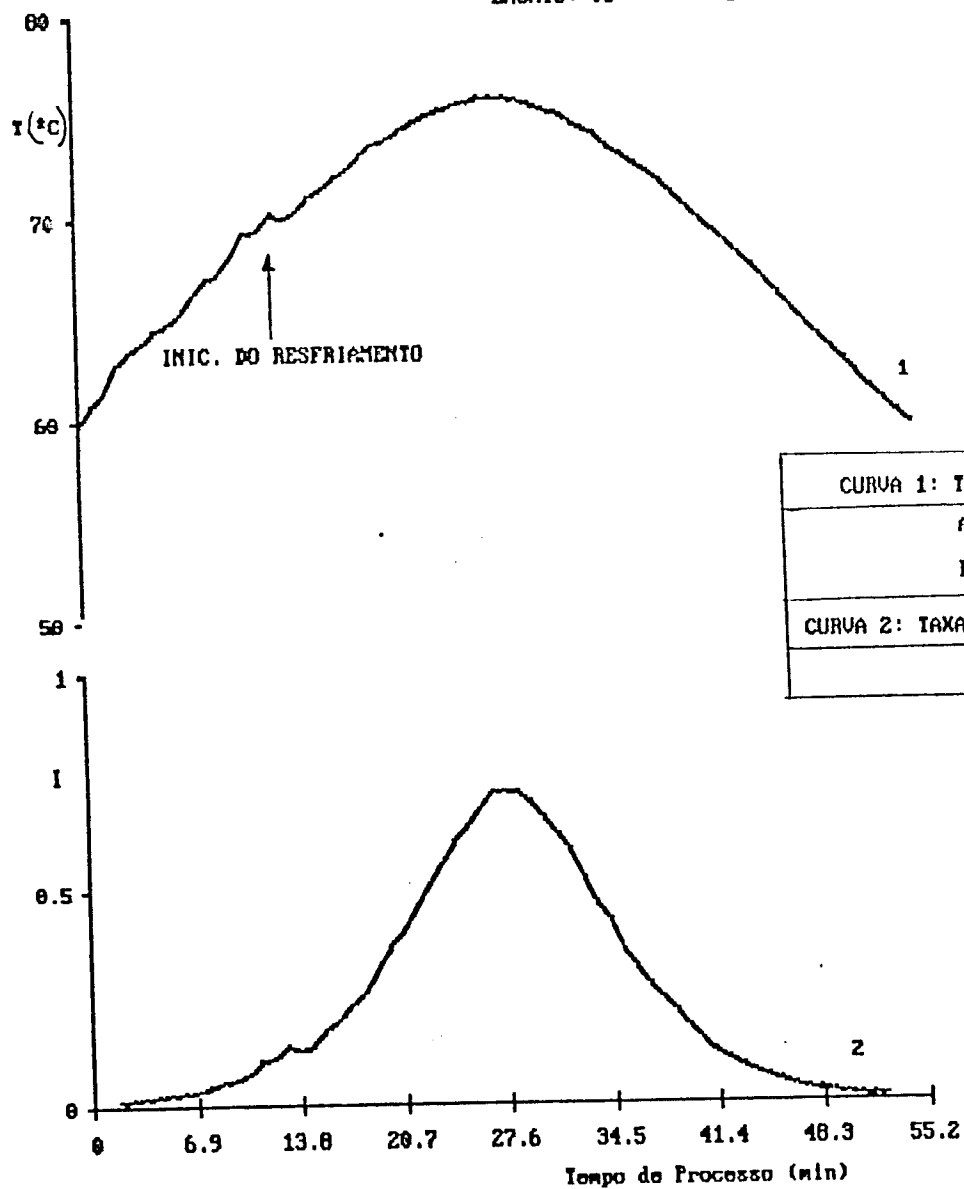


FIGURA 31. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12,9 MIN.

