

N.A. Michael Eskin
Fereidoon Shahidi

BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS

3ª EDIÇÃO


CAMPUS

Adquirido em

www.mercadolivre.com.br

Vendedor: GFS-USA

**Clique aqui para obter novos
títulos**

Bioquímica de Alimentos

3ª Edição

N. A. Michael Eskin e Fereidoon Shahidi

TRADUÇÃO DE
Claudia Coana
Yara Marina Joanna

REVISÃO TÉCNICA
Professora Doutora Hélia Harumi Sato
Departamento de Ciência de Alimentos
Bioquímica de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Professora Doutora Gabriela Alves Macedo
Departamento de Alimentos e Nutrição
Bioquímica de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP



Do original: *Biochemistry of Foods*
Tradução autorizada do idioma inglês da edição publicada por Elsevier
Copyright © 2013, by Elsevier Inc.

First edition 1971
Second edition 1990
Third edition 2013
© 2015, Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados e protegidos pela Lei nº 9.610, de 19/02/1998.
Nenhuma parte deste livro, sem autorização prévia por escrito da editora, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.

Revisão: Hugo de Lima Corrêa
Editoração Eletrônica: Estúdio Castellani
Epub: SBNigri Artes e Textos Ltda.

Elsevier Editora Ltda.
Conhecimento sem Fronteiras
Rua Sete de Setembro, 111 – 16º andar
20050-006 – Centro – Rio de Janeiro – RJ – Brasil

Rua Quintana, 753 – 8º andar
04569-011 – Brooklin – São Paulo – SP – Brasil

Serviço de Atendimento ao Cliente
0800-0265340
atendimento1@elsevier.com

Consulte nosso catálogo completo, os últimos lançamentos e os serviços exclusivos no site www.elsevier.com.br

ISBN: 978-85-352-7164-5
ISBN (versão eletrônica): 978-85-352-8362-4
Edição original: ISBN: 978-0-12-242352-9

Nota: Muito zelo e técnica foram empregados na edição desta obra. No entanto, podem ocorrer erros de digitação, impressão ou dúvida conceitual. Em qualquer das hipóteses, solicitamos a comunicação ao nosso Serviço de Atendimento ao Cliente, para que possamos esclarecer ou encaminhar a questão. Nem a editora nem o autor assumem qualquer responsabilidade por eventuais danos ou perdas a pessoas ou bens, originados do uso desta publicação.

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

Eskin, Michael
Bioquímica de alimentos/Michael Eskin, Fereidoon Shahidi; tradução Claudia Coana, Yara Marina Joanna. – 3.
ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
il.; 28 cm.

E73b
3. ed. Tradução de: *Biochemistry of foods*
Inclui bibliografia
ISBN 978-85-352-7164-5

1. Alimentos – Composição. 2. Bioquímica. I. Shahidi, Fereidoon. II. Título.

15-
21092

CDD: 641.3
CDU: 641.5

Dedicamos este livro a:

Dr. H. Michael Henderson, caro amigo e colega com quem escrevi a primeira edição de *Bioquímica de alimentos*, em 1971, que faleceu em 2009.

Colaboradores

MICHEL ALIANI Departamento das Ciências da Nutrição Humana, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá

PETER ECK Departamento de Ciências da Nutrição Humana da Universidade de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá

N.A. MICHAEL ESKIN Departamento de Ciências da Nutrição, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá

H. DOUGLAS GOFF Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá

JUAN HE Departamento de Ciência dos Alimentos e Tecnologia, Universidade do Estado de Oregon, Corvallis, Oregon, Estados Unidos

ARTHUR R. HILL Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá

CHI-TANG HO Departamento de Ciência dos Alimentos, Cook College, Universidade Rutgers, New Brunswick, Nova Jersey, Estados Unidos

ERNST HOEHN Estação de Pesquisa Federal da Suíça, Suíça

PRASHANTI KETHIREDDIPALLI Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá

HERMAN LUTTERODT Departamento de Ciência da Nutrição e dos Alimentos, Universidade de Maryland, College Park, Maryland, Estados Unidos

YOSHINORI MINE Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá

MICHAEL C. QIAN Departamento de Ciência dos Alimentos e Tecnologia, Oregon, Universidade do Estado de Oregon, Corvallis, Oregon, Estados Unidos

CHRISTIANE QUEIROZ Departamento da Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

KAREN M. SCHAICH Departamento de Ciência da Nutrição, Universidade de Rutgers, New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos

FEREIDOON SHAHIDI Departamento de Bioquímica, Universidade Memorial de Newfoundland, St. John, Newfoundland, Canadá

MARGARET SLAVIN Departamento de Estudos de Nutrição e Alimentos, Universidade George Mason, Fairfax, Virginia, Estados Unidos

GRAHAM G. STEWART GGStewart Associados, 13 Heol Nant Castan, Rhiwbina, Cardiff, Reino Unido

VERA LÚCIA VALENTE MESQUITA Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

PEDRO VAZQUEZ-LANDAVERDE CICATA-IPN, Unidade Queretaro, Colônia Colinas del Cimatario, Queretaro, México

MONICA WHENT Departamento de Ciência da Nutrição e de Alimentos, Universidade de Maryland, College Park, Maryland, Estados Unidos

LIANGLI YU Departamento de Ciência da Nutrição e de Alimentos, Universidade de Maryland, College Park, Maryland, Estados Unidos

HUA ZHANG Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade de Guelph, Guelph, Ontário, Canadá

YING ZHONG Departamento de Bioquímica, Universidade Memorial de Newfoundland, St. John, Newfoundland, Canadá

KEQUAN ZHOU Departamento de Ciência da Nutrição e dos Alimentos, Universidade do Estado do Wayne, Detroit, Michigan, Estados Unidos

Prefácio

Os progressos feitos desde a publicação da primeira edição de *Bioquímica de alimentos*, em 1971, foram extraordinários, fato evidenciado pela abordagem mais ampla observada na preparação da segunda edição, em 1990.

Na terceira edição, tentamos nos manter fiéis à segunda edição, atualizando, de modo significativo, alguns capítulos, adicionando vários capítulos novos e substituindo o capítulo sobre enzimas nos alimentos por tecnologia de DNA recombinante. É um verdadeiro privilégio e um prazer ter escrito um importante compêndio, que engloba toda minha carreira como bioquímico de alimentos. Fiquei especialmente feliz quando o Dr. Fereidoon Shahidi concordou em coeditar esta edição e, juntos, buscamos criar um livro que se destaca como um compêndio importante ou de referência, para ser utilizado por professores, estudantes e pesquisadores no importantíssimo e dinâmico campo da ciência dos alimentos.

Este livro foi organizado em quatro partes. A Parte I volta-se para as importantes transformações bioquímicas que ocorrem nos alimentos *in natura* e que influenciam sua qualidade. Além de discutir a bioquímica do envelhecimento dos cereais, no Capítulo 1, foi adicionada uma seção sobre leguminosas. O Capítulo 2 cobre as transformações bioquímicas pós-colheita de frutas e vegetais, com uma extensa discussão sobre o sabor e o armazenamento. O Capítulo 3 fornece uma discussão em profundidade das alterações *post mortem* responsáveis pela conversão de músculo em carne e em peixe comestíveis. O Capítulo 4 traz informações atuais sobre as complexas mudanças químicas envolvidas na biossíntese do leite. O Capítulo 5, o último da parte, apresenta importantes informações sobre as alterações bioquímicas associadas ao desenvolvimento dos ovos. O Capítulo 6 apresenta uma extensa revisão das reações do escurecimento não enzimático dos alimentos durante o processamento e o armazenamento. O Capítulo 7 detalha a bioquímica da fermentação da cerveja, e o Capítulo 8 fornece uma discussão detalhada dos processos bioquímicos envolvidos na produção de queijo e iogurte. O Capítulo 9 traz uma revisão sobre o processamento de óleos e a modificação das gorduras.

A Parte III enfoca áreas selecionadas associadas com a deterioração de alimentos. O Capítulo 10 apresenta uma revisão detalhada do escurecimento enzimático, enquanto o Capítulo 11 fornece uma revisão abrangente sobre a oxidação lipídica. No final desta parte, o Capítulo 12 oferece uma cobertura atualizada e revisada a respeito da formação de sabores indesejáveis no leite.

A Parte IV, a última, sobre Biotecnologia, traz uma extensa revisão das tecnologias de DNA recombinante no Capítulo 13.

Nesta edição, expressamos nossa profunda gratidão aos colegas de todo o mundo pelas inúmeras e importantes contribuições aos capítulos do livro. Também apresentamos nosso reconhecimento às nossas esposas por autorizarem as inúmeras horas gastas necessárias para organizarmos esta obra. Finalmente, gostaríamos de

reconhecer a enorme assistência editorial fornecida pela equipe da Elsevier, o que tornou possível sua finalização como um trabalho de amor.

N.A. Michael Eskin
Fereidoon Shahidi

Capa

Folha de Rosto

Créditos

Colaboradores

Prefácio

Parte I - Transformações bioquímicas em alimentos

Capítulo 1 – Cereais e leguminosas

Kequan Zhou,* Margaret Slavin,† Herman Lutterodt, Monica Whent,** N.A. Michael Eskin,‡ Liangli Yu****

Parte I: Cereais

I. Introdução

II. Estrutura dos grãos de cereais

III. Composição dos grãos de cereais

A. Amiloplastos

B. Grânulo de amido

C. Biossíntese do amido

D. Conversão de amido em sacarose nos grãos em desenvolvimento

E. Síntese do amido

F. Síntese de amido: Amilopectina

G. Corpos proteicos

H. Origem dos corpos proteicos

I. Classificação das proteínas vegetais

J. Prolaminas

K. Síntese de proteína

L. Lipídeos

IV. Germinação de cereais

- A. Mobilização de amidos de cereais por -amilase
- B. Biossíntese da -amilase durante a germinação
- C. Atividade da -amilase em cereais germinados
- D. Efeito da germinação na qualidade da farinha
- E. Tratamento do grão germinado: redução da -amilase
- F. Mobilização das proteínas durante a germinação
- G. Mobilização de lipídeos durante a germinação

V. Estocagem de grãos

- A. Respiração
 - 1. Efeito do teor de umidade
 - 2. Efeito da temperatura
- B. Armazenagem prolongada de grãos e farinha

Parte II: Leguminosas

I. Introdução

II. Estrutura das sementes das leguminosas

III. Composição das sementes das leguminosas

- A. Composição aproximada
- B. Proteínas
 - 1. Fixação de nitrogênio
 - 2. Classificação
 - 3. Estrutura e propriedades das proteínas
 - 4. Qualidade da proteína
- C. Carboidratos
 - 1. Visão geral
 - 2. Carboidratos insolúveis
 - 3. Carboidratos solúveis
 - 4. Conclusão
- D. Lipídeos
- E. Outros componentes de interesse
 - 1. Inibidores de enzimas
 - 2. Lectinas
 - 3. Lipoxigenase

IV. Efeitos da germinação

- A. Carboidratos
- B. Lipídeos
- C. Proteínas
- D. Vitaminas e minerais
- E. Fatores antinutricionais
 - 1. Atividade do inibidor de tripsina
 - 2. Ácido fítico

- F. Componentes nutracêuticos
- G. Qualidade sensorial dos alimentos

V. Efeitos da fermentação

VI. Armazenamento

- A. Respiração, umidade e temperatura
- B. Envelhecimento das sementes e qualidade dos alimentos
- C. Efeitos nas isoflavonas

Referências

Capítulo 2 – Frutas e vegetais

N.A. Michael Eskin,† Ernst Hoehnt†

I. Introdução

II. Respiração

- A. Frutas
- B. Vegetais
 - 1. Controle do aumento climatérico
 - 2. Controle enzimático

III. Início da maturação

IV. Biossíntese do etileno

- A. Metionina como um precursor do etileno
 - 1. O ciclo Yang, a reciclagem da metionina
 - 2. Metionina e biossíntese do etileno
- B. Regulação do etileno no amadurecimento das frutas
 - 1. ACC sintase e ACC oxidase
 - 2. Cianeto
 - 3. Ácidos orgânicos
 - 4. Peroxidação lipídica: lipoxigenase
 - 5. Galactose

V. Alterações da cor

- A. Alterações na clorofila durante a maturação
- B. Biossíntese da clorofila
 - 1. Fase 1: Do glutamato à clorofila
 - 2. Fase 2: Ciclo da clorofila
- C. Regulação da biossíntese da clorofila
- D. Degradação da clorofila: processamento e estocagem
- E. Carotenoides
 - 1. Alterações dos carotenoides durante o amadurecimento
 - 2. Degradação dos carotenoides: processamento e armazenamento
- F. Antocianinas
 - 1. Biossíntese de antocianinas
 - 2. Antocianinas: efeito do processamento

VI. Textura

A. Parede celular

1. Componentes da parede celular
2. Degradação da parede celular

VII. Sabor e aroma

A. Aroma

1. Aldeídos, álcoois e ésteres

B. Sabor

1. Conversão amido-açúcar
2. Ácidos orgânicos

VIII. Estocagem

A. Armazenamento pelo frio

B. Armazenamento em atmosfera controlada

C. Novos desenvolvimentos no armazenamento pós-colheita

Referências

Capítulo 3 – Carnes e peixes

N. A. Michael Eskin,‡ Michel Aliani,* Fereidoon Shahidi†

I. Introdução

II. A natureza do músculo

A. Estrutura

B. Citoesqueleto

1. Filamentos G
2. Filamentos intermediários

C. Tecido conectivo

1. Colágeno

III. Contração muscular

A. Regulação da contração muscular: troponina e tropomiosina

B. Mecanismo de ação da tropomiosina

C. ATP e a reação de Lohmann

D. Contração muscular em peixes

IV. Conversão dos músculos para carnes e peixes comestíveis

A. ATP e as mudanças no post mortem

B. Metabolismo do ATP no post mortem

C. Nucleotídeos de Adenosina e a desnaturação proteica

D. Glicólise no post mortem

E. pH no post mortem

F. Cinética da glicólise post mortem

G. Efeito da temperatura na glicólise durante o post mortem: encurtamento a frio

H. Efeito de estímulos elétricos na glicólise post mortem e a maciez

I. Pressurização no pré-rigor

J. Enzimas glicolíticas

K. Condições da carne pálida, macia e exsudativa (PSE) e escura, firme e seca (DFD)

1. PSE

2. DFD

L. Alterações post mortem nas proteínas de carnes e peixes

1. Capacidade de retenção de água

2. Proteômica e a capacidade de retenção de água

M. Maciez no pós-rigor

N. Mecanismo de amaciamento pós-rigor

1. Fator ativado por cálcio: a família calpaína

2. Calpastatina

3. Roteases lisossomais

4. Proteassomos

5. Proteômica e a maciez da carne

O. Citoesqueleto e a maciez da carne

1. Filamentos G

2. Filamentos intermediários

P. Efeito da pressurização na maciez

1. Tratamento a alta pressão

2. Ondas de choque de alta pressão

Q. Enzimas lisossomais e degradação do colágeno

V. Pigmentos da carne

A. Mioglobina

1. A estrutura primária das mioglobinas

2. Alterações da mioglobina na carne crua

3. Alterações da mioglobina e tensão de oxigênio

4. Efeito do pH, temperatura e sal na formação da metamioglobina

5. Enzimas endógenas da carne e a formação de metamioglobina

B. Pigmentos em peixes

C. Preservação dos pigmentos da carne

Referências

Capítulo 4 – Leite

N. A. Michael Eskin,§ H. Douglas Goff†

I. Introdução

II. Composição do leite

III. Componentes do leite

A. Lipídeos

1. A biossíntese da gordura do leite

2. Síntese dos ácidos graxos na glândula mamária

3. Síntese de ácidos graxos insaturados

B. Proteínas do leite

1. Caseínas

- 2. Características moleculares e estruturais das caseínas
- 3. Proteínas do soro do leite
- C. Micela da caseína
 - 1. Estrutura da micela de caseína
 - 2. Modelos de micelas de caseínas
- D. Biossíntese das proteínas do leite
- E. Lactose

Referências

Capítulo 5 – Componentes dos ovos nos sistemas alimentares

Yoshinori Mine, Hua Zhang¹

I. Introdução

II. Estrutura e componentes químicos dos ovos

- A. Estrutura dos ovos
 - 1. Estrutura da casca do ovo
 - 2. Estrutura da clara do ovo
 - 3. Estrutura da gema do ovo
- B. Composição química dos ovos
 - 1. Composição química da casca do ovo
 - 2. Composição química da clara do ovo
 - 3. Composição química da gema do ovo

III. Biossíntese dos ovos

- A. Introdução ao processo de formação do ovo
- B. Biossíntese da casca do ovo e mudanças bioquímicas relacionadas
 - 1. Regulação da biossíntese da casca do ovo
 - 2. Biomineralização da casca do ovo
- C. Biossíntese da clara ou albúmen do ovo
- D. Biossíntese da gema do ovo
 - 1. Formação da vitelogenina
 - 2. Síntese da lipoproteína de baixa densidade da gema
 - 3. Biossíntese das livetinas da gema

IV. Alterações nos componentes dos ovos induzidas pelo processamento de alimentos

- A. Desnaturação das proteínas dos ovos
- B. Alterações nas proteínas dos ovos durante sua preservação
 - 1. Efeitos do envelhecimento em ovos
 - 2. Efeitos do calor nos ovos
 - 3. Efeitos do congelamento de ovos
 - 4. Efeitos da irradiação nos ovos
- C. Alterações na funcionalidade das proteínas do ovo induzidas por processamento
 - 1. Efeitos da secagem por calor na gelificação
 - 2. Efeitos do calor e da formação de espuma
 - 3. Efeitos do calor na emulsificação
- D. Modificação da funcionalidade da proteína do ovo

1. Modificações químicas e físicas dos ovos
2. Melhoria das propriedades funcionais dos ovos utilizando as reações de Maillard

Referências

Parte II – Bioquímica dos alimentos processados

Capítulo 6 – Reações de escurecimento em alimentos

N. A. Michael Eskin,** Chi-Tang Ho,† Fereidoon Shahidi**

I. Introdução

II. Escurecimento não enzimático

- A. Reação de Maillard
 1. Reação de carbonilamina
 2. Mecanismo da reação de carbonilamina
 3. Rearranjo de Amadori
 4. Condições para a reação de Maillard

III. Formação de pigmentos

- A. Compostos da via de Amadori
- B. Vias alternativas
- C. Degradação de Strecker
 1. Reação de degradação de Strecker e a formação de acrilamida

IV. Compostos heterocíclicos

- A. Pirazina
- B. Pirróis
- C. Oxazóis e oxazolininas
- D. Tiazóis

V. Reação de Maillard – interações lipídicas

VI. Efeito dos polifenóis nos polímeros de Maillard

VII. Polímeros melanoidina-Maillard

VIII. Caramelização

- A. Degradação acídica
- B. Degradação alcalina
- C. Compostos aromáticos
- D. Anidridos de difrutose: um marcador de caramelização

IX. Oxidação do ácido ascórbico

X. Atividade antioxidante de produtos para escurecimento não enzimático

XI. Inibição do escurecimento não enzimático

- A. Temperatura
- B. Teor de umidade

- C. pH
- D. Empacotamento a gás
- E. Agentes bioquímicos
- F. Inibidores químicos
 - 1. Dióxido de enxofre/sulfitos
 - 2. Ácidos aspártico e glutâmico

Referências

Capítulo 7 – Bioquímica da cerveja

Graham G. Stewart††

I. Introdução

II. Malte e malteação

- A. Estrutura dos grãos

III. Maceração e fervura

IV. Composição do mosto

- A. Açúcares do mosto
- B. Efeito da pressão osmótica e do etanol na absorção da glicose, maltose e maltotriose do mosto
- C. Absorção de mosto com maltose e maltotriose: diferenças entre cepas de leveduras para cervejas tipo Ale e Lager
- D. Mosto com nitrogênio livre aminado
- E. Fermentação do mosto

V. Exoenzimas na fabricação da cerveja

- A. Adjuntos
- B. Fabricação de cerveja com cevada

VI. Separação do mosto e filtração da cerveja

VII. Conclusões

Agradecimentos

Referências

Capítulo 8 – Produtos lácteos: Queijos e iogurtes

Arthur R. Hill, Prashanti Kethireddipalli‡‡

I. Introdução

II. Composição do leite

III. Qualidade do leite

- A. Tipos de micro-organismos e sua atividade no leite
 - 1. Bactérias do ácido láctico
 - 2. Bactérias psicotróficas

- 3. Formadores de gases
- 4. Bactérias patogênicas
- B. Antibióticos
- C. Leite mastítico

IV. Química da coagulação do leite

- A. Coagulação enzimática do leite
- B. Coagulação ácida do leite

V. Culturas para queijos e iogurtes

- A. Funções das culturas para o queijo
- B. Classificação das culturas ácido lácticas
- C. Culturas secundárias e adjuntas
- D. Gerenciamento das culturas
 - 1. Culturas naturais
 - 2. Culturas iniciadoras mistas e definidas
 - 3. Manipulação das culturas nas fábricas
 - 4. Bacteriófagos

VI. Manufatura de queijos

- A. Controle da umidade
- B. Controle do pH
- C. Controle do cálcio
- D. Textura (corpo do queijo)
- E. Controle do sabor

VII. Bioquímica da maturação do queijo

- A. Metabolismo da lactose residual e o catabolismo do lactato e do citrato
- B. Lipólise e catabolismo dos ácidos graxos
- C. Proteólise e catabolismo de aminoácidos
 - 1. Coagulantes
 - 2. Proteases nativas do leite
 - 3. Bactérias de ácido láctico
 - 4. Catabolismo de aminoácidos
- D. Maturação controlada/acelerada do queijo e tecnologia do sabor do queijo
 - 1. Temperaturas elevadas na estocagem
 - 2. Processamento a alta pressão
 - 3. Maturação de queijos baseada em enzimas e tecnologia do sabor
 - 4. Culturas starter atenuadas
 - 5. Culturas adjuntas não iniciadoras
 - 6. Bactérias ácido-láticas geneticamente modificadas

VIII. Iogurtes

- A. Introdução a produtos lácteos fermentados
- B. Manufatura do iogurte
- C. Culturas iniciadoras dos iogurtes
- D. Bioiogurte
- E. Sabor do iogurte

Referências

Capítulo 9 – Processamento de sementes oleaginosas e modificação de gorduras

Fereidoon Shahidi

I. Introdução

II. Processamento de óleos comestíveis

- A. Remoção dos fosfolípidos: o processo de degomagem
- B. Refino
- C. Branqueamento
- D. Desodorização
- E. Winterização e hidrogenação

III. Modificação de gorduras

- A. Lipídeos estruturados e seus ácidos graxos constituintes
- B. Produção de lipídeos estruturados e especiais
- C. Lipídeos estruturados que contêm ácidos graxos poli-insaturados n-3
- D. Produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados n-3 a partir de óleos marinhos e óleos de algas
- E. Lipídeos estruturados e especiais com baixas calorias
- F. Os lipídeos modificados na promoção da saúde e na redução do risco de doenças
- G. Novos avanços na produção de conjugados de ácidos graxos e seus potenciais efeitos sobre a saúde

Referências

Parte III – Bioquímica dos alimentos deteriorados

Capítulo 10 – Escurecimento enzimático

Vera Lúcia Valente Mesquita, Christiane Queiroz

I. Introdução

- A. Aspectos históricos da polifenoloxidase

II. Características da polifenoloxidase

- A. Estrutura e sequência
- B. Mecanismo da reação
- C. Importância biológica da polifenoloxidase nas plantas
- D. Compostos fenólicos na matéria-prima alimentar
 - 1. Fenóis simples
 - 2. Ácidos fenólicos
 - 3. Derivados do ácido cinâmico
 - 4. Flavonoides
- E. Lacase
- F. Especificidade da polifenoloxidase

III. Polifenoloxidase em alimentos e no processamento de alimentos

- A. O papel da polifenoloxidase na fermentação do chá
- B. Camarões e outros crustáceos

IV. Controle ou inibição do escurecimento enzimático

- A. Exclusão do oxigênio
- B. Inibidores químicos da polifenoloxidase
- C. Processamento térmico
- D. Processamento com alta pressão
- E. Radiação gama
- F. Campo elétrico pulsado
- G. Outras tecnologias

Referências

Capítulo 11 – Oxidação lipídica

Karen M. Schaich,^{***} Fereidoon Shahidi,[†] Ying Zhong[†] e N. A. Michael Eskin^{**}

I. Introdução

II. Onde ocorre a oxidação dos lipídeos?

III. Como ocorre a oxidação lipídica?

A. Mecanismos da oxidação lipídica: a cadeia de radicais livres tradicional

1. Iniciação ($LH \rightarrow L\cdot$)
2. Propagação e ramificação
3. Processos de terminação

B. Mecanismos da reação: as múltiplas vias da reação

1. Abstração de hidrogênio
2. Rearranjo interno ou ciclização
3. Adição
4. Cisão
5. Desproporcionamento

C. Progressão e cinética da oxidação lipídica

1. Progressão da oxidação lipídica
2. Cinética da oxidação lipídica

IV. Que fatores controlam a oxidação lipídica?

A. Natureza dos lipídeos

1. Grau de insaturação
2. Ácidos graxos livres versus ésteres versus triacilgliceróis
3. Isômeros trans versus isômeros cis
4. Conjugação
5. Fosfolipídeos

B. Efeitos da superfície

C. Iniciadores e catalisadores

1. Radicais livres pré-formados
2. Metais
3. Enzimas
4. Hemes
5. Clorofila e outros pigmentos

D. Condições ambientais e solventes

1. Luz
2. Aquecimento
3. Água
4. Oxigênio

V. Quais são as consequências da oxidação lipídica?

A. Efeitos diretos causados por alterações nos lipídeos

1. Produção de odores e sabores desagradáveis, perda de sabor (flavor fade)
2. Degradação das membranas e alteração da estrutura dos lipídeos

B. Efeitos causados pela interação dos intermediários e produtos da oxidação lipídica com outras moléculas, com destaque para as proteínas

1. Reações dos radicais livres de lipídeos
2. Reações dos hidroperóxidos de lipídeos
3. Reações dos epóxidos de lipídeos
4. Reações dos aldeídos de lipídeos
5. Conexão entre as reações de cooxidação e o dano às proteínas

VI. Como a oxidação lipídica pode ser controlada?

A. Antioxidantes do tipo 1: agentes que impedem a produção de radicais livres

1. Quelantes de metais e formadores de complexos com metais
2. Os removedores de oxigênio singlete, em particular os carotenoides

B. Antioxidantes do tipo 2: compostos que eliminam radicais

1. Transferência de átomos de hidrogênio
2. Redução ou oxidação
3. Terminação de cadeias
4. Decomposição de radicais ou ROOH

C. Antioxidantes do tipo 3: fatores ambientais que limitam a oxidação

Referências

Capítulo 12 – Defeitos de sabor do leite

Juan He†††, Pedro Vazquez-Landaverde†, Michael C. Qian* e N. A. Michael Eskin**

I. Introdução

II. Defeitos de sabor do leite

A. Sabores lipolisados

1. Métodos para a determinação dos ácidos graxos livres
2. Propriedades sensoriais dos ácidos graxos livres

B. Lipases do leite

1. Lipólise do leite
2. Defeitos de sabor produzidos por micro-organismos
3. Defeito de sabor – Sabor proteolisado

C. Defeito de sabor – Sabor oxidado

D. Defeito de sabor – Sabor de peixe

E. Defeitos de sabor induzidos pela luz

F. Defeitos de sabor induzidos pelo aquecimento

G. Processamento não térmico e formação de sabores indesejados

Referências

Parte IV – Biotecnologia

Capítulo 13 – As tecnologias do DNA recombinante nos alimentos

Peter Eck

I. Introdução

II. Cultivos de plantas geneticamente modificadas

- A. Transformação genética de plantas para cultivo
- B. Expressão eficaz de genes em plantas para cultivo
- C. Plantas geneticamente modificadas da cadeia alimentar
- D. Plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos
 - 1. Plantas que expressam a toxina do *Bacillus thuringiensis*
 - 2. Proteínas Cry: modo de ação
 - 3. Toxinas do *Bacillus thuringiensis*: impacto sobre o ambiente e a saúde
 - 4. Plantas comerciais com proteínas do *Bacillus thuringiensis*
- E. Plantas tolerantes a herbicidas
 - 1. Tolerância ao herbicida glifosato
 - 2. Transgenes da 5-Enolpiruvil-3-Ácido fosfochiquímico sintase tolerante ao glifosato
 - 3. Glifosato oxidorreductase
 - 4. Tolerância ao herbicida glufosinato
 - 5. Fosfinotricina acetiltransferase
 - 6. Tolerância ao herbicida bromoxinil
- F. Esterilidade masculina: o sistema dos genes barstar e barnase
- G. Plantas com resistência a vírus patógenos
 - 1. Mecanismo da resistência das plantas a vírus patógenos
 - 2. Comercialização de plantas transgênicas resistentes a vírus
 - 3. Perfis nutricionais alterados em plantas transgênicas

III. Micro-organismos geneticamente modificados e produtos derivados destinados a uso alimentar

- A. Produtos que contêm ou que são os próprios micro-organismos geneticamente modificados com capacidade de multiplicação
 - 1. Levedura modificada para reduzir o sulfeto de hidrogênio de alimentos e bebidas fermentados
 - 2. Levedura modificada para a redução do carbamato de etila nas bebidas fermentadas
 - 3. Levedura modificada para a fermentação maloláctica

IV. Enzimas e proteínas comerciais, oriundas de micro-organismos geneticamente modificados, destinadas à indústria alimentícia

- A. Acetolactato descarboxilase
- B. Aminopeptidase
- C. Amilases
 - 1. α -Amilases
 - 2. β -Amilases
 - 3. Amilase maltogênica
 - 4. γ - Amilases
 - 5. Pululanases

6. Amilases formadoras de maltotetraose

7. Glicosiltransferase ramificante

D. Asparaginase

E. Proteinase aspártica

F. Aspergillopepsina I/Protease ácida fúngica

G. Carboxipeptidases

H. Celulase

I. Ciclodextrina glucanotransferase

J. Quimosina

K. Glicose oxidase

L. Glicerofosfolípido colesterol aciltransferase

M. Hexose oxidase

N. Proteína estruturadora de gelo

O. Lacase

P. Lipases

1. Fosfolipase A1

2. Fosfolipase A2

3. Fosfolipase C

4. Triacilglicerol lipases

Q. Pectinesterase

R. Pectina liase

S. Fitases

T. Transglicosidase

U. Xilanase

Referências

Notas

Parte I

Transformações bioquímicas em alimentos *in natura*

Cereais e leguminosas

Kequan Zhou,^{*} Margaret Slavin,[†] Herman Lutterodt,^{**} Monica Whent,^{**} N.A. Michael Eskin,[‡] Liangli Yu^{**}

PARTE I: CEREAIS

I. INTRODUÇÃO

Os cereais são membros da grande família das monocotiledôneas, as Gramíneas, que consistem principalmente em trigo, milho, cevada, arroz e sorgo (Anderson *et al.*, 2000). Alimentos ricos em cereais têm sido a base da alimentação para a população mundial por séculos. Os grãos de cereais contêm os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) requeridos para o crescimento e o sustento da humanidade, contribuindo com cerca de 70% e 50% do total de calorias e proteínas, respectivamente (Topping, 2007). Grãos de cereais também são fontes de vitaminas e minerais importantes e de outros micronutrientes essenciais para uma ótima saúde. Eles ainda fornecem 20% de magnésio e zinco, 30% a 40% de carboidratos e ferro, 20% a 30% de riboflavina e niacina e mais de 40% de tiamina das dietas (Marston e Welsh, 1980). A produção mundial de cereais *per capita* alcançou cerca de 280 kg/ano na primeira metade do século XX, como pode ser visto na Figura 1.1 (Gilland, 2002). Estima-se que a produção mundial de cereais atinja 3.555 milhões de toneladas, com produção *per capita* de 378 kg (Gilland, 1998). Alimentos com base em cereais, especialmente grãos inteiros, têm demonstrado potencial para promover a saúde e reduzir o risco de várias doenças crônicas, como doenças coronarianas, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (Truswell, 2002; Montonen *et al.*, 2003; Slavin, 2000; Slavin *et al.*, 1999). Esses efeitos benéficos são atribuídos a numerosos compostos fitoquímicos contidos nos grãos. Este capítulo, portanto, vai discutir as alterações bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento, a germinação e a estocagem de grãos de cereais, com foco especial no trigo.

II. ESTRUTURA DOS GRÃOS DE CEREAIS

Os diversos tecidos que constituem as sementes de cereais são geralmente descritos quanto a estrutura e origem do embrião (Evers *et al.*, 1999). A semente de cereais é composta de três tecidos principais: o embrião, o endosperma e a camada de aleurona (que envolve o endosperma de armazenamento). A ilustração do trigo na Figura 1.2 mostra essa estrutura, na qual o endosperma representa mais de 80% da massa do grão, enquanto as células de aleurona e o tecido do germe contendo o embrião e recoberto pelo escutelo correspondem a 15% e 3%, respectivamente. Os tecidos periféricos do grão que recobrem o endosperma amiláceo são constituídos, da superfície externa para a interna, de: pericarpo externo, pericarpo interno, casca da semente, camada de hialina e camada de aleurona (Barrona *et al.*, 2007). O germe é constituído de embrião e escutelo. As estruturas anatômicas de todos os grãos de cereais tendem a ser similares entre si, com algumas diferenças mínimas.

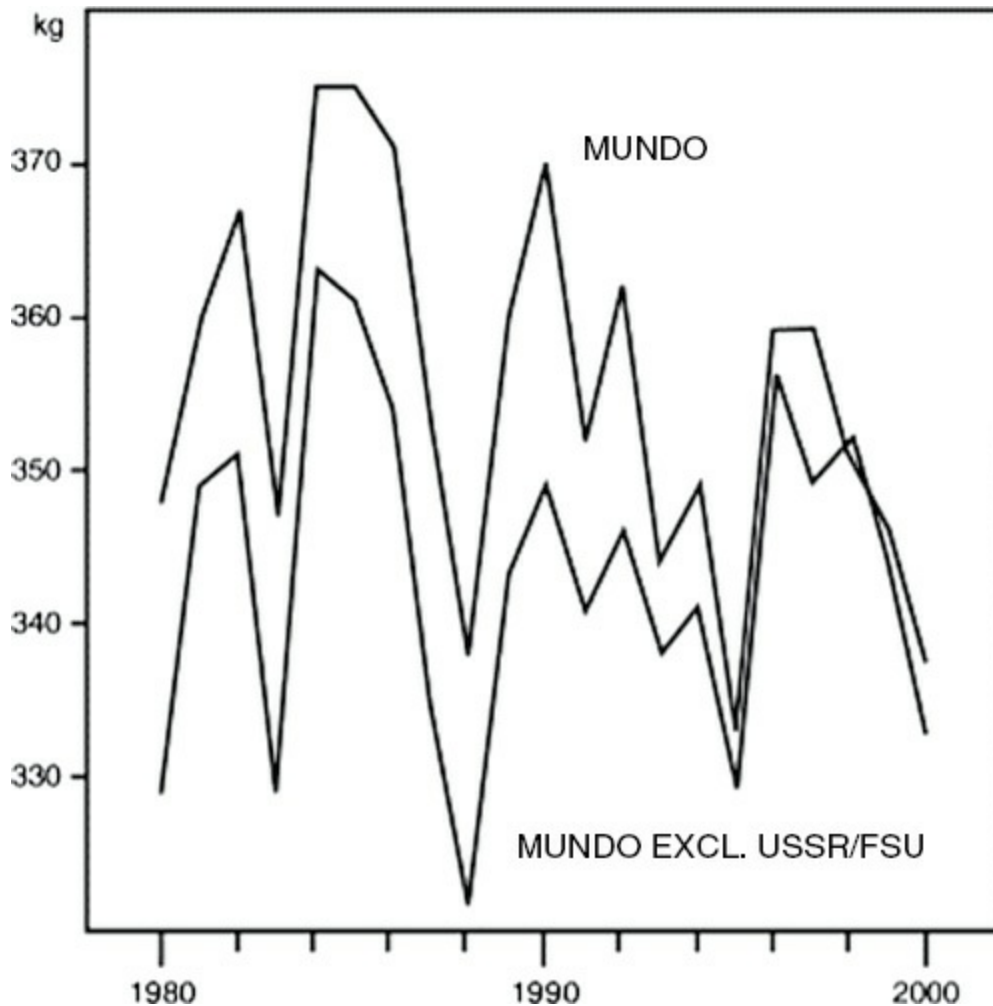


FIGURA 1.1 Produção de cereais *per capita* 1980–2000. Fontes: FAOSTAT; Escritório do Censo, Estados Unidos. Adaptado de Gilland (2002).

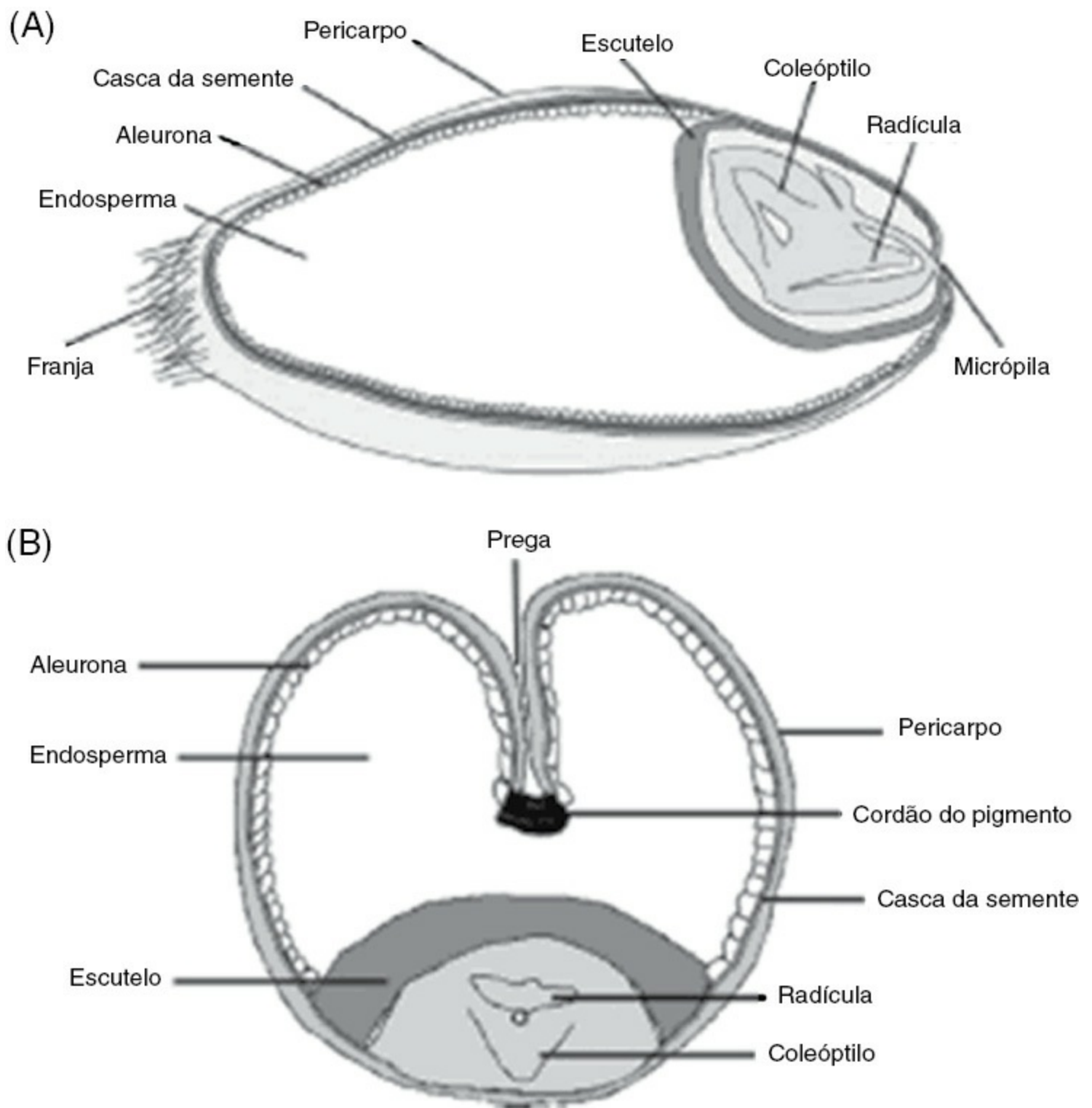


FIGURA 1.2 Diagrama do grão de trigo apresentando as estruturas principais em corte (A) longitudinal e (B) transversal. Rathjen *et al.* (2009); reprodução autorizada.

Os grãos de trigo e milho, por exemplo, são envoltos por uma película ou pericarpo e casca da semente ou testa, conjunto denominado de cariopses. No caso de cevada, aveia e arroz, porém, é encontrada uma camada adicional, que envolve a cariopse ou o núcleo do grão.

III. COMPOSIÇÃO DOS GRÃOS DE CEREAIS

Grãos de cereais são altamente nutritivos e seus principais componentes são proteínas (entre 10% e 15%) e amido (aproximadamente 60% a 70% do grão), além de polissacarídeos não amiláceos derivados da parede celular e que

constituem 3% a 8% do total (Saulniera *et al.*, 2007). A composição dos cereais depende muito da variedade do grão, das condições de crescimento, do cultivo e infecções (Tester, 1995). O endosperma amiláceo constitui a maior parte da semente do cereal e fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião durante a germinação. Os nutrientes tornam-se disponíveis através da liberação de enzimas da camada de aleurona e do embrião que hidrolisam as reservas do endosperma contidas em estruturas de armazenamento identificadas como grânulos de amido e corpos proteicos. Estes componentes têm grandes efeitos na escolha dos cereais pelas suas propriedades físico-químicas na moagem e no processamento dos alimentos. É importante notar que os carboidratos não digeríveis dos grãos de cereais têm recebido atenção cada vez maior como importante fonte de fibras nas dietas e apresentam impacto na qualidade nutricional além de efeitos benéficos na saúde (Salmeron *et al.*, 1997). Além disso, os polissacarídeos dos cereais estão associados a muitas outras substâncias, principalmente proteínas, polifenóis e fitatos, que podem modificar as ligações dos minerais pelas fibras dietéticas (Vitali *et al.*, 2008).

A. Amiloplastos

Amiloplastos são plastídeos ou organelas responsáveis pelo armazenamento dos grânulos de amido. A taxa da síntese do amido encontrado em grãos de cereais é um dos fatores que afetam o tamanho do grão e sua produção (Kumar e Singh, 1980). No endosperma maduro do trigo, da cevada e do centeio, o amido é encontrado em duas frações distintas de acordo com o tamanho dos grânulos. Os grânulos de amido primário ou tipo-A variam de 20 µm a 45 µm de diâmetro, enquanto os grânulos do tipo secundário ou tipo-B raramente excedem 10 µm de diâmetro (Evers, 1973). A análise da distribuição dos tamanhos dos grânulos de amido do endosperma do trigo, realizada por Evers e Lindley (1977), demonstrou que grânulos com menos de 10 µm de diâmetro correspondem a cerca de um terço do peso total do amido. A presença dos dois tipos de grânulos no grão de trigo foi confirmada por Baruch *et al.* (1979). Os autores observaram que o tamanho dos grânulos de amido era afetado por mudanças sazonais, assim como ocorre na produção dos grãos e na concentração de proteínas. Os grânulos de amido ocupam somente uma pequena fração do plastídio total durante o desenvolvimento inicial do grão; porém, atingem quase 93% na maturidade (Briarty *et al.*, 1979). No endosperma maduro, os grânulos de amido do tipo-A equivalem a apenas 3% do número total de grânulos. No entanto, representam de 50% a 70% do peso total em função do maior tamanho (Evers e Lindley, 1977). Os grânulos menores do tipo-B constituem 97% do total de grânulos, mas equivalem a apenas 25% a 50% do peso total.

Os grânulos de amido isolados também contêm proteínas, sendo que a maior parte pode ser removida por meio de lavagens sucessivas com água. Uma pequena parte das proteínas, porém, permanece associada ao grânulo. Lowy *et al.* (1981) evidenciaram que essa fração de proteínas pode ser extraída rapidamente com uma solução salina e sugeriram estar associada à superfície do grânulo de amido. Essa fração que pode ser extraída equivale a 8% do total de proteínas do grânulo de amido. A fração maior de proteína apresentou massa molecular de cerca de 30.000 Da e é encontrada nos dois tipos de grânulos de amidos, A e B. Baseada nas análises de aminoácidos, esta proteína é muito diferente daquela encontrada no glúten do trigo. Uma fração adicional de proteínas foi extraída de grânulos de amido do tipo-A, mas somente após a gelatinização na presença de sulfato de dodecil de sódio. Essa fração era muito diferente e, baseada na análise por eletroforese, considerou-se ser parte de componentes internos do grânulo.

B. Grânulo de amido

Seu formato é característico e dependente do gênero e da espécie (Ellis, 1998). O formato e o tamanho dos grânulos de amido variam em diferentes cereais (Tabela 1.1). A distribuição de tamanhos dos grânulos de amido

nos amiloplastos, a composição e suas propriedades se alteram durante o desenvolvimento. Os grânulos de amido grandes tipo-A de trigo, cevada e centeio são lenticulares, enquanto os de tipo-B, menores, são esféricos ou poliédricos. Os grânulos de amido de arroz, aveia e milho são irregulares e poliédricos em seus formatos, sendo os de arroz comparáveis em seu tamanho aos grânulos de amido tipo-B do trigo e da cevada, enquanto os de milho são maiores (Ellis, 1998). O amido é composto de amilose e amilopectina, sendo que o teor de amilose varia de 20% a 30% para a maioria dos amidos de cereais (Katz *et al.*, 1993). No caso de algumas variedades de milho, cevada e arroz, o amido é composto, quase exclusivamente, de amilopectina e é chamado de amido ceroso. Amido de milho com alto teor de amilose também é encontrado.

TABELA 1.1 Estrutura e conteúdo de amilose de alguns grânulos de amido de cereais

Fonte	Formato do grânulo	Tamanho do grânulo (nm)	Conteúdo de amilose (%)
Trigo	Lenticular ou redondo	20-25	22
Milho	Redondo ou poliédrico	15	28
Milho ceroso	Redondo	15 (5-15)	1
Alto teor de amilose	Redondo ou formato de salsicha irregular	25	52
Cevada	Redondo ou elíptico	20-25	22
Arroz	Poligonal	3-8	17-19 ^a 21-23 ^b
Aveia	Poliédrico	3-10	23-24

^a Japônica

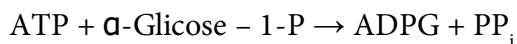
^b Índica

Fonte: Adaptado de Lineback (1984).

Parte da amilose no grânulo de amido está complexada com lisofosfolipídeos, como função do estágio de desenvolvimento do endosperma, durante o qual a amilose é formada (Morrison, 1993). Nos grânulos de amido do tipo-B esse processo dá-se mais tarde do que no desenvolvimento de grânulos do tipo-A. As proporções de amilose e de lisofosfolipídeos aumentaram tanto nos grânulos de amido de tipo-A quanto no tipo-B durante o desenvolvimento dos grãos de trigo e cevada (Morrison e Gadan, 1987; McDonald, 1991).

C. Biossíntese do amido

A sacarose é considerada a maior fonte de carbono na síntese do amido em endospermas de cereais e é convertida em amido por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas (Duffus, 1993). A síntese do amido é obtida pela ação da amido sintase que utiliza adenosina difosfatoglicose (ADPG) ou uridina difosfatoglicose (UPDG) como substrato (Recondo e Leloir, 1961). A ADPG parece ser a doadora de glicosil mais ativa, e é formada pela ação de ADPG-pirofosforilase (Preiss e Levi, 1979).



A quantidade de pirofosfato inorgânico (PP_i) em grãos em desenvolvimento é controlada pela enzima alcalina pirofosfatase inorgânica (EC 3.6.1.1). Esta enzima, que limita o acúmulo de PP_i , era considerada o fator controlador da síntese do amido, uma vez que PP_i inibia a ADPG-pirofosforilase em milho doce (Amir e Cherry, 1972). As atividades do ADPG-pirofosforilase e da pirofosfatase alcalina foram estudadas por Kumar e Singh (1983) durante o desenvolvimento do grão de trigo. Os resultados, mostrados na Figura 1.3, indicam que ambas as enzimas aumentaram regularmente alcançando seu máximo 28 dias após a antese, mas, em seguida, declinaram até a maturidade. O aumento rápido na atividade de pirofosfatase alcalina 14 dias depois da antese correspondeu ao período de síntese rápida do amido. A inabilidade dos metabólitos intermediários da conversão sacarose-amido para inibir a atividade da pirofosfatase alcalina eliminou qualquer atividade regulatória possível desta enzima na

biossíntese do amido.

D. Conversão de amido em sacarose nos grãos em desenvolvimento

A quantidade de açúcares livres formados durante o desenvolvimento do trigo foi examinada por Kumar e Singh (1981), em função do tamanho do grão e do conteúdo de amido. Seus resultados, resumidos na Figura 1.4, indicam que a sacarose alcançou o nível máximo 14 dias após a antese, e, então, diminuiu e estabilizou após 28 dias.

A síntese do amido foi muito baixa após 7 dias, porém aumentou significativamente depois de 14 dias e a ascensão continuou até 35 dias depois da antese. O rápido declínio da sacarose e dos açúcares redutores depois que a síntese de amido começou sugere o envolvimento de enzimas hidrolíticas, incluindo a invertase. Kumar e Singh (1980) observaram que a atividade dessa enzima diminuiu para níveis negligenciáveis após 21 dias, comparado ao rápido aumento da sacarose-UDP glicosil transferase (Figura 1.5). Esta última enzima, também conhecida como sacarose sintetase, catalisa o primeiro passo na formação de amido a partir da sacarose, como será descrito nesta seção. As atividades paralelas da sacarose-UDP glicosil transferase e a síntese do amido indicaram que esta enzima teve uma participação maior na hidrólise da sucralose. Kumar e Singh (1984) sugeriram que a função inicial da invertase é fornecer substratos para as vias metabólicas que geram compostos ricos em energia necessários para sustentar a alta atividade de divisão celular.

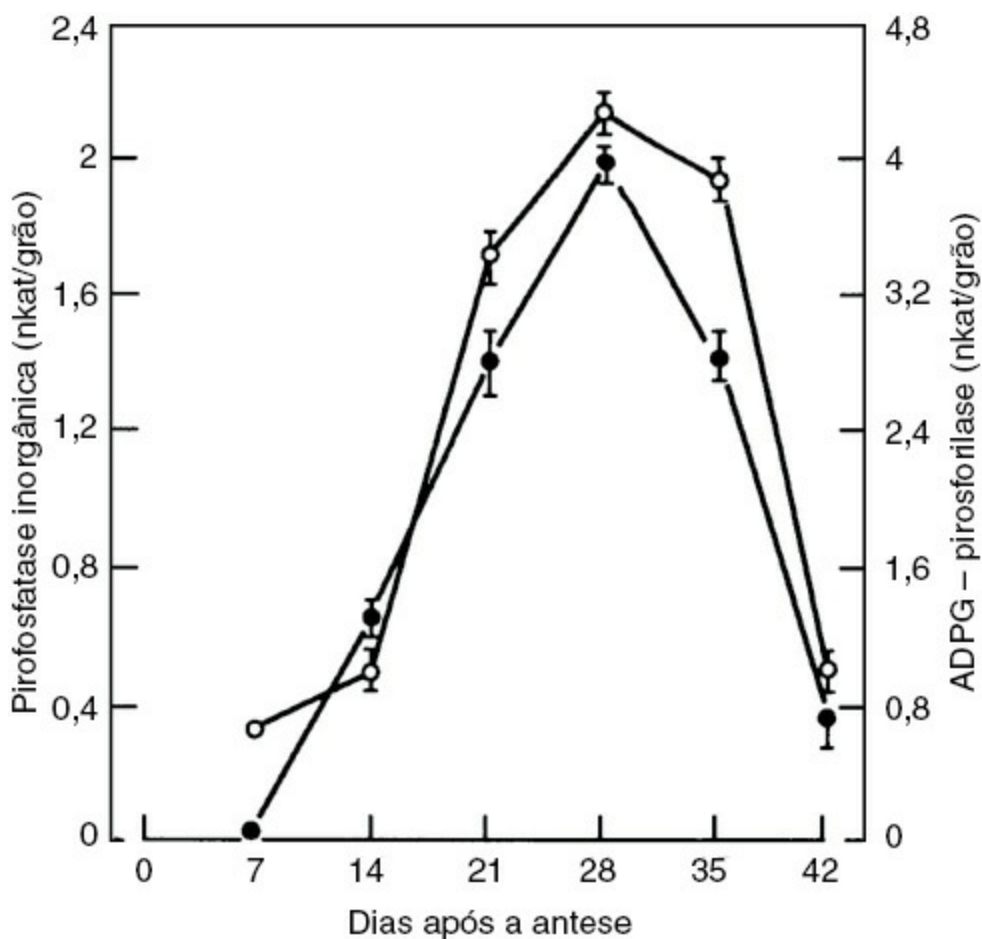


FIGURA 1.3 Atividade da pirofosfatase alcalina inorgânica (o) e ADGP-pirofosforilase (•) durante o desenvolvimento do grão de trigo. Kumar e Singh (1983).

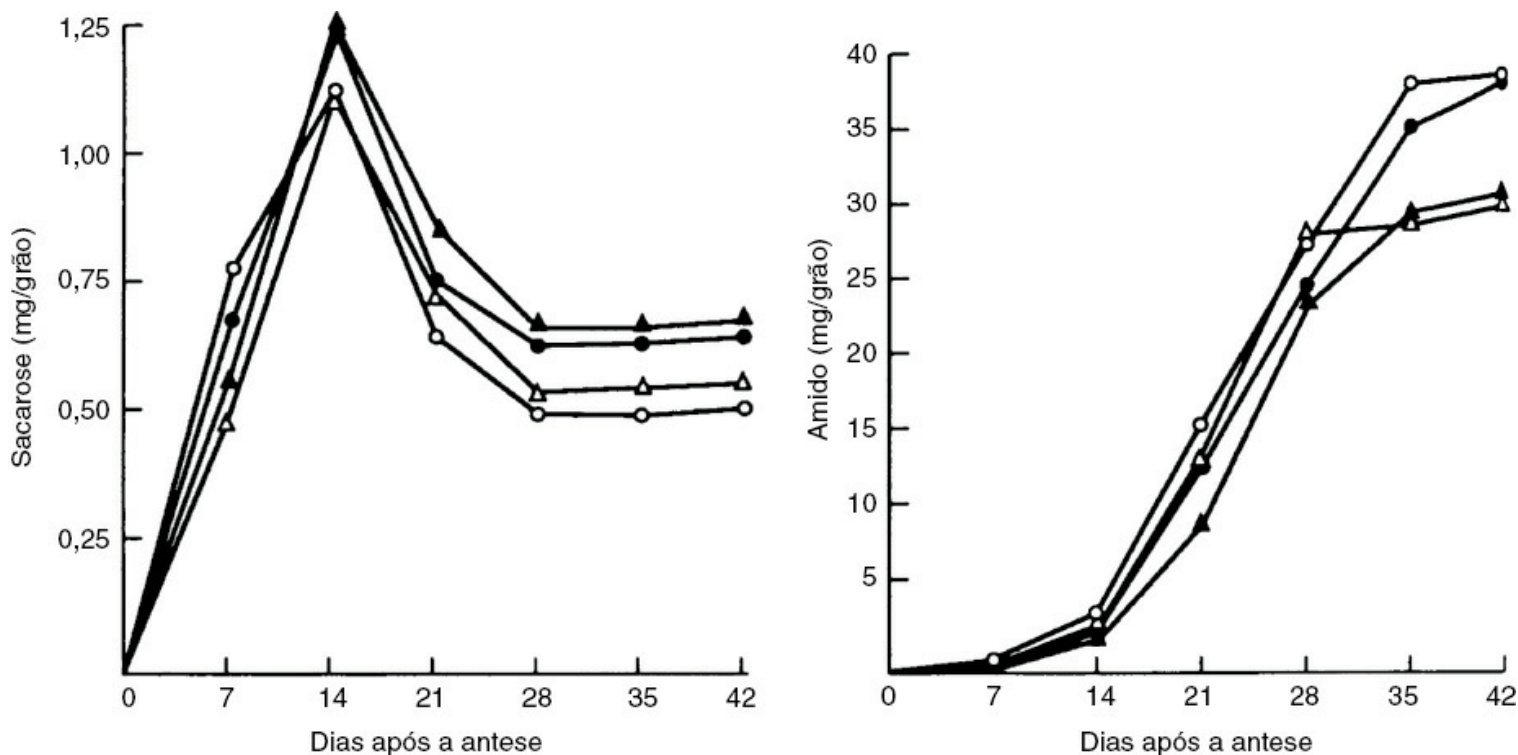


FIGURA 1.4 Alterações da sacarose e do amido (mg por grão) durante o desenvolvimento de quatro variedades de grãos de trigo. Kumar e Singh (1981).

Chevalier e Lingle (1983) relataram que a invertase insolúvel foi encontrada principalmente no pericarpo externo com pouca atividade no endosperma (Figura 1.6). Eles monitoraram a atividade da sacarose sintetase, localizada predominantemente no endosperma. Com núcleos de grãos inteiros de trigo, Kumar e Singh (1980) monitoraram a atividade de invertase nos estágios iniciais do desenvolvimento do grão, assim como a atividade da sacarose sintetase durante o amadurecimento do grão. Chevalier e Lingle (1983) localizaram um aumento de sacarose livre em núcleos de cevada e trigo maduros, resultado consistente com pesquisa anterior realizada com trigo (Cerning e Guilbot, 1973), cevada (Laberge *et al.*, 1973) e arroz (Singh e Juliano, 1977). O grande aumento da concentração de sacarose, observado por Lingle e Chevalier (1980), no fragmento de endosperma, foi acompanhado por uma diminuição da atividade de sacarose sintetase. Este declínio da atividade da sintetase foi considerado um fator importante no controle do conteúdo do grão, e parece ser responsável pelo acúmulo de sacarose em espaços extracelulares, como a cavidade do endosperma, uma vez que o endosperma encontrava-se incapacitado de utilizar a nova sacarose. O efeito geral era de evitar que mais sacarose entrasse no núcleo.

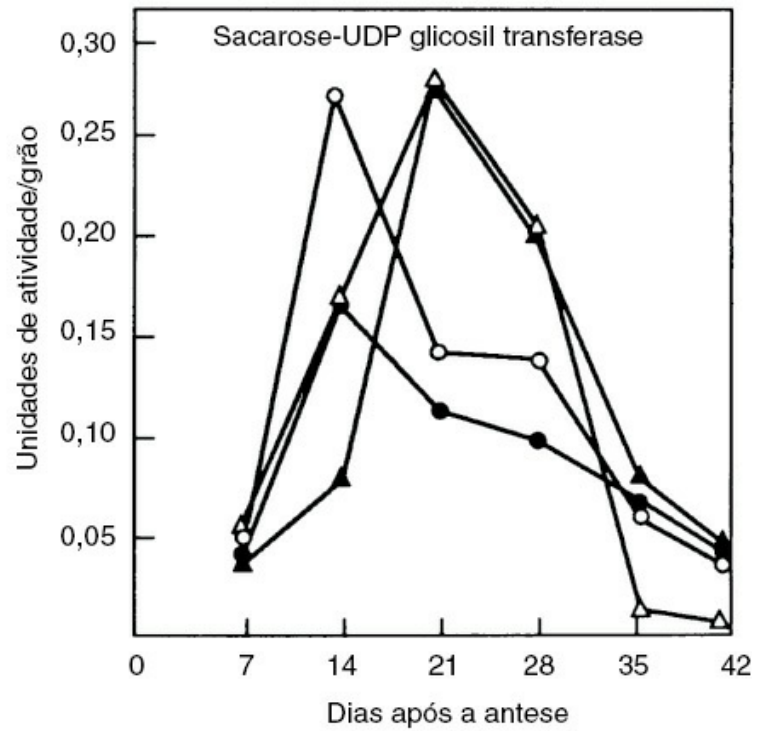
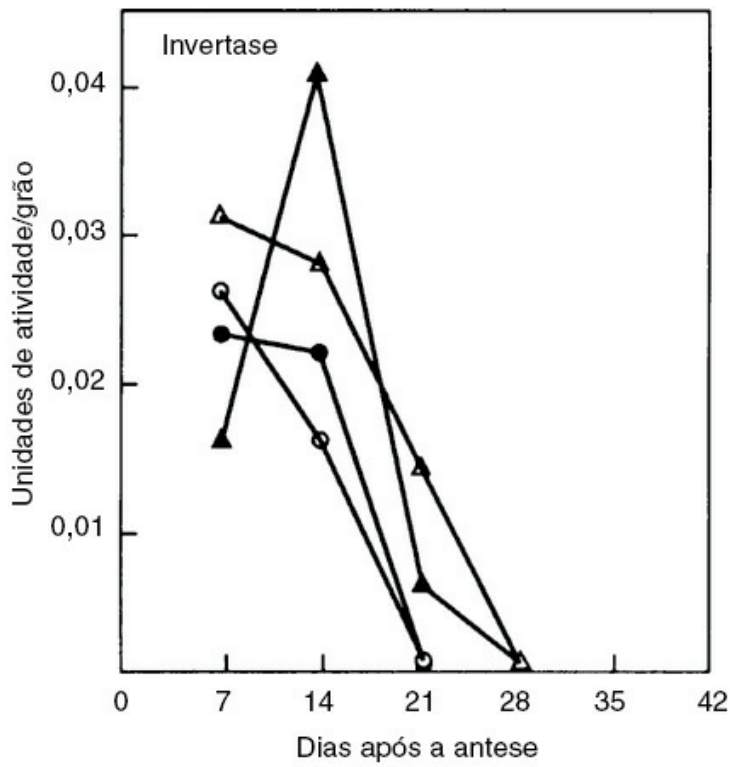


FIGURA 1.5 Alterações na invertase e sacarose-UDP glicosil transferase durante o desenvolvimento de grãos de trigo. *Kumar e Singh (1980).*

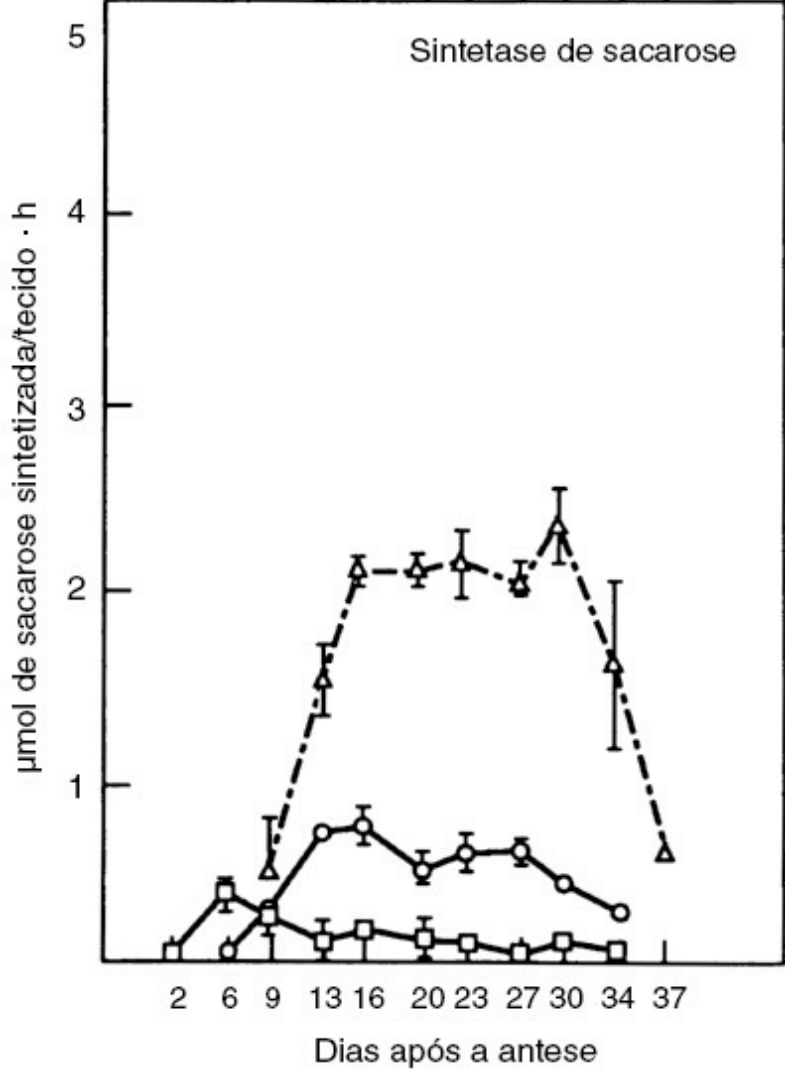
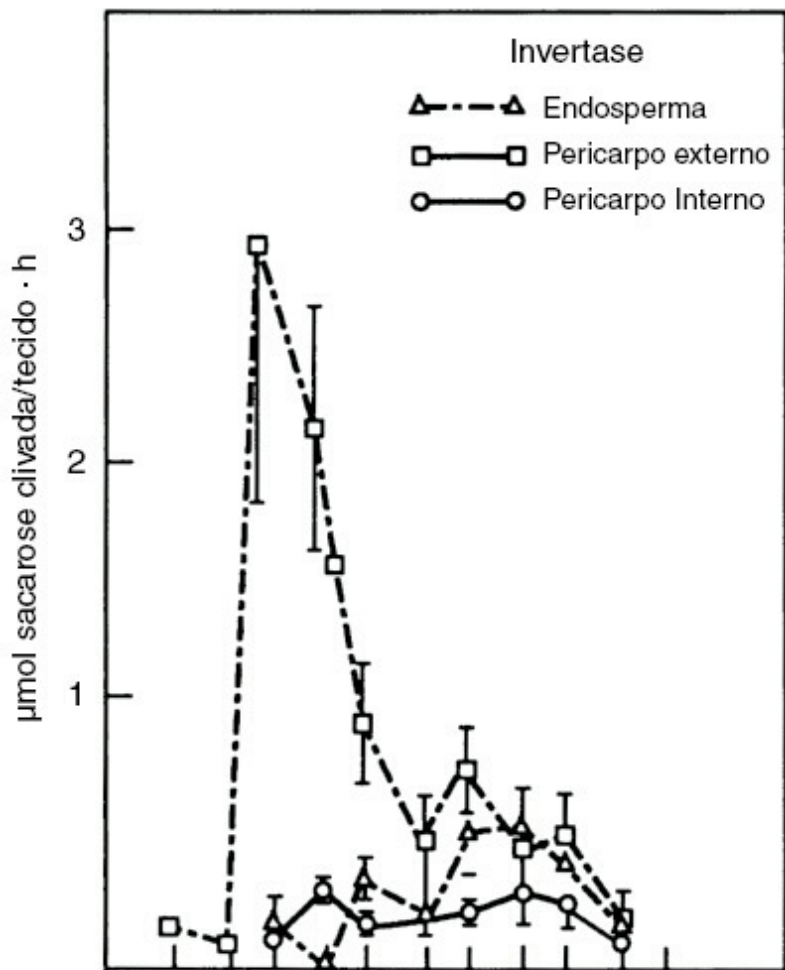
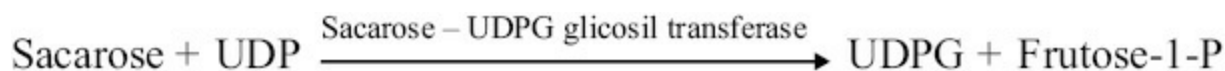


FIGURA 1.6 Distribuição das atividades da invertase e sacarose sintetase no endosperma e pericarpo de grãos de trigo em desenvolvimento. Reproduzida de Chevalier e Lingle (1983).

Kumar e Singh (1984) confirmaram o acúmulo de sacarose em até 14 dias após a antese, o que representa rápida realocação das partes fotossintéticas para o endosperma do trigo, seguido pela síntese ativa de amido. Trabalhos anteriores de Chevalier e Lingle (1983) haviam demonstrado o movimento da sacarose do floema ao endosperma durante o desenvolvimento dos núcleos do trigo e da cevada. Utilizando fatias de endosperma do trigo, Rijven e Gifford (1983) também observaram que a sacarose é o substrato preferido para a síntese de amido, já que não havia sido hidrolisado antes de ser absorvido pelo endosperma.

E. Síntese do amido

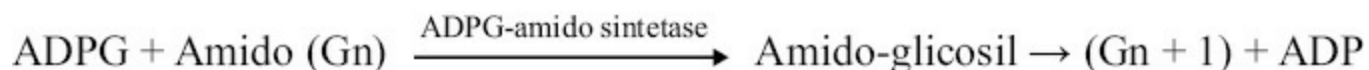
A síntese do amido *in vivo* envolve a enzima fosforilase ou a sintetase conduzindo à formação do polímero linear de amilose. Depois que a sacarose penetra no endosperma, ele se transforma no ponto de partida para a síntese da amilose. O primeiro passo envolve a conversão de UDPG pela sacarose sintetase (sacarose-UDP glicosil transferase):



Depois, a frutose-1-P é convertida em glicose-1-P pela fosfoglicoisomerase, hexoquinase e fosfoglicomutase. Glicose-1-P é metabolizada para ADPG por ADPG-pirofosforilase:



A ausência de PP_i detectável sugere que ele é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase, uma vez que, como já foi mencionado, ele é um potente inibidor de ADPG-fosforilase (Amir e Cherry, 1971). A síntese da amilose, como discutido anteriormente, pode ser diretamente mediada pela amido sintetase envolvendo o UPDG ou, de maneira indireta, pela ADPG amido-sintetase para ADPG por meio da glicose-1-P:



No entanto, parece que a reação que utiliza ADPG é a via preferencial para a biossíntese do amido em grãos de trigo em desenvolvimento (Kumar e Singh, 1984). Nesta reação, a glicose é repetidamente transferida do ADPG para uma pequena cadeia de glucana, até que uma cadeia alongada de amido seja formada. A quantidade extremamente pequena de glicose-1-P no grão em desenvolvimento sugere que ela é utilizada com rapidez e indica, portanto, uma possível função regulatória da fosfoglicomutase, a enzima responsável pela sua formação na biossíntese do amido. Kumar e Singh (1984) demonstraram definitivamente que o término do acúmulo de amido em grãos de trigo maduros ocorre em função da perda da capacidade de síntese do endosperma e não por falta de sacarose.

Joshi *et al.* (1980) tentaram explicar a regulação da biossíntese do amido no milho normal e no tipo Opaco-2 durante o desenvolvimento do endosperma. O milho do tipo Opaco-2 é muito superior em termos nutricionais, apesar de produzir menor quantidade de grãos e ter conteúdo de amido e proteína inferiores. Os pesquisadores monitoraram a atividade da sacarose-UDP glicosil transferase, glicose 6-fostato cetoisomerase e ADPG-amido glicosil transferase solúvel e ligada no desenvolvimento do endosperma durante 30 dias após a polinização. Exceto pela sacarose-UDP glicosil transferase, todas as outras enzimas estavam em menor concentração no milho Opaco-2, se comparado com o milho normal durante os últimos estágios do desenvolvimento do endosperma. A atividade mais baixa dessas enzimas foi responsável pela quantidade reduzida de amido no milho Opaco-2, que continha 15% menos amido no endosperma. Este processo foi acompanhado por diminuição da síntese proteica

no endosperma de milho tipo Opaco-2, fato que esclarece a reduzida atividade de síntese de enzimas durante os estágios posteriores do desenvolvimento do endosperma.

F. Síntese de amido: Amilopectina

A biossíntese da cadeia ramificada de amilopectina requer a formação de amilose via fosforilase ou sintetase, como descrito na seção anterior. Os pontos de ramificação na posição α -(1,6)-d-ligação glicosídica são introduzidos na amilopectina pela enzima ramificadora enzima-Q (EC 2.4.1.18). Borovsky *et al.* (1979) concluíram que a introdução dos pontos de ramificação em 1,6 é um processo randômico no qual a enzima-Q interage com duas cadeias de glucana 1,4 mantidas unidas na conformação de dupla hélice.

A amilose e a amilopectina são sintetizadas ao mesmo tempo na razão de 1:4 em amidos normais (Robyt, 1984). Muitas hipóteses foram desenvolvidas para esclarecer a simultaneidade da amilose e da amilopectina no grânulo de amido, apesar de nosso entendimento da biossíntese do amido permanecer incompleta (Erlander, 1958; Geddes e Greenwood, 1969; Marshal e Whelan, 1970). Uma das hipóteses sugere que um mecanismo opera para proteger o polímero linear da enzima ramificadora (Whela, 1958; 1963). A participação de fosfolipídeos na regulação da síntese da amilopectina foi formulada por Vieweg e De Fekete (1976), uma vez que os fosfolipídeos inibem a ação da enzima ramificadora. Assim, somente a amilose, sem fosfolipídeos agregados a ela, pode, teoricamente, ser convertida, apesar deste fato ainda não ser comprovado. Outra hipótese, já discutida, é a possível especificidade da enzima ramificadora pela conformação em dupla hélice envolver as cadeias de amilopectina mais curtas (Borovsky *et al.*, 1979; Robyt, 1984).

G. Corpos proteicos

Corpos de proteína são organelas unidas às membranas celulares, que contêm proteínas de reserva no endosperma amiláceo dos cereais (Pernollet, 1978; 1982). Eles também são encontrados na camada de aleurona, apesar de possuírem composição, estrutura e funções diferentes das anteriores. Enquanto os corpos de reserva de proteínas do endosperma exercem somente a função de armazenamento, os da camada de aleurona desempenham funções sintéticas e de secreção (Simmons e O'Brien, 1981). Os corpos de proteínas da camada de aleurona possuem diâmetro de 2 μ m a 4 μ m com inclusões globoides e cristalinas. Tais diferenças foram confirmadas em trigo, cevada, milho e arroz pelo exame de suas diferenças ultraestruturais, conforme indicado na Tabela 1.2.

Em tipos da espécie *Triticum*, corpos de proteínas desaparecem quando os grãos ficam maduros, como foi observado em sementes de trigo (Simmonds, 1972; Pernollet e Mossé, 1983) e em sementes de centeio (Parker, 1981). Tal fato resulta na conversão dos grânulos de proteínas esféricos em massas de proteínas com formatos irregulares que, por sua vez, dão origem à matriz proteica, que não estão mais unidas pela membrana que se encontrava entre os grânulos de amido.

H. Origem dos corpos proteicos

A origem dos corpos proteicos no endosperma ainda não foi esclarecida. A opinião da maioria dos pesquisadores é de que surgem do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Campbell *et al.*, 1981; Mifflin *et al.*, 1981; Mifflin e Burgess, 1982; Parker e Hawes, 1982), apesar de Bechtel *et al.* (1982a; 1982b) afirmarem que são secreções de proteínas de reserva no trigo. Independente do mecanismo sugerido, a iniciação e a formação dos corpos proteicos envolvem uma ativa participação do Complexo de Golgi. Pernollet e Camilleri (1983) examinaram a formação e o desenvolvimento dos corpos proteicos no endosperma do trigo e descobriram que os polipeptídeos armazenados

em todos os corpos proteicos são similares. Em pesquisa anterior feita por Tanaka *et al.* (1980), há a sugestão de que somente um tipo de proteína era armazenado no endosperma do trigo.

A presença de todas as células de armazenagem de proteínas nos corpos proteicos, no entanto, indicava uma via de síntese comum em operação nas sementes de trigo. Os polipeptídeos nas estruturas de proteína eram similares àsquelas presentes no retículo endoplasmático, sugerindo, assim, que as proteínas de reserva eram proteínas secretórias liberadas no retículo endoplasmático antes de serem deslocadas para os corpos proteicos. Este modelo entrava em conflito com o proposto por Bechtel *et al.* (1982a; 1982b) para a síntese de gliadina solúvel, entretanto era coerente com os estudos feitos por Greene (1981) e Donovan *et al.* (1982). Estes pesquisadores afirmavam que os RNAs do mensageiro que codificavam as moléculas de gliadina transformavam-se em polissomos ligados ao retículo endoplasmático.

Três estágios diferentes foram percebidos por Pernollet e Camilleri (1983) durante o desenvolvimento dos corpos proteicos do trigo. O estágio inicial envolveu a síntese das proteínas de estocagem e sua associação com pequenas vesículas em estruturas de 5-10 μm no primeiro mês após a antese. No segundo estágio, a formação de pequenos corpos proteicos diminuiu, e eles se juntaram e formaram corpos muito maiores (50-100 μm). A instabilidade da membrana dos grandes corpos proteicos e a pressão mecânica dos grânulos de amido em desenvolvimento provocaram o rompimento da membrana e a consequente liberação dos corpos proteicos para o interior da matriz de proteína. A perda dos corpos proteicos e a formação da matriz de proteínas caracterizam o estágio final de desenvolvimento do endosperma de trigo maduro. O modelo proposto por Pernollet e Camilleri (1983), na Figura 1.7, resume a sequência de eventos que conduzem à formação de corpos proteicos no trigo e seu eventual rompimento.

TABELA 1.2 Diferenças ultraestruturais entre corpos proteicos da camada de aleurona e do endosperma amiláceo

Espécies	Camadas de aleurona		Endosperma	
	Diâmetro (μm)	Estruturas	Diâmetro (μm)	Estruturas
Trigo	2-3	Dois tipos de inclusões	0,1-8	Nenhuma inclusão; estrutura granular
	4-5	Um globoide e um cristalóide	1-2	Nenhuma inclusão; estrutura granular
Cevada	2-3	Dois tipos de inclusão	2	Nenhuma inclusão; estrutura lamelar
	4-5	Um globoide e um cristalóide	1-1	Nenhuma inclusão; homogênea
Arroz	1,5-4	Globoide	2-5	Nenhuma inclusão; homogênea
	1-3	Globoide	2-5	Nenhuma inclusão; homogênea
Milho			1-2	Nenhuma inclusão; homogênea

Adaptado de Pernollet (1978). Reimpresso com autorização. Copyright ©: Pergamon Press.

Várias modificações foram introduzidas desde então para melhorar a extração dessas frações. A prática mais comum envolve a extração da fração combinada de albumina-globulina como proteína solúvel em sal, enquanto as prolaminas são extraídas com solução aquosa de 1-propanol ou 2-propanol mais um agente redutor (Shewry *et al.*, 1980). Este método é apropriado para o estudo de genética básica dos produtos, mas é totalmente inapropriado do ponto de vista tecnológico, uma vez que agentes redutores resultam em novas ligações de dissulfeto que alteram a solubilidade das frações. Para evitar a desnaturação da fração de glutelina por extração alcalina, são utilizadas, como alternativa, soluções tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) com pH igual a 10 (Moreaux e Landry, 1968). As proporções relativas das frações de proteínas nas sementes de trigo, cevada, milho e centeio, de acordo com Osborne, estão resumidas na Tabela 1.3.

TABELA 1.3 Proporções relativas (%) das frações de proteína nas sementes de cereais, de acordo com Osborne

Cereal	N Não-proteico	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas	Resíduos
Cevada ^a	11,6		15,6	45,2	18,0	5,0
Trigo ^b		33,1		60,7		6,2
Milho ^a	4,4	0,9	1,5	55,4	22,9	-
Arroz ^c		15,7		6,7	61,5	15,4
Aveia ^d	11		56	9	23	-

^a% Total de sementes N (%)

^b% Sementes recuperadas N (%)

^c% Total de proteínas (%)

^d% Proteínas recuperadas (%)

Fonte: Bright e Shewry (1983); com permissão.

J. Prolaminas

As principais proteínas de armazenamento presentes no endosperma amiláceo do trigo, cevada e milho são as prolaminas, solúveis em álcool. Elas representam de 30% a 60% do total de nitrogênio do grão, dependendo da espécie, do estado nutricional e genótipo da planta (Bright e Shewry, 1983; Shewry *et al.*, 1981). As frações de prolamina identificadas nas diferentes espécies de cereais estão descritas na Tabela 1.4.

A denominação prolamina deriva de seu alto conteúdo, não usual, de prolina e de nitrogênio amida (glutamina). Ela é deficiente do aminoácido essencial lisina. Aveia e arroz diferem substancialmente de outros cereais por possuírem pouca prolamina (5% a 10%), e apresentam maior quantidade de globulina e de proteína similar à glutelina, respectivamente. Estes cereais, portanto, possuem maior quantidade de lisina, o que os torna superiores em termos nutricionais. Uma separação por eletroforese das diferentes frações de prolamina, baseada em seu tamanho molecular, é feita por eletroforese com gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Este método permite a identificação de diferentes perfis de polipeptídeos nas prolaminas, que variam significativamente entre diferentes cultivares da mesma espécie. PAGE é uma técnica muito utilizada na identificação da diversidade de sementes de trigo e cevada. Quando as diferenças são mínimas, a focalização isoeletrica bidimensional (IEF) e a PAGE podem ser aplicadas de modo efetivo.

Utilizando os procedimentos supracitados, os polipeptídeos identificados para frações de prolamina no trigo, cevada e milho estão resumidos na Tabela 1.5.

TABELA 1.4 Frações de prolamina em grãos de cereais

Espécies	Nome trivial
Trigo	Gliadina
Milho	Zeina

Cevada	Ordeína
Aveia	Aveninas

TABELA 1.5 Frações de prolamina do trigo, cevada e milho

Trigo	MM	Cevada	MM	Milho	MM
α -Gliadina	32.000	b-hordeína	35.000-46.000	20K	20.000-21.000
β -Gliadina	40.000	c-hordeína	45.000-72.000	22K	22.000-23.000
ω -Gliadina	40.000-72.000	d-hordeína	100.000	9K	9.000-10.000
Subunidades HMM	95.000-136.000			14K	13.000-14.000

MM: Massa molecular; HMM: Alta massa molecular

As gliadinas do milho estão classificadas em dois grupos, segundo sua mobilidade eletroforética em baixo pH. O primeiro grupo inclui a fração mais rápida, a α -gliadina, seguido pela β - e ω -gliadinas, enquanto o segundo grupo, com uma massa molecular aparente muito maior (95-136.000), é chamado de unidade de alta massa molecular (HMM). Todas as frações de gliadina são deficientes em lisina e treonina. Três grupos de proteína hordeína foram separados da cevada por SDS-PAGE e designados como B, C e D. Eles diferem entre si quanto à massa molecular aparente e à composição de aminoácidos (Mifflin e Shewry, 1977). A fração C contém apenas traços de aminoácidos sulfurados, ao passo que a fração D é rica em glicina (13%). O conteúdo de lisina é particularmente baixo em todas as frações de proteína hordeína (< 1%), enquanto as hordeínas B e C também são deficientes em treonina.