ENSAIO: 03

LATA: 05

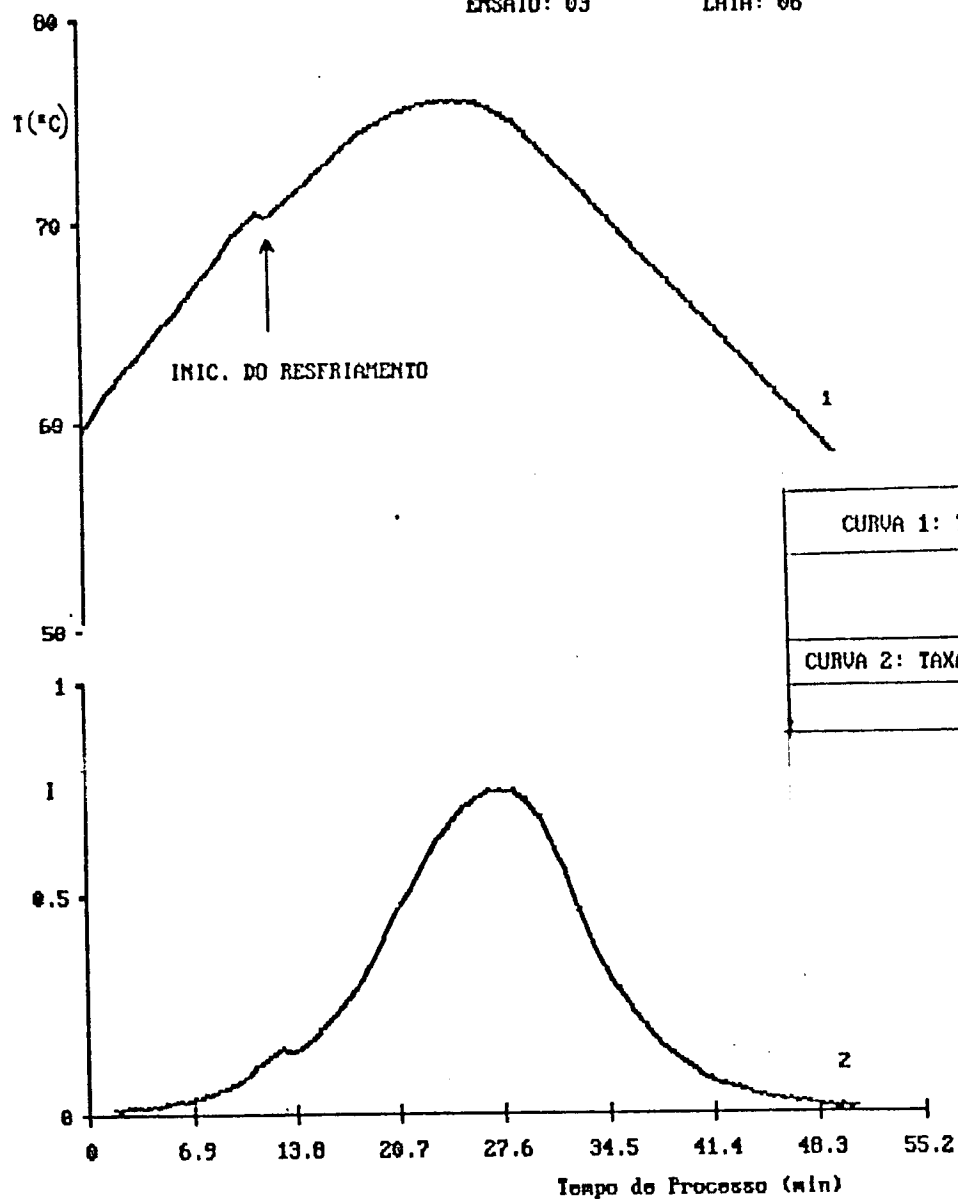


CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN
RESF.: T = 30,5 °C ; t = 41,9 MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)
$T_p = 12,71$ MIN À 77 °C

FIGURA 32. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 12.9 MIN.

ENSAIO: 03

LATA: 06



CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)

AQUEC.: T = 97 °C ; t = 12,9 MIN

RESF.: T = 30,5 °C ; t = 41,9 MIN

CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)

Fp= 12,55 MIN À 77 °C

A análise estatística desses dados é apresentada na tabela 37

Tabela 37 - Análise de variâncias dos valores de F_p

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F
Entre Latas	0,0330	2	0,0165	0,7569
Entre Ensaios	0,0084	5	0,0017	0,0771
Resíduo	0,2180	10	0,0218	
Total	0,2594	17	0,0153	
Tabelado				
$\alpha = 0,05$			$\alpha = 0,01$	
$F_{2,10} = 4,10$			$F_{2,10} = 7,56$	
$F_{5,10} = 3,33$			$F_{5,10} = 5,64$	

A análise estatística dos Valores de F_p nos três ensaios, mostrou que não há diferença significativa entre os ensaios e entre as latas de um mesmo ensaio, a nível de $\alpha = 0,05, \alpha = 0,01$. Isto indica que o tempo de aquecimento de 12,9 min em banho de água à 97°C pode ser extrapolado para o processamento de lotes com a polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) em escala industrial

Observando-se as figuras 15 a 32 verificou-se que na 1ª fase do resfriamento havia um aumento da temperatura no ponto frio da lata. Resultados semelhantes foram encontrados por BOARD et alii (1960), KOPELMAN et alii (1982), ROBERTSON & MILLER (1984) e SIDDALINGU et alii (1985). Esses autores verificaram na esterili-

zação em autoclave de alimentos condutivos enlatados, que quando se desligava o vapor ainda havia um alto gradiente de temperatura entre a superfície e o centro geométrico da lata, ocasionando um aumento de temperatura, conhecido como "OVERSHOOTING", durante a 1ª fase de resfriamento. Este "overshooting" é responsável por uma fração elevada da letalidade do processo. Por tanto, neste trabalho a fase de resfriamento se torna muito importante, pois praticamente toda a inativação da pectinesterase se dá nesta fase.

O exame da polpa de mamão enlatada, após o processamento térmico, mostrou que não houve gelatinização e não foi detectada atividade residual da pectinesterase, pelo método de KERTESZ (1955), em nenhuma das amostras. Portanto este processamento térmico equivalente a 1,70 D da porção termorresistente da pectinesterase ($F_{77^{\circ}\text{C}}^{78^{\circ}\text{C}} = 12,30 \text{ min}$) foi suficiente para inativar 98% desta enzima.