O componente zeína da proteína do milho, apesar de não estar bem definido, é composto de duas frações maiores e de duas menores. As duas frações maiores têm massa molecular aparente equivalente a 20.000-21.000 e 22.000-23.000, enquanto as frações menores têm de 9.000-10.000 e de 13.000-14.000 e são designadas como zeína de 22K, 9K e 14K, respectivamente. Todas são deficientes em lisina. Ao contrário dos outros grãos de cereais, a maior quantidade de proteínas de estocagem da aveia está nas globulinas 12S e 7S, sendo que as prolaminas correspondem a menos de 15% do total de nitrogênio do grão (Peterson e Smith, 1976). Burgess e Mifflin (1985) demonstraram que a globulina 7S é encontrada principalmente no embrião, enquanto a globulina 12S, a fração maior, é predominante no endosperma. Com base na SDS-PAGE, parece que as frações de globulina e de prolamina estão localizadas em diferentes corpos proteicos.

K. Síntese de proteína

O desenvolvimento da semente do cereal e a síntese da proteína estão associados a pelo menos três fases. A primeira fase é caracterizada por uma rápida divisão das células, na qual a síntese da proteína permanece muito baixa. Quando a divisão de células cessa, há aumento do RER e acúmulo de nucleotídeos solúveis (Briarty *et al.*, 1979; Jenner, 1968), resultando em uma síntese rápida de proteínas de estocagem relacionada com a iniciação e a síntese do RNA mensageiro (mRNA) assim como com a eficiência da tradução do mRNA. O acúmulo de mRNA em sementes de trigo em desenvolvimento foi correlacionado com a síntese de proteína por Greene (1983). Usando uridina [5-³H] e leucina L-[³H] marcadas, o autor estudou a síntese, o funcionamento e a estabilidade dos RNAs das proteínas de estocagem. Três fases de desenvolvimento foram identificadas:

1. Mudança da síntese de proteína de não estocagem, da semente, para proteína de estocagem.
2. Aumento da taxa de acúmulo de poli(A)+RNA.
3. Aumento do nível de transcrição de mRNA.

Uma relação direta entre níveis de mRNA e taxa de síntese proteica pode ser vista na Figura 1.8. A síntese do peptídeo gliadina foi predominante a partir do 15º até o 25º dia após a floração e acompanhou o aumento de poli(A)+RNA. Assim, a expressão do gene da proteína de estocagem, no endosperma do trigo, é um processo

mRNA-limitante, baseado na quantidade de proteína de estocagem que o mRNA sintetizou perto do final da divisão das células de endosperma. Okita e Greene (1982) haviam identificado previamente mRNA, em trigo Cheyenne, responsáveis pela síntese de gliadina 20 a 25 dias depois da antese. Para uma revisão mais detalhada das proteínas de cereais, recomenda-se a leitura do artigo de Laszity (1984).

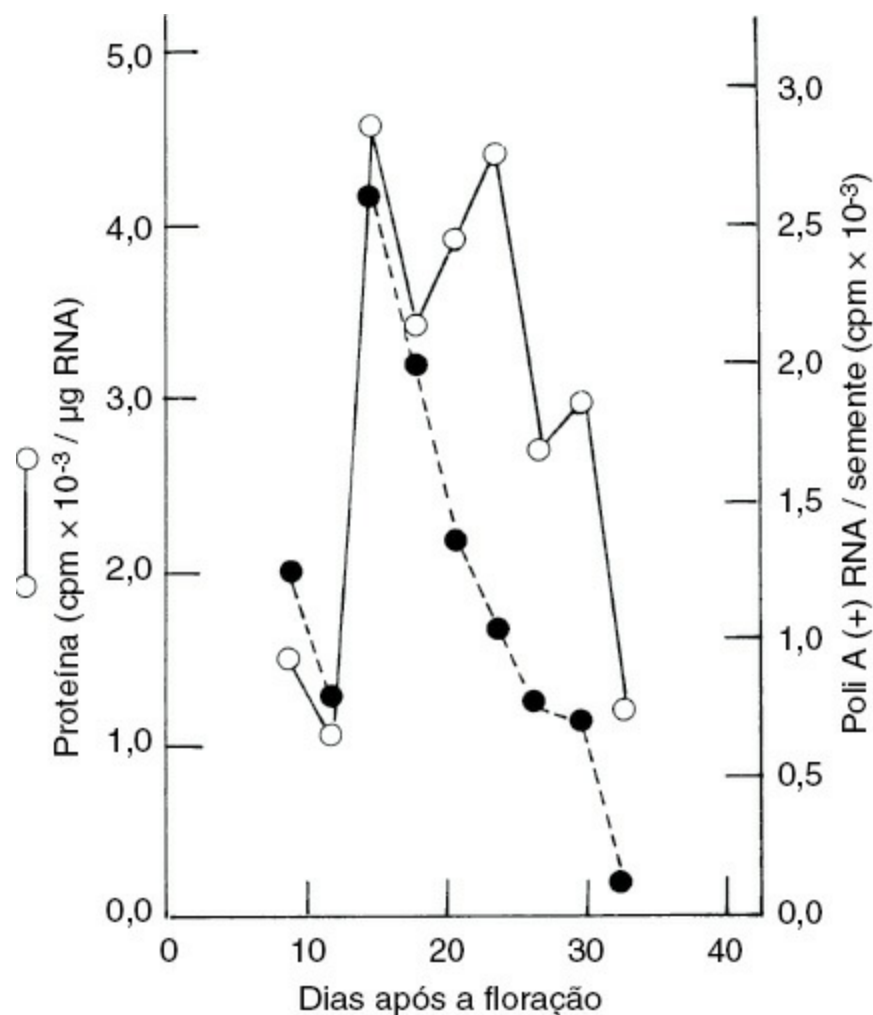


FIGURA 1.8 Perfis do desenvolvimento do acúmulo de poli(A) + RNA e da capacidade de síntese de proteínas *in vitro* do trigo. Greene (1983).

L. Lipídeos

Os lipídeos são distribuídos por todo o grão de cereal como parte das membranas intracelulares e esferosomas. Eles são estocados como gotículas ricas em triglicerídeos nos esferosomas da camada de aleurona que ficam agrupados ao redor da aleurona dos grãos ou no plasmalema (Buttrose, 1971; Chamura, 1975; Morrison *et al.*, 1975; Morrison, 1978). Os esferosomas também estão presentes no embrião, no escutelo e no coleóptilo (Buttrose e Soeffly, 1973; Jelseman *et al.*, 1974). Os lipídeos também são encontrados nos grânulos de amido, predominantemente como monoacil lisofosfatidil etanolamina e lisofosfatidicolina e também como complexos de inclusão com amilose no interior do grânulo. Aparentemente há uma correlação entre o conteúdo de amilose e de lipídeos nos cereais; por exemplo, o milho ceroso contém pouco conteúdo de lipídeos enquanto o amido com alto teor de amilose possui maior quantidade de lipídeos do que o amido no milho comum (Acker e Becker, 1971). A distribuição de lipídeos em grãos de cereais maduros pode ser verificada na Tabela 1.6.

Os principais ácidos graxos presentes em grãos com alto teor de lipídeos são os ácidos linoleico, oleico, palmítico e linolênico, em ordem de conteúdo decrescente (Price e Parsons, 1975). Os lipídeos de cereais podem ser separados em lipídeos polares e não polares por fracionamento com solvente. No caso de trigo vermelho duro,

Waldron, por exemplo, os lipídeos polares e não polares correspondiam a 49,6% e 50,4% do total de lipídeos, respectivamente (Hargin e Morrison, 1980). A distribuição das frações de lipídeos no interior dos tecidos de trigo é mostrada na Tabela 1.7.

Os germes contêm um terço do total de lipídeos do trigo, 80% dos quais são triglicerídeos neutros. Os lipídeos da aleurona, no entanto, representam um quarto do total de lipídeos, dos quais 80% são de natureza não polar. O endosperma, porém, contém quase a metade dos lipídeos dos grãos inteiros. O amido do endosperma é associado a 15,6% do total de lipídeos, dos quais 96% são fosfolipídeos. O fosfolipídeo associado ao amido, predominante no endosperma, é lisofosfatidil-colina (Hargin e Morrison, 1980).

TABELA 1.6 Conteúdo de lipídeos em grãos de cereais inteiros

Cereal	Lipídeos (%)
Trigo	1,8
Milho	0,4-1,7
Cevada	3,3-4,6
Aveia	5,4
Arroz	1,9-3,1

TABELA 1.7 Distribuição de lipídeos do trigo no interior dos tecidos^{a,b}

Lipídeos totais				Endosperma (44,8%)			
Germe (30,4%)		Camada de aleurona (24,8%)		Frações não associadas com amido (29,2%)		Amido (15,6%)	
Lipídeos não polares (24,1%)	Lipídeos polares (6,3%)	Lipídeos não polares (17,9%)	Lipídeos polares (6,9%)	Lipídeos não polares (9,7%)	Lipídeos polares (19,5%)	Lipídeos não polares (0,7%)	Lipídeos polares (14%)

^a Adaptado de Hargin e Morrison (1980).

^b Calculado e adaptado a partir de dados de Hargin e Morrison (1980). Os dados foram calculados como porcentagem do total de lipídeos.

A biossíntese de lipídeos inicia-se com a formação de ácidos graxos em um processo de múltiplas etapas, que envolve um complexo enzimático, a proteína carreadora de acil (ACP) ácido graxo sintetase. Assim que são sintetizados, são esterificados com glicerol formando triglicerídeos, os quais são uma fonte de energia importante durante a germinação dos cereais. Os lipídeos são responsáveis pela manutenção do embrião e da camada de aleurona nos estágios iniciais da germinação até que açúcares comecem a ser supridos pelo amido do endosperma.

IV. GERMINAÇÃO DE CEREAIS

A germinação de cereais é importante na indústria do malte, dependente de certo grau de degradação do amido. Na preparação de produtos de panificação, porém, é importante que a maioria dos grânulos se mantenha intacta. Assim, a germinação ou brotação de grãos de cereais afeta a classificação dos grãos de trigo e cereais em função dos danos causados. Segundo o *Grain Grading Primer* (US Department of Agriculture, 1957), a germinação de trigo é definida como “grãos que possuem a extremidade do germe rompido pela germinação ou grãos que tiveram os brotos removidos”. Tal circunstância ocorre com maior frequência em tempo úmido, em decorrência da elevação do conteúdo de umidade. A germinação do trigo anterior à colheita reduz o rendimento dos grãos e a qualidade da farinha, o que desencadeia efeito adverso nas propriedades de panificação da farinha, em função do aumento da hidrólise do amido da massa pela α -amilase (Buchanan e Nicholas, 1980). Se a atividade da α -amilase é excessiva, o pão produzido apresenta miolo úmido e pegajoso.

A. Mobilização de amidos de cereais por α -amilase

O grânulo de amido intacto do trigo é atacado por certas isoenzimas da α -amilase. Duas classes foram identificadas por Sargeant (1979) durante a germinação do trigo, sendo que uma delas hidrolisou os grânulos de amidos. Halmer (1985) considerou que desde que a hidrólise de amidos ocorre normalmente com grânulos de amidos solúveis e não em grânulos intactos, torna-se difícil relacionar a atividade amilolítica total, medida em laboratório, com a atividade de degradação dos grânulos dos grãos de cereal *in vivo*. A hidrólise de amidos por α -amilase é caracterizada pela endoclivagem de amilose e amilopectina (Abbott e Matheson, 1972).

B. Biossíntese da α -amilase durante a germinação

A importância da atividade de α -amilase em produtos de panificação e na indústria cervejeira tem exigido atenção redobrada na fase da secreção desta enzima durante a germinação. A maior controvérsia é se a biossíntese da α -amilase ocorre no escutelo ou na camada aleurona (Akazawa e Hara-Nashimura, 1985). No caso dos grãos de cevada, a formação de α -amilase *de novo* foi relatada como ocorrida em ambos, escutelo e camada de aleurona (Briggs, 1963; 1964; Chrispeels e Varner, 1967).

A biossíntese e a secreção desta enzima parecem envolver o hormônio vegetal giberelina GA_3 , o qual é produzido pelo embrião e desencadeia a produção de α -amilase assim como outras enzimas hidrolíticas na camada de aleurona (Briggs *et al.*, 1981). O aumento da atividade enzimática foi atribuído à elevação da quantidade de mRNA que codifica a α -amilase (Bernal-Lugo *et al.*, 1981; Higgins *et al.*, 1976). No caso do trigo, a camada de aleurona também se torna alvo de enzimas induzidas por hormônios, incluindo o aumento da síntese de α -amilase (Filmer e Varner, 1967; Melcher e Varner, 1971). Varty *et al.* (1982) descobriram que o hormônio vegetal ácido abscísico inibe a transcrição e a tradução do mRNA da α -amilase em tecidos de aleurona isolados de trigo, o que explica a capacidade de tal ácido de inibir a indução da α -amilase por GA_3 (Chrispeels e Varner, 1967). Estudos feitos por Raynes e Briggs (1985) apontaram aumento da produção de α -amilase em grãos de cevada descascados em grãos germinados com ou sem ácido giberélico. Seus resultados, mostrados na Figura 1.9, indicam que a produção e a atividade enzimática foram afetadas por GA_3 e K_2SO_4 . A presença de K_2SO_4 adiaria a destruição de α -amilase (Briggs, 1968). Baseadas nas pesquisas com o escutelo do arroz, o cálcio parece também ter um papel na biossíntese e na secreção de α -amilase, com possível intervenção de calmodulina (Mitsui *et al.*, 1984).

Alguns pesquisadores relataram que a isoenzima da α -amilase é a principal enzima encontrada em grãos maduros germinados ou em tecido de aleurona incubado com GA_3 e α -AMY1 (MacGregor, 1983; Marchylo *et al.*, 1981; Sargeant, 1979; 1980), o que difere da produção de α -amilase em tecidos de embriões prematuros removidos e do escutelo, no qual a α -AMY2 foi a isoenzima predominante formada até na presença de GA_3 . Normalmente, este tecido produz pouca atividade de α -amilase em grãos de trigo prematuros; porém, após sua remoção da caropsis, ele começa a sintetizar α -amilase e conduzir às mudanças citológicas características associadas à germinação. Cornford *et al.* (1987) examinaram a produção de α -amilase em tecidos de embriões e escutelos de trigo prematuro e descobriram que ela é influenciada pela idade do embrião. Enquanto as formas α -AMY1 e α -AMY2 foram detectadas por *rocket-line* imunoeletroforese, na presença de GA_3 , a produção de α -AMY2 foi estimulada pela adição de tal fator de crescimento. O ácido abscísico inibiu a produção de α -AMY1 e de muitas bandas de α -AMY2, apesar de quatro bandas de α -AMY2 ativas terem sido detectadas. A alteração do modo de desenvolvimento para germinativo pelos embriões excisados, em termos da produção de α -amilase, pode ocorrer em função da perda do ácido abscísico pelo embrião (Triplett e Quatrano, 1982).

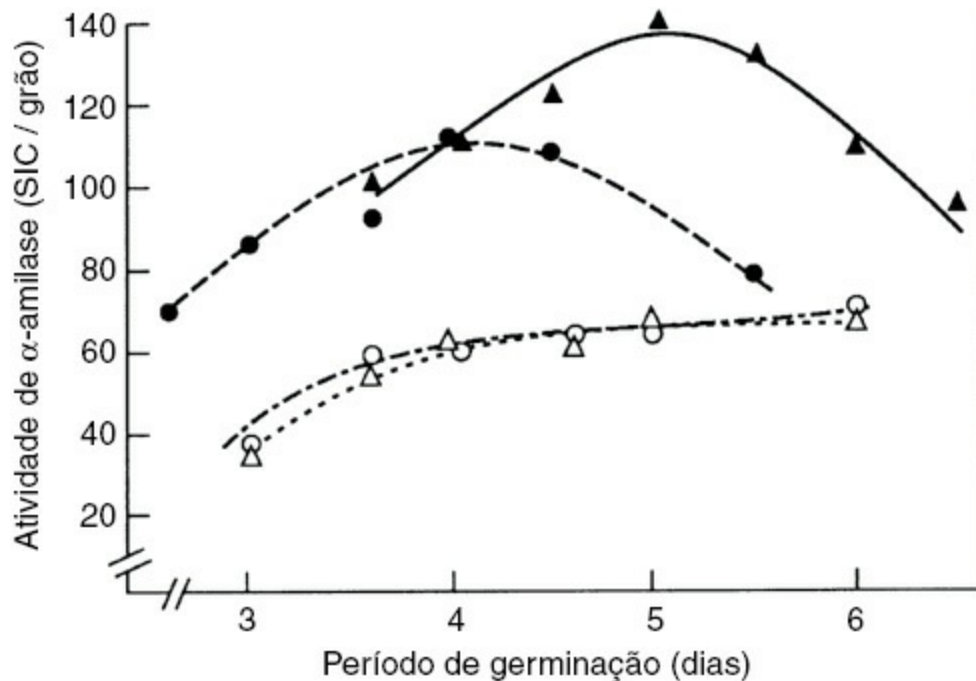


FIGURA 1.9 Atividade de α -amilase em cevada descascada germinada em K_2SO_4 e GA_3 . Sem aditivos (o); K_2SO_4 (50mM) (Δ); e GA_3 (50µg/mL) (●); GA_3 (50µg/mL) e K_2SO_4 (50mM) (

). Raynes e Briggs (1985).

MacGregor e Matsuo (1982) desenvolveram uma pesquisa detalhada sobre a degradação inicial do amido durante a germinação em endospermas de grãos de cevada e de trigo. Os grãos examinados foram cortados longitudinalmente pelo sulco, sem distorcer nenhum de seus aspectos estruturais (Figura 1.10). Com a utilização de microscópios eletrônicos de escaneamento, foram evidenciadas mudanças físicas similares em ambos os grãos de cevada e de trigo durante as fases iniciais. A degradação do amido pareceu ter início na junção endosperma-embrião e continuou ao longo da borda dorsal do grão. Este efeito foi observado somente após a ocorrência de extensa degradação do material da parede celular e da matriz de proteína no endosperma. Os resultados foram consistentes com trabalhos anteriores, que mostraram que a síntese de α -amilase durante a germinação teve início no embrião (Gibbons, 1979; 1980; Okamoto *et al.*, 1980). Independente do local em que a α -amilase é sintetizada, no final, ela é liberada no endosperma, ocorrendo a hidrólise do amido.

C. Atividade da α -amilase em cereais germinados

Durante o processo de germinação, o amido é degradado por α -amilases e açúcares simples são liberados (Kruger, 1972 a; 1972b). Lineback e Ponpipom (1977) monitoraram a degradação do amido durante a germinação de cereais, incluindo o trigo e a cevada. Os autores descobriram que a elevação na atividade de α -amilase foi acompanhada pelo aumento dos açúcares em todos os cereais pesquisados. A quantidade de α -amilase produzida refletia o grau de amido danificado na farinha moída produzida pelas sementes germinadas. Apesar do alto teor de atividade da α -amilase ter sido associado com o trigo germinado, a degradação do amido foi menor do que em outros cereais. A degradação do amido do trigo foi evidenciada pela erosão da superfície do grânulo e do sulco equatorial. O grânulo de amido da aveia tem maior resistência ao ataque das enzimas, porém apresenta baixo teor de amido danificado na farinha moída.

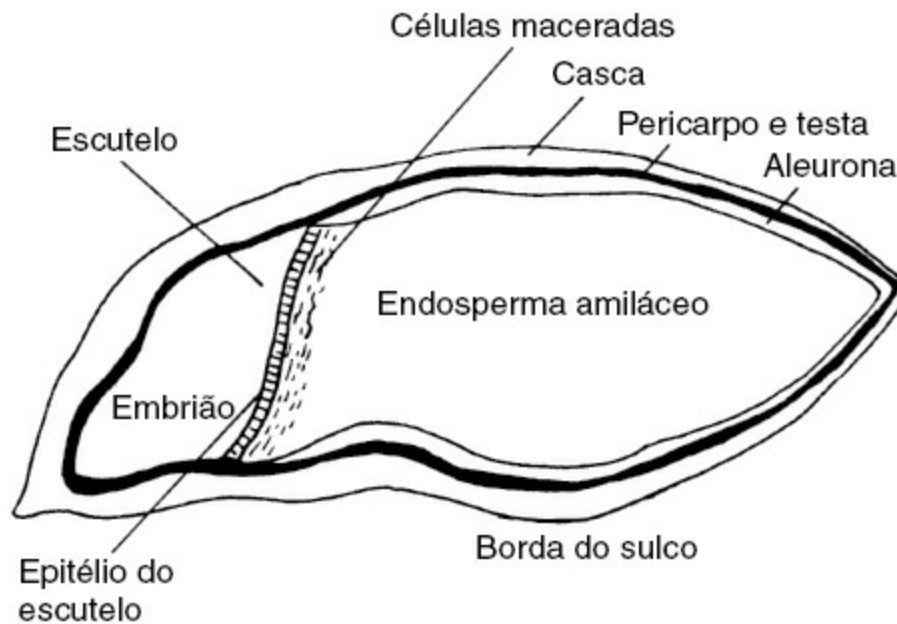


FIGURA 1.10 Seção longitudinal do grão da cevada aberta por meio da borda do sulco. MacGregor e Matsuo (1982).

Estudos feitos sobre a germinação de cinco cultivares de trigo, realizados por Reddy *et al.* (1984a), mostraram que o desenvolvimento da α -amilase é dependente da temperatura. Grãos de trigo germinados em câmaras de crescimento a 15,5°C desenvolveram a taxa de atividade enzimática mais alta quando comparada aos grãos crescidos no campo a 20°C. A atividade não aumentou significativamente até o terceiro dia da germinação, mas subiu de maneira acentuada depois do sexto dia.

D. Efeito da germinação na qualidade da farinha

Lukow e Bushuk (1984) estudaram o efeito da germinação na qualidade da farinha de trigo. Utilizando farinha de dois cultivares do trigo *Canadian hard red spring* verificaram que a atividade da α -amilase era muito baixa mas aumentou para 1.600- e 3.000 vezes durante a germinação. O aumento marcante na atividade enzimática foi acompanhado por um acréscimo nos açúcares redutores, o que explica as características de panificação inferiores das farinhas de trigo germinadas. O maior efeito da atividade da α -amilase foi a redução da propriedade da farinha em absorver água em decorrência da degradação do amido gelatinizado. O resultado geral foi a produção de pão com miolo úmido e pegajoso (Jongh, 1967; Thomas e Lukow, 1969).

Kruger e Matsuo (1982) pesquisaram o efeito da brotação pré-colheita na qualidade do trigo durum para preparo da massa para macarrão. A atividade de α -amilase aumentou de 155 a 320 vezes depois de 72 e 120 horas de germinação, respectivamente. No resfriamento durante a produção de semolina e espaguete, a atividade da α -amilase decresceu mas não destruiu as enzimas de imediato. Os pesquisadores notaram que a α -amilase ainda estava ativa durante os primeiros 6 minutos de cozimento do espaguete e foi responsável pela produção de açúcares redutores, uma substancial perda de elementos sólidos e efeito danoso à qualidade do espaguete.

E. Tratamento do grão germinado: redução da α -amilase

A germinação de grãos de trigo tem início no período de colheita e apresenta efeito adverso na qualidade (Meredith e Pomeranz, 1985). O maior culpado é a atividade da α -amilase, que aumenta durante a germinação, enquanto a atividade da β -amilase permanece a mesma. Vários métodos foram examinados para melhorar as propriedades do grão brotado. Já que a fração de amido do trigo brotado tem boa qualidade, os esforços foram direcionados para a inibição da α -amilase com a utilização de calor ou agentes químicos (Bean *et al.*, 1974; Cawley

e Mitchell, 1968; McDermott e Elton, 1971; Westermarck-Rosendahl *et al.*, 1979). Em pesquisa anterior, descrita por Schultz e Stephan (1960), foi observado, por exemplo, uma melhoria na qualidade quando o trigo é tratado com ácidos. Fuller *et al.* (1970) usaram ácido hidrocloreídrico seguido de neutralização com o uso de amônia para reduzir a atividade da α -amilase, mas seu método mostrou-se impraticável. Muitos inibidores de α -amilase foram examinados por Westermarck-Rosendahl *et al.* (1979) para melhorar as qualidades de panificação do trigo germinado. Os agentes mais promissores foram: fosfato trissódico, fosfato dissódico, polifosfato de sódio, SDS, estearoil lactilato de cálcio e ácido cítrico. As avaliações foram baseadas nos valores dos testes de *Falling Number* das amostras de grãos nos quais o nível ótimo para a farinha de panificação era de cerca de 200 segundos (Greenaway, 1969). Estes inibidores de α -amilase causaram aumento nos valores *Falling Number* muito acima de 200 segundos, como demonstrado na Tabela 1.8 com polifosfato de sódio.

Os testes de *Falling Number* medem o tempo que o pistão leva para mergulhar livremente em uma suspensão de farinha e água e o efeito da degradação amilolítica do amido na viscosidade da pasta de farinha e água. Quanto mais rápida a diminuição da viscosidade da pasta de farinha, menor o valor de *Falling Number*. Outras pesquisas realizadas por Westermarck-Rosendahl *et al.* (1980) demonstraram que entre os 23 inibidores de enzimas testados os mais promissores foram o fosfato trissódico e o fosfato dissódico, os quais foram especialmente eficazes na redução da viscosidade, problema associado com as farinhas de trigo germinado, assim como melhoraram as características do miolo. Soluções alternativas debatidas por Meredith e Pomeranz (1985) incluíram a eliminação de variedades de trigo suscetíveis a brotamento mediante programas de criação e seleção.

TABELA 1.8 Efeito do polifosfato de sódio no valor de *Falling Number* de trigo germinado danificado

Agente químico	Concentração ^a (%)	<i>Falling Number</i>
Polifosfato de sódio	0,1	147 ^b
	0,5	175 ^b
	1,0	250 ^c

^a Baseado na quantidade de farinha (conteúdo de umidade 15%)

^b Diferença significativa a 5%

^c Diferença significativa a 1%

Adaptado de Westermarck *et al.* (1979).

F. Mobilização das proteínas durante a germinação

Aminoácidos essenciais aumentam durante a germinação ou a brotação de grãos de cereais (Dalby e Tsai, 1976; Tsai *et al.*, 1975). Por exemplo, lisina e triptofano aumentaram durante a germinação do trigo, da cevada, da aveia e do arroz. A dimensão do aumento estava diretamente relacionada com a diminuição do conteúdo de prolamina no grão. Uma elevação substancial de 50% de lisina foi observada no trigo, comparada com um aumento pequeno na aveia (Figura 1.11). O teor de prolamina na aveia, porém, é muito mais baixo do que no trigo. Jones e Tsai (1977) relataram aumento no conteúdo de lisina e triptofano no embrião do milho normal e decréscimo correspondente no endosperma. Um teor mais alto de lisina é necessário para o crescimento e desenvolvimento do embrião, como já havia sido observado por Singh e Axtell (1973) nas pesquisas com proteínas de embriões de cevada e do endosperma. Os precursores da biossíntese da lisina no milho podem ser obtidos pela mobilização das reservas de zeína no endosperma.

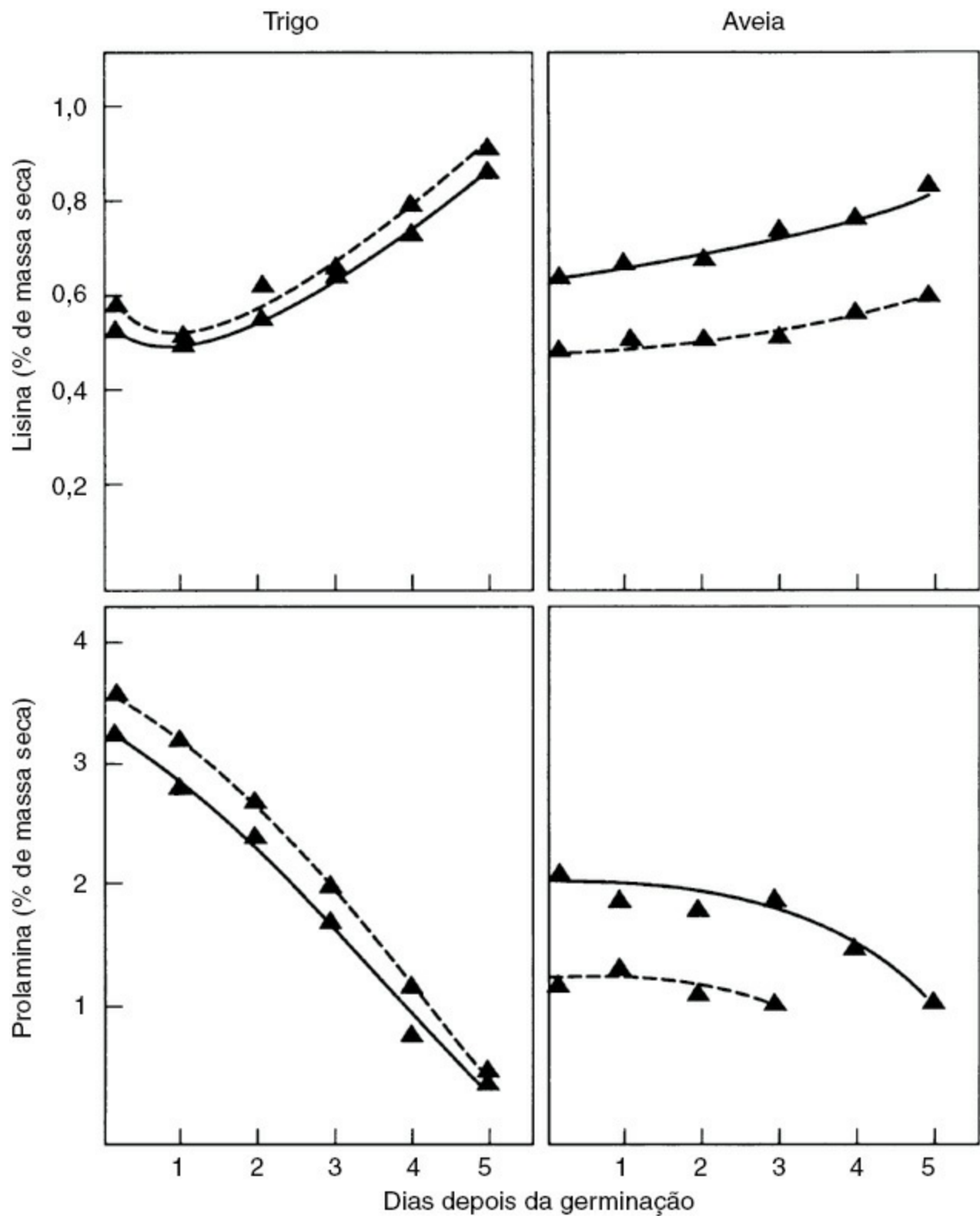


FIGURA 1.11 Alterações no conteúdo de proteína e prolamina durante a germinação do trigo e aveia. Adaptado de Dalby e Tsai (1976).

TABELA 1.9 Efeito da germinação de trigo cv "Neepawa" a 16,5°C na produção de aminoácidos livres

Aminoácido ($\mu\text{mol/g N}$)	Período de germinação (horas)	
	0	122
Triptofano	47	50
Lisina	5,7	63
Histidina	2,2	72
Ácido glutâmico	64	95

Metionina	2,4	27
Isoleucina	5,1	140
Leucina	6,0	170
Tirosina	4,5	72
Fenilalanina	4,2	150
Prolina	7,8	790
Glutamina	12	920

Adaptado de Tkachuk (1979).

A liberação de aminoácidos durante a germinação do trigo foi investigada por Tkachuk (1979). Após 122 horas de germinação, a uma temperatura de 16,5°C, o conteúdo de prolina e de glutamina aumentou 100 e 80 vezes, respectivamente, enquanto a lisina aumentou somente 12 vezes (Tabela 1.9). Estes resultados representam as alterações que surgem nos grãos de trigo inteiros e talvez não demonstrem as mudanças que ocorreriam no embrião e na camada de aleurona. Apesar disso, ilustram a ocorrência de proteólise considerável durante a germinação, o qual poderia se tornar um método para avaliar a extensão da germinação.

Kruger (1984), utilizando cromatografia líquida de alto desempenho e coluna de permeação do gel, monitorou os perfis de massas moleculares das proteínas solúveis em tampão (tampão de fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, contendo 0,5 M de cloreto de sódio) em grãos de trigo sadios e germinados. Dos grupos de proteínas de massa molecular examinados observou-se maior alteração nos peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos, evidenciando aumento do nitrogênio amino solúvel, especialmente os aminoácidos, durante a germinação. Poucas alterações ocorreram durante os primeiros dois dias de germinação quando comparados aos posteriores seis dias. Em seguida, Kruger e Marchylo (1985) examinaram a mobilização de proteínas durante a germinação de cinco cultivares de trigo. Seis componentes principais das proteínas foram eluídos, dos quais apenas as espécies de baixa massa molecular tiveram alterações significativas durante a germinação. Estes resultados confirmaram pesquisas anteriores feitas por Kruger (1984) e Lukow e Bushuk (1984), que evidenciaram a ocorrência de uma hidrólise muito rápida das proteínas do endosperma do trigo, seguida de atividade limitada de endopeptidase, durante o período inicial de germinação.

Maior liberação de aminoácidos livres durante a germinação sugere extensa mobilização das proteínas de estocagem. O mecanismo que controla este processo permanece inexplicado. Algumas proteases foram encontradas no grão de trigo, incluindo endopeptidases, carboxipeptidases e aminopeptidases (Grant e Wang, 1972; Kruger, 1973; Preston e Kruger, 1976a; 1976b; 1977; Kruger e Preston, 1978). Entre elas, a carboxipeptidase é predominante no endosperma, representando um quarto do total da atividade da endopeptidase (Preston e Kruger, 1976a). Tais enzimas apresentam efeito negligenciável nas reservas do endosperma durante os dois primeiros dias de germinação, provavelmente por causa de sua compartimentalização, presença de inibidores da protease ou insolubilidade do substrato. Durante a fase de germinação, há uma atividade limitada de endopeptidase, resultando na formação de produtos intermediários que são, em seguida, degradados pela carboxipeptidase, para aminoácidos (Kruger e Marchylo, 1985). Apenas uma fração das proteínas de estocagem é afetada durante a germinação, fato que explica a similaridade dos perfis de proteína em sementes brotadas e maduras.

G. Mobilização de lipídeos durante a germinação

A germinação e a brotação de grãos de cereais são acompanhadas de aumento do teor total de lipídeos (Lorenz, 1980; Rahnotra *et al.*, 1977). A presença de lipase em sementes de trigo e de cevada não germinadas é muito pequena, mas aumenta assim que a germinação começa (Huang e Moreau, 1978; Taverner e Laidman, 1972). Um grande contraste entre os cereais é o fato de a aveia ser rica em atividade de lipase (Matlashewski *et al.*, 1982). Lipase (triacilglicerol lipase, EC 3.1.1.30) hidrolisa triacilgliceróis, diacilgliceróis e possivelmente

monoacilgliceróis, e produz ácidos graxos. A maior dificuldade para medir a atividade da lipase deve-se à insolubilidade do substrato em solução aquosa. Tal entrave foi parcialmente superado utilizando-se substratos solúveis em água, como *p*-nitrofenil acetato (PNPA) ou butirato ou preparação de emulsão estável com óleo de oliva. Um método específico para quantificar a lipase foi desenvolvido por Matlashewski *et al.* (1982) e utiliza triacilgliceróis radioativos, marcando a metade dos ácidos graxos. Utilizando este método, Baxter (1984) determinou a atividade da lipase em cevada germinada e não germinada. A Figura 1.12 ilustra que a atividade da lipase aumentou lentamente durante os primeiros dois dias de germinação, mas cresceu rapidamente após três dias. Foram separadas duas frações distintas de lipase com massas moleculares semelhantes (na faixa de 400.000 Da), mas com propriedades iônicas diferentes. A maior fração (I) foi associada ao embrião enquanto a menor fração de lipase (II) foi localizada no endosperma. Taverner e Laidman (1972) encontraram lipase no embrião e no endosperma do trigo, cada uma induzida por fatores diversos. Urquardt *et al.* (1984) separaram embriões de aveia do restante do grão e monitoraram as alterações na atividade da lipase durante a germinação. O aumento inicial da atividade da lipase ocorreu primariamente na camada do farelo, com pouca ou nenhuma atividade no endosperma (Urquardt *et al.*, 1983). Enquanto o papel principal da lipase é a hidrólise de triacilgliceróis de estocagem, sua função fisiológica permanece obscura.

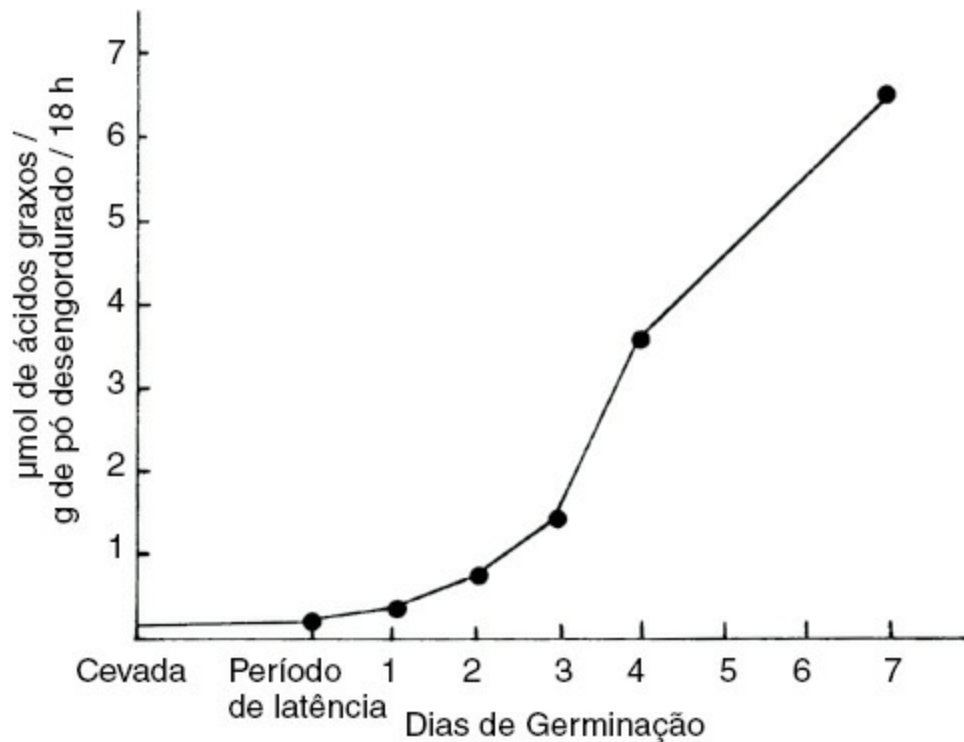


FIGURA 1.12 Atividade da lipase em extrato aquoso de cevada (variedade Sonja) durante germinação. Baxter (1984).

V. ESTOCAGEM DE GRÃOS

Depois da colheita, os grãos de cereais, como o trigo, são estocados em sacos ou silos de grandes dimensões. Estes grãos são tradicionalmente reconhecidos por manter sua qualidade, que é afetada pela umidade, temperatura, invasão de roedores, insetos, bactérias e fungos. A perda mundial de grãos pós-colheita parece ser em torno de 3% a 10%, podendo atingir até 15% dependendo das condições dos locais e recursos disponíveis (Harris, 1984). Esta parte vai abordar os efeitos da umidade e da temperatura na qualidade dos grãos.

A. Respiração

Quando os grãos de cereais estão secos ocorre pouca respiração. Se o conteúdo de umidade das sementes atinge valores acima de 14%, a respiração aumenta até que um nível crítico de umidade seja atingido. Neste ponto, a respiração se acelera rapidamente e ocorre aquecimento do grão. Este aumento significativo da respiração é atribuído, em parte, à germinação e ao crescimento de fungos, como o *Aspergillus* e o *Penicillium*. A respiração do grão é afetada pela umidade, temperatura e tensão de oxigênio, apesar do teor de umidade ser de enorme importância na estocagem comercial de grãos de cereal.

1. Efeito do teor de umidade

A exposição do grão faz com que a captação de umidade ocorra até atingir o equilíbrio com o vapor de água na atmosfera. O conteúdo de umidade do grão, portanto, é controlado pela umidade relativa na atmosfera, o que, em termos de estocagem de grãos, é de natureza intersticial. Quando exposto a uma atmosfera de umidade relativa uniforme e temperatura constante, a umidade relativa do grão estocado atinge um equilíbrio denominado equilíbrio de umidade relativa (ERH). A relação entre a umidade relativa e o conteúdo de umidade é definida pela sorção isotérmica, cuja forma é sigmoide. Isto ocorre em função do maior conteúdo de umidade no equilíbrio durante a dessorção comparada com a adsorção em um determinado ERH. A Figura 1.13 mostra a isoterma de umidade obtida a 30°C para milho com a curva sigmoide característica, resultante de um conteúdo maior de água da isoterma de dessorção (Denloye e Ade-John, 1985).

O equilíbrio do conteúdo de umidade é muito baixo em grãos. Apenas depois da isoterma atingir 80% de umidade relativa, o conteúdo de umidade aumenta exponencialmente com a umidade relativa (Oxley, 1948). O conteúdo de umidade considerado seguro para os grãos é quando o equilíbrio é atingido com 70% de umidade relativa (Pixton e Warburton, 1971). O crescimento microbiano ocorre somente com umidade relativa acima de 75% e tem por consequência uma extensa deterioração do grão.

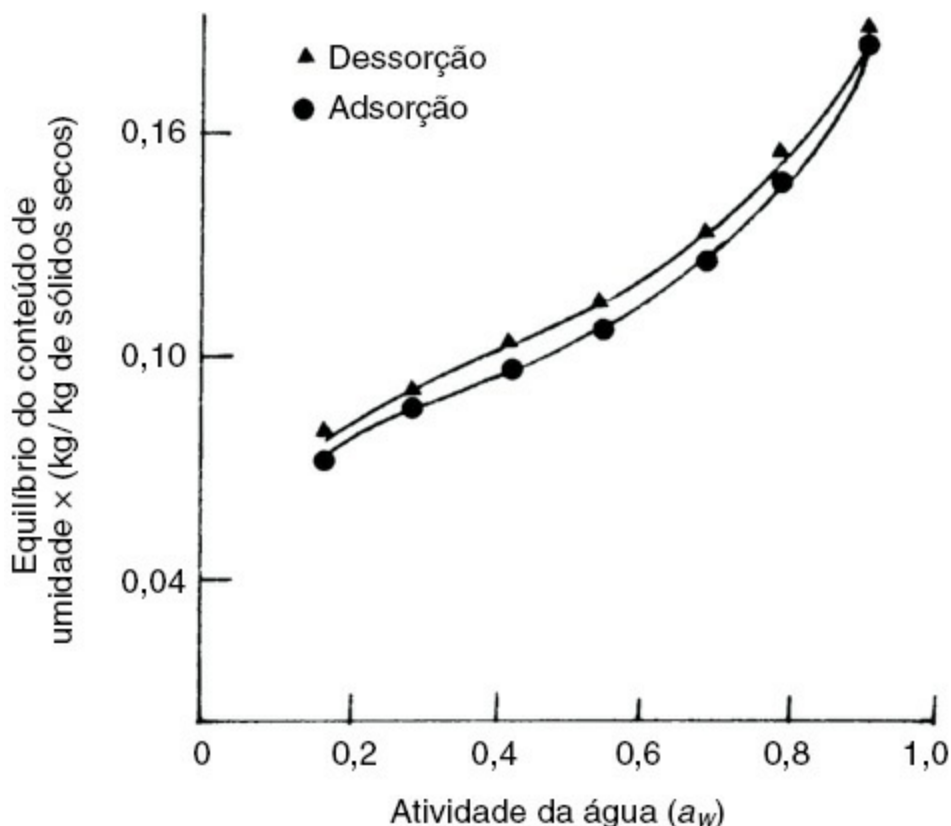


FIGURA 1.13 Isoterma de adsorção de umidade para milho (30°C). Impresso com autorização de Denloye e Ade-John (1985). © Pergamon Press.

Em condições extremamente úmidas, o grão pode ser colhido com um conteúdo de umidade excessivamente alto para uma estocagem segura. Em tal caso, é necessário o uso de secagem para reduzir o conteúdo de umidade do grão, que pode ser estocado com perda mínima da viabilidade das sementes, valor nutritivo e propriedades de panificação (Bushuk, 1978). Spillane e Pelhate (1982) estudaram excluir a etapa de secagem, armazenando grãos de cevada colhidos com grande conteúdo de umidade (> 30%) em condições de ventilação. Caso o aumento da temperatura do grão, em função de sua respiração, não seja controlado, ocorre um crescimento intenso de leveduras e bactérias. Isto pode ser evitado ventilando-se o silo continuamente durante um mês, processo que remove grande parte do calor gerado pela respiração e, assim, reduz a temperatura final do grão abaixo do ponto crítico de 16°C. O conteúdo de umidade do grão foi reduzido para 16% e a umidade relativa do ambiente em torno do grão foi cerca de 80% ao final do período de estocagem. Nestas condições, o crescimento de leveduras e bactérias foi suprimido e os fatores de qualidade do grão permaneceram intactos.

2. Efeito da temperatura

O ERH é pouco afetado por alterações na temperatura. Ayerst (1965) relatou que aumento ou queda de 10°C levou à alteração de 3% no ERH, com base em uma umidade relativa variando de 40% a 90%. Com umidade relativa mais alta, a alteração nunca excedeu 1% (Pixton e Warburton, 1975). Utilizando trigo de tipo Manitoba, Pixton (1968) demonstrou que com um conteúdo de umidade de 10% o ERH teve um aumento de 6%, quando aquecido a 70°C, comparado a apenas 2%, quando o conteúdo de umidade baixou para 14%. Prolongando o aquecimento por mais de uma hora foram observadas alterações posteriores. Denloye e Ade-John (1985) notaram um decréscimo no equilíbrio do conteúdo de umidade para milho mantido a umidade relativa constante na faixa de temperatura de 30°C a 50°C (Figura 1.14).

Desde que o grão é estocado em grande quantidade, o movimento do calor e da umidade no grão estocado é extremamente importante. Anderson *et al.* (1943) mostraram, pela primeira vez, que o movimento da umidade ocorre na forma de gradiente de temperatura alta para baixa. Este processo foi extremamente lento e envolveu difusão com alguma corrente de convexão. O principal efeito do aquecimento estaria relacionado com a translocação da umidade transportada pelo gradiente de temperatura no grão.

B. Armazenagem prolongada de grãos e farinha

Pixton *et al.* (1975) pesquisaram as alterações na qualidade do grão de trigo estocado durante 16 anos em baixa temperatura (4,5°C-0,5°C) e baixa concentração de oxigênio (< 2% por volume). Duas espécies de trigo diferentes (Manitoba e Cappelle), livres de contaminação microbiana e secos, com teores de umidade de, respectivamente, 11,9% e 12,6%, foram estocados em silos de uma tonelada cada um. A umidade não sofreu alterações significativas durante o período. A concentração de proteína bruta, assim como a solúvel em sal, permaneceram sem alterações em ambas as espécies de trigo, independente das condições de estocagem. Um pequeno aumento de 0,5% na concentração de lipídeos totais foi observado nas duas variedades de trigo e foi atribuído ao metabolismo de carboidratos durante o longo período de estocagem. Esta hipótese foi baseada na pequena redução na concentração de açúcares totais observada nas amostras de trigo monitoradas por Pixton e Hill (1967) após oito anos de estocagem, embora a concentração de maltose e sacarose tenha sofrido pouca variação durante todo o período de estocagem.

Observou-se que grãos de trigo apresentaram alta qualidade quando estocados a 4,5°C (96% de umidade relativa), comparado a lotes armazenados em temperatura ambiente durante o mesmo período, que perderam 70% da viabilidade. Se o grão de trigo permanece protegido da umidade atmosférica, de rápidas variações de temperatura e ataque de insetos, a qualidade de processamento permanece intacta, apesar da adição de α -amilase

fúngica ter sido necessária.

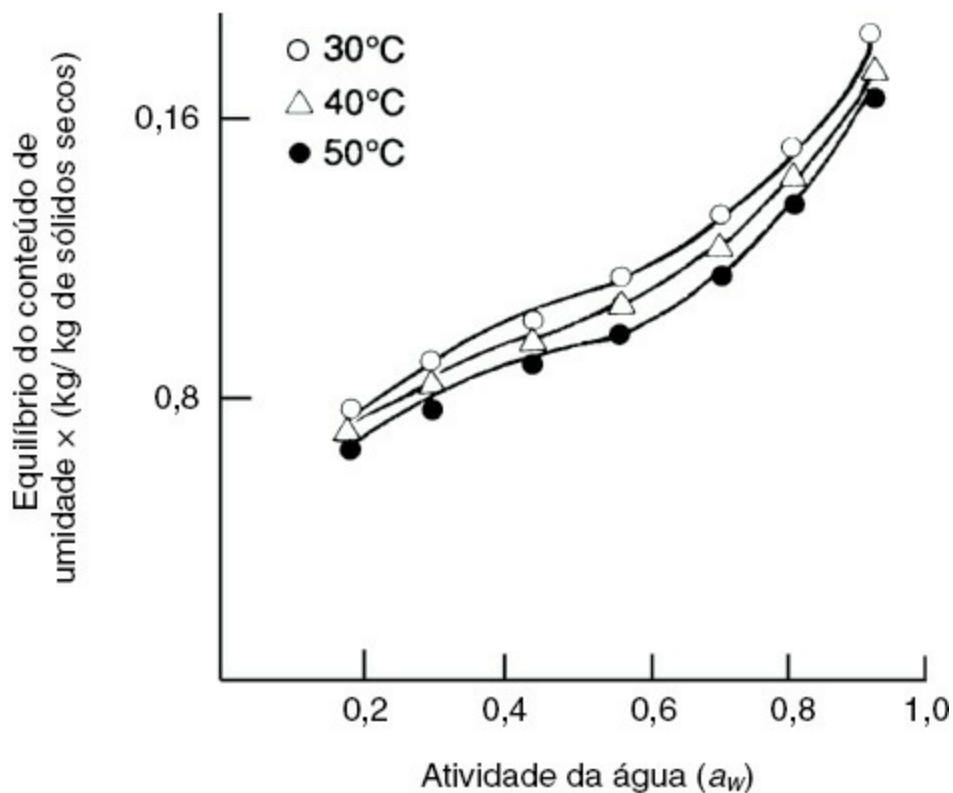


FIGURA 1.14 Isoterma de dessorção de milho a diferentes temperaturas. Reimpresso com autorização de Denloye e Ade-John (1985). © Pergamon Press.

PARTE II: LEGUMINOSAS

I. INTRODUÇÃO

O termo legume engloba mais de treze mil espécies diferentes, todas da família das Leguminosas. As leguminosas têm uma função importante na dieta dos seres humanos em todo o mundo. Entre as milhares de espécies conhecidas, apenas algumas poucas são cultivadas comercialmente: soja, amendoim, feijões, ervilhas, favas, grão-de-bico e lentilhas. Das sete mencionadas, a soja é, de longe, a mais cultivada. Muitas outras espécies de leguminosas têm um papel importante nas produções locais em vários lugares do mundo, mas são excessivamente numerosas para serem discutidas neste capítulo. As leguminosas são muito conhecidas por seu alto teor de proteína vegetal, que ocorre pela capacidade de fixação de nitrogênio em função de sua relação simbiótica com as bactérias no solo. A Tabela 1.10 mostra a estimativa da FAO (Organização de Alimentos e Agricultura) para a produção mundial das principais leguminosas para o ano de 2007. Este capítulo enfoca a composição das sementes de leguminosas e as alterações bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes, sua germinação, estocagem e fermentação.

II. ESTRUTURA DAS SEMENTES DAS LEGUMINOSAS

Apesar da grande variação na composição de macronutrientes das leguminosas, sua estrutura básica é a mesma. As sementes maduras contêm três componentes principais: a casca da semente (testa), o embrião e o endosperma. A maioria das sementes de leguminosas, porém, passa a possuir pouco endosperma quando atinge a maturidade,

uma vez que os cotilédones do embrião compõem grande parte da massa e contêm as reservas necessárias para seu crescimento. Os cotilédones, portanto, fornecem a grande maioria dos componentes nutricionais de interesse para uso como alimentos, exceto fibra e cálcio, dos quais uma porção significativa fica localizada na casca da semente (Kadam *et al.*, 1989). A estrutura de uma semente de soja típica pode ser vista nas Figuras 1.15 e 1.16. Dimensão, formato, cor e espessura da casca da semente variam entre as diferentes leguminosas, apesar de prevalecer a estrutura básica.

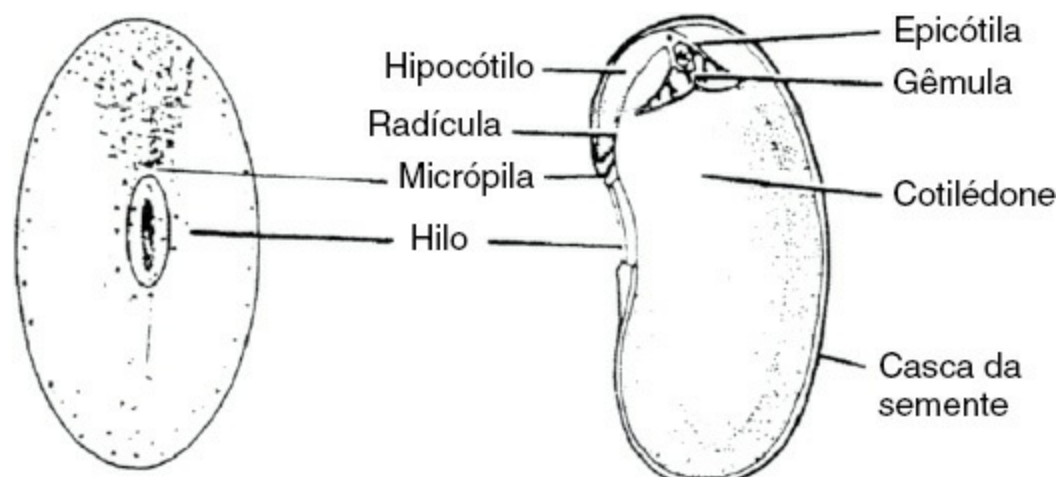


FIGURA 1.15 Estrutura de uma semente de grão de soja. De Liu (1997, p. 4). Com a gentil permissão de Springer Science + Business Media BV.

III. COMPOSIÇÃO DAS SEMENTES DAS LEGUMINOSAS

A. Composição aproximada

Leguminosas alimentares variam muito em sua composição nutritiva, dependendo do tipo e da variedade da semente, das condições do solo e de fatores ambientais. As composições aproximadas de algumas das principais leguminosas cultivadas nos Estados Unidos podem ser consultadas na Tabela 1.11.

TABELA 1.10 Produção global de leguminosas em 2007

Leguminosas	Milhões de Toneladas
Feijões, secos	19,3
Feijões, verdes	6,4
Favas, secas	4,9
Amendoins, com casca	34,9
Lentilhas	3,9
Ervilhas, secas	10,1
Ervilhas, verdes	8,3
Soja	216,1

Dados fornecidos pela FAO (2008).

A concentração proteica de algumas leguminosas selecionadas varia de 19,30% a 26,12% da porção comestível, apesar do conteúdo da proteína total ter variado de 15% a 45% (Kadam *et al.*, 1989), com algumas variedades de soja contendo até 50% de proteína (Vaidehi e Kadam, 1989). A concentração de carboidratos varia de 24% a 68% (Reddy *et al.*, 1984b) e parece estar inversamente relacionada com a concentração de lipídeos. As sementes de leguminosas com alto teor de carboidratos possuem baixo teor de lipídeos e vice-versa. Um exemplo clássico é o amendoim, que possui um alto conteúdo de lipídeos (49,24%) e conteúdo relativamente baixo de carboidratos

(16,13%) (Tabela 1.11). O potássio é, de longe, o mineral mais abundante encontrado na maioria das leguminosas alimentares (Iqbal *et al.*, 2006; USDA, 2008), com a soja contendo até 1,80 g/100 g por porção comestível (Tabela 1.11). Fósforo, cobre, ferro, cálcio e magnésio são alguns dos minerais importantes encontrados em quantidades significativas em leguminosas. A niacina e o ácido pantotênico estão entre as vitaminas mais importantes, em termos de quantidade, encontradas em leguminosas, e sua maioria também é importante fonte de folato.

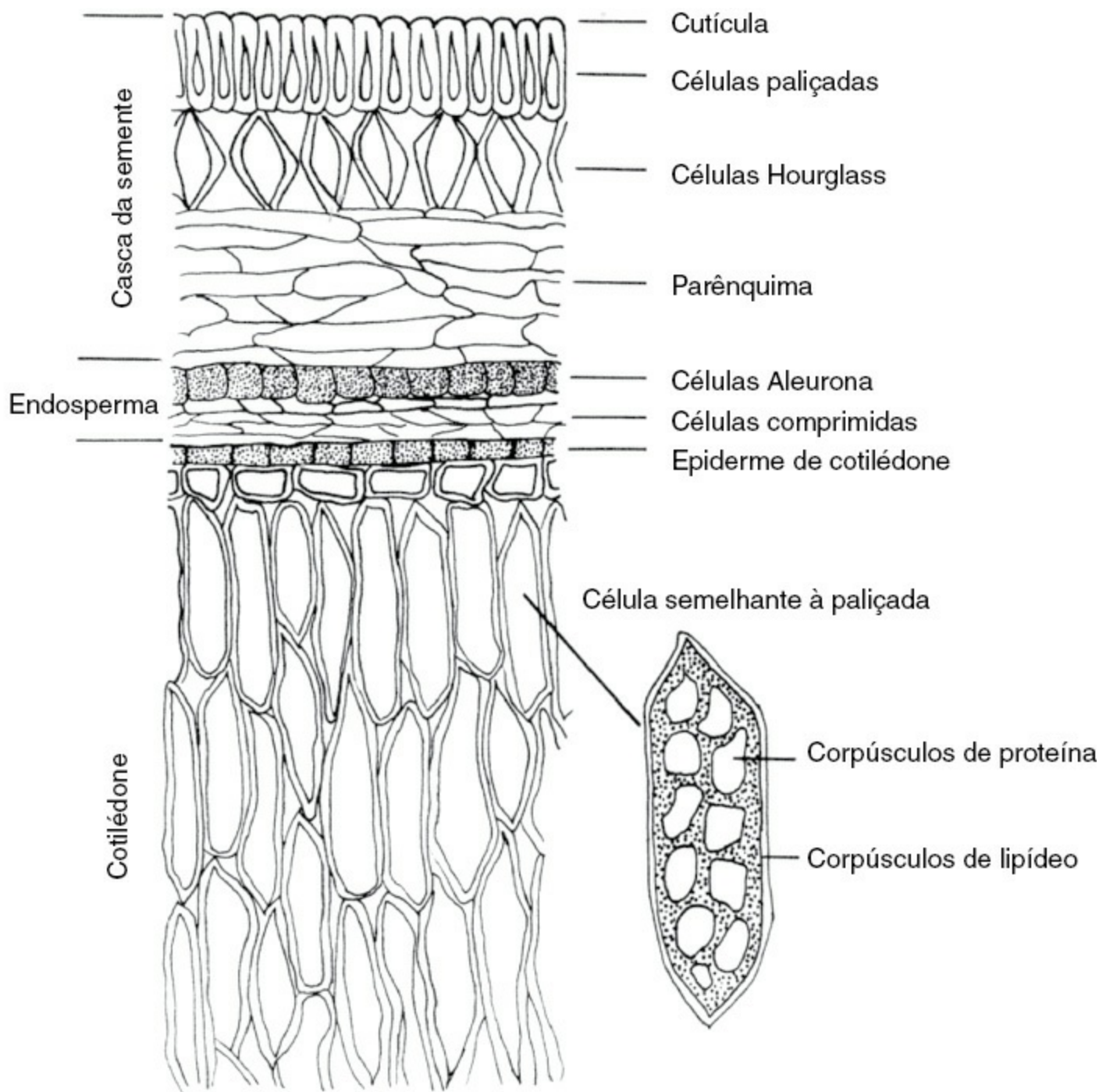


FIGURA 1.16 Seção transversal da casca de semente de soja. De Bair (1979). © Craig Bair.

TABELA 1.11 Composição aproximada de algumas leguminosas alimentares

Nutrientes	<i>Glicina max.L.</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Arachis hipogaea</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Lens culinaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Água (g)	8,54	11,53	6,50	11,27	10,98	10,40	11,02
Proteína (g)	36,49	19,30	25,80	24,55	26,12	25,80	21,60
Lípídeos totais (g)	19,94	6,04	49,54	1,16	1,53	1,06	1,42
Cinza (g)	4,87	2,48	2,33	2,65	3,08	2,67	3,60

Carboidratos, por diferença (g)	30,16	60,65	16,13	60,37	58,29	60,08	62,36
Fibra total da dieta (g)	9,30	17,4	8,50	25,5	25	30,50	15,2
Cálcio (mg)	277	105	92	55	103	56	123
Ferro (mg)	15,70	6,24	4,58	4,43	6,70	7,54	5,02
Magnésio (mg)	280	115	168	115	192	122	171
Fósforo (mg)	704	366	376	366	421	451	352
Potássio (mg)	1.797	875	705	981	1.062	955	1.483
Sódio (mg)	2	24	18	15	13	6	5
Zinco (mg)	4,89	3,43	3,27	3,01	3,14	4,78	3,65
Cobre (mg)	1,658	0,847	1,144	0,866	0,824	0,519	0,841
Manganês (mg)	2,517	2,204	1,934	1,391	1,626	1,33	1,06
Selênio (mg)	17,8	8,2	7,2	1,60	8,2	8,30	3,2

Valores nutricionais por 100 g de porção comestível.
Dados da USDA (2008).

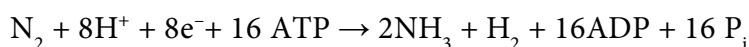
B. Proteínas

1. Fixação de nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio (BNF) é obtida por meio de diazotróficos, micro-organismos que possuem a enzima nitrogenase, que converte o nitrogênio atmosférico (N_2) em nitrogênio orgânico (em geral, amônia). As leguminosas se beneficiam da BNF formando uma associação simbiótica com algumas bactérias fixadoras de nitrogênio. As bactérias de solo *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, quando associadas às leguminosas, são responsáveis pela maior parte do nitrogênio fixado biologicamente (Freiberg *et al.*, 1997). As bactérias colonizam órgãos especiais, denominados nódulos, que são encontrados na raiz das leguminosas, local no qual a fixação do nitrogênio ocorre. O processo de nodulação das leguminosas é complexo e é controlado por vários fatores genéticos e ambientais (Hirsch, 1992; Schubert, 1995).

A nodulação parece ocorrer em três fases: pré-infecção, iniciação do nódulo e diferenciação, com flavonoides da casca da semente servindo como quimioatrativos que induzem os genes dos nódulos do *Rhizobium* (ver revisão de Hirsch, 1992). A nitrogenase é sensível à concentração de oxigênio e requer uma pressão parcial de oxigênio muito baixa para fixar nitrogênio atmosférico.

Os nódulos presentes nas raízes das leguminosas, como parte da simbiose com bactérias, sintetizam leghemoglobina, proteína que se une ao oxigênio e que mantém suficientemente baixa a tensão de oxigênio, de forma a proteger a enzima de nitrogenase, que é lábil ao oxigênio mas alta o bastante para tornar possível a respiração bacteriana. Foi relatado que a porção de apoproteína da leghemoglobina é sintetizada pela planta e a bactéria contribui com o grupo heme (componentes do complexo de ferro com anel de porfirina) (O'Brian *et al.*, 1987). Outra pesquisa, no entanto, sugere que ambos, a apoproteína e o grupo heme, componentes da leghemoglobina, são sintetizados pelo vegetal (Santana *et al.*, 1998). Todo o processo da fixação do nitrogênio atmosférico pode ser reduzido à seguinte equação química:



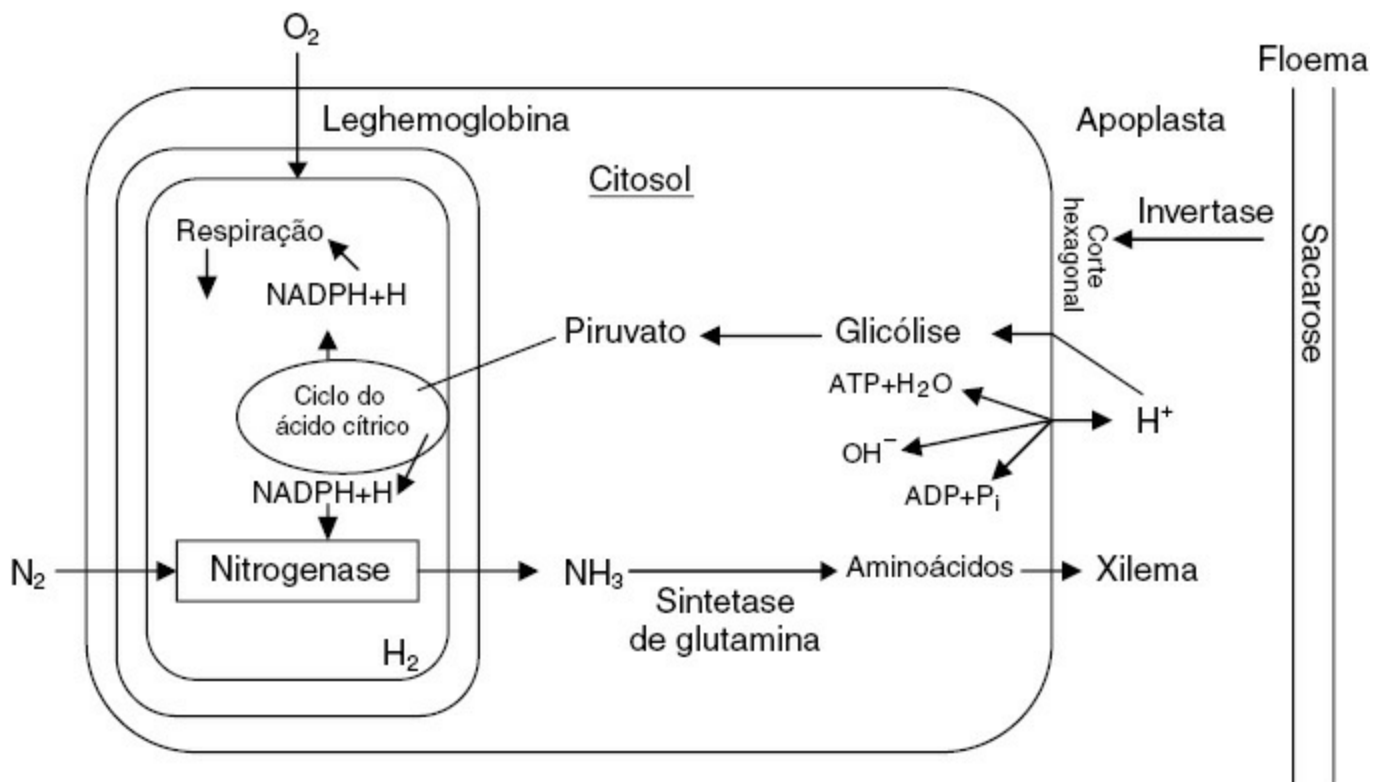


FIGURA 1.17 Modelo metabólico e rotas de transporte de células infectadas nos nódulos de leguminosas. Reeditado de Schubert (1995, p. 102). Com a permissão de SpringerScience + Business Media BV.

A energia (ATP) necessária para acionar tal processo, assim como outros metabólitos indispensáveis para a sobrevivência de bactérias simbióticas, é suprida pela planta hospedeira na forma de sacarose, por intermédio de feixes vasculares localizados no córtex interno do nódulo (Serraj *et al.*, 1999). A acidez, a umidade e a concentração de nitrogênio mineral do solo são alguns dos fatores ambientais que influenciam o ritmo da fixação de nitrogênio atmosférico (Schubert, 1995). A amônia formada, presente na forma de íon de amônio, é liberada no citosol por meio do gradiente de difusão (Schubert, 1995). A Figura 1.17 apresenta um bom sumário esquemático das rotas de transporte e metabólicas no nódulo.

2. Classificação

A maior parte das proteínas das leguminosas fica localizada no cotilédone e no eixo do embrião; a casca da semente apresenta pouquíssima proteína (Singh *et al.*, 1968). As proteínas das sementes de leguminosas podem ser classificadas, com base em sua funcionalidade, como proteínas de estrutura ou de estocagem. Proteínas de estrutura, às vezes denominadas proteínas enzimáticas ou catalíticas, compõem os inibidores de protease, lectinas, lipoxigenases e inibidores de amilase. Em conjunto, elas formam uma pequena porcentagem da proteína total das sementes, são encontradas no cotilédone e são responsáveis pelo metabolismo celular (Duranti e Gius, 1997). São albuminas solúveis em água e influenciam no sabor e na digestibilidade de leguminosas comestíveis no estágio de pós-colheita. Exemplos específicos e seus efeitos serão examinados posteriormente. As proteínas de estocagem, que formam a maior parte das proteínas das sementes de leguminosas, não são solúveis em água, mas sim em soluções salinas, e pertencem à classe de proteínas denominadas globulinas. Elas são encontradas principalmente nas células parênquimas dos cotilédones, em pequenas organelas unidas por membrana denominadas de corpos proteicos (Tombs, 1967; Duranti e Gius, 1997; Herman e Larkins, 1999) e variam em suas dimensões de 2 µm a 20 µm de diâmetro (Vaidehi e Kadam, 1989). As proteínas de estocagem fornecem as estruturas de carbono e nitrogênio necessárias para o crescimento durante a germinação. São também classificadas com base em seus coeficientes de sedimentação em quatro frações principais: 2S, 7S, 11S e 15S. Frações com coeficientes de sedimentação mais altos (até 18S) foram encontradas em algumas variedades de soja (Duranti e Gius, 1997).

Nenhuma das frações é, no entanto, homogênea. As frações de 2S e 15S são compostas basicamente por inibidores de enzimas e fatores alergênicos (Vaidehi e Kadam, 1989). As globulinas 7S compõem a maior parte da fração de 7S, enquanto a globulina 11S é a única proteína da fração 11S. Juntas, as globulinas 7S e 11S representam 50% das proteínas em alguns tipos de soja (Vaidehi e Kadam, 1989), mas em geral contribuem com mais de 70% do total de proteínas na maioria das sementes de soja e de leguminosas (Kimura *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2006). Em algumas leguminosas, por exemplo, no feijão francês e no feijão de corda, predominam as globulinas 7S como proteína de estocagem (Kimura *et al.*, 2008).

3. Estrutura e propriedades das proteínas

As globulinas das frações 7S e 11S, por perfazerem a maior parte das proteínas das sementes de leguminosas, foram muito estudadas. Elas podem ser estruturalmente similares, mas há variações de uma leguminosa para outra, em seus perfis de subunidades e sequências de aminoácidos, fatos que levam a diferenças em sua funcionalidade como um todo.

As globulinas da fração 7S em espécies diferentes de leguminosas são denominadas por diferentes nomes. A globulina predominante na soja é a β -conglucina, glicoproteína trimérica formada por três tipos de subunidades, α , α' e β (Natarajan *et al.*, 2006; Rickert *et al.*, 2004). Combinações diferentes das subunidades criam frações heterogêneas entre as variedades da soja, com propriedades funcionais diversas (Rickert *et al.*, 2004). Cada uma das subunidades, α , α' , possuem um cerne com 418 resíduos de aminoácidos e regiões com extensões de 125 e 141 resíduos, respectivamente (Maruyama *et al.*, 1999; 2002). A subunidade β só possui uma região com cerne de 416 resíduos de aminoácidos (Maruyama *et al.*, 1999). Na pesquisa de Maruyama *et al.* (1999) foi estudada a relação entre as propriedades estruturais e físico-químicas das subunidades de β -conglucina. Os resultados indicaram que as subunidades diferiam entre si quanto à estabilidade térmica, solubilidade, capacidade de emulsificação, hidrofobicidade de superfície e associação induzida por calor. Eles também descobriram que estas propriedades variavam segundo as condições, tais como pH e força iônica. Concluíram que as regiões dos cernes das subunidades são responsáveis por determinar a hidrofobicidade de superfície e a estabilidade térmica, enquanto a solubilidade, associação induzida por calor, e capacidade de emulsificação dependem da extensão das regiões, porção dos carboidratos e regiões dos cernes.

A proteína predominante 7S em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é conhecida como faseolina. Ela possui 420 resíduos de aminoácidos na síntese, mas perde 21 resíduos durante a maturação (Slightom *et al.*, 1983). Como a proteína 7S da soja, a faseolina é uma proteína trimérica com subunidades α , β e γ (Blagrove *et al.*, 1983; Slightom *et al.*, 1983). Em geral, as proteínas 7S têm pH e associação dependente de força iônica e dissociação de equilíbrio (Duranti e Gius, 1997).

A glicinina, a globulina 11S das sementes de soja, é um hexâmero que possui cinco tipos de subunidades, G1, G2, G3, G4 e G5, sendo G1 e G2 alérgenos (Natarajan *et al.*, 2006). Cada subunidade é composta por um polipeptídeo ácido e um básico, unidos por uma única ponte de dissulfeto (Staswic *et al.*, 1981). As sequências de aminoácidos dos polipeptídeos diferem entre elas e entre as espécies, criando, assim, um aumento das frações heterogêneas que assumem diferentes propriedades funcionais. Por exemplo, diferenças na força do gel de diferentes frações de glicinina foram explicadas em função de sua dependência da sequência de aminoácidos da cadeia de polipeptídeos ácidos (Nakamura *et al.*, 1984). Muitas pesquisas enfocaram a relação da estrutura e da funcionalidade da glicinina (Mori *et al.*, 1981; Nakamura *et al.*, 1984; Riblett *et al.*, 2001; Khatib *et al.*, 2002).

4. Qualidade da proteína

A qualidade da proteína costuma ser definida pela composição em aminoácidos, digestibilidade e

biodisponibilidade. É fato conhecido que as proteínas das leguminosas têm baixo teor de aminoácidos sulfurados, como a metionina, que é essencial. O segundo aminoácido limitante entre as proteínas das leguminosas é o triptofano, embora em alguns legumes, como feijão de corda, lentilhas e ervilhas, seja o aminoácido mais limitante (Iqbal *et al.*, 2006). O efeito de tais deficiências é mais marcante na fase de crescimento do que no volume de proteínas necessário na fase de manutenção dos seres humanos (Patwardhan, 1962). Os perfis dos aminoácidos de alguns legumes importantes na alimentação são mostrados na Tabela 1.12. O valor nutricional das proteínas dos legumes pode ser avaliado por vários métodos. Segundo a FAO/World Health Organization (WHO), o mais utilizado inclui a contagem de aminoácidos tendo como referência a razão entre o perfil-padrão de aminoácidos essenciais e o perfil de eficiência proteica (PER) (baseado na resposta de crescimento em animais, em geral ratos). O coeficiente de digestibilidade das proteínas de leguminosas varia muito, entre 51% e 92% (Patwardhan, 1962) e pode ser influenciado pela presença de fatores antinutricionais (Duranti e Gius, 1997).

C. Carboidratos

1. Visão geral

A concentração de carboidratos em leguminosas secas varia muito, entre 24% em feijão alado e 68% em sementes de feijão de corda (Tabela 1.13). Em geral, os carboidratos totais podem conter frações solúveis e insolúveis. Os carboidratos solúveis incluem monossacarídeos e oligossacarídeos, enquanto a fração insolúvel contempla o amido, a fibra dietética assim como outros polissacarídeos. Estes componentes dos carboidratos diferem em sua funcionalidade e impacto na saúde humana. Sementes de leguminosas podem ser diferentes em seu conteúdo de carboidrato total e na composição do carboidrato, fato que explicaria seus diferentes valores nutricionais e utilização nos alimentos.

2. Carboidratos insolúveis

a. Amido

É um dos componentes principais dos carboidratos de leguminosas. Sementes de leguminosas variam muito quanto à concentração de amido e sua composição. A Tabela 1.13 traz detalhes. Os feijões-brancos de grão pequeno da Califórnia possuem 57,8% de amido, enquanto a soja contém muito pouco amido, somente 0,2%. Em geral, a soja, o tremoço e os feijões alados apresentam baixa concentração de amido. O amido das sementes nas leguminosas pode ter grande concentração de amilose e apresentar diferentes razões de amilopectina e amilose. O conteúdo de amilose nas leguminosas varia de 5,3% em ervilhas lisas até 43,9% em feijão da Índia, como ilustrado na Tabela 1.13 (Reddy *et al.*, 1984b).

TABELA 1.12 Conteúdo de aminoácidos em algumas importantes leguminosas alimentares

Aminoácido	<i>Glycine max</i> L.	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Lens culinaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Triptofano (g)	0,591	0,185	0,250	0,275	0,247	0,223	0,256
Treonina (g)	1,766	0,716	0,883	0,872	0,928	0,895	0,909
Isoleucina (g)	1,971	0,828	0,907	1,014	1,053	1,078	0,954
Leucina (g)	3,309	1,374	1,672	1,760	1,964	1,809	1,725
Lisina (g)	2,706	1,291	0,926	1,772	1,671	1,740	1,483
Metionina (g)	0,547	0,253	0,317	0,251	0,213	0,212	0,325
Cistina (g)	0,655	0,259	0,331	0,373	0,334	0,327	0,235

Fenilalanina (g)	2,122	1,034	1,337	1,132	1,103	1,230	1,168
Tirosina (g)	1,539	0,479	1,049	0,711	0,827	0,667	0,608
Valina (g)	2,029	0,809	1,082	1,159	1,161	1,238	1,130
Arginina (g)	3,153	1,819	3,085	2,188	2,411	1,928	1,337
Histidina (g)	1,097	0,531	0,652	0,597	0,664	0,702	0,601
Alanina (g)	1,915	0,828	1,025	1,080	1,070	1,042	0,905
Ácido aspártico (g)	5,112	2,270	3,146	2,896	2,916	2,758	2,613
Ácido glutamínico (g)	7,874	3,375	5,390	4,196	4,437	3,868	3,294
Glicina (g)	1,880	0,803	1,554	1,092	1,095	1,014	0,843
Prolina (g)	2,379	0,797	1,138	1,014	1,099	1,042	0,916
Serina (g)	2,357	0,973	1,271	1,080	1,195	1,150	1,175

Valores de aminoácidos por 100 g de porção comestível. Fonte: USDA (2008).

TABELA 1.13 Teor de carboidrato total e de amido em leguminosas

Leguminosa	Carboidrato total	Amido	Amilose	Temperatura de gelatinização
Semente de feijão alado	24,0–42,2	–	–	–
Ervilha lisa	56,6	36,9–48,6	5,3–8,7	65–69
Ervilha rugosa	–	24,0–36,6	10,2–15,1	>99
Feijão-grande	61,2–61,5	44,0	9,9	–
Feijão-branco pequeno da Califórnia	–	57,8	7,7	–
Feijão-vermelho	56,3–60,5	31,9–47,0	17,5–37,2	64–68
Feijão Navy	58,4	27,0–52,7	22,1–36,0	68–74
Feijão Pinto	–	51,0–56,5	25,8	–
Feijão-rosa	–	42,3	14,9–35,3	–
Feijão fradinho	–	41,2	15,8–38,3	–
Feijão-da-Índia	56,5–63,7	32,2–47,9	43,9	71,5–74
Grão-de-bico	60,1–61,2	37,2–50,0	31,8–45,8	–
Feijão-Mungo	53,3–61,2	37,0–53,6	13,8–35,0	63–69
Grão-de-bico vermelho	57,3–58,7	40,4–48,2	38,6	–
Soja	25,2–33,5	0,2–0,9	15,0–20,0	73–81
Fava	57,3	41,2–52,7	22,0–35,0	–
Lentilha	59,7	34,7–52,8	20,7–45,5	58–61
Feijão-de-corda	56,0–68,0	31,5–48,0	–	–
Semente de tremoço	–	0,3–3,5	–	–

Valores relatados em g/100g sobre uma base de peso seco. Fonte: Reddy *et al.* (1948b).

A temperatura de gelatinização de amidos de vários legumes varia geralmente de 60°C a 90°C (Tabela 1.13), números comparáveis com a temperatura de gelatinização de amido do milho, mais alta do que a do amido de milho ceroso. A temperatura de gelatinização é determinada pela estrutura e composição do amido: uma quantidade substancial de amilopectina promove o processo de gelatinização, enquanto o grau de ramificação da amilopectina no amido altera a temperatura. Outros fatores que podem alterar a temperatura de gelatinização do amido incluem a presença de lipídeos ligados, proteínas e fosfato, além da dimensão e do formato do grânulo de amido.

Foi descoberto recentemente que o amido não pode ser hidrolisado e absorvido por completo após a digestão, apesar de o amido de leguminosas contribuir significativamente na obtenção de energia total. Os componentes do amido que não são hidrolisados no trato intestinal humano são classificados como amidos resistentes (RS), os quais podem gerar efeito positivo sobre o índice glicêmico (GI), um indicador dos efeitos dos carboidratos no nível de glicose no sangue. Muitos fatores, porém, podem alterar a capacidade de digestão e a formação de RS do amido. Entre eles, pode-se incluir as propriedades inerentes do amido, como sua estrutura granular e a razão entre amilose e amilopectina, presença ou tratamento térmico, conteúdo de umidade, interação com outros químicos,

além das condições de estocagem e processamento (Sajilata *et al.*, 2006; Siddhuraju e Becker, 2005; Bravo *et al.*, 1998; Tovar e Melito, 1996). O tratamento térmico diminuiu a concentração de RS de 2,4% para 1,9% na ervilha-forrageira, por exemplo, de 3,3% para 2,5% de lentilhas e de 3,4% para 2,3% em grãos-de-bico (Rochfort e Panozzo, 2007). Em contraste, o tratamento térmico a vapor aumentou a concentração de RS de 1,9% para 6,0% em feijões-pretos e de 0,8% para 4% em feijões-de-lima. O cozimento a alta pressão, por outro lado, aumentou o RS de 0,8% a 2,1% em feijões-de-lima e não apresentou efeito nos feijões-pretos, fato que sugere que, além das propriedades inerentes ao produto, o tratamento térmico e a umidade influem na formação do RS (Tovar e Melito, 1996).