Nos três ensaios a polpa de mamão "formosa" enlatada apresentou-se com 11° Brix de sólidos solúveis e pH 3,8, valores que não se modificaram após o processamento térmico. A atividade inicial da pectinesterase, nestes ensaios, variou entre 45,3 e 56,7 PEu x 10⁴/ml.

5.6.2. Testes com a microflora naturalmente presente

Todas as latas processadas por 12,9 minutos em banho de água à 97°C e incubadas à 30°C/4 semanas e 55°C/2 semanas não apresen-

taram estufamento, indicando que a flora microbiana presente (bactérias não esporuladas, bolores e leveduras) foi destruída no processamento térmico.

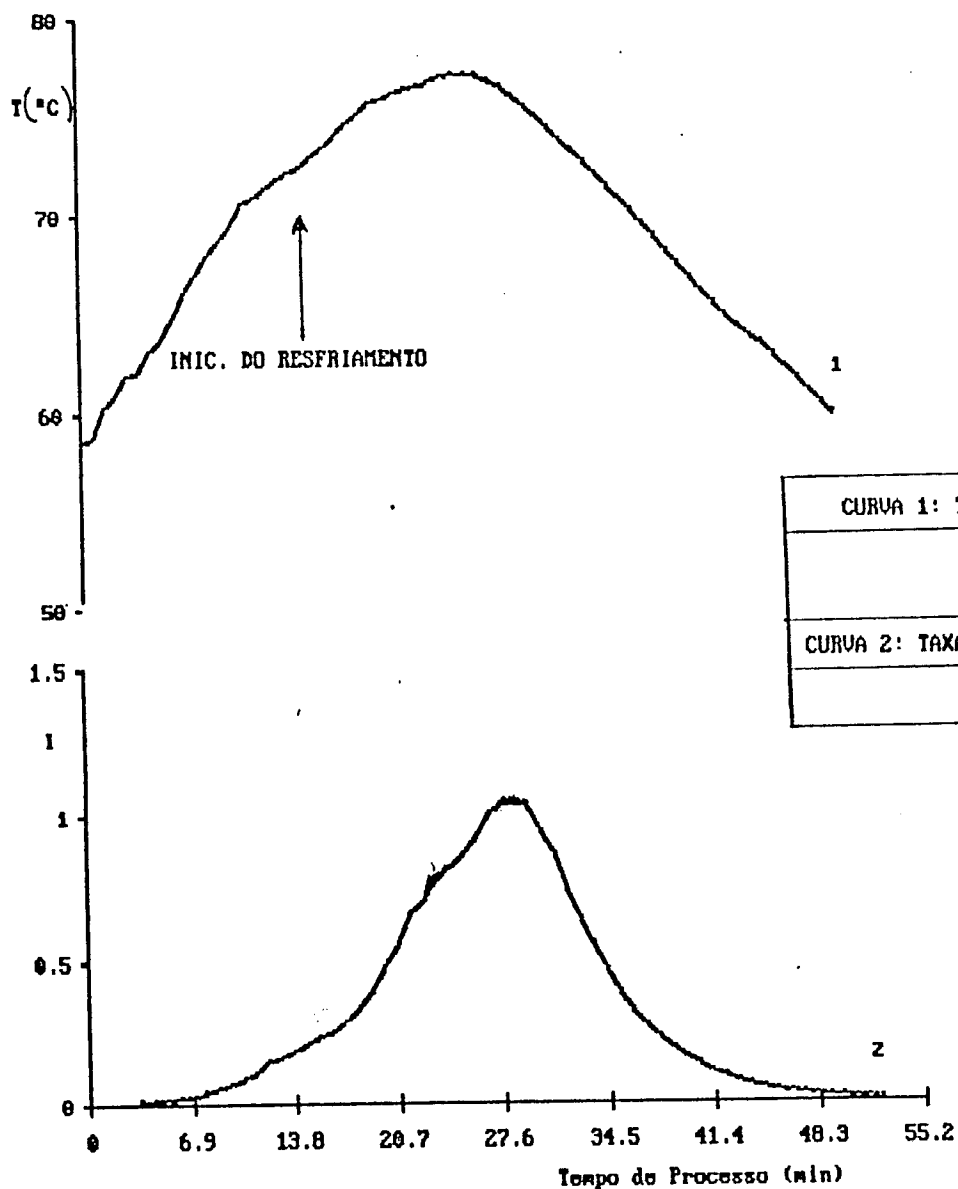
5.6.3. Ensaio de embalagens inoculadas

Todas as latas, inoculadas com a suspensão do *Cl. pasteurianum*, processadas por 15 minutos, em banho de água à 97°C (fig. 33 e 34) e incubadas à 30°C/4 semanas não apresentaram sinal de estufamento e na subcultura não houve crescimento, indicando que este processamento térmico foi suficiente para destruir o microrganismo. Portanto, o processamento térmico baseado em 2,3 reduções decimais da porção termorresistente da pectinesterase conduz a uma polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) microbiologicamente segura.

FIGURA 33. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 15.0 MIN.