O efeito da gelatinização na digestibilidade foi observado por Sandhu e Lim (2007), que compararam a temperatura de colagem de diversos legumes: feijão-da-china ou feijão-mungo, grão-de-bico, ervilha do campo, lentilha, feijão da índia (*black gram*) e feijão-guandu. A feijão-mungo apresentou a mais baixa temperatura de gelificação ou pasta, de 50,2°C comparado com 51,4°C para o grão-de-bico, o que sugere uma digestibilidade maior. Sandhu e Lim (2007) confirmaram o alto grau de digestibilidade da vagem-forrageira, uma vez que seu índice de RS foi estimado em 50,3%. Em comparação, amido de feijão-guandu atingiu 78,9% de RS e apresentou baixa digestibilidade e índice glicêmico (GI). Estes pesquisadores concluíram ainda que o feijão-da-china, com alta digestibilidade, é indicado para pacientes desnutridos, enquanto o consumo de feijão-guando é preferível para diabéticos.

Os processamentos de imersão e autoclavagem também alteraram a digestibilidade do amido em feijões-mucuna, que apresentam 28% de amido em sua composição (Siddhuraju e Becker, 2005). Após a imersão em água, a porcentagem de amido digerível aumentou de 67,4% para 87,2%. Este resultado foi acompanhado por uma significativa diminuição na quantidade do RS, de 88,3 g/kg em sementes cruas para 48,1 g/kg após a imersão. Uma pesquisa anterior, relatada por Chau e Cheung (1997), descobriu que duas sementes de leguminosas da China aumentaram a digestibilidade do amido de 36,4% para 98,2%; enquanto o tratamento térmico aumentou a digestibilidade de seis a sete vezes, o processo de germinação aumentou a digestibilidade de uma a duas vezes. O conteúdo de RS em sementes de leguminosas pode ser consultado na Tabela 1.14.

b. Fibras dietéticas

Sementes de leguminosas são uma excelente fonte de fibras na dieta humana. A concentração de fibras totais se estende por cerca de 1,2% (m/m) no grão-de-bico, no grão-de-bico Bengal, grão-de-bico vermelho e feijões-mungo, e 25,6% (m/m) em vagens de grão-de-bico Bengal (Tabela 1.15). A concentração total de fibras e sua composição podem variar muito no mesmo tipo de vagens de leguminosas. A concentração total de fibras, por exemplo, varia de 1,2% a 25,6% e a concentração de celulose varia de 1,1% a 13,7% em grão-de-bico (Salunkhe *et al.*, 1985).

A fibra nas vagens das leguminosas pode apresentar concentração significativa de celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de substâncias pécticas, arabinogalactana e xiloglucana (Sathe *et al.*, 1984).

Um número crescente de evidências tem descrito efeitos benéficos à saúde do consumo da fibra da vagem das leguminosas e de outras fibras alimentares, podendo incluir, além de outros benefícios, aumento da quantidade e da umidade do bolo fecal, redução do nível de colesterol no plasma, melhora do GI, e risco reduzido de câncer do cólon (Nwokolo, 1996). As moléculas de fibras dietéticas não podem ser digeridas pelo intestino delgado dos humanos, mas são fermentadas por micro-organismos do cólon produzindo ácidos graxos de cadeia curta. A redução do pH do local aumenta o trânsito do conteúdo que está no intestino, além de elevar a eliminação de sais biliares. A redução do risco do câncer do cólon pode ser atribuída à produção dos ácidos graxos de cadeia curta. As fibras dietéticas podem absorver e aglutinar os ácidos biliares, aumentando, assim, sua eliminação pelas fezes. Este efeito estimularia a conversão do colesterol em ácidos biliares no fígado e, com isso, reduziria o nível de

colesterol sérico.

TABELA 1.14 Amido resistente (RS) em sementes de leguminosas *in natura* e cozidas

Leguminosa	<i>In natura</i> (% RS)	Cozida (% RS)
Ervilha forrageira ^a	2,4	1,9
Lentilha ^{a,b}	3,3–6,53	2,5
Grão-de-bico ^{a,b}	3,4–5,7	2,3
Feijão-preto ^c	1,9	6,0
Feijão-vermelho ^c	0,8	NA
Feijão-de-lima ^c	2,0	4,0
Feijão ^b	4,6–6,6	NA
Soja ^b	0,2–0,3	NA
Feijão-fava ^b	0,3–5,6	NA
Ervilha lisa ^b	5,6–7,1	NA
Ervilha enrugada ^b	9,6–10,3	NA
Farelo de trigo	0,4	NA

NA: Não disponível. ^a Dados de Rochfort e Panozzo (2007). ^b Mikulikova *et al.* (2008). ^c Tovar e Melito (1996)

TABELA 1.15 Composição de fibras de leguminosas

Leguminosa	Fibra total	Celulose	Lignina	Hemicelulose
Semente de feijão alado	3,4–12,5	–	0,7–1,0	1,36
Ervilha plana	4,6–7,0	0,9–4,9	0,5–0,9	1,0–5,1
Ervilha rugosa	7,6	1,2–4,2	0,3–1,0	0,9–6,6
Feijão-grande	4,5–6,7	–	–	–
Feijão-vermelho	3,7	2,5–5,9	2,7–3,1	0,3
Feijão Navy	3,4–6,6	3,2	0,1	0,5–4,9
Feijão Pinto	4,3–7,2	9,0	1,8–3,0	4,0
Feijão-rosa	–	6,0	0,2	–
Feijão fradinho	3,1	4,9	0,1	–
Feijão-da-Índia	1,2–19,5	5,0	3,8	10,7
Grão-de-bico	1,2–25,6	1,1–13,7	2,9–7,1	0,6–9,1
Feijão-mungo	1,2–12,8	2,5–4,6	2,2–7,2	0,3–9,1
Feijão-guandu	1,2–20,3	7,3	2,9	10,1
Soja	2,4–5,5	–	–	7,6
Fava	8,0	1,0	0,7–1,1	4,0–4,6
Lentilha	2,6	4,1	2,6	6,0
Feijão-de-corda	1,7–4,0	–	0,6–1,8	–
Semente de tremçoço	3,0	–	0,7–0,8	9,3–9,9

Valores relatados em g/100 g sobre base de dieta seca. Fonte: Reddy *et al.* (1984b).

3. Carboidratos solúveis

Sementes de leguminosas contêm alto nível de carboidratos solúveis em água, incluindo traços de monossacarídeos, como a glucose e a arabinose em vagens de soja, e concentração mensurável de dissacarídeos e oligossacarídeos, que, com frequência, incluem sacarose, rafinose, estaquiose, verbascose e ajugose (Sathe *et al.*, 1984; Nwokolo, 1996). Sementes de leguminosas nos alimentos diferem muito entre si quanto à concentração e composição de açúcares (Tabela 1.16). Ervilhas rugosas podem apresentar cerca de 10% a 15,1% de total de açúcar total solúvel, enquanto a soja pode conter 5% (Reddy *et al.*, 1984b). Os oligossacarídeos individuais não são distribuídos igualmente nas diferentes frações das sementes de leguminosas (Vaidehi and Kadam, 1989), fato que

deve ser levado em consideração na produção ou no uso de alimentos baseados em leguminosas.

A Figura 1.18 demonstra que tais oligossacarídeos são açúcares não redutores derivados da sacarose, adicionados de uma ou mais unidades de galactose por ligações glicosídicas tipo α -1,6, a partir da glucose presente na sacarose. São, em geral, conhecidos como a família das rafinose ou galacto-oligossacarídeos. Oligossacarídeos de rafinose não são digeríveis no intestino delgado humano, em decorrência da ausência da enzima α -1,6 galactosidase na mucosa intestinal, apesar da sacarose ser hidrolisada e absorvida.

A família de oligossacarídeos de rafinose tem sido associada à flatulência e ao desconforto abdominal após a ingestão de leguminosas. Esses oligossacarídeos tendem a absorver fluído ao lúmen por osmose e podem provocar distensão abdominal, cólicas e diarreia. No intestino grosso, podem ser hidrolisados em monossacarídeos por enzimas produzidas por micro-organismos locais. Isto aumenta a osmolalidade do local e pode gerar uma maior retenção de líquidos. Os monossacarídeos também são utilizados pelos micro-organismos, que tendem a produzir volumes significativos de gases e ácidos de pequeno peso molecular. Os ácidos diminuem o pH local, o que causaria irritação no cólon e aumentaria o movimento do conteúdo intestinal. A retenção de fluidos e a intensificação dos movimentos intestinais causariam diarreia. A formação de gases, incluindo a formação de dióxido de carbono, hidrogênio e metano pode causar inchaço e criar problemas em indivíduos com patologias do cólon, incluindo a síndrome do intestino irritável.

TABELA 1.16 Composição em carboidratos solúveis de leguminosas

Leguminosa	Sacarose	Rafinose	Estaquiose	Verbasose	Ajugose	Total solúvel
Semente de feijão alado	0,3–8,2	0,2–2,0	0,1–3,6	0,04–0,9	–	3,4
Ervilha lisa	2,3–2,4	0,3–0,9	2,2–2,9	1,7–2,3	0,06	5,3–8,7
Ervilha enrugada	2,3–4,2	1,2–1,6	2,9–5,5	2,2–4,2	0,13	10,2–15,1
Feijão-grande	2,0–3,8	0,3–0,7	2,3–3,8	–	–	9,9
Feijão-branco pequeno da Califórnia	3,0	0,3–0,7	2,9–3,7	0,1	–	7,7
Feijão-vermelho	1,6	0,3–0,9	2,4–4,0	0,1–0,5	–	8,0
Feijão Navy	2,2–3,5	0,4–0,7	2,6–3,5	0,1–0,4	–	5,6–6,2
Feijão Pinto	2	0,4–0,6	2,9–3,0	0,1–0,2	–	6,7
Feijão-rosa	1,4	0,2–0,4	0,2–0,4	–	–	–
Feijão fradinho	2,6	0,4–1,0	0,4–0,9	–	–	–
Feijão-da-Índia	0,7–1,5	0–1,3	0,9–3,0	3,4–3,5	–	3,0–7,1
Grão-de-bico	0,7–2,9	0,7–2,4	2,1–2,6	0,4–4,5	–	3,5–9,0
Feijão-mungo	0,3–2,0	0,3–2,6	1,2–2,8	1,7–3,8	–	3,9–7,2
Feijão-guandu	2,7	1,0–1,1	2,7–3,0	4,0–4,1	–	3,5–10,2
Soja	–	0,7–1,3	2,2–4,2	0–0,3	–	5,3
Fava	1,4–2,7	0,1–0,5	0,5–2,4	1,6–2,1	–	3,1–7,1
Lentilha	1,8–2,5	0,4–1,0	1,9–2,7	1,0–3,1	–	4,2–6,1
Feijão-de-corda	1,8–3,1	0,4–1,2	2,0–3,6	0,6–3,1	–	6,0–13,0
Tremoço	1,0–2,6	0,5–1,1	0,9–7,1	0,6–3,4	0,3–2,0	7,4–9,5

Valores correspondentes a g/100 g baseados em peso seco.
Dados de Reddy *et al.* (1984b); Kamath e Belavady (1980).

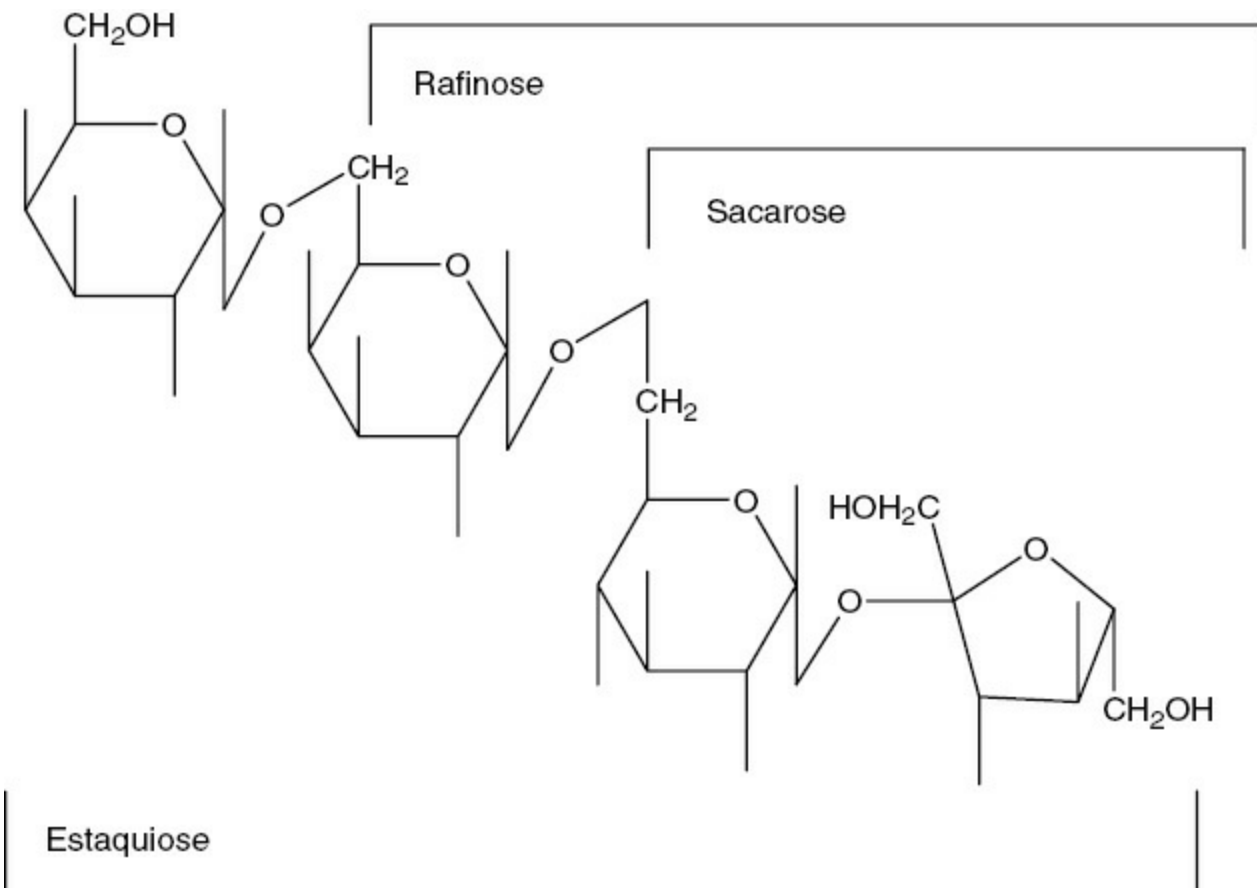


FIGURA 1.18 Estrutura dos carboidratos solúveis de leguminosas, rafinose, estaquiose e sacarose.

A concentração de oligossacarídeos nos alimentos pode ser reduzida por diferentes tipos de processamento, tais como a imersão das sementes ou o cozimento em água (Reddy *et al.*, 1984b; Vaidehi e Kadam, 1989; Martin-Carrejas *et al.*, 2006). Esforços foram realizados, tanto no cultivo como nas modificações genéticas, com o objetivo de reduzir tais oligossacarídeos nas leguminosas. Além disso, a germinação das sementes, a fermentação e o tratamento enzimático por α -galactosidase e a irradiação são possíveis abordagens para tentar eliminar a família dos oligossacarídeos da rafinose nas leguminosas (Reddy *et al.*, 1984b; Rochfort e Panozzo, 2007). Eliminar completamente a família dos oligossacarídeos da rafinose pode não liquidar a flatulência gerada pela ingestão de legumes, uma vez que as fibras dietéticas também contribuem para provocar flatulência. Novas pesquisas têm sugerido que estes polissacarídeos podem provocar potenciais efeitos benéficos à saúde, dentre os quais a imunomodulação e a alteração na velocidade do trânsito intestinal (Parsons *et al.*, 2000; Rochfort e Panozzo, 2007).

4. Conclusão

Carboidratos, um dos principais componentes das sementes de leguminosas, podem ser excelentes fontes de fibras dietéticas e fornecer benefícios à saúde. As frações unitárias de carboidratos de leguminosas podem contribuir de formas diferentes para a nutrição e a segurança dos alimentos e sua funcionalidade. Vários tratamentos feitos após a colheita, incluindo os que envolvem seu processamento, podem afetar a digestibilidade dos carboidratos de leguminosas e alterar seus valores nutricionais e propriedades benéficas, assim como propriedades indesejáveis, tais como causar flatulência.

D. Lipídeos

Sementes de leguminosas armazenam lipídeos em pequenas organelas esféricas com diâmetros que variam de 0,5

µm a 2,5 µm, denominadas de corpos lipídicos (Tzen e Huang, 1992). Estas organelas, também chamadas de esferossomas, se localizam nos cotilédones e, na sua maioria, são compostos por triglicerídeos. A síntese de lipídeos em sementes de soja é controlada pela regulação dos níveis de ácidos graxos das proteínas biossintéticas, cuja presença depende do estágio de maturidade da semente (Ohlrogge e Kuo, 1984).

Óleos de sementes de leguminosas são boas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, em especial, os ácidos graxos essenciais, como ômega-6 ácido linoleico e ômega-3 ácido linolênico. A soja possui, de longe, a maior quantidade de ácido linoleico e boas quantidades de ácido oleico e palmítico (Tabela 1.17). Amendoim (*Arachis hypogaea*) tem o maior conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados, se medido com base em sua massa, e é quase que inteiramente composto por ácido oleico.

Fitoesteróis estão ganhando proeminência como agentes nutracêuticos que diminuem o nível de colesterol sérico. Eles possuem estrutura similar ao colesterol e são encontrados nas membranas celulares de vegetais como componentes da rigidez. Como pode ser visto na Tabela 1.17, o óleo de amendoim tem o maior nível de fitoesteróis por peso da semente, seguido da soja, ervilhas e favas.

TABELA 1.17 Composição de ácidos graxos e fitosterol de algumas importantes leguminosas

Leguminosa	Ácidos graxos de interesse						Fitosterol (mg)	
	16:0	18:1	18:2	18:3	Saturado	Monoinsaturado		Poli-insaturado
<i>Glycine max</i>	2,116	4,348	9,925	1,330	2,884	4,404	11,255	161
<i>Cicer arietinum</i>	0,501	1,346	2,593	0,101	0,626	1,358	2,694	35
<i>Arachis hypogaea</i>	5,154	23,756	15,555	0,003	6,834	24,429	15,559	220
<i>Pisum sativum</i>	0,125	0,232	0,411	0,084	0,161	0,242	0,495	135
<i>Vicia faba</i>	0,204	0,297	0,581	0,046	0,254	0,303	0,627	124
<i>Lens culinaris</i>	0,133	0,180	0,404	0,109	0,156	0,189	0,516	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,343	0,123	0,332	0,278	0,366	0,123	0,610	-

Valores de aminoácidos por porção comestível de 100g.

Fonte: USDA (2008).

Os fosfolipídeos são outra classe de lipídeos encontrados nas sementes de leguminosas. Trata-se de uma grande família de lipídeos polares, em que o mais predominante é a lecitina, proveniente da soja. A lecitina de soja traz muitos benefícios à saúde e tem sido utilizada em alimentos funcionais (Wang *et al.*, 2006). Os fosfolipídeos encontrados em maior quantidade nos feijões incluem fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol (Yoshida *et al.*, 2009). O conteúdo de fosfolipídeos nas sementes de vegetais diminui à medida que a semente amadurece, em consequência da diminuição na proporção dos componentes da membrana na semente em desenvolvimento (Wang *et al.*, 2006).

E. Outros componentes de interesse

1. Inibidores de enzimas

Sementes de leguminosas contêm proteínas de baixa massa molecular (Clemente e Domoney, 2006), que inibem a atividade enzimática das proteases, amilases e lipases (Lajolo e Genovese, 2002). Entre elas, as inibidoras de protease são as mais importantes e extensivamente estudadas até hoje.

Os inibidores de protease presentes na soja são classificados em duas famílias, Bowman-Birk e Kunitz, que diferem quanto à estrutura, massa molecular e atividade. Os inibidores de Bowman-Birk possuem uma massa molecular que varia de 6 kDa e 10 kDa, possuem sete pontes de dissulfídicas, além de poderem agir contra a tripsina e a quimiotripsina simultaneamente em sítios de ligação independentes (Lajolo e Genovese, 2002; Becker-Ritt *et al.*, 2004). São formados por dois polipeptídeos com ligações discretas que possuem, cada um, um sítio de

ligação, fazendo com que ambos possam inibir duas moléculas de enzimas ao mesmo tempo (Clemente e Domoney, 2006). Os inibidores de Kunitz são menores e possuem somente uma cadeia de polipeptídeos com massa molecular de cerca de 2 kDa (Becker-Ritt *et al.*, 2004). Eles possuem duas pontes de dissulfídicas e agem especificamente contra a tripsina (Lajolo e Genovese, 2002).

O efeito dos inibidores de protease na digestão e no metabolismo está bem documentado em um estudo feito por Grant *et al.* (1995). As consequências e os efeitos de uma dieta de longo prazo, contendo inibidores de protease e lectinas com quatro importantes leguminosas (soja, feijão-de-corda, feijão e lupino), em ratos, foram investigados. Em termos de concentração, a soja demonstrou possuir o maior teor de tripsina inibida: 24,6 g/kg e 12,0 g de quimiotripsina inibida/kg, enquanto a lupina mostrou ter o menor teor de tripsina inibida: 1,1 g/kg e 1,4 g de quimiotripsina inibida/kg. O consumo de uma dieta com soja, que possui alto teor de inibidores de protease e baixo teor de lectinas, durante um período superior a 700 dias causou grande aumento no pâncreas dos ratos, e alguns desenvolveram nódulos macroscópicos no pâncreas. Em uma pesquisa anterior, feita por Jaffe e Lette (1968), os ratos tiveram seu crescimento severamente afetado com uma dieta de feijões-vermelhos (*P. vulgaris*), que possuem baixo teor de hemaglutinina e alta atividade de inibidor de tripsina.

Comprovou-se que um tratamento térmico da soja em água a 80°C durante 40 minutos reduziu muito a atividade inibidora da protease da soja, com o benefício do crescimento dos ratos (Armour *et al.*, 1998). Apesar das atividades antinutricionais encontradas nos inibidores de protease das leguminosas, estudos recentes sugerem possíveis efeitos benéficos à saúde. Tais inibidores presentes na soja, especialmente da família Bowman-Birk, demonstraram possuir propriedades anticancerígenas (consultar Kennedy, 1998). Uma pesquisa feita por Lin e Ng (2008) descobriu um inibidor de tripsina dimérico do tipo Kunitz, em feijões de soja pretos (*Glycine max* cv. “Dull Black”), que estimula a produção de óxido nítrico por meio de macrófagos e inibe a transcriptase reversa do vírus 1 da imunodeficiência humana (HIV-1). Eles também demonstraram a possibilidade de inibir a proliferação de células cancerígenas no fígado e nas mamas. Ainda são necessários estudos mais aprofundados para confirmar e elucidar os mecanismos que estão por trás das novas atividades biológicas dos inibidores de protease de leguminosas.

Os inibidores de α -amilase são caracterizados como proteínas oligoméricas formadas por subunidades de glicopeptídeos (Berre-Anton *et al.*, 1997). Elas são sintetizadas no retículo endoplasmático, tornando-se pré-proteínas glicosiladas, e depois transportadas para os vacúolos de proteínas de estocagem (Pueyo *et al.*, 1993). Duas isoformas, α -AII e α -AII', foram isoladas em feijões (*P. vulgaris*), e ambas apresentaram mecanismos inibidores mistos não competitivos da α -amilase mamária (Berre-Anton *et al.*, 1997). A mesma pesquisa apontou que a α -AII tem atividade ótima em pH ácido, igual a 4,5°C a 30°C, sugerindo que esta enzima pode ter especificidade para a α -amilase pancreática, cuja atividade ótima é similar à descrita anteriormente. No feijão comum, o nível de controle molecular dos inibidores de α -amilase parece ser exercido por um gene muito similar àquele responsável por codificar lectinas, tanto em suas estruturas como em suas composições (Moreno e Chrispeels, 1989). A inibição da digestão de amido pelo inibidor da α -amilase demonstrou decrescer a utilização das proteínas da dieta e de gordura em ratos, ocasionando diminuição de seu crescimento (Pusztai *et al.*, 1995).

2. Lectinas

As lectinas das leguminosas formam um grupo de glicoproteínas homólogas encontrado principalmente em sementes (Loris *et al.*, 1998). A afinidade da proteína pela porção do carboidrato é específica e reversível (Lajolo e Genovese, 2002; Hamelryck *et al.*, 1996), o que explica seu papel no reconhecimento da planta hospedeira-rhizobia durante o início da fixação do hidrogênio (Bohloul e Schmidt, 1974). Neste estudo, a lectina de soja com identificação por isotiocinato de fluoresceína uniu-se de modo seletivo somente a cepas de soja nodulares de *Rhizobium japonicum*. A conclusão a que chegaram foi que as lectinas de soja devem interagir com polissacarídeos

específicos na superfície da célula apropriada de *Rhizobium*, causando assim o início da nodulação. As lectinas das leguminosas apresentam considerável similaridade em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, mas as pequenas variações na sequência de aminoácidos causam grandes diferenças em suas estruturas quaternárias (Srinivas *et al.*, 2001) e nas especificidades pelos carboidratos (Loris *et al.*, 1998).

Lectinas aglutinam-se e unem-se aos fragmentos de açúcar nas membranas das células, alterando a estrutura das membranas. Estas atividades, quando ocorrem no intestino, interferem com a digestão e a absorção, fazendo com que as lectinas se tornem fatores antinutricionais. Lajolo e Genovese (2002) relataram que lectinas de soja purificadas interferem no crescimento, induzem danos e aumento do intestino delgado e estimulam a hipertrofia e a hiperplasia do pâncreas em ratos de laboratório. Fitohemaglutinina, a lectina de semente da *P. vulgaris*, é formada por duas subunidades de polipeptídeos (E e L), e pesquisas relatam serem eritroaglutinadores e leucoaglutinantes, respectivamente (Hamelryck *et al.*, 1996). As lectinas de leguminosas são, em geral, neutralizadas por processamento térmico, por exemplo, cozimento em pressão atmosférica por 15 minutos, processo considerado suficiente para cercear seus efeitos antinutricionais.

Apesar de suas conhecidas propriedades antinutricionais, pesquisas estão começando a comprovar que algumas lectinas de leguminosas possuem possíveis efeitos benéficos à saúde. Feijões, quando crus, que possuem alto teor de lectina, diminuíram o acúmulo de lipídeos em ratos obesos (Pusztai *et al.*, 1998). Pusztai e seus colaboradores concluíram, com base na pesquisa, que pode ser factível desenvolver agentes adjuntos ou terapêuticos a partir da lectina de feijões, que estimulem a função intestinal e reduzam a obesidade.

3. Lipoxigenase

Lipoxigenase é uma enzima monomérica com ferro, não pertencente ao grupo heme, que catalisa a dioxigenação dos ácidos graxos que contêm sistemas de pentadieno (1Z,4Z) (Schilstra *et al.*, 1994). Em leguminosas, as lipoxigenases catalisam a hidroperoxidização de lipídeos induzindo ao desenvolvimento de aromas indesejáveis, ocorrendo, em geral, nas sementes após a colheita. O papel fisiológico das lipoxigenases nos vegetais ainda não foi desvendado, mas já se sabe que são capazes de oxidar os pigmentos das leguminosas (clorofila e carotenoides), além de colesterol (Sessa, 1979). Aparentemente, sua atividade é influenciada pela presença de produtos do hidroperóxido (Smith e Lands, 1972). A atividade da enzima também aumenta durante o processamento, quando as paredes das células são rompidas e os mecanismos de controle celular não estão mais em ação (Sessa, 1979). O desenvolvimento de aromas indesejáveis depende da composição de ácidos graxos e resultam da formação de aldeídos de cadeias curtas, cetonas e alcoois (Kobayashi *et al.*, 1995; Yuan e Chang, 2007).

IV. EFEITOS DA GERMINAÇÃO

Há muito tempo, a germinação é considerada um método alternativo para aumentar o valor nutricional e as propriedades sensoriais das sementes de leguminosas (Chen *et al.*, 1975). A utilização de sementes germinadas varia: elas podem ser secas e moídas e transformadas em farinha para usos semelhantes aos das farinhas feitas com sementes não germinadas. A semente germinada e fresca é consumida como se fosse um vegetal, especialmente nas culturas orientais, e uma conscientização crescente fez com que estes brotos também fossem introduzidos com maior frequência na dieta ocidental. A germinação, porém, pode caracterizar uma barreira para fornecedores de leguminosas, uma vez que sementes maturadas podem ser estocadas por longo tempo quando feita em condições apropriadas; os brotos frescos são relativamente perecíveis e requerem controle mais rígido de umidade e temperatura. As alterações na composição das sementes durante a germinação foram abordadas neste texto; entretanto, é importante salientar que a comparação de pesquisas sobre a germinação é difícil em decorrência da variação dos protocolos relativos à umidade relativa, temperatura, idade das sementes, espécies de sementes e

tempo de germinação, entre outras questões. Além do mais, as publicações que analisam a germinação de sementes, cujos resultados não são baseados em peso seco, trazem agravantes adicionais ligados a conclusões: o peso adicional da água inerente às plântulas pode indicar níveis decrescentes dos macronutrientes e quilocalorias baseadas em peso. O tema de pesquisas tornou-se demasiado complexo para que possamos debater, aqui, cada uma das variáveis. Assim, apenas um debate geral sobre as principais tendências na germinação de leguminosas foi apresentado. Para informações mais específicas, sugere-se recorrer a outras publicações.

A. Carboidratos

A rafinose e a estaquiase são de grande interesse, quando enfocados os carboidratos das leguminosas na germinação: são dois α -galactosídeos, os maiores causadores de flatulência. Aman (1979) relata que a concentração destas moléculas tende a diminuir nos primeiros dias de germinação, coincidindo com um aumento da concentração de frutose (Viana *et al.*, 2005). Outros pesquisadores fazem a mesma afirmação em várias leguminosas, incluindo, especialmente, a soja, o feijão-preto e o grão-de-bico (El-Adawy, 2002 [grão-de-bico]; Martin-Cabrejas *et al.*, 2008 [soja]; Donangelo *et al.*, 1995). Donangelo *et al.* (1995) sugerem que a atividade da α -galactosidase durante a germinação pode ser responsável pelas alterações citadas. Viana *et al.* (2005) afirmaram o mesmo, por meio de reações com substratos químicos e pela purificação parcial da enzima. A composição de carboidratos de sementes de soja germinadas pode ser verificada na Figura 1.19.

A magnitude do decréscimo em α -galactosídeos varia nas diferentes espécies de leguminosas, assim como a quantidade e o tipo de fibra presente em sementes (Donangelo *et al.*, 1995; Vanderstoep, 1981; Martin-Cabrejas *et al.*, 2008). Dentre tais pesquisas, a de Martin-Cabrejas *et al.* (2008) e a de Bau *et al.* (1997) relatam haver um decréscimo no total de fibras dietéticas na soja germinada, enquanto Donangelo *et al.* (1995) registraram um discreto aumento. Aman (1979) não encontrou alterações em feijões-mungo e pequena diminuição de fibras em grãos-de-bico. El-Adawy (2002) relatou haver um pequeno aumento nas fibras durante a germinação de grãos-de-bico. De qualquer modo, as diferenças no conteúdo de fibras em grãos-de-bico variam cerca de $\pm 2\%$ por peso, o que indica pouca importância na dieta. A soja germinada, porém, perdeu o equivalente a 10% de fibra de sua matéria seca em 24 horas (Martin-Cabrejas *et al.*, 2008).

B. Lipídeos

É consenso a diminuição do teor de lipídeos durante a germinação de leguminosas, com base em seu peso seco (Bau *et al.*, 1997 [triglicerídeos]; Chen *et al.*, 1975 [triglicerídeos]; El-Adawy, 2002 [gordura]; Mostafa e Rahma, 1987 [concentração de óleo]). Enquanto a magnitude da diminuição varia, o aparente decréscimo pode ser consequência de um aumento de outras matérias secas na plântula (Liu, 1997). A degradação dos lipídeos, sugerem os pesquisadores, somada à diminuição dos carboidratos, estimula o crescimento das plântulas assim como os processos que as acompanham (Bau *et al.*, 1997).

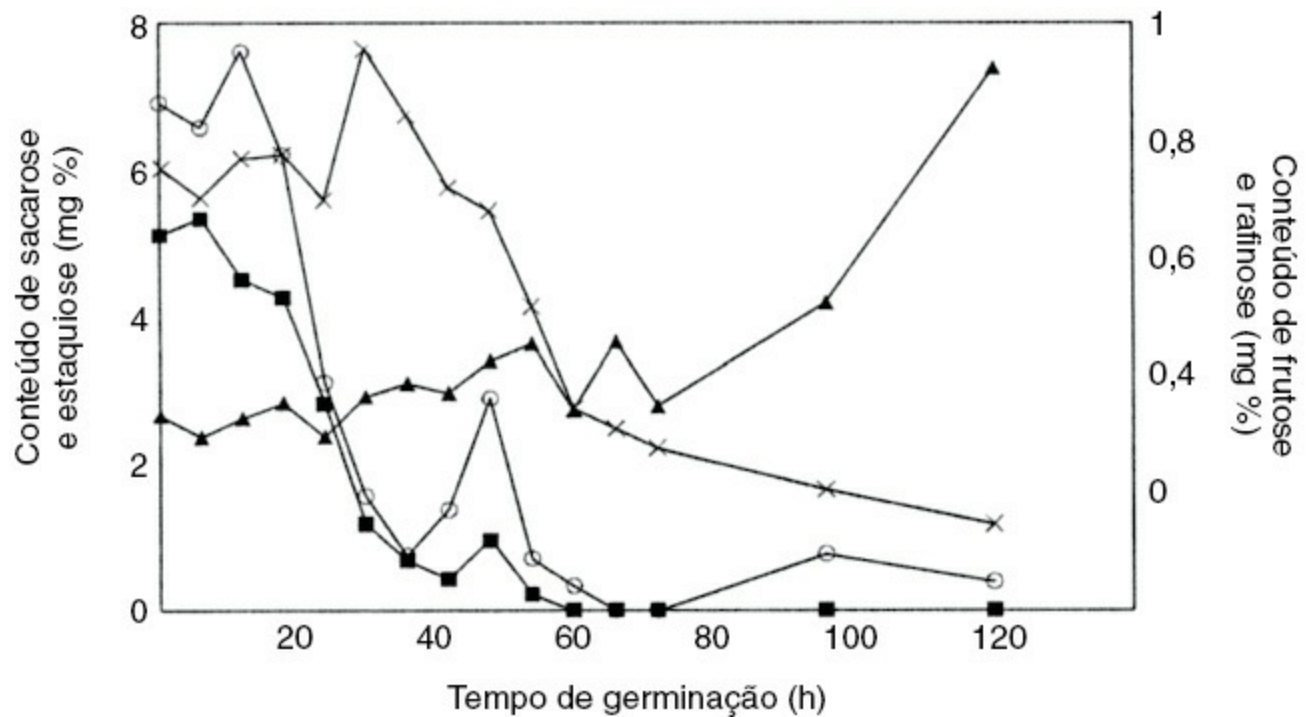


FIGURA 1.19 Conteúdos (mg %) de rafinose (o), estaquiose (▪), frutose (▲), e sacarose (x) em semente de soja em germinação. De Viana *et al.* (2005). ©Elsevier.

C. Proteínas

Muitas pesquisas demonstraram aumento na concentração total de proteínas em base seca de várias leguminosas após a germinação (El-Adawy, 2002; Bates *et al.*, 1977; Kakade e Evans, 1966; Martin-Cabrejas *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 1973). Este fato pode ser atribuído a: (1) uso de carboidratos e lipídeos como fonte de energia para sementes em germinação, criando, assim, a possibilidade de a proteína contribuir em maiores proporções do peso remanescente; e (2) produção de enzimas. Um número menor de pesquisas demonstrou apenas pequeno aumento da proteína, ou mesmo nenhum aumento, durante a germinação (Ahmad e Pathak, 2000).

Vários grupos estudaram o impacto da germinação na composição de aminoácidos livres, incluindo os não proteicos. Kuo *et al.* (2004) relataram que a germinação afetou de maneira variada as proteínas livres e os aminoácidos não proteicos de feijões, ervilhas e lentilhas, sem apontar tendência específica nas três leguminosas. Foi também relatado que a incidência de luz durante a germinação afetou o conteúdo dos aminoácidos de cada espécie de maneira diversa. Rodriguez *et al.* (2008) e Urbano *et al.* (2005) demonstraram haver diminuição do nitrogênio proteico à medida que a germinação progride em feijões, ervilhas e lentilhas, o que coincidiu com aumento de magnitude similar do nitrogênio não proteico. Alterações nos aminoácidos individuais também foram diferentes, conforme as diversas espécies. Um debate mais amplo sobre a concentração de aminoácidos e proteínas na soja pode ser encontrado em Bau *et al.* (1997).

D. Vitaminas e minerais

Uma vez que há muita variação na composição das sementes de leguminosas durante a germinação, o tópico menos controverso parece ser o da vitamina C. A concentração da vitamina C ou do ácido ascórbico aumentou durante a germinação da soja (Ahmad e Pathak, 2000; Bau *et al.*, 1997), e em diferentes ervilhas e feijões (Sangronis e Machado, 2007; Chen *et al.*, 1975; Vanderstoep, 1981; Khattak *et al.*, 2007; Fernandez-Orozco, 2008). O processo de respiração é atribuído ao ácido ascórbico (Sangronis e Machado, 2007).

As vitaminas B são as próximas a serem discutidas. Embora não haja uma tendência nítida, relatos apontam para um acréscimo da concentração de riboflavina na soja quando submetida a condições específicas (Ahmad e Pathak, 2000; Bau *et al.*, 1995), assim como em grãos-de-bico (El-Adawy, 2002) e ervilhas (Urbano, 2005). Pequenos acréscimos na concentração de tiamina também foram observados em soja germinada e em feijões-brancos, pretos e guandu (Ahmad e Pathak, 2000; Sangronis e Machado, 2007), enquanto uma diminuição (El-Adawy, 2002; Urbano *et al.*, 2005) ou nenhuma alteração (Vanderstoep, 1981) foi observada em grãos-de-bico e ervilhas. Os resultados observados para a vitamina niacina foram diferentes e mais limitados (Bau *et al.*, 1997; El-Adawy, 2002).

São poucas as informações sobre as vitaminas E e A (Bau *et al.*, 1997). Chen *et al.* (1975) relataram ter encontrado valores baixos em ervilhas e feijões, embora seus valores em sementes germinadas tenham sido maiores, quando comparados com sementes secas. Fernandez-Orozco *et al.* (2008) apontaram diferenças no conteúdo de tocoferol em duas variedades de soja, apesar das duas demonstrarem aumento geral de atividade nos quatro isômeros de tocoferol e de vitamina E após a germinação. Sementes de feijão-mungo mostraram diminuição geral nas concentrações de tocoferol e na atividade da vitamina E, e, após a germinação, discreto aumento do isômero α -tocoferol.

O efeito da germinação na concentração de minerais em leguminosas também varia entre as diferentes espécies, de acordo com a literatura da área. O cálcio aumentou na soja (Bau *et al.*, 1997; Donangelo *et al.*, 1995) e em feijão-preto, branco e guandu (Sangronis e Machado, 2007). A concentração de ferro parece diminuir em várias leguminosas (Chen *et al.*, 1975; Donangelo *et al.*, 1995; Sangronis e Machado, 2007; Vanderstoep, 1981). Apesar do conteúdo do ferro decrescer, o aumento da vitamina C em sementes germinadas parece torná-lo mais biodisponível. Outros minerais não demonstram tendências evidentes durante a germinação ou foram menos estudados. É importante destacar que tem sido sugerido que o conteúdo de minerais na água utilizada para a germinação tem o potencial de afetar tal conteúdo em leguminosas germinadas.

E. Fatores antinutricionais

A redução dos fatores antinutricionais em leguminosas tem sido uma das razões principais das pesquisas sobre sua germinação, já que a destruição destes compostos, sem o uso de processamento térmico, pode determinar uma solução mais fácil para sua remoção. Os fatores antinutricionais já foram debatidos. A maioria das pesquisas focou o efeito da germinação nos inibidores da tripsina e no fitato.

1. Atividade do inibidor de tripsina

Inibidores de tripsina evitam a ação da tripsina no intestino, que hidrolisam a proteína, transformando-a em aminoácidos absorvíveis e pequenos peptídeos. Assim, tal redução poderia teoricamente melhorar a absorção de proteínas. Existem muitos relatos de redução de inibidores de tripsina (TIA) durante a germinação, inclusive de ervilhas (Urbano *et al.*, 2005), vários tipos de feijão e soja (Sangronis e Machado, 2007; Donangelo *et al.*, 1995; Mostafa e Rahma, 1987) e grãos-de-bico (El-Adawy, 2002). Alguns pesquisadores, no entanto, relataram pouca ou nenhuma alteração no TIA (Vanderstoep, 1981; Kakade e Evans, 1966), enquanto outros registram aumento do TIA (Palmer *et al.*, 1973). Kakade e Evans (1966) demonstraram que imergir as sementes por períodos mais longos diminuiu o TIA, o que ajudaria a explicar as diferenças nos estudos, em função dos protocolos de germinação não padronizados quanto aos métodos de imersão e de lavagem.

Apesar de considerarem as medidas de TIA precisas, a maior evidência utilizada pelos pesquisadores ainda é a utilização da proteína em animais vivos, desenvolvendo estudos de alimentação e razão de eficiência de uso da proteína (PER). A germinação durante dois e quarto dias, com e sem incidência de luz, mostrou um aumento dos

valores PER em ervilhas, porém com queda após seis dias de germinação (Urbano *et al.*, 2005). Uma pesquisa com ratos demonstrou melhora nutricional em feijões, apesar dos aumentos no TIA mencionados anteriormente (Palmer *et al.*, 1973). Exames de digestibilidade de proteínas *in vitro* também indicaram aumento da digestibilidade de grãos-de-bico (El-Adaway, 2002), vários tipos de feijões (Sangronis e Machado, 2007), e soja (Mostafa e Rahma, 1987).

2. Ácido fítico

Os fitatos, apesar de suas propriedades antioxidantes, são vistos como fatores antinutricionais em razão da capacidade de quelar e evitar a absorção de minerais. A diminuição de fitatos ou ácido fítico, portanto, é considerada resultado desejável no processamento. Khattak *et al.* (2007) relataram que a germinação de grãos-de-bico, submetidos à luz azul, produziu maior redução de ácido fítico, enquanto Urbano *et al.* (2005) relataram redução similar em ervilhas, sem a presença da luz durante sua germinação. Também foram vistas reduções em várias espécies de feijão (Sangronis e Machado, 2007) e grãos-de-bico (El-Adawy, 1997); não foi observado nenhum decréscimo no ácido fítico na soja e em feijões-pretos após dois dias de germinação (Donangelo *et al.*, 1995). A hidrólise de fitatos durante a germinação parece ocorrer em consequência de aumento na atividade da enzima fitase endógena (Bau *et al.*, 1997).

F. Componentes nutraceuticos

Pesquisas sobre os componentes antioxidantes presentes em leguminosas germinadas são recentes e têm crescido. As isoflavonas na soja merecem atenção particular, por causa da conexão entre seu consumo e a menor incidência de doenças crônicas. A questão, portanto, era saber se a germinação afeta positiva ou negativamente a concentração e a composição das isoflavonas em sementes de soja. Zhu *et al.* (2005) pesquisaram o conteúdo de isoflavona em duas variedades de sementes de soja cultivadas até comprimentos específicos do hipocótilo. Apesar de haver diferenças entre as duas variedades, eles concluíram que a concentração total de isoflavonas em sementes de solo seco aumentou mg/g depois de um dia de germinação e, em seguida, diminuiu até o final da pesquisa. No entanto, o aumento e a diminuição coincidiram com o aumento e a diminuição nos derivados de malonil de isoflavonas, que possuem uma massa molecular significativamente mais alta do que as formas de agliconas, apesar de possuírem atividades antioxidantes similares. Consequentemente, torna-se difícil interpretar os efeitos antioxidantes das alterações e recomenda-se que os valores de isoflavonas sejam descritos com base em molaridade.

Fernando-Orozco *et al.* (2008) pesquisaram os conteúdos fenólicos totais e várias medidas da capacidade antioxidante. Sementes de soja e de feijões-mungo tiveram seu conteúdo de fenólicos totais medido durante o período de vários dias de germinação. O aumento dos fenólicos foi acompanhado por elevação da capacidade antioxidante das sementes germinadas, acréscimos estes observados na capacidade antioxidante do equivalente do Trolox, além do aumento da capacidade do peróxido de atrair radicais. O resultado do conteúdo de fenólicos totais pode ser visto na Figura 1.20.

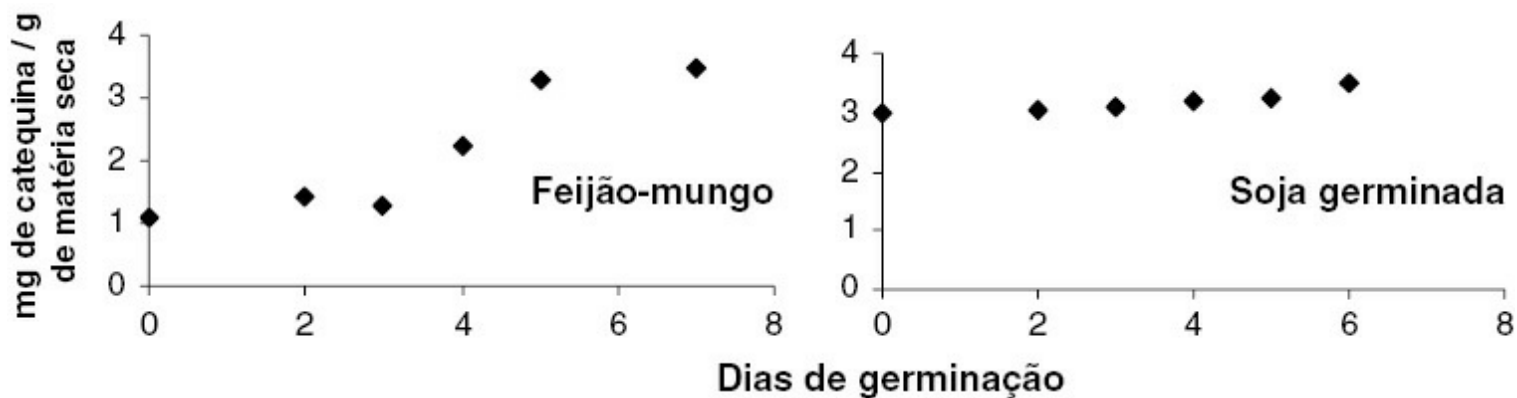


FIGURA 1.20 Conteúdos fenólicos totais de soja germinada e sementes de feijão-mungo. Adaptado de Fernandez-Orozco *et al.* (2008).

G. Qualidade sensorial dos alimentos

Sementes de leguminosas germinadas geralmente apresentam suas qualidades organolépticas melhoradas. Ahmad e Pathak (2000) apontaram diminuição no aroma do feijão e melhoria dos fatores sensoriais depois de três dias de germinação da soja. A germinação também promoveu uma subida na avaliação sensorial de um produto de soja-fruta-pão na Nigéria (Ariahu *et al.*, 1999). Chen *et al.* (1975) investigaram a aceitação de brotos de ervilhas e feijão; embora não tenham se dedicado especificamente à comparação com suas sementes secas, observou-se que todas as variedades demonstraram-se aceitáveis sensorialmente.

V. EFEITOS DA FERMENTAÇÃO

A fermentação de leguminosas foi empregada por humanos por milênios para preservar os alimentos, introduzir variações na dieta e diminuir o tempo de cozimento. A história detalhada da fermentação foi bem estudada e pode ser vista em vários trabalhos (Hesseltine, 1965; Deshpande *et al.*, 2000). Em particular, o Agricultural Services Bulletin, n. 142, da FAO, do ano 2000, é uma excelente fonte científica e do ponto de vista social do uso da fermentação (Deshpande *et al.*, 2000). O texto trata das principais leguminosas cultivadas, além de algumas produzidas em locais específicos, incluindo as alterações bioquímicas ocorridas durante a fermentação com a utilização de diferentes métodos e uma variedade de culturas de micro-organismos. Portanto, será feita apenas uma breve revisão do processo de fermentação de leguminosas.

A função do processo de fermentação depende, em certa medida, do local em que é realizado. Em áreas mais remotas, ou em desenvolvimento, em que a refrigeração não é encontrada com facilidade, a fermentação serve basicamente como técnica de preservação de alimentos mediante a geração de produtos, como o álcool e o ácido láctico e o acético. A preservação de alimentos é um assunto de menor importância em países modernos e as razões que levam à escolha de sua fermentação tendem a ser a de conseguir diferentes consistências e melhor aroma, além de outros efeitos sensoriais. A fermentação também reduz o tempo de cozimento das leguminosas, já que promove a hidrólise de componentes estruturais por meio da ação de enzimas, o que faz com que os produtos requeiram menor energia para seu cozimento, um efeito desejável tanto em países em desenvolvimento como em regiões mais modernas. Os benefícios já descritos podem parecer óbvios para quem cozinha e talvez expliquem por que os primeiros seres humanos optaram pela fermentação de alimentos, mas há outras funções que só se tornaram aparentes por intermédio de cuidadosas observações e graças à ciência. Os fatores antinutricionais das leguminosas, examinadas anteriormente, incluindo os inibidores de tripsina, fitatos e oligossacarídeos que produzem gases, são, muitas vezes, reduzidos até níveis insignificantes durante a fermentação. Essa redução ocorre graças à ação das enzimas, e também em consequência da imersão e da fervura (etapas frequentes do processo de

fermentação), que filtram ou destroem tais componentes. Parte por causa da redução dos componentes antinutricionais e parte porque as enzimas microbianas digerem carboidratos, proteínas e triglicerídeos, o valor nutricional dos alimentos é elevado pelo aumento da biodisponibilidade de nutrientes. A presença de micróbios pode adicionar proteínas, aminoácidos e/ou vitaminas ao produto fermentado.

Preocupações com as aflatoxinas surgem quando se fala de leguminosas e fungos, mas os relatórios da FAO relatam que elas não têm sido objeto de alerta em produtos fermentados, especialmente em processamentos modernos, mas também em processamentos tradicionais (Deshpande *et al.*, 2000).

Desde o relatório da FAO, vários artigos foram publicados sobre o efeito da fermentação no conteúdo de isoflavonas e propriedades antioxidantes das leguminosas. A fermentação da soja com *Rhizopus oligosporus* demonstrou um aumento do teor de fenólicos totais e de atividade de sequestro contra 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH)

(McCue e Shetty, 2003). A fermentação de feijão-preto com vários fungos e filamentos também registrou aumento similar no conteúdo de fenólicos totais (Lee *et al.*, 2008). Pyo *et al.* (2005) apontaram aumento na atividade antioxidante contra 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e radicais DPPH depois da fermentação, além da bioconversão das formas glicosiladas das isoflavonas em agliconas. Outros grupos mostraram resultados semelhantes: as cadeias laterais de açúcares são hidrolisadas das isoflavonas glicosiladas, aumentando, assim, os resíduos de agliconas (Ikeda *et al.*, 1995; Chun *et al.*, 2007).

VI. ARMAZENAMENTO

O armazenamento de leguminosas tem sido objeto de muita atenção, especialmente em consequência da enorme perda potencial de alimentos pelo envelhecimento biológico e também por infestações de roedores, insetos e micro-organismos. Fatores físicos, como umidade, temperatura e concentração de oxigênio, afetam a extensão da deterioração e da infestação. A umidade inicial das sementes e o meio ambiente desempenham papel predominante na determinação do ritmo de deterioração das sementes durante o armazenamento (Liu, 1997). Um debate mais extenso, anterior, mas ainda relevante, pode ser encontrado em Salunkhe, Kadam e Chavan, *Postharvest Biotechnology of Food Legumes* (1983). Um estudo mais recente sobre o envelhecimento das sementes da soja durante o armazenamento pode ser consultado no trabalho de Liu, *Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization* (1997).

A. Respiração, umidade e temperatura

A respiração tem um papel de destaque na estabilidade da estocagem de leguminosas, como já vimos em relação aos cereais. A taxa de respiração é maior nas sementes oleaginosas do que em cereais (Salunkhe *et al.*, 1985). Além disso, sementes com alto teor de umidade têm uma taxa maior de respiração. A respiração em sementes estocadas aumenta a umidade, encorajando, assim, o crescimento de fungos. Fica óbvio, portanto, a importância de secar as sementes antes de estocar, para que este ciclo não ocorra. A temperatura também afeta a taxa de respiração das sementes de leguminosas, diminuindo-a 50% a cada decréscimo de 10°C (Salunkhe *et al.*, 1985). No caso da soja, um conteúdo de umidade de 13% ou mais baixo tem sido sugerido como sendo adequado para ambientes de estocagem nos Estados Unidos (Liu, 1997), apesar de uma temperatura de 5°C e 11% de umidade terem sido considerados “ideais” (Liu, 1997).

As condições ambientais devem ser consideradas na estocagem de leguminosas. Existe um equilíbrio na umidade, similar àquele necessário para os cereais, como foi descrito anteriormente. Sementes de leguminosas estocadas a uma umidade relativa de 70% ficarão equilibradas com um conteúdo de umidade de cerca de 14%

(Dobie, 1982). Os padrões do *Codex Alimentarius* (1995) recomendam dois níveis de conteúdo de umidade para sementes a serem estocadas, com base no clima e no tempo de armazenamento. Os valores selecionados podem ser vistos na Tabela 1.18. Para sementes a serem estocadas sem casca, o conteúdo deve ter 2% a menos do mostrado na Tabela 1.18.

B. Envelhecimento das sementes e qualidade dos alimentos

O interessante não é só saber que as sementes envelhecem, mas também conhecer qual o processo que ocorre com elas e como o envelhecimento afeta seu uso. Uma diminuição na capacidade de extração ou na solubilidade das proteínas, quando o tempo de estocagem é estendido, foi observada em vários estudos. Este fato foi visto em múltiplas pesquisas (Saio *et al.*, 1980; 1982; Liu *et al.*, 2008; Narayan *et al.*, 1988a). A capacidade de extração de proteínas 11S diminuiu mais rapidamente do que as de 7S (Saio *et al.*, 1982). As diminuições ficaram exacerbadas em condições adversas de armazenamento, $\geq 30^{\circ}\text{C}$, $\geq 80\%$ de umidade relativa e/ou tempo de estocagem excessivo. Saio e Baba (1980) demonstraram que más condições de estocagem de sementes de soja tiveram por consequência deformações dos corpos proteicos e perda de grânulos de amido. Feijões inteiros se mostraram mais resistentes à deterioração do que farinhas moídas (Saio *et al.*, 1982). A cor das sementes de soja muda de seu aspecto inicial de creme amarelado para marrom-claro depois de nove anos de estocagem ambiental (Narayan *et al.*, 1988a).

TABELA 1.18 Conteúdo sugerido de umidade para sementes de leguminosas

Leguminosa	Conteúdo de umidade recomendado (%)	
	Clima tropical, longo prazo	Clima temperado, curto prazo
Feijão	15	19
Lentilha	15	16
Grão-de-bico	14	16
Ervilha	15	18

Fonte: *Codex Alimentarius* (1995).

A degradação das proteínas em leguminosas, especialmente na soja, é importante e indesejada em razão de seu uso como alimentos. Sojas estocadas de modo inadequado produzem menor volume de tofu (Narayan *et al.*, 1988b; Hou e Chang, 2004): ele fica demasiado macio e há menos sólidos no leite de soja (Saio *et al.*, 1980). Hou e Chang (2004) sugerem que avaliar a mudança de cor na semente da soja estocada pode ser um método rápido para antecipar o conhecimento da qualidade do tofu produzido com seu uso. As características organolépticas do leite de soja, do tofu e das castanhas de soja diminuíram significativamente com o aumento do tempo de armazenamento das sementes por até nove anos (Narayan *et al.*, 1988b). Condições de estocagem inadequadas também levaram à diminuição de outras propriedades funcionais, incluindo a atividade de emulsificação, estabilidade da emulsificação, estabilidade térmica e índice de dispersão de proteínas (Liu *et al.*, 2008).

Outras alterações foram observadas nas sementes de soja durante a estocagem, incluindo a hidrólise de gorduras neutras em ácidos graxos livres (Yanagi *et al.*, 1985); uma diminuição dos açúcares livres (Hou e Chang, 2004), além do decréscimo da lisina disponível, da atividade do inibidor de tripsina e da atividade da lipoxigenase e aumento do nitrogênio não proteico e dos valores de peróxidos (Narayan *et al.*, 1988a).

C. Efeitos nas isoflavonas

Em consequência da capacidade das isoflavonas de mitigar doenças crônicas, pesquisas dos efeitos da estocagem

foram expandidas. Vários grupos mostraram que as isoflavonas em sementes de soja armazenadas (Hou e Chang, 2002; Lee *et al.*, 2003), em proteínas isoladas de soja e em farinha de soja (Pinto *et al.*, 2005), nas formas de malonilglucosídeo, diminuíram e houve aumento das formas de glucosídeos e agliconas. A concentração de isoflavonas totais permaneceu estável durante o período de estudos, que se estendeu de um a três anos (Lee *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2005). A taxa de conversão foi aumentada com elevação da temperatura e da umidade e chegou a níveis insignificantes sob refrigeração (Hou e Chang, 2002; Pinto *et al.*, 2005).

Outras discussões sobre as isoflavonas e dos efeitos de processamento e armazenamento de soja, incluindo a questão da cinética de sua degradação, podem ser consultadas no artigo de revisão de Shimoni (2004).

REFERÊNCIAS

- Abbot, I.R., Matheson, N.K., 1972. Starch depletion in germinating wheat, wrinkled seed peas and senescing tobacco leaves. *Phytochemistry* 11, 1261-1272.
- Acker, L., Becker, G., 1971. Recent studies on the lipids of cereal starches. II. Lipids of various types of starch and their binding to amylose. *Stärke* 23, 419-424.
- Ahmad, S., Pathak, D.K., 2000. Nutritional changes in soybean during germination. *J. Food Sci. Technol.* 37, 665.
- Akazawa, T., Hara-Nishimura, I., 1985. Topographic aspects of biosynthesis extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Annu. Rev. Physiol.* 36, 441-472.
- Aman, P., 1979. Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chick pea. *J. Sci. Food Agric.* 30, 869-875.
- Amir, J., Cherry, J.H., 1971. Chemical control of sucrose conversion to polysaccharides in sweet corn after harvest. *J. Agric. Food Chem.* 19, 954-957.
- Amir, J., Cherry, J.H., 1972. Purification and properties of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from sweet corn. *Plant Physiol.* 49, 893-897.
- Anderson, J.A., Babbitt, J.D., Meredith, W.O.S., 1943. The effect of temperature differential on the moisture content of wheat. *Can. J. Res. Sect. C* 21, 297-306.
- Anderson, J.W., Hanna, T.J., Peng, X., Kryscio, R.J., 2000. Whole grain foods and heart disease risk. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 291S-299S.
- Ariahu, C.C., Ukpabi, U., Mbajunwa, K.O., 1999. Production of African breadfruit (*Treculia africana*) and soybean (*Glycine max*) seed based food formulations. I: Effects of germination and fermentation on nutritional and organoleptic quality. *Plant Foods Hum. Nutr.* 54, 193-206.
- Armour, J.C., Perera, R.L.C., Buchan, W.C., Grant, G., 1998. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *J. Sci. Food Agric.* 78, 225-231.
- Ayerst, G., 1965. Determination of water activity of some hygroscopic food materials by a dew-point method. *J. Sci. Food Agric.* 16, 71-78.
- Bair, C.W., 1979. Microscopy of soybean seeds: cellular and subcellular structure during germination, development, and processing with emphasis on lipid bodies. Ph.D. Thesis Iowa State University, Ames.
- Barrona, C., Surgeta, A., Rouau, X., 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J. Cereal Sci.* 45, 88-96.
- Baruch, D.W., Meredith, P., Jenkins, L.D., Sinimonds, L.D., 1979. Starch granules of developing wheat kernels. *Cereal Chem.* 56, 554-558.
- Bates, R.P., Knapp, F.W., Araujo, P.E., 1977. Protein quality of green-mature, dry mature and sprouted soybeans. *J. Food Sci.* 42, 271-272.
- Bau, H.-M., Villaume, C., Nicolas, J.-P., Mejean, L., 1997. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 73, 1-9.
- Baxter, D.E., 1984. Recognition of two lipases from barley and green malt. *J. Inst. Brew.* 90, 277-281.
- Bean, M.M., Nimmo, C.C., Fullington, J.G., Keagy, P.M., Mecham, U.K., 1974. Dried Japanese noodles. II. Effect of amylase, protease, salts, and pH on noodle doughs. *Cereal Chem.* 51, 427-433.
- Bechtel, D.B., Gaines, R.L., Pomeranz, Y., 1982. Protein secretion in wheat endosperm. Formation of the protein matrix. *Cereal Chem.* 59, 336-343.
- Bechtel, D.B., Gaines, R.L., Pomeranz, Y., 1982. Early stages in wheat endosperm formation and protein body initiation. *Ann. Bot. (London)* 50, 507-518.
- Becker-Ritt, A.B., Mulinari, F., Vasconcelos, I.M., Carlini, C.R., 2004. Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds: comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. *J. Sci. Food Agric.* 84, 263-270.
- Bernal-Lugo, L., Beachy, R.N., Varner, J.E., 1981. The response of barley aleurone layers to gibberellic acid includes the transcription of new sequences. *Biochim. Biophys. Acta.* 102, 617.
- Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C., Payan, F., Rouge, P., 1997. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta.* 1343, 31-40.
- Blagrove, R.J., Colman, P.M., Lilley, G.G., Donkelaar, A.V., Suzuki, E., 1983. Physicochemical and structural studies of phaseolin from French bean seed. *Plant Food Hum. Nutr.* 33, 227-229.
- Bohlool, B.B., Schmidt, E.L., 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium* – legume root nodule symbiosis. *Science New Ser.* 185, 269-271.
- Borovsky, D., Smith, E.E., Whelan, W.J., French, D., Kikumoto, S., 1979. The mechanism of Q-enzyme action and its influence on the structure of amylopectin. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 627-631.
- Bravo, L., Siddhuraju, P., Saura-Calixto, F., 1998. Effect of various processing methods on the *in vitro* starch digestibility and resistant starch content of Indian pulses. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4667-4674.
- Briarty, L.G., Hughes, C.E., Evers, A.D., 1979. The developing endosperm of wheat. A stereological analysis. *Ann. Bot. (London)* 44, 641-658.
- Briggs, D.E., 1963. Biochemistry of barley germination: action of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brew.* 69, 13-19.
- Briggs, D.E., 1964. Origin and distribution of α -amylase in malt. *J. Inst. Brew.* 70, 14-24.
- Briggs, D.E., 1968. α -Amylase in germinating, decorticated barley. III. Effects of adding CCC and other chemical substances. *Phytochemistry* 7, 539-554.
- Briggs, D.E., Hough, J.S., Stevens, R., Young, T.W., 1981. *Malting and Brewing Science I. Malt and Sweet Wort*, second ed. Chapman & Hall, London.
- Bright, S.W.J., Shewry, P.R., 1983. Improvement of protein quality in cereals. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1, 49-93.
- Buchanan, A.M., Nicholas, E.M., 1980. Sprouting, alpha-amylase, and breadmaking quality. *Cereal Res. Commun.* 8, 23-28.
- Burgess, S.R., Mifflin, B.J., 1985. The localization of oat (*Avena sativa* L.) seed globulins in protein bodies. *J. Exp. Bot.* 36, 945-954.
- Bushuk, W., 1978. Biochemical changes in edible plant tissue during maturation and storage. In: Hultin, H.O., Miller, M. (Eds.), *Postharvest Biology and Biotechnology, Foods and Nutrition Press, Westport, CT, Chapter I.*
- Buttrose, M.S., 1971. Ultrastructure of barley aleurone cells as shown by freeze etching. *Planta* 96, 13-26.
- Buttrose, M.S., Soeffly, A., 1973. Ultrastructure of lipid deposits and other contents in freeze-etched coleoptile cells of ungerminated rice grains. *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 357.

- Campbell, W.P., Lee, J.W., O'Brien, T.P., Smart, M.G., 1981. Endosperm morphology and protein body formation in developing wheat grain. *Aust. J. Plant Physiol.* 8, 5-19.
- Cawley, J.E., Mitchell, T.A., 1968. Inhibition of wheat α -amylase by bran phytic acid. *J. Sci. Food Agric.* 19, 106-108.
- Cerning, J., Guilbot, A., 1973. Changes in the carbohydrate composition during development and maturation of the wheat and barley kernel. *Cereal Chem.* 50, 220-232.
- Chamura, S., 1975. Histochemical investigation of the accumulation of phosphorised lipid in aleurone cells of rice kernels. *Nippon Sakumotsu Gakkai Kiji* 44, 243.
- Chau, C.-F., Cheung, P.C.-K., 1997. Effect of various processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4773-4776.
- Chen, L.H., Wells, C.E., Fordham, J.R., 1975. Germinated seeds for human consumption. *J. Food Sci.* 40, 1290-1294.
- Chevalier, P., Lingle, S.E., 1983. Sugar metabolism in developing kernels of wheat and barley. *Crop. Sci.* 23, 272-277.
- Chrispeels, M.J., Varner, J.E., 1967. Hormonal control of enzyme synthesis and mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layer of barley. *Plant Physiol.* 42, 1008-1016.
- Chun, J., Kim, G.M., Lee, K.W., Choi, I.D., Kwon, G.-H., Park, J.-Y., et al., 2007. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 72 (2), M39-M44.
- Clemente, A., Domoney, C., 2006. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman – Birk family. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 7, 210-216.
- Codex Alimentarius, 1995. Codex Standard for Certain Pulses. Codex Standard, 171-1989 (Rev. 1 1995) 3.2.1.1. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization.
- Cornford, C.A., Black, M., Daussant, J., Murdoch, K.M., 1987. α -Amylase production by pre-mature wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos. *J. Exp. Bot.* 38, 277-285.
- Dalby, A., Tsai, C.Y., 1976. Lysine and tryptophan increases during germination of cereal grains. *Cereal Chem.* 53, 222-226.
- Denloye, A.O., Ade-John, A.O., 1985. Moisture sorption isotherms of some Nigerian food grains. *J. Stored Prod. Res.* 21, 53-58.
- Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., Oyewole, O.B., Azam-Ali, S., Battcock, M., Bressani, R., 2000. Fermented grain legumes, seeds and nuts – a global perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin*. 142 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Dobie, P., 1982. Storage losses in legumes. *J. Nutr. Soc.* 41, 75-79.
- Donangelo, C.M., Trugo, L.C., Trugo, N.M.F., Eggum, B.O., 1995. Effect of germination of legume seeds on chemical composition and on protein and energy utilization in rats. *Food Chem.* 53, 23-27.
- Donovan, G.R., Lee, J.W., Longhurst, T.J., 1982. Cell-free synthesis of wheat prolamins. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 59-68.
- Duffus, C.M., 1993. Starch synthesis and deposition in developing cereal endosperms. In: Shewry, P.R., Stobart, A.K. (Eds.), *Seed Storage Compounds: Biosynthesis, Interactions and Manipulation*, Clarendon Press, Oxford, p. 191-209.
- Duranti, M., Gius, C., 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crop. Res.* 53, 31-45.
- El-Adawy, T., 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Food Hum. Nutr.* 57, 83-97.
- Ellis, R.P., Cochrane, M.P., Dale, M.F.B., Duffus, C.M., Lynn, A., Morrison, I.M., et al., 1998. Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* 77, 289-311.
- Erlander, S.P., 1958. Proposed mechanism for the synthesis of starch from glycogen. *Enzymologia* 19, 273-283.
- Evers, A.D., 1973. The size distribution among starch granules in wheat endosperm. *Stärke* 25, 303-304.
- Evers, A.D., Lindley, J., 1977. The particle size distribution in wheat endosperm starch. *J. Sci. Food Agric.* 28, 98-102.
- Evers, A.D., Blakeney, A.B., O'Brien, L., 1999. Cereal structure and composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 629-650.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M.K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., 2008. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiate* cv. *emerald*, *Glycine max* cv. *jutro* and *Glycine max* cv. *merit*. *Food Chem.* 111, 622-630.
- Filmer, P., Varner, J.E., 1967. A test for de novo synthesis of enzymes, density labeling with H₂O¹⁸ of barley α -amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 1520-1526.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at <http://faostat.fao.org>.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X., 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387, 394-401.
- Fuller, P., Hutchinson, J.B., McDermott, E.E., Stewart, B.A., 1970. Inactivation of α -amylase in wheat and flour with acid. *J. Sci. Food Agric.* 21, 27-31.
- Geddes, R., Greenwood, C.T., 1969. Biosynthesis of starch granules. IV. Observations on the biosynthesis of the starch granule. *Stärke* 21, 148-153.
- Gibbons, G.C., 1979. On the localisation and transport of α -amylase during germination and early seedling growth of *Hordeum vulgare*. *Carlsberg Res. Commun.* 44, 353-366.
- Gibbons, G.C., 1980. On the sequential determination of α -amylase transport and cell wall breakdown in germinating seeds of *Hordeum vulgare*. *Carlsberg Res. Commun.* 45, 177-184.
- Gilland, B., 1998. Plants and population: is there time?. *NAS Colloquium*, 1-2.
- Gilland, B., 2002. World population and food supply: can food production keep pace with population growth in the next half-century? *Food Policy* 27, 47-63.
- Grant, D.R., Wang, C.C., 1972. Dialyzable components resulting in proteolytic activity in extracts of wheat flour. *Cereal Chem.* 49, 201-207.
- Grant, G., Dorward, P.M., Buchan, W.C., Armour, J.C., Puszta, A., 1995. Consumption of diets containing raw soya beans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*), or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. *Br. J. Nutr.* 73, 17-29.
- Greenaway, W.T., 1969. The sprouted wheat problem: the search for a solution. *Cereal Sci. Today* 14 (390), 393-395 406.
- Greene, F.C., 1981. *In vitro* synthesis of wheat (*Triticum aestivum* L.) storage proteins. *Plant Physiol.* 68, 778-783.
- Greene, F.C., 1983. Expression of storage protein genes in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Correlation of RNA accumulation and protein synthesis. *Plant Physiol.* 71, 40-46.
- Halmer, P., 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. *Physiol. Veg.* 23, 107-125.
- Hamelryck, T.W., Do-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L., Loris, R., 1996. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 271, 20479-20485.
- Hargin, K.D., Morrison, W.R., 1980. The distribution of acyl lipids in the germ, aleurone, starch and non-starch endosperm of four wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 31, 877-888.
- Harris, L., 1984. Postharvest grain losses in the developing world. *Cereal Foods World* 29, 456.
- Herman, E.M., Larkins, B.A., 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell.* 11, 601-613.
- Hesseltine, C.W., 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycol.* 7 (2), 149-197.
- Higgins, T.J.V., Zwar, J.A., Jacobsen, J.V., 1976. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. *Nature*

(London) 260, 166-169.

- Hirsch, A.M., 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122, 211-237.
- Hou, H.J., Chang, K.C., 2002. Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. *J. Food Sci.* 67, 2083-2089.
- Hou, H.J., Chang, K.C., 2004. Storage conditions affect soybean color, chemical composition and tofu qualities. *J. Food Process. Pres.* 28, 473-488.
- Huang, A.A.C., Moreau, R.A., 1978. Lipases in the storage tissue of peanut and other oilseeds during germination. *Planta.* 141, 111-116.
- Ikeda, R., Ohta, N., Watanabe, T., 1995. Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans [abstract]. *J. Jpn. Soc. Food Sci.* 42, 322-327.
- Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N., Khan, M.S., 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem.* 97, 331-335.
- Jaffe, W.G., Lette, C.L.V., 1968. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94, 203-210.
- Jelseman, C.L., Morre, D.J., Ruddat, M., 1974. Isolation and characterization of spherosomes from aleurone layers of wheat. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 84, 166-178.
- Jenner, C.F., 1968. The composition of soluble nucleotides in the developing wheat grain. *Plant Physiol.* 43, 41-49.
- Jones, R.A., Tsai, C.Y., 1977. Changes in lysine and tryptophan content during germination of normal and mutant maize seed. *Cereal Chem.* 54, 565-571.
- Jongh, G., 1967. Amylase determination. *Getreide Mehl.* 17, 1-4.
- Joshi, S., Lodha, M.L., Mehta, S.L., 1980. Regulation of starch biosynthesis in normal and opaque-2 maize during endosperm development. *Phytochemistry* 19, 2305-2309.
- Kadam, S.S., Deshpande, S.S., Jambhale, N.D., 1989. Seed structure. In: Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Eds.), *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*, Vol. ICRC Press, Boca Raton, FL, p. 23-50.
- Kakade, M.L., Evans, R.J., 1966. Effect of soaking and germinating on the nutritive value of navy beans. *J. Food Sci.* 31, 781-783.
- Kamath, M.V., Belavady, B., 1980. Unavailable carbohydrates of commonly consumed Indian food. *J. Sci. Food Agric.* 31, 194-202.
- Katz, F.R., Furcsik, S.L., Tenbarger, F.L., Hauber, R.J., Friedman, R.B., 1993. Behaviour of starches derived from varieties of maize containing different genetic mutations: effects of starch genotype on granular morphology. *Carbohydr. Polym.* 21, 133-136.
- Kennedy, A.R., 1998. The Bowman – Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (Suppl), 1406S-1412S.
- Khatib, K.A., Herald, T.J., Aramouni, F.M., MacRitchie, F., Schapaugh, W.T., 2002. Characterization and functional properties of soy β -conglycinin and glycinin of selected genotypes. *J. Food Sci.* 67, 2923-2929.
- Khattak, A.B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S.A., Khattak, M.S., 2007. Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability, in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Food Chem.* 103, 115-120.
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., Utsumi, S., 2008. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from peas, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean – French bean 7S globulin exhibits excellent properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10273-10279.
- Kobayashi, A., Tsuda, Y., Hirata, N., Kubota, K., Kitamura, K., 1995. Aroma constituents of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] milk lacking lipoxygenase isozymes. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2449-2452.
- Kruger, J.E., 1972. Changes in the amylases of hard red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chem.* 49, 379-390.
- Kruger, J.E., 1972. Changes in the amylase of hard spring wheat during germination. *Cereal Chem.* 49, 391-398.
- Kruger, J.E., 1973. Changes in the levels of proteolytic enzymes from red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chem.* 50, 122-132.
- Kruger, J.E., 1984. Rapid analysis of changes in the molecular weight distribution of buffer-soluble proteins during germination of wheat. *Cereal Chem.* 61, 205-208.
- Kruger, J.E., Marchyto, B.A., 1985. Examination of the mobilization of storage proteins of wheat kernels during germination by high-performance reversed-phase and gel permeation chromatography. *Cereal Chem.* 62, 1-5.
- Kruger, J.E., Matsuo, R.R., 1982. Comparison of alpha-amylase and simple sugar levels in sound and germinated durum wheat during pasta processing and spaghetti cooking. *Cereal Chem.* 59, 26-31.
- Kruger, J.E., Preston, K.R., 1978. Changes in aminopeptidases of wheat kernels during growth and maturation. *Cereal Chem.* 55, 360-372.
- Kumar, R., Singh, R., 1980. The relationship of starch metabolism to grain size in wheat. *Phytochemistry* 19, 2299-2303.
- Kumar, R., Singh, R., 1981. Free sugars and their relationship with grain size and starch content in developing wheat grains. *J. Sci. Food Agric.* 32, 229-234.
- Kumar, R., Singh, R., 1983. Alkaline inorganic pyrophosphatase from immature wheat grains. *Phytochemistry* 22, 2405-2407.
- Kumar, R., Singh, R., 1984. Levels of free sugars, intermediate metabolites and enzymes of sucrose-starch conversion in developing wheat grains. *J. Agric. Food Chem.* 32, 806-808.
- Kuo, Y.-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C., 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids in commercial legumes. *Food Chem.* 86, 537-545.
- Laberge, D.E., MacGregor, A.W., Meredith, W.O.S., 1973. Changes in the free sugar content of barley kernels during maturation. *J. Inst. Brew.* 79, 471-477.
- Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6592-6598.
- Lasztity, R., 1984. *The Chemistry of Cereal Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lee, I.H., Hung, Y.H., Chou, C.C., 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean [abstract]. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 150-156.
- Lee, S.J., Ahn, J.K., Kim, S.H., Kim, J.T., Han, S.J., Jung, M.Y., Chung, I.M., 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3382-3389.
- Lin, P., Ng, T.B., 2008. A stable trypsin inhibitor from Chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities. *Process Biochem.* 43, 992-998.
- Lineback, D.R., 1984. The starch granule; organization and properties. *Bakers Dig.* 58 (3), 16-21.
- Lineback, D.R., Ponpipom, S., 1977. Effects of germination of wheat, oats, and pearl millet on alpha-amylase activity and starch degradation. *Stärke* 29, 52-60.
- Lingle, S.E., Chevalier, P., 1980. Vascularization of developing barley kernels. *Plant Physiol.* 65 (Suppl), 105.
- Liu, K., 1997. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Chapman and Hall, New York.
- Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W., Xiao, L., 2008. Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food Chem.* 111, 29-37.
- Lorenz, K., 1980. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 353-385.
- Loris, R., Hamelryck, T., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1383, 9-36.
- Lowy, G.D.A., Sargeant, J.G., Schofield, J.D., 1981. Wheat starch granule protein: the isolation and characterization of a salt-extractable protein from starch granules. *J. Sci. Food Agric.* 32, 371-377.
- Lukow, O.M., Bushuk, W., 1984. Influence of germination on wheat quality. II. Modification of endosperm protein. *Cereal Chem.* 61, 340-344.
- McCue, P., Shetty, K., 2003. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus* [abstract]. *Food Biotechnol.* 17 (1), 27-37.
- McDermott, E.E., Elton, G.A., 1971. Effect of surfactants on the α -amylase activity of wheat flour. *J. Sci. Food Agric.* 2, 131-135.
- McDonald, A.M.L., Stark, J.R., Morrison, W.R., Ellis, R.P., 1991. The composition of starch granules from developing barley genotypes. *J. Cereal Sci.* 13, 93-112.
- MacGregor, A.W., 1983. Cereal α -amylases: synthesis and action pattern. In: Daussant, J., Mosse, J., Vaughan, J. (Eds.), *Seed Proteins*, Academic Press, New York, p. 1-34.