ENSAIO: 04

LATA: 01

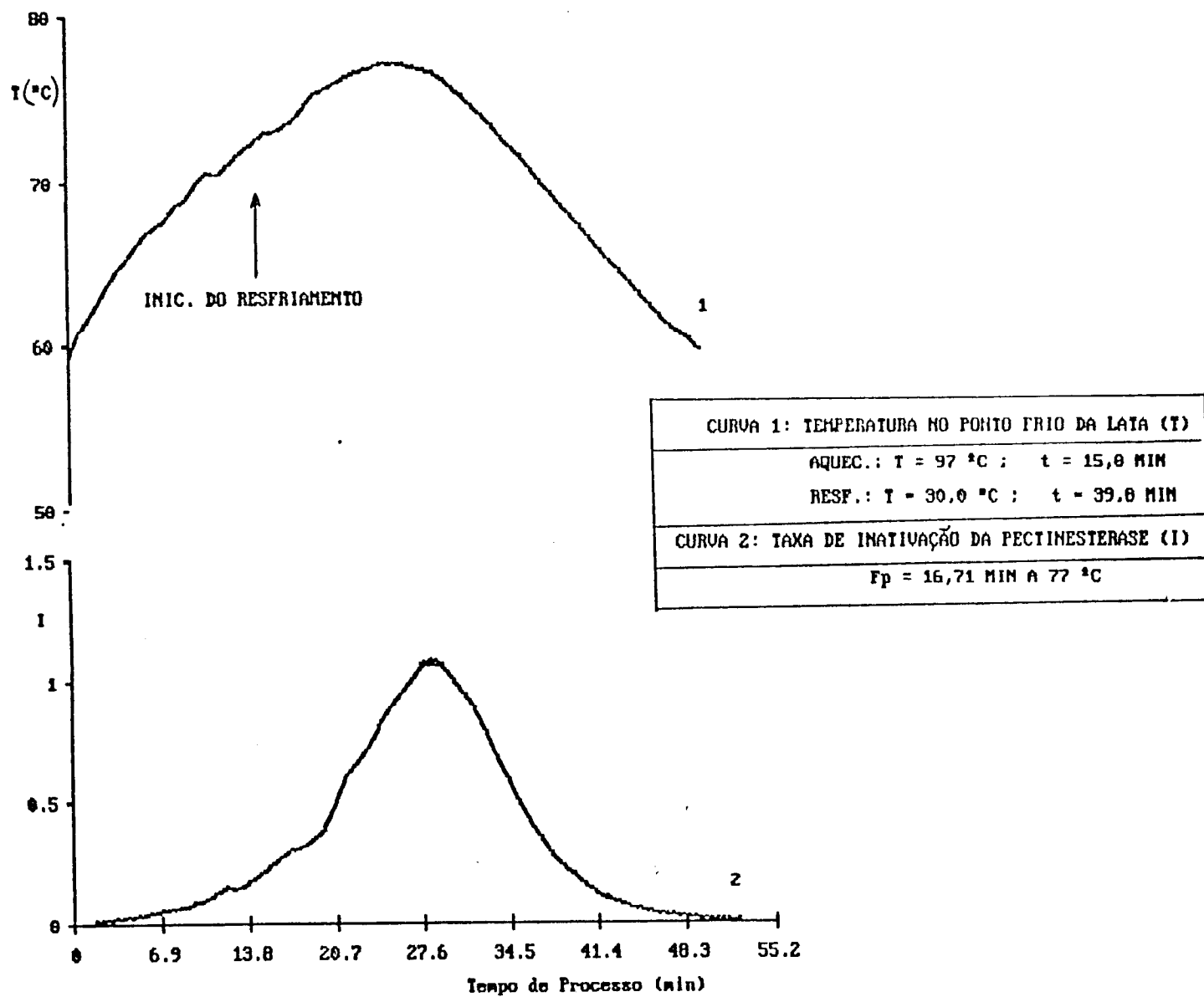


CURVA 1: TEMPERATURA NO PONTO FRIO DA LATA (T)
AQUEC.: T = 97 °C ; t = 15,0 MIN
RESF.: T = 30,0 °C ; t = 39,8 MIN
CURVA 2: TAXA DE INATIVAÇÃO DA PECTINESTERASE (I)
$T_p = 16,65 \text{ MIN À } 77^{\circ}\text{C}$

FIGURA 34. PROCESSAMENTO DA POLPA DE MAMÃO "FORMOSA" ACIDIFICADA (pH 3.8) COM O TEMPO DE AQUECIMENTO DE 15.0 MIN.

ENSAIO: 04

LATA: 02



6.0 CONCLUSÕES

- 1 - Nas amostras ensaiadas de polpa de mamão "formosa", no seu pH natural, não foi encontrada atividade de peroxidase.
- 2 - A atividade da pectinesterase na polpa de mamão "formosa", no seu pH natural, variou entre 26,5 e 57,5 PEu x 10^4 /ml.
- 3 - A carga de bactérias mesófilas totais da polpa de mamão "formosa", no seu pH natural, foi da ordem de 10^4 UFC/ml e na polpa acidificada com e sem adição de sacarose foi da ordem de 10^3 UFC/ml. A adição de ácido cítrico e sacarose não alterou a população de bolores e leveduras e bactérias lácticas, que foram da ordem de 10^2 e 10^3 UFC/ml, respectivamente.
- 4 - O melhor método para a esporulação do *Cl. pasteurianum* foi o das transferências sucessivas, através do qual se conseguiu a produção de um lote com 10^6 esporos/ml.
- 5 - O *Cl. pasteurianum* conseguiu crescer e produzir gás na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) e na polpa acidificada com adição de sacarose (20° e 30° Brix), podendo, portanto, ser usado como indicador de pasteurização.
- 6 - As curvas de inativação térmica da pectinesterase à 75°, 77° e 80°C apresentaram uma mudança de inclinação, indicando a existência de duas porções da enzima, uma termolábil e outra termorresistente. Esta última, caracterizada por um tempo de redução maior e por um coeficiente térmico ao redor de 7,8°C.

- 7 - A energia de ativação, nas temperaturas estudadas, para a porção termolábil e termorresistente da pectinesterase foram 61,7 e 72,7 Kcal/mol, respectivamente, estando, portanto, dentro da faixa (40-100 Kcal/mol) de energia de ativação reportada para o processo de inativação térmica de enzimas.
- 8 - Não é indicada a adição de sacarose na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), preparada para ser enlatada e processada termicamente. Esta adição causou um aumento nos tempos de redução decimal em média de 3 vezes para a polpa com 20° Brix e de 5 vezes para a polpa com 30° Brix, indicando que a sacarose exerce um efeito protetor na enzima, contra o calor. Por este motivo, optou-se pelo preparo da polpa com seu conteúdo natural de açúcares.
- 9 - A destruição térmica do *Cl. Pasteurianum* na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) seguiu uma cinética de 1ª ordem, com os tempos de redução decimal à 75°, 77° e 80° C de 9,7; 7,1 e 2,7 minutos, respectivamente, e o coeficiente térmico de 8,8°C.
- 10 - Os tempos de redução decimal da porção termorresistente da pectinesterase, as temperaturas estudadas, foram maiores do que os do *Cl. pasteurianum*, indicando que essa porção da enzima apresenta uma resistêncua térmica maior. Portanto, o processamento térmico aplicado a polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) pode ser baseado na inativação térmica dessa porção da enzima.
- 11 - O ponto frio da lata com polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8), processada na posição vertical, em banho de

água a 97°C, foi determinado como sendo o centro geométrico da mesma.

- 12 - Na aplicação de 1,7 reduções decimais da atividade da porção termorresistente da pectinesterase na polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) conseguiu-se uma inativação de 98%. Esta redução decimal serviu para estabelecer um valor $F_{77^{\circ}\text{C}}^{78^{\circ}\text{C}}$ de 12,30 minutos e através da relação empírica de SHIGA (1976) encontrou-se um tempo de aquecimento de 12,9 minutos, em banho de água à 97°C.
- 13 - Nos três ensaios de processamento térmico com 12,9 minutos de aquecimento, em banho de água à 97°C e 41,9 minutos de resfriamento, as dezoito latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) apresentaram valores de pasteurização variando entre 12,33 e 12,75 minutos equivalente à 77°C. A análise estatística dos dados indicaram não haver diferença significativa entre ensaios e entre latas de um mesmo ensaio, a nível de α igual a 0,05 e 0,01.
- 14 - No exame das latas de polpa de mamão "formosa" acidificada (pH=3,8), após o processamento térmico por 12,9 minutos, em banho de água à 97°C, verificou-se não haver gelatinização e não se detectou atividade remanescente da pectinesterase, pelo método de KERLESZ (1955), em nenhuma das amostras. Portanto, este processamento térmico equivalente a 1,7 reduções decimais da atividade da porção termorresistente da pectinesterase ($F_{77^{\circ}\text{C}}^{78^{\circ}\text{C}} = 12,30 \text{ min}$) foi suficiente para inativar 98% dessa porção da enzima e destruir a flora microbiana naturalmente presente.

15 - O processamento térmico, no qual se aplicou à polpa de mamão acidificada (pH 3,8), inoculada com *Cl. pasteurianum*, 2,3 reduções decimais da porção da porção termorresistente da pectinesterase, foi suficiente para destruir este microrganismo. Portanto, este processamento térmico é o recomendado para se ter esta polpa microbiologicamente segura.