- MacGregor, A.W., Matsuo, R.R., 1982. Starch degradation in endosperms of barley and wheat kernels during initial stages of germination. *Cereal Chem.* 59, 210-216.
- Marchylo, B.A., Lacroix, L.J., Kruger, J.E., 1981. α -Amylase synthesis in wheat kernels as influenced by seed coat. *Plant Physiol.* 67, 89-91.
- Marshall, J.J., Whelan, J.J., 1970. Incomplete conversion of glycogen and starch by crystalline amyloglucosidase and its importance in the determination of amylaceous polymers. *FEBS. Lett.* 9, 85-88.
- Marston, R.M., Welsh, S.O., 1980. Nutrient content of the national food supply. *Nat. Food Rev.* Winter ed.
- Martin-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., Benitez, V., Molla, E., Lopez-Andreu, F.J., Esteban, R.M., 2006. Effect of industrial dehydration on the soluble carbohydrates and dietary fiber fractions in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7652-7657.
- Martin-Cabrejas, M.A., Diaz, M.F., Aguilera, Y., Benitez, V., Molla, E., Esteban, R.M., 2008. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chem.* 107, 1045-1052.
- Maruyama, N., Sato, R., Wada, Y., Matsumura, Y., Goto, H., Okuda, E., Nakagawa, S., Utsumi, S., 1999. Structure-physiochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5278-5284.
- Maruyama, N., Salleh, M.R.M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., Nakagawa, S., Utsumi, S., 2002. Structure-physiochemical function relationships of soybean β -conglycinin heterotrimers. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4323-4326.
- Matlshewski, G.J., Urquhart, A.A., Sahasrabudhe, M.R., Altosaar, I., 1982. Lipase activity in oat flour suspensions and soluble extracts. *Cereal Chem.* 59, 418-422.
- Melcher, V., Varner, J.E., 1971. Protein release of barley aleurone layers. *J. Inst. Brew.* 77, 456-461.
- Meredith, P., Pomeranz, Y., 1985. Sprouted grain. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 7, 239-320.
- Mifflin, B.S., Burgess, S.R., 1982. Protein bodies from developing wheat and peas, the effects of protease treatment. *J. Exp. Bot.* 33, 251-260.
- Mifflin, B.J., Shewry, P.R., 1977. An introduction to the extraction and characterization of barley and maize prolamins. In: Mifflin, B.J., Shewry, P.R. (Eds.), *Techniques for the Separation of Barley and Maize Seed Proteins*, Academic Press, New York, p. 13.
- Mifflin, B.J., Burgess, S.R., Shewry, P.R., 1981. The development of protein bodies in the storage tissues of seeds, subcellular separations of homogenates of barley, maize and wheat endosperms of pea cotyledons. *J. Exp. Bot.* 32, 199-219.
- Mikulikova, D., Masar, S., Kraic, J., 2008. Biodiversity of legume health-promoting starch. *Starch* 60, 426-432.
- Mitsui, T., Christeller, J.T., Hara-Nishimura, I., Akazawa, T., 1984. Possible roles of Ca^{2+} and calmodulin in the biosynthesis and secretion of α -amylase in rice seed scutellar epithelium. *Plant Physiol.* 75, 21-25.
- Montonen, J., Knekt, P., Jarvinen, R., Aromaa, A., Reunanen, A., 2003. Whole-grain and fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 62-92.
- Moreaux, T., Landry, J., 1968. Extractin selective des proteines du grain de maïs et en particulier de la fraction "glutelines". *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 266, 2302.
- Moreno, J., Chrispeels, M.J., 1989. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7885-7889.
- Mori, T., Utsumi, S., Inaba, H., Kitamura, K., Harada, K., 1981. Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 29, 20-23.
- Morrison, W.R., 1978. Cereal lipids, Chapter 4. In: Pomeranz (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 2, American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN.
- Morrison, I.N., Kuo, J., O'Brien, T.P., 1975. Histochemistry and fine structure of developing wheat aleurone cells. *Planta.* 123, 105-116.
- Morrison, W.R., 1993. Cereal starch granule development and composition. In: Shewry, P.R., Stobart, K. (Eds.), *Seed Storage Compounds*, Oxford Science Publications, Oxford, UK, p. 175-206.
- Morrison, W.R., Gadan, H., 1987. The amylose and lipid contents of starch granules in developing wheat endosperm. *J. Cereal Sci.* 5, 263-275.
- Mostafa, M.M., Rahma, E.H., 1987. Chemical and Nutritional changes in soybean during germination. *Food Chem.* 23, 257-275.
- Nakamura, T., Utsumi, S., Kitamura, K., Harada, K., Mori, T., 1984. Cultivar differences in gelling characteristics of soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 32, 647-651.
- Narayan, R., Chauhan, G.S., Verma, N.S., 1988. Changes in the quality of soybean during storage. Part 1 – Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. *Food Chem.* 27, 13-23.
- Narayan, R., Chauhan, G.S., Verma, N.S., 1988. Changes in the quality of soybean during storage. Part 2 – Effect of Soybean storage on the sensory qualities of the products made therefrom. *Food Chem.* 30, 181.
- Natarajan, S.S., Xu, C., Bae, H., Caperna, T.J., Garrett, W.M., 2006. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3114-3120.
- Nwokolo, E., 1996. The need to increase consumption of pulses in the developing world. In: Nwokolo, E., Smartt, J. (Eds.), *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*, Chapman and Hall, London, p. 3-11.
- O'Brian, M.R., Kirshbom, P.M., Maier, R.J., 1987. Bacterial heme synthesis is required for the expression of the leghemoglobin but not the apoprotein in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8390-8393.
- Ohlrogge, J.B., Kuo, T.-M., 1984. Control of lipid synthesis during soybean seed development: enzymic and immunochemical assay of acyl carrier protein. *Plant Physiol.* 74, 622-625.
- Okamoto, K., Kitano, H., Akazawa, T., 1980. Biosynthesis and excretion of hydrolases in germinating cereal seeds. *Plant Cell Physiol.* 21, 201-204.
- Okita, T.W., Greene, F.C., 1982. The wheat storage proteins: isolation and characterization of gliadin messenger RNAs. *Plant Physiol.* 69, 834-839.
- Oparka, K.J., Harris, N., 1982. Rice protein-body formation, all types are initiated by dilation of the endoplasmic reticulum. *Planta.* 154, 184-188.
- Osborne, T.B., 1895. The proteins of barley. *J. Am. Chem. Soc.* 17, 539-567.
- Oxley, T.A., 1948. *The scientific principles of grain storage*. Northern Publishing, Liverpool.
- Palmer, R., McIntosh, A., Pustai, A., 1973. The nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the effect on nutritional value of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. *J. Sci. Food Agric.* 24, 937-944.
- Parker, M.L., 1981. The structure of mature rye endosperm. *Ann. Bot. (London)* 47, 181-186.
- Parker, M.L., Hawes, C.R., 1982. The Golgi apparatus in developing endosperm of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta.* 154, 277-283.
- Parsons, C.M., Zhang, Y., Araba, M., 2000. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. *Poultry Sci.* 79, 1127-1131.
- Patwardhan, V.N., 1962. Pulses and beans in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 11, 12-30.
- Pernollet, J.-C., 1978. Protein bodies of seeds, ultrastructure, biochemistry, and degradation. *Physiol. Veg.* 20, 259-276.
- Pernollet, J.-C., 1982. Les corpuscles protéiques des graines, stade transitoire de vacuoles spécialisées. *Physiol. Veg.* 20, 259.
- Pernollet, J.-C., Camilleri, C., 1983. Formation and development of protein bodies in the wheat endosperm. *Physiol. Veg.* 21, 1093-1103.
- Pernollet, J.-C., Mossé, J., 1983. Structure and location of legume or cereal seed storage proteins. In: Daussant, J., Mosse, J., Vaughan, J. (Eds.), *Seed Proteins*, Academic Press, New York, p. 155-191.
- Peterson, D.M., Smith, D., 1976. Changes in nitrogen and carbohydrate fractions in developing oat groats. *Crop. Sci.* 16, 67-71.
- Pinto, M.D.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2005. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant

- activity, and *in vitro* protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6340-6346.
- Pixton, S.W., 1968. The effect of heat treatment on the moisture content/relative humidity equilibrium relationship of Manitoba wheat. *J. Stored Prod. Res.* 4, 267-270.
- Pixton, S.W., Hill, S.T., 1967. Long-term storage of wheat. II. *J. Sci. Food Agric.* 18, 94-98.
- Pixton, S.W., Warburton, S., 1971. Moisture content relative humidity equilibrium of some cereal grains at different temperatures. *J. Stored Prod. Res.* 6, 283-293.
- Pixton, S.W., Warburton, S., 1975. The moisture content equilibrium relative humidity relationship of rice bran at different temperatures. *J. Stored Prod. Res.* 11, 1-8.
- Pixton, S.W., Warburton, S., Hill, S.T., 1975. Longterm storage of wheat. III. Some changes in the quality of wheat observed during 16 years of storage. *J. Stored Prod. Res.* 11, 177-185.
- Preiss, J., Levi, C., 1979. Metabolism of starch in leaves. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* 6, 282-312.
- Preston, K.R., Kruger, J.E., 1976. Location and activity of proteolytic enzymes in developing wheat kernels. *Can. J. Plant Sci.* 56, 217-223.
- Preston, K.R., Kruger, J.E., 1976. Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. *Plant Physiol.* 58, 516-520.
- Preston, K.R., Kruger, J.E., 1977. Specificity of two isolated wheat carboxypeptidases. *Phytochemistry* 16, 525-528.
- Price, P.B., Parsons, J.G., 1975. Lipids of seven cereal grains. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 490-493.
- Pueyo, J.J., Hunt, D.C., Chrispeels, M.J., 1993. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. *Plant Physiol.* 101, 1341-1348.
- Pusztai, A., Grant, G., Duguid, T., Brown, D.S., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Bardocz, S., 1995. Inhibition of starch digestion by α -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. *J. Nutr.* 125, 1554-1562.
- Pusztai, A., Grant, G., Buchan, W.C., Bardocz, S., de Carvalho, A.F.F.U., Ewen, S.W.B., 1998. Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. *Br. J. Nutr.* 79, 213-221.
- Pyo, Y.-H., Lee, T.-C., Lee, Y.-C., 2005. Effect of lactic acid fermentation on enrichment of antioxidant properties and bioactive isoflavones in soybean. *J. Food Sci.* 70 (3), S215-S220.
- Rahnotra, G.S., Loewe, R.J., Lehmann, T.A., 1977. Breadmaking quality and nutritive of sprouted wheat. *J. Food Sci.* 42, 1373-1375.
- Rathjen, J.R., Strounina, E.V., Mares, D.J., 2009. Water movement into dormant and non-dormant wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *J. Expt. Bot.* 60 (6), 1619-1631.
- Raynes, J.G., Briggs, D.E., 1985. Genotype and the production of α -amylase in barley grains germinated in the presence and absence of gibberellic acid. *J. Cereal Sci.* 3, 55-65.
- Recondo, E., Leloir, L.F., 1961. Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 85-88.
- Reddy, L.V., Cling, T.M., Metzger, R.J., 1984. Alpha-amylase activity in wheat kernels matured and germinated under different temperature conditions. *Cereal Chem.* 61, 228-231.
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates – a review. *Food Chem.* 13, 25-68.
- Riblett, A.L., Herald, T.J., Schmidt, K.A., Tilley, K.A., 2001. Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4983-4989.
- Rickert, D.A., Johnson, L.A., Murphy, P.A., 2004. Functional properties of improved glycinin and β -conglycinin fractions. *J. Food Sci.* 69, 303-311.
- Rijven, A.H.G.C., Gifford, R.M., 1983. Accumulation and conversion of sugars developing wheat grains. 3. Non-diffusional uptake of sucrose, the substrate preferred by endosperm slices. *Plant Cell Environ.* 6, 417-425.
- Robyt, J.F., 1984. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In: Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Paschall, E.F. (Eds.), *Starch: Chemistry Technology*, second ed. Academic Press, New York.
- Rochfort, S., Panozzo, J., 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7981-7994.
- Rodriguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., Hernandez, A., 2008. Correlations between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. *Food Chemistry* 108 (1), 245-252.
- Saio, K., Baba, K., 1980. Microscopic observation on soybean structural changes in storage [abstract]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 27, 343.
- Saio, K., Nikkuni, I., Ando, Y., Otsuru, M., Terauchi, Y., Kito, M., 1980. Soybean quality changes during model storage studies. *Cereal Chem.* 57, 77-82.
- Saio, K., Kobayakawa, K., Kito, M., 1982. Protein denaturation during model storage studies of soybeans and meals. *Cereal Chem.* 59, 408-412.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., 2006. Resistant starch – a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 5, 1-17.
- Salmeron, J., Ascherio, A., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Spiegelman, D., Jenkins, D.J., Stampfer, M.J., Wing, A.L., Willett, W.C., 1997. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 20, 545-550.
- Salunkhe, D.K., Kadam, S.S., Chavan, J.K., 1985. *Postharvest Biotechnology of Food Legumes.*, 29-52CRC Press, Boca Raton, FL 29-52.
- Sandhu, S.S., Lim, S.-T., 2007. Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydr. Polym.* 71, 245-252.
- Sangronis, E., Machado, C.J., 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajunis cajan*. *LWT J. Food Sci. Technol.* 40, 116-120.
- Santana, M.A., Pihakaski-Maunsbach, K., Sandal, N., Marcker, K.A., Smith, A.G., 1998. Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiol.* 116, 1259-1269.
- Sargeant, J.G., 1979. The α -amylase isoenzymes of developing and germinating wheat grain. In: Laidman, D.L., Wyn Jones, R.G. (Eds.), *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*, Academic Press, New York, p. 339-343.
- Sargeant, J.G., 1980. α -Amylase isoenzymes and starch degradation. *Cereal Res. Commun.* 8, 77-85.
- Sathe, S.K., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., 1984. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids. *Crit. Rev. Food Sci.* 21 (1), 41-93.
- Saulniera, L., Sadoa, P.-E., Branlard, G., Gilles, C., Guillon, F., 2007. Wheat arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J. Cereal Sci.* 46, 261-281.
- Schilstra, M.J., Veldink, G.A., Vliegenhart, J.F.G., 1994. The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron(III) lipoxygenase in solution. *Biochemistry* 33, 3974-3979.
- Schubert, S., 1995. Nitrogen assimilation by legumes – process and ecological limitations. *Fert. Res.* 42, 99-107.
- Schulz, A., Stephan, H., 1960. Untersuchungen über eine zweckmassige Verarbeitung auswuchsgeschädigter Roggenmehle. *Brot Gebaeck* 14, 240.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., Purcell, L.C., 1999. Symbiotic N_2 fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50, 143-155.
- Sessa, D.J., 1979. Biochemical aspects of lipid-derived flavors in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 27, 234-239.
- Shewry, P.R., Field, J.M., Kirkman, M.A., Faulks, A.J., Mifflin, B.J., 1980. The extraction, solubility and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *J. Exp. Bot.* 31, 393-407.
- Shewry, P.R., Mifflin, B.J., Forde, B.C., Bright, S.W.J., 1981. Conventional and novel approaches to the improvement of the nutritional quality of cereal and

- legume seeds. *Sci. Prog. (Oxf.)* 67, 575-600.
- Shimoni, E., 2004. Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: soy isoflavones. *J. Food Sci.* 69 (6), R160-R166.
- Siddhuraju, P., Becker, K., 2005. Nutritional and antinutritional composition, *in vitro* amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed mucuna beans (*Mucuna Pruriens* var. *utilis*): an under-utilised legume. *Food Chem.* 91, 275-286.
- Simmonds, D.H., 1972. The ultrastructure of the mature wheat endosperm. *Cereal Chem.* 49, 212-222.
- Simmonds, D.H., O'Brien, T.P., 1981. Morphological and biochemical development of the wheat endosperm. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 4, 5-70.
- Singh, R., Axtell, J.D., 1973. High lysine mutant gene (hl) that improves protein quality and biological value of grain sorghum. *Crop. Sci.* 13, 535-539.
- Singh, R., Juliano, B.O., 1977. Free sugars in relation to starch accumulation in developing rice grain. *Plant Physiol.* 59, 417-421.
- Singh, S., Singh, H.D., Sikka, K.C., 1968. Distribution of nutrients in the anatomical parts of common Indian pulses. *Cereal Chem.* 45, 13-18.
- Slavin, J.L., 2000. Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 300S-307S.
- Slavin, J.L., Martini, M.C., Jacobs Jr., D.R., Marquart, L., 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 459S-463S.
- Slightom, J.L., Sun, S.M., Hall, T.C., 1983. Complete nucleotide sequence of a French bean storage protein gene: phaseolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1897-1901.
- Smith, W.L., Lands, W.E.M., 1972. Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 247, 1038-1047.
- Spillane, P.A., Pelhate, J., 1982. Changes in quality and in microbiological activity during extended storage of high-moisture grain. *Cereal Foods World* 27, 107-111.
- Srinivas, V.R., Reddy, G.B., Ahmad, N., Swaminathan, C.P., Mitra, N., Surolia, A., 2001. Legume lectin family, the "natural mutants of the quaternary state", provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1527, 102-111.
- Staswick, P.E., Hermodson, M.A., Nielsen, N.C., 1981. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.* 256, 8752-8755.
- Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M., Kasai, Z., 1980. Isolation and characterization of two types of protein bodies in rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1633-1639.
- Taverner, R.J.A., Laidman, D.L., 1972. The induction of lipase activity in the germinating wheat grain. *Phytochemistry* 11, 989-997.
- Tester, R.F., Morrison, W.R., Ellis, R.H., Piggot, J.R., Batts, G.R., Wheeler, T.R., Morison, J.I.L., Hadley, P., Ledward, D.A., 1995. Effects of elevated growth temperature and carbon dioxide levels on some physicochemical properties of wheat starch. *J. Cereal Sci.* 22, 63-71.
- Thomas, B., Lukow, G., 1969. Starch degradation during dough raising with regard to α -amylase. *Brot Gebaeck* 23, 24.
- Tkachuk, R., 1979. Free amino acids in germinated wheat. *J. Sci. Food Agric.* 30, 53-58.
- Tombs, M.P., 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant Physiol.* 42, 797-813.
- Topping, D., 2007. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *J. Cereal Sci.* 46, 220-229.
- Tovar, J., Melito, C., 1996. Steam-cooking and dry-heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2642-2645.
- Triplett, B.A., Quatrano, R.S., 1982. Timing localization and control of wheat germ agglutinin synthesis in developing wheat embryos. *Dev. Biol.* 91, 491-496.
- Truswell, A.S., 2002. Cereal grains and coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 1-14.
- Tsai, C.Y., Dalby, A., Jones, R.A., 1975. Lysine and tryptophan increases during germination of maize seed. *Cereal Chem.* 52, 356-360.
- Tzen, J.T.C., Huang, A.H.C., 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J. Cell Biol.* 117, 327-335.
- Urbano, G., Aranda, P., Vilchez, A., Aranda, C., Cabrera, L., Porres, J.M., Lopez-Jurado, M., 2005. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. *Food Chem.* 93, 671-679.
- Urquardt, A.A., Altosaar, I., Matlashewski, G.J., 1983. Localization and lipase activity in oat grains and milled oat fractions. *Cereal Chem.* 60, 181-183.
- Urquardt, A.A., Brummell, C.A., Altosaar, I., Matlashewski, G.J., Sahasrabudhe, M.R., 1984. Lipase activity in oats during grain maturation and germination. *Cereal Chem.* 61, 105-108.
- US Department of Agriculture, 1957. *Grain Grading Primer*. Misc. Publ. No. 740. USDA, Washington, DC, p. 32.
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2008. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. , Nutrient Laboratory Home Page. Available at <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
- Vaidehi, M.P., Kadam, S.S., 1989. Soybean. In: Salunkhe, D.K. , Kadam, S.S. (Eds.), *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*, vol. 3CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-31.
- Vanderstoep, J., 1981. Effect of germination on the nutritive value of legumes. *Food Technology* 35 (3), 83-85.
- Varty, K., Arreguin, B., Gomez, M.T., Lopez, P.J.T., Gomez, M.A.L., 1982. Effects of abscisic acid and ethylene on the gibberellic acid-induced synthesis of α -amylase by isolated wheat aleurone layers. *Plant Physiol.* 73, 692-697.
- Viana, S.F., Guimaraes, V.M., Jose, I.C., Goret de Amneida e Oliveira, M., Brunoro Costa, N.M., Goncalves de Barros, E., Moreira, M.A., Tavares de Rezende, S., 2005. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. *Food Chem.* 93, 665-670.
- Vieweg, G.H., De Fekete, M.A.R., 1976. The effect of phospholipids on starch metabolism. *Planta.* 129, 155-222.
- Vitali, D., Dragojevića Vedrinar, I., Šebečića, B., 2008. Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: impact of proteins, phytic acid and polyphenols. *Food Chem.* 110, 62-68.
- Wang, L., Wang, T., Fehr, W.R., 2006. Effect of seed development stage on sphingolipid and phospholipid contents in soybean seeds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7812-7816.
- Westermarck-Rosendahl, C., Junnila, L., Koivistoinen, P., 1979. Efforts to improve the baking properties of sprout-damaged wheat by reagents reducing α -amylase activity. I. Screening tests by the falling number method. *Lebensm. Wiss. Technol.* 12, 321-324.
- Westermarck-Rosendahl, C., Junnila, L., Koivistoinen, P., 1980. Efforts to improve the baking properties of sprout-damaged wheat by reagents reducing α -amylase activity. III. Effects on technological properties of flour. *Lebensm. Wiss. Technol.* 13, 193.
- Whelan, W.J., 1958. In: Ruhland, W. (Ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, vol. 6Springer, Berlin, p. 154.
- Whelan, W.J., 1963. Recent advances in starch metabolism. *Stärke* 15, 247-251.
- Yanagi, S.O., Galeazzi, M.A.M., Saio, K., 1985. Properties of soybean in model storage studies. *Agric. Biol. Chem.* 49, 525-528.
- Yoshida, H., Saiki, M., Yoshida, N., Tomiyama, Y., Mizushima, Y., 2009. Fatty acid distribution in triacylglycerols and phospholipids of broad beans (*Vicia faba*). *Food Chem.* 112, 924-928.
- Yuan, S., Chang, S.K., 2007. Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials. *J. Agric. Food Chem.* 55, 426-431.
- Zhu, D., Hettiarachchy, N.S., Horax, R., Chen, P., 2005. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. *Plant Food Hum. Nutr.* 60, 147-151.

Frutas e vegetais

N.A. Michael Eskin,[†] Ernst Hoehn[†]

I. INTRODUÇÃO

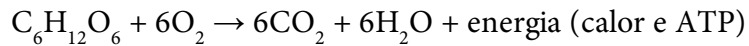
Características das frutas e dos vegetais como sabor, cor, tamanho, formato e a ausência de defeitos externos determinam sua aceitação pelos consumidores. O desenvolvimento dessas características é resultado de muitas alterações químicas e bioquímicas que têm lugar na pós-colheita e na estocagem. Uma vez que a colheita de frutas e vegetais em sua fase de maturidade correta é fundamental para o desenvolvimento de um produto amplamente aceitável para o mercado de alimentos frescos como também para serem processados, é importante dominar com mais profundidade quais mudanças estão ocorrendo neste período. Este capítulo vai ressaltar as alterações que estão acontecendo nas frutas e nos vegetais durante o período pós-colheita. É nesse período que as frutas demonstram uma redução gradual em sua qualidade em paralelo com os metabolismos de transpiração e a respiração, assim como com outras alterações bioquímicas e fisiológicas. Afinal, os alimentos vegetais deterioram pela atividade indesejável de enzimas e por danos causados por micro-organismos.

O crescimento e a maturação de frutas e vegetais antes de colhidos dependem da fotossíntese e da absorção de água e minerais por parte da planta genitora. Depois da sua separação, porém, tornam-se unidades independentes para as quais os processos respiratórios têm papel preponderante. Este capítulo vai focar as mudanças na fase posterior à colheita de frutas e vegetais e que afetam a sua qualidade.

II. RESPIRAÇÃO

A respiração é o processo fundamental pelo qual os organismos vivos fazem a conversão da energia potencial em energia cinética. Em vegetais superiores os produtos principais de estocagem são a sacarose e o amido. Tais substâncias são completamente oxidadas na presença de oxigênio transformando-se em dióxido de carbono e água

com a produção de adenosina trifosfato (ATP):



A molécula de ATP é a forma na qual a energia é armazenada no interior das células. A contribuição das proteínas e lipídeos na respiração das plantas é difícil de ser avaliada, mas pode ocorrer mediante a formação de acetil-coenzima A (Acetil CoA). Na ausência de oxigênio ocorre uma respiração anaeróbica, o que resulta em degradação apenas parcial dos carboidratos e baixa produção de ATP.

As vias metabólicas envolvidas na respiração dos tecidos das plantas resultam na conversão do amido ou sacarose em glicose-6-P. Esta última é então oxidada pela glicólise (via de Embden–Meyerhoff) ou pela via das pentosesfosfato para triose fosfato, que se introduz no ciclo do ácido tricarbóxico através do piruvato (Esquema 2.1) (ap Rees, 1977). Por fim, em uma terceira fase, a fosforilização oxidativa converte NADH e FADH₂ em energia química na forma de ATP (Browse *et al.*, 2006).

A contribuição destas duas vias importantes da oxidação de carboidratos para a respiração das plantas permanece inexplicada. As técnicas experimentais utilizadas na avaliação dos papéis relativos de cada uma dessas vias baseadas na produção de ¹⁴CO₂ ou denominadas de intermediários de hexoses (ap Rees, 1980) não foram bem-sucedidas. Existe comprovação de que as duas vias existem nos tecidos vegetais (ap Rees, 1974) e que elas se transformam de modo considerável durante o desenvolvimento das plantas (ap Rees, 1977). Evidências atuais confirmam que a via glicolítica representa a de maior predominância em operação ao passo que a contribuição máxima da via das pentoses fosfato pode não exceder 30% do total (ap Rees, 1980). A importância relativa dessas vias depende, provavelmente, do tipo de planta, do órgão e do estado de maturidade.

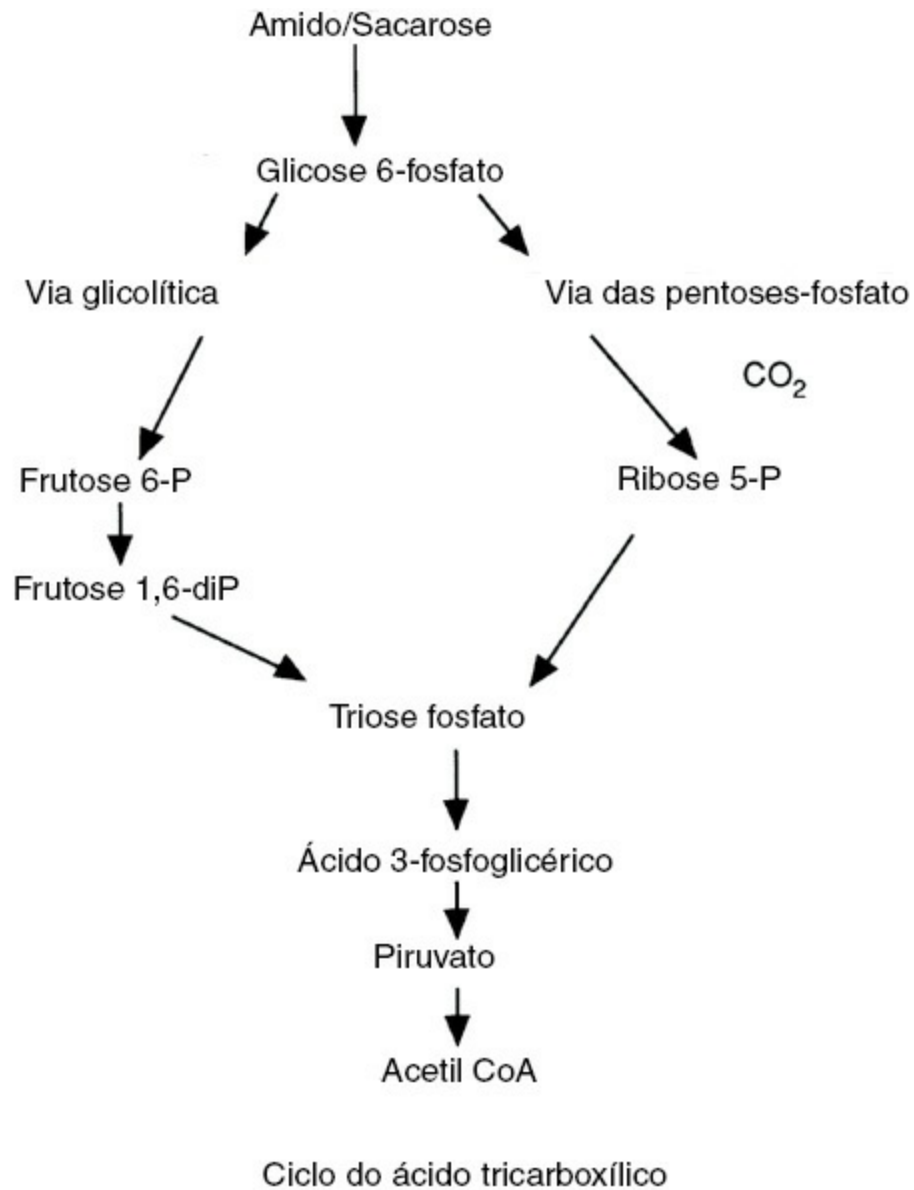
A taxa de respiração de frutas e vegetais é afetada por diversos fatores ambientais. Nos casos em que isto resulta em efeitos negativos nos tecidos vegetais o fenômeno é definido como estresse. Durante o armazenamento de frutas e vegetais (seção VIII) os efeitos de baixas temperaturas, redução dos níveis de oxigênio (O₂) e aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera de armazenamento são utilizados para aumentar a vida de prateleira do produto estocado. No entanto, é necessário manter um *status* de energia adequado para evitar o escurecimento ou a senescência das frutas e vegetais armazenados (Saquet *et al.*, 2000; 2003a; Xuan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). É conhecido que reduzir o nível de concentração de O₂ durante o controle da atmosfera de estocagem reduz o ritmo da respiração dos vegetais, assim como o suprimento de energia e que grande limitação de O₂ induz a uma respiração fermentativa (anaeróbica) no metabolismo no produto estocado (Esquema 2.1). O rendimento de ATP durante a respiração anaeróbica é de apenas de 2 moles de ATP por mol de açúcar hexose comparada com 36 moles de ATP por mol de hexose na respiração aeróbica. Portanto, o *status* de produção de energia pode ser insuficiente e provocar danos durante a armazenagem (Jiang *et al.*, 2007).

A. Frutas

Grande número de frutas tem um importante aumento na atividade respiratória depois da colheita, fato que é denominado como aumento climatérico da respiração. Este fenômeno foi percebido pela primeira vez por Kidd e West (1922, 1930a) ao observar um grande aumento no gás dióxido de carbono ao final do período de maturação de maçãs. A partir de então surgiram inúmeros relatos sobre a ocorrência deste mesmo fenômeno em vários tipos de frutas. A adequação do termo climatérico foi questionada por Rhodes (1970), que sugeriu que fosse utilizado em todas estas situações descrevendo “toda a fase de controle da vida da fruta desencadeada pelo etileno e as alterações concomitantes que ocorrem”.

McGlasson *et al.* (1978), no entanto, sugeriram que respiração climatérica seria um termo mais apropriado para descrever este fenômeno gasoso. Biale e Young (1981), porém, preferiram que a denominação fosse uma descrição

mais abrangente na qual o termo climatérico descreveria as alterações físicas, químicas, fisiológicas e metabólicas associadas ao aumento da taxa respiratória que ocorre durante a fase de transição do crescimento e maturação ao período final de senescência. Basicamente, o termo climatérico define os últimos estágios da fruta a nível celular, o que determina a qualidade da fruta que será oferecida ao consumidor.



ESQUEMA 2.1 Vias glicolítica e das pentoses-fosfato.

Biale (1960a; 1960b) classificou tentativamente as frutas como climatéricas ou não climatéricas conforme suas taxas respiratórias pós-colheita. Em uma revisão posterior, Biale e Young (1981) sugeriram uma lista mais extensa de frutas que pertencem aos dois grupos, como pode ser visto na Tabela 2.1. Frutas como o melão cantalupo, o melão “honeydew” e os figos foram incluídas e consideradas climatéricas (Lyons *et al.*, 1962; Pratt e Groeschel, 1968; Marei e Crane, 1971). Algumas frutas raras também foram incluídas, como goiabas e abricó-do-pará (Akamine e Goo, 1978; 1979a; 1979b; Saltveit, 2004).

O período imediatamente anterior ao aumento climatérico, quando o nível respiratório está no ponto mínimo é conhecido como pré-climatérico. Após o aumento climatérico ocorre a fase pós-climatérica, na qual há um declínio do ritmo respiratório. Ao contrário do súbito aumento da atividade respiratória que caracteriza as frutas climatéricas, as frutas não climatéricas passam por uma fase de um declínio regular da atividade respiratória. Essa tendência de baixa na atividade respiratória pós-colheita foi verificada pela primeira vez em limões estocados a 15°C observada por Biale e Young (1947) e posteriormente em laranjas (Biale, 1960a; 1960b). A Figura 2.1 ilustra a

diferença na atividade respiratória entre frutas climatéricas e não climatéricas, por exemplo, abacates e limões.

Na primeira classificação feita por Biale (1960a; 1960b), as laranjas foram classificadas como frutas não climatéricas uma vez que tinham baixo nível respiratório. Foi comprovado em seguida que alguns membros da família dos cítricos têm atividade respiratória similar à das frutas climatéricas. Apesar de terem taxas respiratórias mais altas, uma tendência de baixa atividade respiratória foi observada em cultivares de “Valencia” e “Washington Navel”. Esse declínio na respiração foi observado por Bain (1958) em laranjas “Valencia” desde o surgimento das frutas até sua maturidade. No entanto, Trout *et al.* (1960) relataram um típico aumento respiratório em laranjas estocadas a 4,3°C-10°C. Esses resultados foram atribuídos por Biale e Young (1981) a possíveis danos pelo frio em estocagem a baixas temperaturas. Apenas metade das laranjas mantidas a 10°C apresentaram um aumento na respiração após a colheita, o que pode ter ocorrido por causa da imaturidade de algumas destas frutas. Aharoni (1968) também utilizou o termo climatérico para descrever o aumento na taxa respiratória após a colheita de laranjas jovens e imaturas do tipo “Washington Navel”, “Shamouti” e “Valencia”, assim como em grapefruit sem sementes do tipo Marsh estocadas a 16°C e 20°C. Por outro lado, frutas já crescidas e maduras não demonstraram nenhum aumento na atividade respiratória. Eaks (1970) examinou os padrões respiratórios de vários tipos de frutas cítricas através de toda a sua ontogenia. As laranjas pequenas e imaturas e o grapefruit mostraram um aumento na atividade da respiração e do etileno a 20°C por vários dias após a colheita. À medida que o peso da fruta aumenta, o que é característico da fase de maturação, o nível do dióxido de carbono e a produção de etileno diminuem até a maturação ficar próxima ou ser completada; nesta fase, nenhuma alteração da respiração foi observada. Com base nesses estudos ficou evidente que as frutas cítricas foram classificadas corretamente como não climatéricas.

TABELA 2.1 Atividade respiratória de frutas selecionadas

Climatéricas	Não climatéricas
Maçã	Mirtilo
Damasco	Uva
Abacate	Toranja
Banana	Jamelão
Fruta-pão	Limão
Figo	Azeitona
Goiaba	Laranja
Abricó-do-pará	Abacaxi
Melão-cantalupo	Morango
	Melão honeydew

Adaptado de Biale e Young (1981).

Rhodes (1970) observou que se o período climatérico tivesse sido definido como o período de atividade metabólica intensificada durante a transição da fase de crescimento até a senescência das frutas, a confusão com as frutas cítricas teria sido evitada. Uma situação similar foi observada com as uvas, nas quais um aumento da respiração foi relatado por Peynaud e Riberau-Gayon (1971) durante o crescimento rápido, definido como “climatérico rudimentar”. No entanto, essa situação foi esclarecida quando a alteração respiratória na pós-maturação demonstrou possuir um padrão tipicamente não climatérico, fato consistente com trabalhos anteriores de Geisler e Radler (1963). Uma controvérsia similar surgiu em relação aos abacaxis e embora Dull *et al.* (1967) tenham encontrado uma pequena tendência de aumento respiratório ela não é típica de frutas climatéricas. A identificação de vários tomates mutantes por Herner e Sink (1973) sem nenhum padrão climatérico foi revisada depois por Tigchelaar *et al.* (1978 a, b). Essas frutas mutantes não produzem etileno e têm baixo teor de carotenoides. Um aspecto específico desses casos foram os baixos níveis de poligalacturonase, o que explica a sua firmeza prolongada.

B. Vegetais

Quando os vegetais são separados da planta-mãe, seu metabolismo continua a funcionar apesar de as reações catabólicas tornarem-se rapidamente predominantes. O aumento climatérico característico em algumas frutas como maçãs e abacates não ocorre em vegetais, que não possuem uma divisão clara entre a maturação e a senescência.

A intensidade, assim como o ritmo da respiração, varia conforme a planta, o grau de maturação e se o vegetal estiver em pleno crescimento no momento da colheita ou sendo parte da estocagem. McKenzie (1932), por exemplo, relatou uma intensidade respiratória maior em alfaces imaturas logo após a colheita (*Lactuca sativa*) durante as primeiras 12 horas. Depois desse período a respiração diminuiu e atingiu o mesmo nível encontrado em alfaces maduras. A deterioração de vários vegetais foi examinada por Platenius (1942), que descobriu que a taxa respiratória inicial dos aspargos (*Asparagus officinalis*) a 24°C é quase 50 vezes maior do que a das batatas. A taxa respiratória declinou em todos os vegetais estocados durante 60 dias, independentemente da temperatura. As taxas de respiração iniciais parecem ser um indicador útil com relação ao potencial de tempo de vida útil do vegetal durante o período de pré-resfriamento e início da estocagem. Uma alta taxa de respiração, no entanto, indica uma vida curta durante a estocagem, enquanto o oposto é verdadeiro para variedades com baixa taxa de respiração. Tal fato pode ser comprovado em um grande número de vegetais na Figura 2.2.

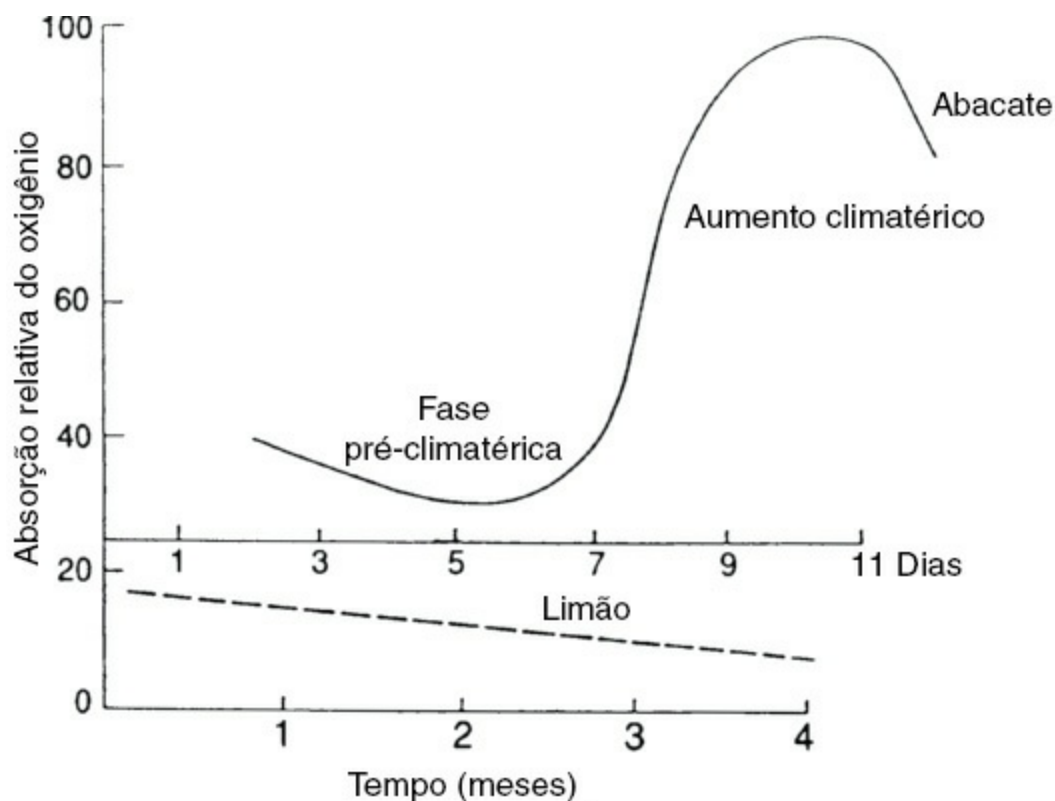


FIGURA 2.1 Atividade respiratória em frutas climatéricas, exemplificadas pelo abacate, comparada com frutas não climatéricas, representadas pelo limão (Biale *et al.*, 1954). Reimpresso com autorização do detentor dos direitos autorais, American Society of Plant Physiology (ASPP).

Vegetais e frutas podem ser classificados quanto à taxa respiratória como: extremamente alta, muito alta, alta, moderada, baixa e muito baixa (Saltveit, 2004). Tecidos jovens, por exemplo, como as partes de aspargos em fase de crescimento ou sementes de ervilhas verdes em desenvolvimento possuem altas taxas respiratórias, enquanto taxas baixas são encontradas em órgãos de estocagem como raízes (batatas) e bulbos (cebolas). Vegetais folhosos apresentam taxa respiratória moderada enquanto alguns vegetais, como o repolho, podem ser estocados em baixas temperaturas por períodos de tempo consideráveis. Outros, por exemplo, pepinos (*Cucumis sativa*), são muito suscetíveis a danos pelo frio se estocados na faixa de temperatura de 0°C-10°C (Eaks e Morris, 1956). Muitos

outros produtos, em particular os que vêm dos trópicos ou subtropicais são suscetíveis a danos pelo frio quando a temperatura atinge valores abaixo de 10°C-12°C (Wang, 1989; Saltveit, 2004). Os danos provocados pelo frio são diagnosticados por um aumento da respiração que atinge um patamar que corresponde ao resfriamento, após o qual ocorre um declínio da respiração.

1. Controle do aumento climatérico

O grande aumento na atividade respiratória associado ao período climatérico tem sido atribuído a vários fatores diferentes. Uma das teorias propõe que a razão é a mudança repentina na “permeabilidade das membranas celulares ou na capacidade de organização” (Solomos e Laties, 1973). Enquanto tais alterações são evidentes durante a maturação, permanece a questão de serem elas causa ou consequência do processo de maturação (Theologis e Laties, 1978). A segunda teoria enfoca o aumento da síntese de proteínas como um pré-requisito necessário para o processo de maturação (Brady *et al.*, 1976; Richmond e Biale, 1966) ou um aumento significativo da produção de ATP via estímulo da respiração (Biale, 1960b). Pesquisas posteriores, porém, revelaram que não há diferenças na capacidade respiratória da mitocôndria obtida de tecidos do abacate no pré-climatérico ou climatérico (Biale, 1969).

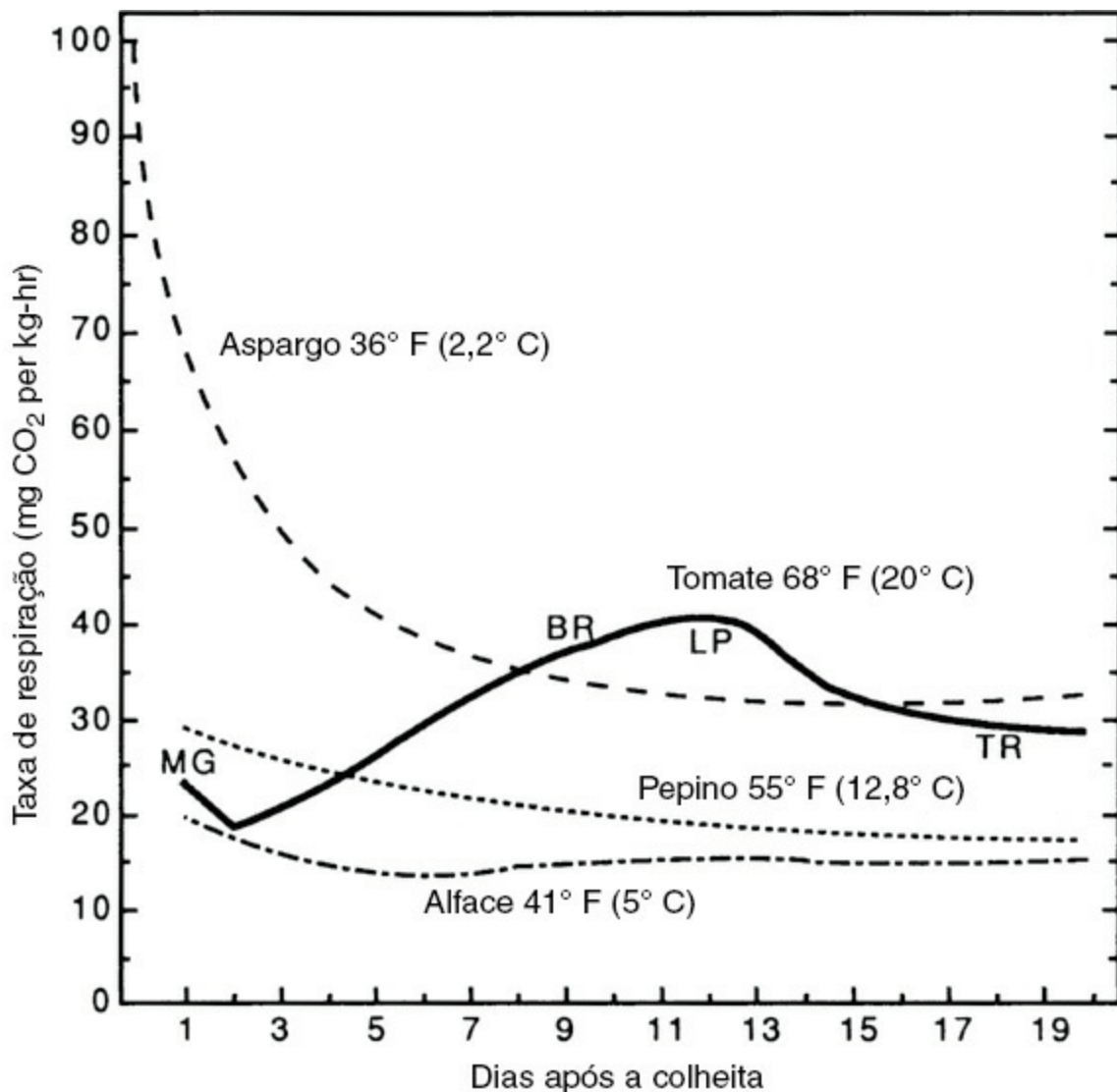


FIGURA 2.2 Taxa de respiração de um broto (aspargo), um vegetal folhoso (alface repolhuda), uma fruta não madura (pepino) e uma madura (tomate) a temperaturas encontradas costumeiramente durante sua comercialização [para tomate: MG = *mature green* (verde desenvolvido); BR = (*breaker*) coloração incipiente; LP = (*light pink*) rosa-claro; TR = (*table red*) vermelho maduro]. Dados obtidos em Lipton (1977); Pratt *et al.* (1954); Workman *et al.* (1957) e Ryall and Lipton (1979).