7.0. RECOMENDAÇÃO

Recomenda-se aplicar à polpa de mamão "formosa" acidificada (pH 3,8) um processamento térmico equivalente a 2,3 reduções decimais da atividade da porção termorresistente da pectinesterase, o que garante um produto microbiologicamente seguro e livre da atividade enzimática da pectinesterase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, S. N. *Stabilization of protein structure by sugar*, Biochemistry, 21: 6536-6544, 1982.
- AUNG, T. & ROSS, E. *Heat sensitivity of pectinesterase activity in papaya puree and of catalase - like activity in passion fruit juice*, J. Fd. Sci, 30: 144-147, 1965.
- AYLWARD, F. & HAISMAN, D. R. *Oxidation systems in fruits and vegetables - Their relation to the quality preserved products*, Adv. Fd. Res 17: 1-76, 1969.
- BACK, J. F.; DAKENFULL, D. & SMITH, M.B. *Increase thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyos*, Biochemistry, 18: 5191-5196, 1979.
- BISSETT, O. W.; VELDHUIS, M. K. & RUSHING, N. B. *Effect of heat treatment temperature on the storage life of Valencia orange concentrates*, Food Technol, 7(6): 258-260, 1953.
- BOARD, P.W.; COWELL, N.D. & HICKS, E.W. *Studies in canning processes III - The cooling phase of processes for products heating by conduction*, Fd. Research, 25: 449-459, 1960.
- BOWEN, J. F. & SMITH, E. S., *Sporulation in Cl. pastenrianum*, Fd. Research, 20: 655-658, 1955.
- BURNETTE, F. S. & FLICK JR., G.J. *Activity and resistance to thermal inactivation of peroxidase in the blue crab (Callinectes sapidus)*, J. Fd. Sci, 43: 31-34, 1978.

- CARROL, E.A.; GUYER, R. B.; BISSETT, O. W. & VELDHUIS, M. K. *Stability of frozen concentrated orange Juice. V - The effect of heat treatment at intermediate stages of concentration on Juices prepared from Valencia oranges*, Food Technol, 11 (10): 516-519, 1957.
- CHANG, B. S., PARK, K. H. & LUND, D. B. *Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase*, J. Fd. Sci., 53: 920-923, 1988.
- CHANG, L. W. S.; MORITA, L. L. & YAMAMOTO, H. Y. *Papaya pectinesterase inhibition by sucrose*, J. Fd. Sci, 30 (2): 218-222, 1965.
- CHANG JR., H. T.; CHANG, T. S. H.; STANFFORD, A. E. & BREKKE, J. E. *Nonvolatile acids of papaya*. J. Agric. Chem, 19 (2): 236-265, 1971.
- CHANG JR. H. T.; FLATH, R. A.; FORREY, R.R.; CAVALETTO, C. G.; NAKAYAMA, T. O. M. & BREKKE, J. E. *Development off-odors and off-flavor in papaya puree*, J. Agric. Fd. Chem, 21 (4): 566-570, 1973.
- CHANG JR. H. T. & KWOK, S. C. M. *Importance of enzymic inactivation prior to extraction of sugar of papaya*, J. Food Sci, 40: 770, 1975.
- CHENCHIN, E. & YAMAMOTO, H. Y. *Distribution and heat inactivation of peroxidase isoenzymes in sweet corn*. J. Fd. Sci, 38: 40-42, 1973.
- CZYHRINCIW, N. *Tropical fruits technology*, Adv. Fd. Res. 17: 153-214, 1969.
- DASTUR, K.; WECKEL, K. G. & VON ELBE, J., *Thermal process for canned cherries*, Fd. Technol, 22: 1176-1182, 1968.

- DRAETTA, I. S.; SHIMOKOMAKI, M; YUKOMIZO, Y.; FUJITA, J. T., MENEZES, H. C. & BLEINROTH, E. W. *Transformações bioquímicas do mamão (Carica papaya) durante a maturação*, Col. ITAL, 6: 395-408, 1975.
- DELGADO, O. C.; MENDEZ, J. A. B. & GUARIGUATA, C. I. *Cinética de inactivación termica de la peroxidasa in nobos y guisantes*. Arch. Lation americano Nutric. 34 (4): 685-693, 1984.
- EAGERMAN, B. A. & ROUSE, A. H. *Heat inactivation temperatura-time relationship for pectinesterase inactivation in citrus juices*, J. Fd. Sci, 41: 1396-1397, 1976.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK, Rome - v. 44, pp. 169-170, 1990.
- FARKAS, D. F.; GOLDBLITH, S. A. & PROCTOR, B. E. *Stopping storage off-flavor by cubing peroxidase*. Fd. Eng. 28 (1): 52-53, 1956.
- FDA Bacteriological Analytical Manual, Association of Analytical Chemist, Arlington, 1984.
- INGRAN, M., *Sporesforms at food spoilage organism*, in: *Bacterial spores*, Eds. GOULD, G. W. & HURST, A., Academic Press, New York, pp. 549-610, 1969.
- JAGTINIANI, J.; CHAN Jr., H.T. & SAKAI, W.S., *Tropical fruit processing*, Academic Press, New York, 1988.
- JOFFE, F. M. & BALL, C. O. *Kinetics and energetics of thermal inactivation and the regeneration rates of perodixase System*. J. Fd. Sci, 27 (6): 587-592, 1962.

- KAPLAN, A. M.; ESSENLEN JR., W. B. & FELLERS, C. R. *Enzyme systems of canned acid foods - Effect of processing conditions of time and temperature*. Ind. Eng. Chem, 41 (9): 2017-202, 1949.
- KERTESZ, Z.I. *Pectic enzymes*, In: Methods in Enzymology, S.P. Colowick & N. O. Kaplan, Academic Press, New York, v. 1, pp. 158-162, 1955.
- KOPELMAN, I.J.; NAVEH, D. & PFLUG, I.J. *Overshooting of thermal process due temperature distribution at steam-off*, J. Fd. Technol, 17: 441-449, 1982.
- LAKE, D. E. & LYNT, R. K., *Mesophilic anaerobic sporesformers*, in: Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, A.P.H.A., Ed. SPECK, M. L., Washington, USA, pp. 221-234, 1984.
- LEE, J. C. & TIMASHEFF, S. N. *The stabilization of proteins by sucrose*, J. Biol. Chem. 256 (14): 7193-7201, 1981.
- LEE, Y. C. & HAMMES, J. K. *Heat inactivation in corn-on-the cob*. J. Fd. Sci. 44: 785-787, 1979.
- LEITÃO, M. F. F., *Microbiologia de sucos e Produtos ácidos*, Bol. ITAL, 33: 9-42, 1973.
- LEVI, A.; GACEL, S. & JUVEN, B. J. *Intermediate-moisture tropical Fruits products for developing countries .II - Quality characteristic of papaya*, J. Fd. Technol., 20: 163-175, 1985.
- LING, A. C. & LUND, D. B. *Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat labile isoenzymes from thermal destruction curves*. J. Fd. Sci. 43: 1307-1310, 1978.

LU, A. T. & WHITAKER, J. R. *Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase*. J. Fd. Sci. 30: 1178-1178, 1974.

LUNA, J. V. U., *Variedades de Mamoeiro*, Inf. Agropec. 12 (134): 14-17, 1986.

LUND, D. B. *Heat processing*. In: Principles of Food Science Part II Principles of Food Preservation, M. Karel, O. Fennema and D. B. Lund (eds), Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 51-52, 1975.

----- *Design of thermal process for Maximizing Nutrient Retention*. Fd. Technol. 31: 71-78, 1977.

MARSAHLL, M. R.; MARCY, J. E. & BRADDOCK, R. J. *Effect of total solids level on heat inactivation of pectinesterase in orange juice*, J. Fd. Sci., 50: 220-222, 1985.

Mc COLLOCH, R. J.; RICE, R. G.; GENTILI, B. & BEAVENS, E. A. *cloud stability of frozen superconcentrated citrus Juices*. Fd. Tecnol, 10: 633, 1956.

MEDINA, J. C. et. al. *Mamão, da cultura ao processamento e Comercialização*, Série Frutas Tropicais nº 7, ITAL, 1980.

MOURA, P. A. M. & RESENDE, L. M. A. *Aspectos econômicos da cultura do mamoeiro*. Informativo Agropecuário, 12 (134): 3-7, 1968.

MUCCIOLO, P. *Carnes - conservas e semiconservas - Tecnologia e Inspeção Sanitária*, Ed. ICONE, São Paulo, 1985.

NANJUNDASWAMY, A. M.; SAROJA, S. & RANGANNAS, S. *Determination of thermal process for canned mango products*. Ind. Fd. Packer. 27 (6): 5-13, 1973.

NATH, N. & RANGANNA, S. *Determination of thermal process schedule for totapuri mango*. J. Fd. Technol. 15: 251-164, 1980.

----- *Determination of thermal process schedule of acidified papaya*. J. Fd. Sci. 46: 201-206, 1981.

----- *Determination of a thermal process schedule for guava (Psidium guajava Linn)*. J. Fd. Technol. 18: 301-316, 1983.

NEBESKY, E. A.; ESSELEN JR, W. B.; KAPLAN, A. M. & FELLERS, C. R. *Thermal destruction and stability of peroxidase in acid Foods*. Food Res. 15: 114-124, 1950.

Official methods of analysis of ADAC, 14th ed., 1984.

OWUSU-YAN, J.; MARSHALL, M. R.; KOBURGER, J. A. & WEI, C. I. *Low pH inactivation of pectinesterase in single strength orange Juice*, J. Fd. Sci. 53 (2): 504-507, 1988.

PAL, D. K.; SUBRAMANYAN, M. D.; DIVAKAR, N. G.; YER, C. P. A. & SELVARAJ, Y. *Studies on the physico-chemical composition of fruits of twelve papaya varieties*, J. Fd. Sci. and Technol., 17: 254-256, 1980.

PAL, D. K. & SELVARAJ, Y. *Biochemistry of papaya (Carica papaya L) fruit ripening changes in RNA, DNA, protein and enzymes of mitochondrial, carbohydrate, respiratory and phosphate metabolism*, J. of Hortic. Sci., 62 (1): 117-124, 1987.

PERALTA, E. I.; ALABASTRO, E. F.; LEGASPI, G. R. A. & APOLINARIO, K. M., *Growth characteristic and thermal resistance of spoilage organism isolated from canned peachy papaya given minimal heat treatment*, Philippine J. Sci., 102: 69-80, 1973.

- PERKINS, W. E., *Production of clostridial spores*, J. Appl. Bacteriological, 27 (3): 1-16, 1964.
- RAMASWAMY, H. S. & RANGANNA, S. *Thermal inactivation of peroxidase in relation to quality of frozen cauliflower (var. Indian Snowball)*. Can. Inst. Food Sci. J. 14 (2): 139-143, 1981.
- RAMASWAMY, H.S.; VAN DE VOORT, F.R. & GHAZALA, S. *An Analysis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinetic Data*. J. Fd. Sci 54(5): 1322-1326, 1989.
- REED, G. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, N.Y., 1975.
- REED, J. M.; BOHRER, C. W. & CAMERON, E. J., *Spores destruction rate studies on organisms of significance in the processing of canned foods*. Fd. Research, 16 (5): 383-408, 1951.
- REICHERT, J.E. *Tratamiento Térmico de los Productos Cárnicos*. Ed. ACRIBIA, Zaragoza, 1988.
- RESENDE, R.; FRANCIS, F. J. & STUMBO, C. R. *Thermal destruction and regeneration of enzymes in green bean and soinach puree*, Fd. Technol, 23: 63-66, 1969.
- RILLO, L.; CASTALDO, D.; GIOVANE, A.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; & QUAGLIUOLO, L. *Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin Orange Fruit*, J. Agric. Fd. Chem, 40: 591-593, 1992.
- ROBERTSON, G.L. & MILLER, S.L. *Uncertainties associated with the estimation of Fo values cans which heat by conduction*, J. Fd. Technol, 19: 623-630, 1984.
- ROUSE, A. H. & ATKINS, C. D. *Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices*, Fd. Technol, 6: 291-294, 1952.

----- *Further results from a study on heat inactivation of pectinesterase in citrus juices*, *Fd. Technol*, 7: 221-223, 1953.

SALUNKHE, D. K. & DESAI, B. B. *Papaya in postharvest biotechnology of fruits*, v. 2, pp. 13-26, CRC Press, Inc, Florida, 1984.

SELVARAJ, J. Y.; PAL, D. K.; SUBRAMANYAM, M. D. & IYER, C. P. A. *Changes in the chemical composition of forms cultivars of papaya (Carica papaya L.) during growth and development*, *J. Hortic. Sci.* 57 (1): 135-143, 1982.

SELVARAJ, J. Y. & PAL, D. K. *Changes in the chemical composition of papaya (Tailand Variety) during growth and development*, *J. Fd. Sci. and Technol.* 19: 257-259, 1982.

SILVA, E. & NOGUEIRA, J. N. *Estudo da atividade da polifenoloxi-dase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças*. *O solo*, 76: 43-51, 1984.

SEYMOUR, T.A.; PRESTON, J.F.; WICKER, L.; LINDSAY, J.A.; WEI, C. & MARSHALL, M.R. *Stability of pectinesterase of Marsh white grapefruit pulp*, *J. Agric. Fd. Chem.* 39: 1075-1079, 1991(a).

----- *Purification of properties of pectinesterase of Marsh white grapefruit pulp*, *J. Agric. Fd. Chem.* 39: 1080-1085, 1991(b).

SHIGA, I. *A New methods of estimating thermal process time for a given F value*, *J. Fd. Sci.* 41: 461-462, 1976.

SIDDALINGU; SRINIVASAN, B.; PADIVAL, R.A.; & RANGANNA, S. *Determination of thermal process schedule for canned mango, papaya and guava pulps*, *Acta Alimentaria*, 14(4): 331-342, 1985.

- SPECK, M. L. (ed) *Compendium of methods of the microbiological examination of foods*, A.P.H.A., 1976.
- STUMBO, C. R. *Thermobacteriology in food processing*, 2^a ed., Ed. Academic Press, New York, 1973.
- TAMURA, Y. & MORITA, Y. *Thermal denaturation and regeneration of japanese radish peroxidase*, J. Biochem, 78: 561-565, 1975.
- TEIXEIRA, A. A.; DIXON, J. R.; ZAHRADNIK, J. W. & ZINSMEISTER, G. E. *Computer optimization of nutrient retention in the thermal processing of conduction-heating foods*, Fd. Technol, 23: 845-850, 1969.
- TOWNSEND, C. T., *Spore-forming anaerobes causing spoilage in acid canned foods*, Fd. Research, 4: 231-237, 1939.
- VAMOS-VIGYÁZÓL *Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables*, Critic. Rev. Fd. Sci. Nutr., 15 (1): 49-127, 1981.
- VARDA, K.; GOLDSCHIDT, S.; AMIR, J. & GRANNIT, R. *Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase*, J. Fd. Sci., 46: 756-764, 1981.
- VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M. & PILNIK, W. *Purification and some characteristics of two pectinesterase isoenzymes from Orange*, Lebensm Wiss U-Technol, 11: 267-274, 1978.
- VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M.; SPAANSEN, C. H. & PILNIK, W. *Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties multiple pectinesterases from orange*, J. Fd. Sci. 45: 969-998, 1980.

WHITAKER, J. R. *Effect of temperature on enzyme-catalysed reactions*, in: *Principles of enzymology for the food science*: Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 319-349, 1972.

WICKER, L. & TEMELLI, F. *Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp*, J. Fd. Sci., 53 (1): 162-164, 1988.

YAMAMOTO, H. Y.; STEINBERG, M. P. & NELSON, A. T. *Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn*, J. Fd. Sci., 27: 113-119, 1962.