Além do mais, a taxa de respiração pré-climatérica de fatias de abacate foi suficiente para facilitar o aumento climatérico (Millerd *et al.*, 1953). Esse fato foi confirmado em estudos que utilizaram mitocôndrias isoladas de abacates (Biale *et al.*, 1957). Outras pesquisas realizadas por Lance *et al.* (1965) e Hobson *et al.* (1966), utilizando técnicas mais aprimoradas, com mitocôndrias isoladas de abacates em todos os estágios do climatério, demonstraram que as atividades oxidativas e fosforilativas permaneceram inalteradas enquanto os cofatores estiveram presentes no meio. A estimulação da glicólise em abacate em condições anaeróbicas também demonstrou considerável capacidade glicolítica latente (Solomos e Laties, 1974). Esses estudos indicaram a adequação das enzimas endógenas em frutas pré-climatéricas na manutenção da respiração climatérica. O fato é consistente com os estudos feitos por Frenkel *et al.* (1968) e McGlasson *et al.* (1971), que relataram que à medida que se inibe a síntese proteica, evita-se a maturação de ervilhas intactas e de fatias de bananas, mas não se observa declínio no curso da respiração.

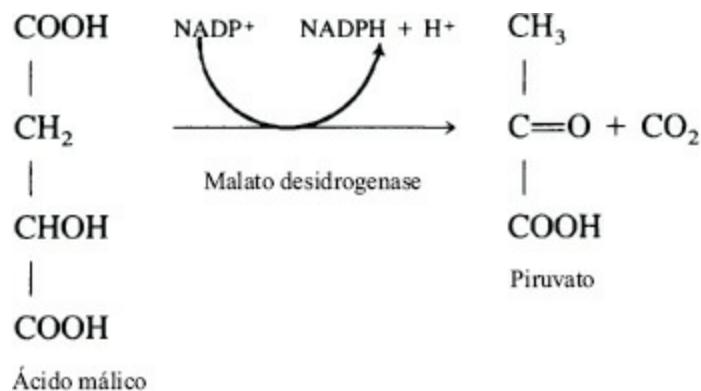
O enorme aumento na atividade respiratória que acompanha a maturação de frutas do tipo climatérico parece estar ligado a alguma alteração na função da respiração mitocondrial *in vivo* (Biale, 1960a; 1960b). Uma explicação possível para esse fato pode ser atribuída a um aumento na respiração cianeto resistente (Solomos e Laties, 1976; Solomos, 1977). Solomos e Laties (1974; 1976) observaram que o cianeto dá início a alterações fisiológicas e bioquímicas idênticas em abacates e tubérculos de batatas. O cianeto é um conhecido inibidor da citocromo oxidase, a oxidase terminal na cadeia de transporte de elétrons. Assim, há uma via cianeto-insensível que permite a oxidação de substratos respiratórios na presença de cianeto (Bendall e Bonner, 1971). A presença dessa via cianeto-resistente ou via alternativa foi comprovada em frutas que respondem ao etileno (Solomon e Laties, 1974; 1976). Posteriormente Theologis e Laties (1978) estudaram essa via na respiração de abacates e bananas em estágio de maturação. Esses pesquisadores descobriram que o aumento da respiração durante o período climatérico em frutas intactas é mediado pelo citocromo. As frutas pré-climatéricas têm a capacidade de manter o transporte de elétrons pela via do citocromo apesar de permanecer não expressa. Durante o aumento do climatérico a via alternativa parece permanecer em baixo nível de atividade e pode estar envolvida na geração de peróxido (Rich *et al.*, 1976). A enzima responsável pela respiração via do cianeto-resistente é denominada de oxidase alternativa (Vanlerbergh e McIntosh, 1997). A função dessa via alternativa não está totalmente elucidada, mas pode diminuir os efeitos deletérios do estresse na respiração (Tucker, 1993; Wagner e Krab, 1995; Møller, 2001). Um debate sobre o possível papel regulatório do cianeto na biosíntese do etileno pode ser encontrado na seção IV.

2. Controle enzimático

A possibilidade de que a atividade enzimática represente o fator de controle do estágio climatérico já foi discutida. Tager e Biale (1957) notaram um aumento da atividade das enzimas carboxilase e aldolase durante a maturação de bananas acompanhada pela troca da via das pentoses fosfato pela via glicolítica. Isso pode ocorrer no período de transição da fase pré-climatérica para pós-climatérica durante a maturação da fruta.

a. Enzima malato desidrogenase

Hulme *et al.* (1963) relataram a ocorrência de um grande aumento na atividade das enzimas malato desidrogenase (desidrogenase málica) e da piruvato carboxilase durante a maturação das maçãs. Este fato explicaria o pequeno aumento na absorção de oxigênio durante a maturação das maçãs quando comparada ao grande aumento na evolução do dióxido de carbono.



Várias pesquisas demonstraram que a enzima malato desidrogenase possui vários graus de resistência ao cianeto dependendo da atividade da enzima (Lance *et al.*, 1967; Macrae, 1971; Coleman and Palmer, 1972; Neuburger e Douce, 1980). Moreau e Romani (1982) examinaram a oxidação do malato durante o aumento climatérico na mitocôndria do abacate com foco especial na via alternativa cianeto-resistente. O aumento da atividade da enzima malato desidrogenase acompanhou o aumento da oxidação do malato à medida que a maturação progredia durante o climatérico. O malato é oxidado pela desidrogenase málica pela via do citocromo. Ele também pode ser oxidado pela via alternativa do NADH desidrogenase rotenona-resistente localizada na camada interna da membrana da mitocôndria (Palmer, 1976; Marx e Brinkmann, 1978; Rustin *et al.*, 1980). Esses pesquisadores concluíram que a enzima desidrogenase málica e a via da alternativa da oxidase provavelmente funcionam em condições de demanda relativamente baixa de ATP e características de alteração para alta energia nos últimos estágios do climatérico. Embora a regulação da via transportadora de elétrons via citocromo e vias alternativas ainda não tenha sido totalmente elucidada na mitocôndria do abacate, o envolvimento da via alternativa não pode ser ignorado.

b. Fosfofrutoquinase e pirofosfato: frutose-6-fosfato fosfotransferase

Salimen and Young (1975) examinaram a possibilidade de o período climatérico ser regulado pela ativação das enzimas envolvendo a fosfofrutoquinase (PFK) (ATP:d-frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase, EC 2.7.1.11). Essa questão foi baseada na pesquisa de Barker e Solomos (1962), que observaram um aumento na atividade da frutose 1,6-difosfato durante a maturação de bananas e tomates por Chalmers e Rowan (1971). Este aumento na atividade de frutose 1,6-difosfato foi atribuído à ativação da PFK. Salimen e Young (1975) relataram que a ativação desta enzima é responsável por um aumento de 20 vezes na atividade de frutose 1,6-difosfato durante o processo de maturação. A separação por eletroforese da PFK demonstrou que não houve o surgimento de novas formas de enzimas durante o climatérico e que as enzimas se mantiveram no formato oligomérico. Rhodes (1971) relatou que a PFK estava presente em sua forma oligomérica em tomate até a fase climatérica enquanto as espécies oligoméricas e de baixa massa molecular foram isoladas na fase pós-climatérica. Isaac e Rhodes (1982) descobriram depois que a PFK existe na forma oligomérica na fase em que o tomate adquire uma coloração inicial avermelhada. Utilizando a cromatografia de permeação em gel Isaac and Rhodes (1987) identificaram um único pico que corresponde à forma oligomérica nos estádios de coloração verde e início de coloração avermelhada. Dois picos foram separados, no entanto, nos estádios laranja e vermelho de maturação do tomate, que correspondem aos formatos oligoméricos e monoméricos da enzima (Figura 2.3). Para explicar o comportamento da PFK, os pesquisadores sugeriram que a estimulação da enzima ocorreu pela interação com o fosfato inorgânico (P_i) do vacúolo em consequência de alterações na permeabilidade na membrana durante o início do climatérico. A interação contínua com o P_i e citrato afetam a enzima em nível molecular, o que provoca a dissociação da forma oligomérica da enzima em subunidades monoméricas durante os estádios finais da maturação.

Bennett *et al.* (1987) examinaram o papel da regulação glicolítica do climatérico em abacates. Empregaram

espectroscopia de ressonância nuclear magnética ^{31}P *in vivo* para monitorar os níveis de nucleótdeos fosforilados. Concentraram atenção especial na pirofosfato:frutose-6-fosfato fosfotransferase (PFP), uma enzima alternativa encontrada em abacaxis por Carnal e Black (1979). Essa enzima catalisa reações idênticas à PFK, utilizando PP_i em vez de ATP como doador de fosfato, e é ativada pela frutose 2,6-bifosfato. Um aumento na quantidade de frutose 2,6-fosfato ocorreu em conjunto com um aumento da respiração, o que deu a ideia, aos pesquisadores, de que o PFP também pode estar envolvido na regulação da maturação da fruta do abacate.

III. INÍCIO DA MATURAÇÃO

O etileno é uma das várias substâncias voláteis que emanam das frutas e dos vegetais e que foi identificado mais tarde por Gane (1934) como o componente ativo no estímulo da maturação. A aplicação de quantidades mínimas de etileno, na ordem de 1 ppm, estimula a atividade respiratória, induz a maturação e apressa o aparecimento do estágio climatérico. O etileno, portanto, foi rapidamente reconhecido como o hormônio de plantas que dá início à maturação assim como regula muitos aspectos do crescimento das plantas, de seu desenvolvimento, de suas respostas a patógenos e a danos, senescência e respostas abióticas e bióticas ao estresse (Abeles, 1973; Gazzarrini e McCourt, 2001; Alexander e Grierson, 2002). Com base no tipo de respiração, as frutas podem ser agrupadas como climatéricas e não climatéricas, fato que foi descrito no início do capítulo (Lelievre *et al.*, 1997). A maturação em frutas climatéricas (Tabela 2.1) se manifesta por um aumento na respiração e da concentração de etileno. Em frutas não climatéricas a respiração não sofre nenhuma alteração no pós-colheita e a produção de etileno permanece muito baixa durante a maturação. Além do aumento do metabolismo respiratório, o etileno exógeno estimula sua própria biossíntese em frutas de maturação climatérica (Burg e Burg, 1965). A aplicação de níveis maiores de etileno exógeno em frutas climatéricas antecipa o aumento climatérico, acompanhada por um aumento da absorção de oxigênio (Figura 2.4). O etileno, portanto, é necessário para a maturação uma vez que o processo de maturação pode ser inibido por controle genético (Oeller *et al.*, 1991; Theologis *et al.*, 1993; Picton *et al.*, 1993; Ayub *et al.*, 1996; Brummell, 2005) ou pela ação de inibidores do etileno como 1-metil-ciclopropeno (1-MCP) (Sisler e Serek, 1997). Quanto às frutas não climatéricas, um aumento na absorção de oxigênio acompanha a aplicação de etileno. No caso de frutas climatéricas, quando o etileno já causou o aumento da respiração o processo não pode ser revertido. Esse fato estabelece um grande contraste em frutas não climatéricas, cuja atividade respiratória retorna aos níveis de controle quando o tratamento com etileno é finalizado (Vendrell *et al.*, 2001).

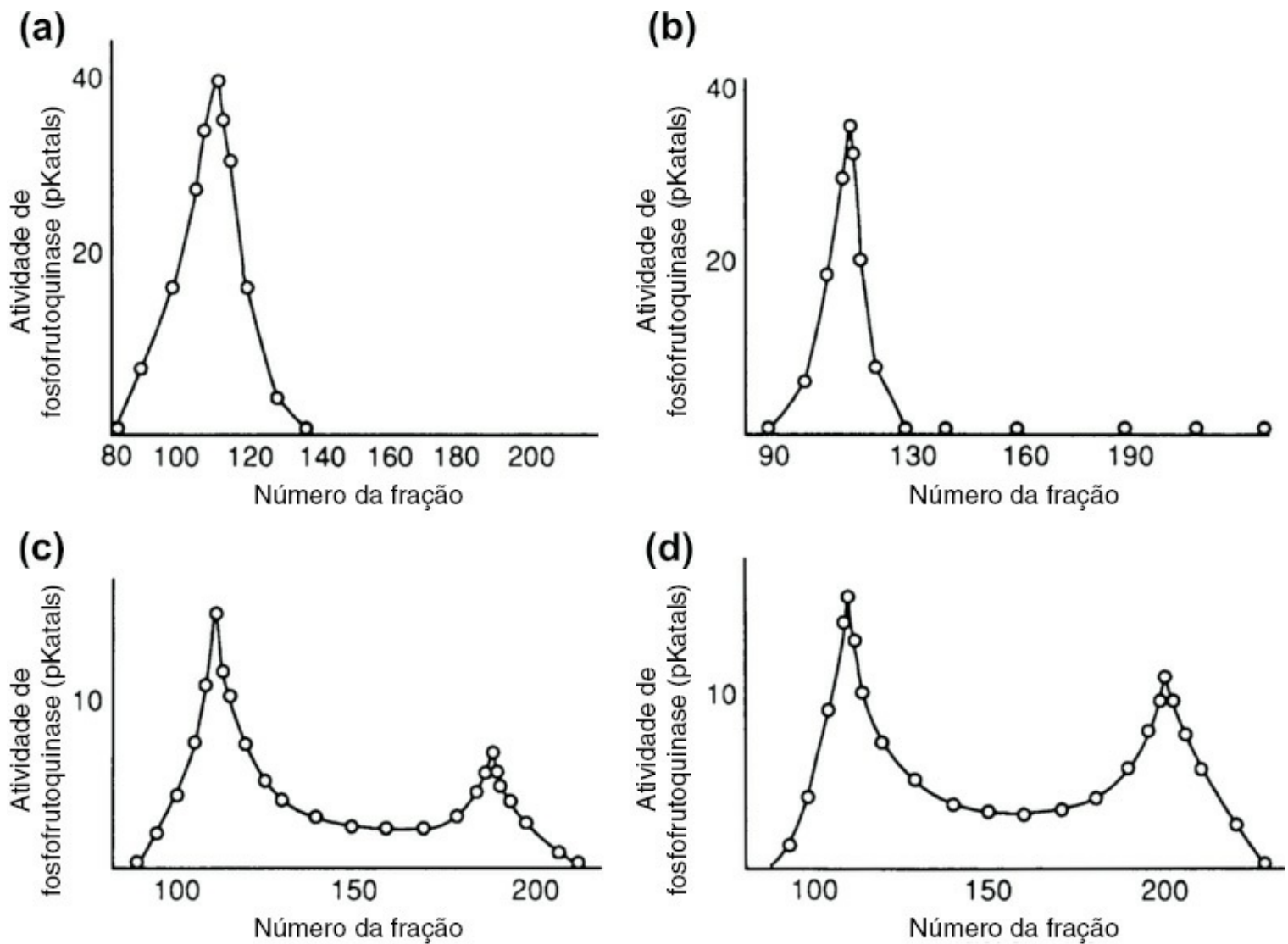


FIGURA 2.3 Eluição da preparação enzimática de fosfofrutoquinase (PFK) de tomates (a) verdes; (b) início do alaranjado, (c) alaranjados e (d) vermelhos em Ultrogel AcA p (Isaac e Rhodes, 1987). Reimpressão autorizada. Copyright © Pergamon Press.

Há algum tempo o etileno era considerado um subproduto e não um hormônio de maturação uma vez que a quantidade presente durante a fase pré-climatérica em muitas frutas seria insuficiente para estimular a maturação (Biale *et al.*, 1954). Tal conclusão baseava-se na quantidade de etileno que emanava da fruta e não nas concentrações intracelulares e era medida utilizando técnicas manométricas, que eram pouco sensíveis. Pesquisas posteriores utilizando cromatografia a gás forneceram ampla comprovação da presença de etileno nos espaços intracelulares (Burg e Burg, 1965). É geralmente aceito que os níveis de etileno necessários para estimular a maturação estão entre 0,1-1,0 ppm, faixa fora do alcance das técnicas manométricas normais. A Tabela 2.2 reune a alteração nos níveis endógenos de etileno durante a maturação de algumas frutas climatéricas e não climatéricas. No caso do abacate, manga e peras o nível de etileno antes do aumento climatérico é mais baixo do que o limite aceito de 0,1 ppm. Biale e Young (1971) notaram que a iniciação rápida da maturação em abacates requer níveis de etileno mais altos do que 1 ppm. Esses pesquisadores afirmaram, 10 anos mais tarde (Biale e Young, 1981) que era difícil fazer generalizações quanto ao nível mínimo de etileno necessário para induzir o aumento do climatério por causa das poucas informações disponíveis. Peacock (1972) sugeriu que a eficiência do etileno é definida pela concentração, tempo de exposição e o momento em que é aplicado após a colheita. À medida que a fruta aproxima-se da maturação fica evidente que há uma diminuição da sensibilidade ao etileno.

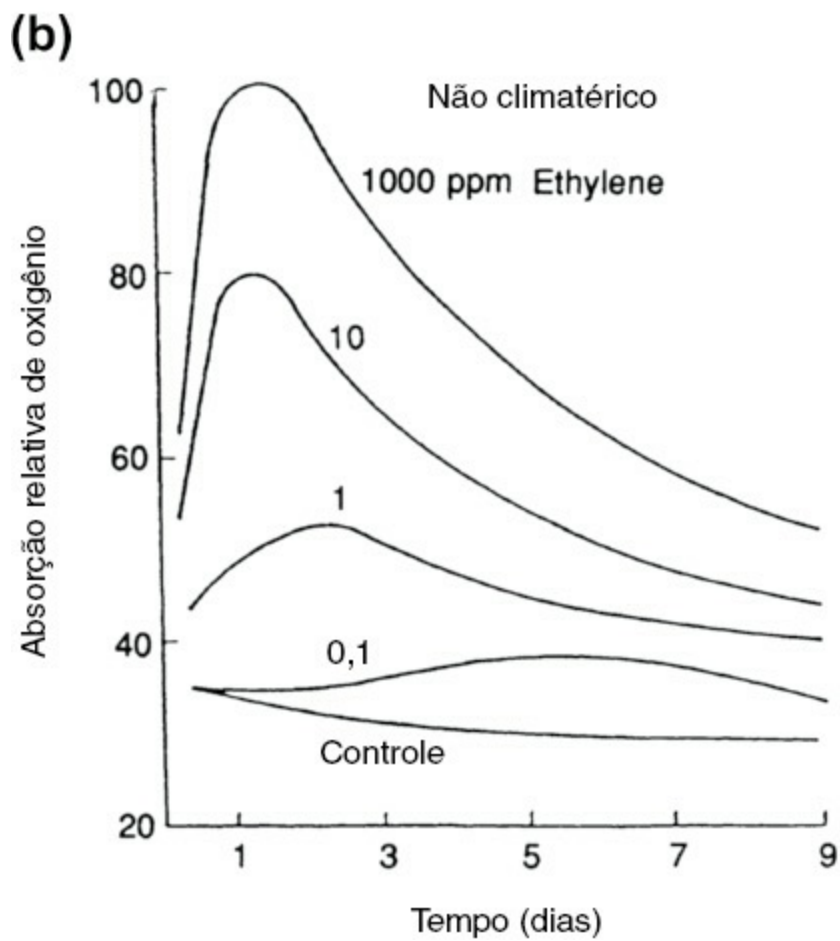
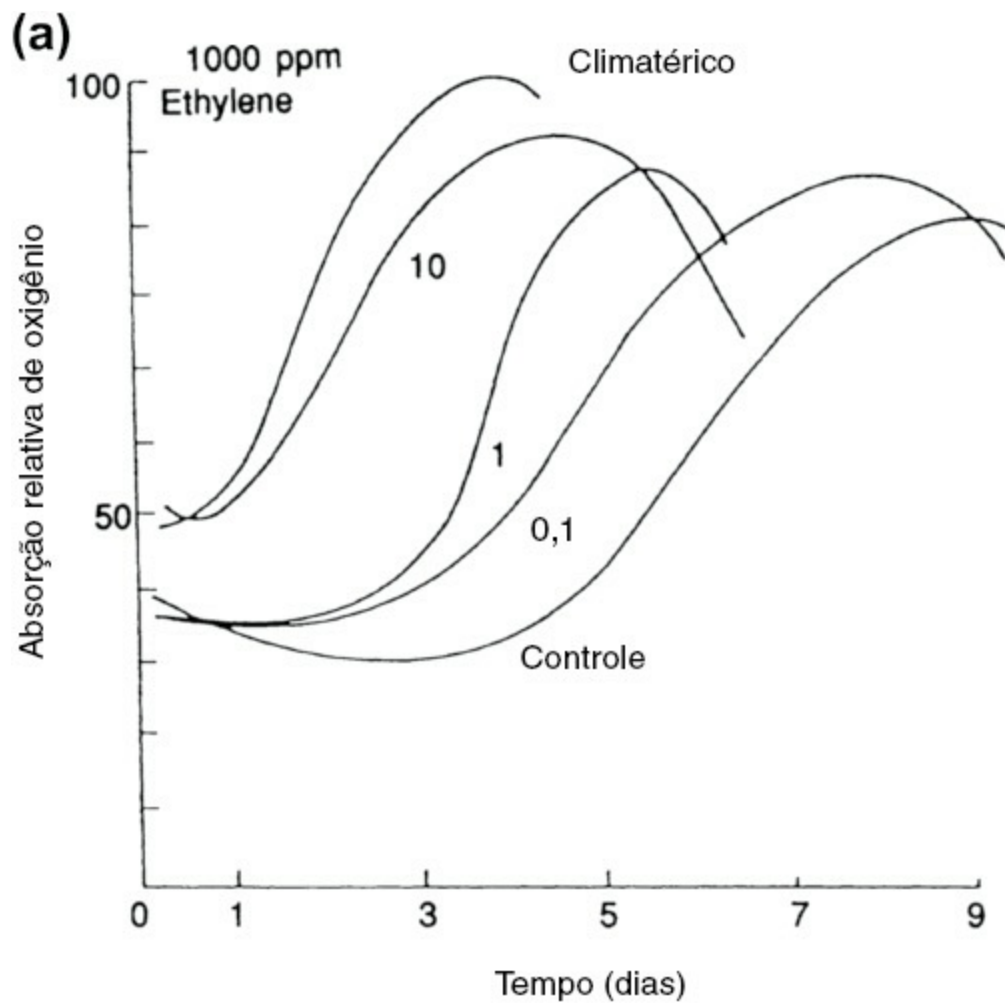


FIGURA 2.4 Absorção relativa de oxigênio por frutas climatéricas e não climatéricas, em relação a concentração de etileno. Biale (1964).

Estudos realizados por Vendrell e McGlasson (1971) em frutas como banana e figos pré-climatéricos (Zeroni *et al.*, 1976), revelaram no entanto que etileno exógeno exerceu uma regulação tipo inibição pelo produto final na produção de etileno. Essa autoinibição da produção de etileno também foi relatada em frutas não climatéricas, por exemplo, nos tecidos do flavedo danificados de cítricos (Riov e Yang, 1982a). Com base nessas informações, McMurchie *et al.* (1972) propuseram o conceito de sistema 1 e sistema 2 do etileno. O sistema 1 é responsável pela baixa taxa de produção de etileno em frutas pré-climatéricas e pela maioria, se não pelo total, do etileno produzido pelos tecidos de vegetais. O sistema 2 é responsável pela alta taxa de produção do etileno observada durante o climatérico e é induzido por autocatálise do etileno. A transição para o sistema 2 parece ser consequência da ativação transcricional dos genes de diferentes ACC (ACS) sintases e genes de ACC (ACO) oxidases (Esquema 2.2) (Barry *et al.*, 2000; Alexander e Grierson, 2002).

É evidente que o etileno possui um papel crucial e complexo na regulação da maturação de frutas climatéricas. O etileno afeta a expressão de várias enzimas específicas necessárias à maturação enquanto outros compostos, ainda não identificados, podem induzir esse processo em frutas não climatéricas. Parece, portanto, que as vias etileno-dependentes e etileno-independentes da maturação coexistem. O isolamento dos genes associados com o processo de maturação de frutas não climatéricas podem conduzir a uma maior elucidação da regulação da maturação das frutas (Aharoni *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011).

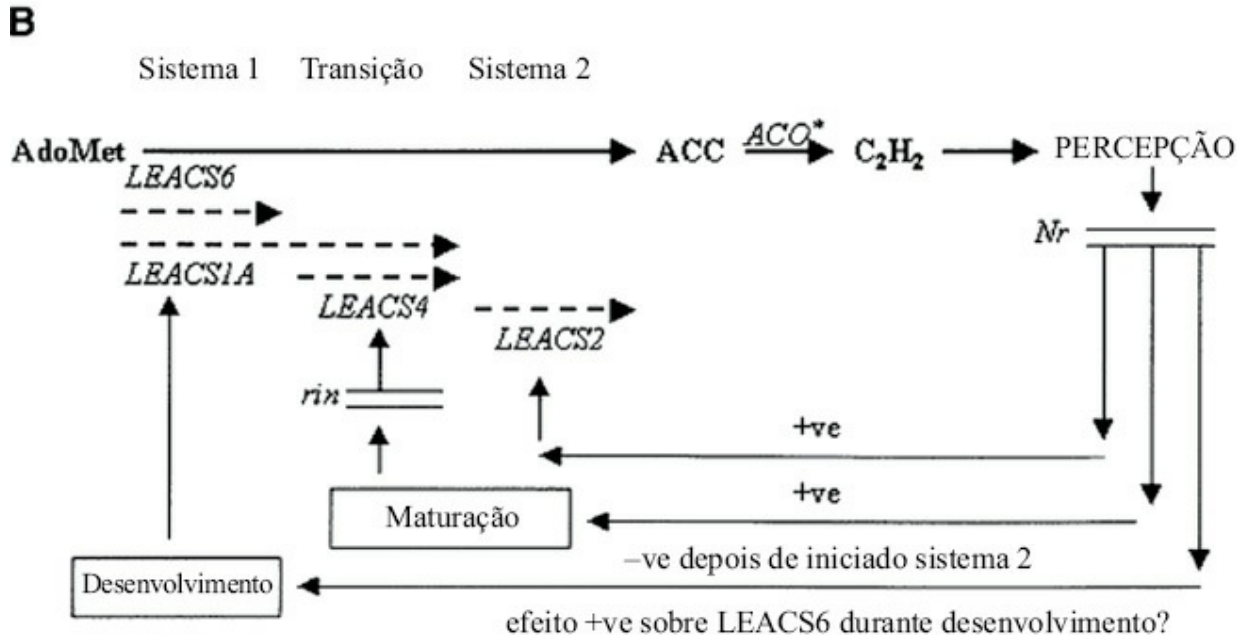
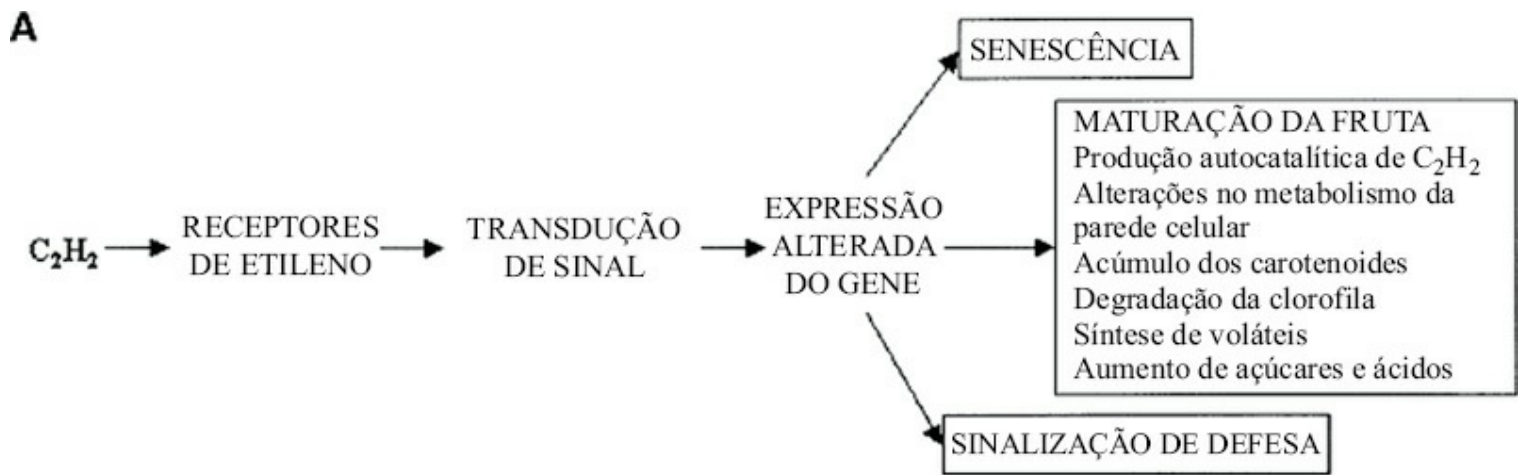
TABELA 2.2 Teor de etileno endógeno (ppm) em algumas frutas climatéricas e não climatéricas

Fruta	Variedade	Pré-climatérica	Início	Pico climatérico
Climatérica				
Abacate ^a	Fuerte	0,03	0,09	25
Banana ^b	Gros Michel	0,1	1,5	40
Manga ^b	Kent Haden	0,01	0,08	3
Pera ^c	Anjou	0,09	0,4	40
Não climatérica			Estado estabilizado	
Limão ^a			0,1–0,2	
Laranja ^a			0,1–0,2	
Lima ^a			0,3–2,0	

^a De Akamina e Goo (1979b)

^b De Burg e Burg (1962)

^c De Kosiyachinda e Young (1975)



* Principalmente *ACO1* durante maturação da fruta.

ESQUEMA 2.2 (A) Representação esquemática do papel do etileno no amadurecimento das frutas. (B) Modelo propondo a regulação diferencial do gene ACS durante a transição do sistema 1 para o sistema 2 da síntese do etileno. Os símbolos -ve (negativo) e +ve (positivo) referem-se à ação do etileno em sinalizar vias resultando em repressão (-ve) ou estimulação (+ve) da expressão do gene. Barry *et al.* (2000) e Alexander e Grierson (2002).

IV. BIOSÍNTESE DO ETILENO

Vários precursores do etileno foram propostos, mas é bem estabelecido que a metionina é o principal precursor em vegetais superiores (Kende, 1993; Alexander e Grierson, 2002).

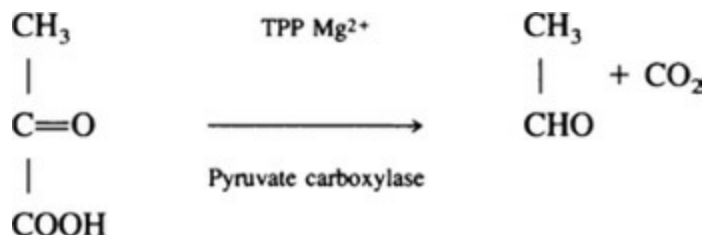
A. Metionina como um precursor do etileno

Lieberman e Mapson (1964) examinaram inicialmente a produção de hidrocarbonetos, incluindo o etano e o etileno, em sistemas-modelo contendo ácido linoleico peroxidado, Cu^{2+} , e ácido ascórbico. Para testar se a produção de etileno a partir do ácido linoleico envolve radicais livres, os pesquisadores adicionaram um sequestrante de radicais livres, a metionina. Em vez de a metionina inibir essa reação, eles descobriram que a produção de etileno foi grandemente aumentada. Pesquisas posteriores demonstraram que o etileno pode ser produzido na ausência de lipídeos peroxidados sempre que o ascorbato e metionina- Cu^{2+} estiverem presentes

(Lieberman *et al.*, 1965). Em pouco tempo, ficou estabelecido que a metionina é, de fato, o precursor biológico do etileno em plantas (Lieberman *et al.*, 1965; Yang, 1974). Empregando ^{14}C -metionina marcada, Lieberman *et al.* (1966), demonstraram sua conversão em etileno em tecidos de maçã. O fato de o C1 da metionina ter liberado dióxido de carbono e de C3 e C4 terem produzido etileno no sistema químico e no tecido da planta sugeriu que existe um mecanismo comum nos dois processos. Os dois sistemas são bem diferentes, mas a metionina foi convertida, em sistemas modelo, via metional com o grupo metil sulfeto liberando dimetil sulfeto volátil. Este processo difere em tecidos de plantas já que a metionina é limitante, de modo que o grupo de enxofre é reciclado para ressíntese da metionina.

1. O ciclo Yang, a reciclagem da metionina

A inibição da produção de etileno a partir da metionina na presença de DNP (um inibidor da fosforilação oxidativa) indica a formação de *S*-adenosil-*l*-metionina (SAM) como um intermediário nesse processo (Burg, 1973; Murr and Yang, 1975). Ao utilizar a metionina marcada com C14, Adams e Yang (1977) relataram que o grupo $\text{CH}_3\text{-S}$ da metionina foi liberado como 5-metiltioadenosina (MTA) durante a síntese do etileno em fatias de maçã. O MTA só é formado como produto da degradação se o etileno foi sintetizado a partir do SAM. Além do MTA, os pesquisadores detectaram a presença de 5-metiltioribose (MTR), produto da degradação do MTA no tecido de maçãs. Tal fato sugere que a unidade $\text{CH}_3\text{-S}$ do MTR combinada com um receptor de quatro-carbonos, como a homoserina, forma a metionina, enquanto se libera o grupo ribose. Mais tarde foi descoberto que a unidade de ribose do MTA/MTR é diretamente incorporada à metionina junto com o grupo $\text{CH}_3\text{-S}$. Yung e Yang (1980) demonstraram que três moléculas de MTR estão envolvidas na formação da metionina, com a fração da ribose modificada para formar o 2,3-aminobutirato da metionina e a unidade $\text{CH}_3\text{-S}$ permanece intacta:



Esta via explica como a metionina é reciclada e mantida nos tecidos das plantas. A via geral envolvida na ressíntese da metionina a partir do MTA é mostrada no Esquema 2.3. O fosfato MTR-1 é convertido em ácido 2-oxo-4-metiltiobutanoico, a partir do qual a metionina é formada novamente. Miyazaki e Yang (1987) examinaram as enzimas do ciclo metionina em várias frutas e demonstraram que a conversão do MTR em metionina em maçãs em maturação não é um fator limitante na formação do etileno. Este ciclo foi denominado ciclo de Yang em livros de bioquímica da fisiologia vegetal (Bradford, 2008).

2. Metionina e biossíntese do etileno

Estudos realizados por Hansen (1942) e Burg e Thimann (1959) demonstraram que a produção de etileno cessava quando maçãs e peras eram estocadas em atmosfera de nitrogênio. Uma nova exposição ao oxigênio, porém, restaurava a produção de etileno. A rápida produção de etileno sugere um acúmulo de um composto intermediário durante a estocagem anaeróbica. Adams e Yang (1979), utilizando metionina $[\text{U-}^{14}\text{C}]$, identificaram o ácido carboxílico 1-aminociclopropano-1 (ACC) como o fator intermediário que se forma na maçã estocada com nitrogênio. Ao que parece, a metionina é primeiro convertida em *S*-adenosilmetionina, que posteriormente, sofre fragmentação para ACC e MTA. Esses pesquisadores também descobriram que o ACC marcado com C14 foi convertido em etileno quando o tecido da maçã foi incubado em ar, o que sugere a seguinte sequência:

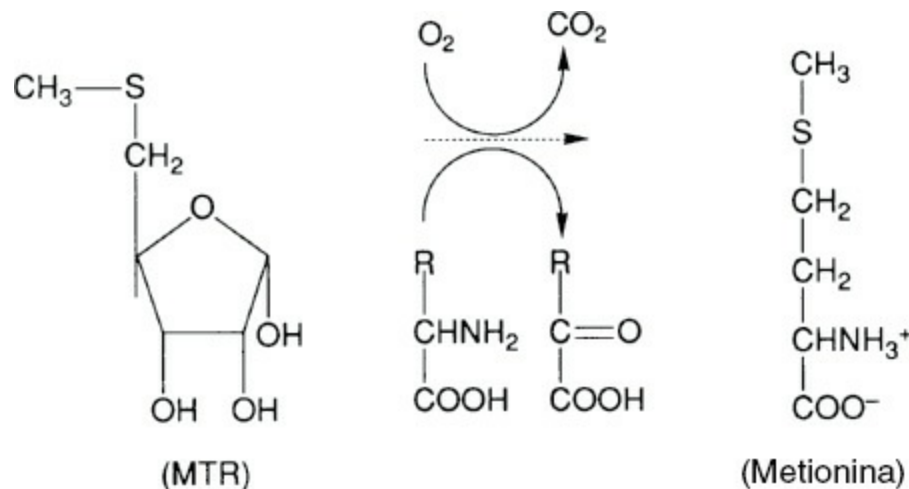
Metionina → SAM → ACC → Etileno

A conversão de metionina em SAM envolve a metionina adenosil transferase (ATP metionina S-adenosiltransferase, EC 2.5.1.6).

ESQUEMA 2.3 O ciclo Yang e a formação do etileno e outros produtos a partir do ACC. Bradford (2008).

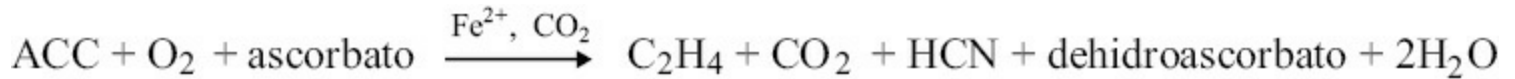
Essa enzima foi encontrada em tecidos de plantas por Konze e Kende (1979) sendo relacionada com a produção de etileno. A adição de aminoetoxilvinilglicina (AVG), um inibidor das reações enzimáticas dependentes de piridoxal fosfato (Rando, 1974), resultou em inibição da produção de etileno a partir da metionina. A parte da sequência de reação afetada foi de SAM para ACC, que envolve a participação do fosfato piridoxal (Adams e Yang, 1979). A enzima envolvida, a ACC sintase, foi encontrada em preparações com tomate e sua ativação através do fosfato piridoxal foi comprovada (Boller *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1979). A ACC sintase foi posteriormente identificada e analisada em maçãs (Bufler e Bangerth, 1983; Bufler, 1984), tomates (Acaster e Kende, 1983), melão cantalupo (Hoffman e Yang, 1980) e cascas de cítricos (Riov e Yang, 1982b).

Lurssen *et al.* (1979) demonstraram que a produção de etileno foi aumentada com a aplicação de ACC em órgãos de plantas. Esses pesquisadores consideraram a hipótese de que o ACC era derivado da metionina via SAM ou ACC. O sistema de enzimas envolvido na formação do etileno a partir do ACC parece estar associado a partículas celulares (Mattoo e Lieberman, 1977; Imaseki e Watanabe, 1978). Um rompimento das membranas das células por tratamento com compostos lipofílicos ou choque osmótico reduziu a produção de etileno nos tecidos vegetais (Odawara *et al.*, 1977; Imaseki e Watanabe, 1978). Este fenômeno particular de inibição foi identificado na formação de ACC para etileno (Apelbaum *et al.*, 1981). Um extrato enzimático capaz de converter ACC em etileno foi reportado em sementes de ervilhas por Konze e Kende (1979). Sistemas similares foram encontrados em sistemas microssomais de cravos (Mayak *et al.*, 1981) e em sistema microssomal de ervilhas (McRae *et al.*, 1982). A pesquisa à procura do sistema de enzimas que fosse responsável pela conversão de ACC em etileno foi totalmente descrita, afinal, por Kende (1993). Durante muito tempo considerou-se que o sistema de formação de etileno fosse associado às membranas e era descrito como dependente das enzimas formadoras de etileno (EFE). Yang e Hoffman (1984) sugeriram que o ACC poderia ser oxidado por uma enzima, a ACC hidroxilase, tornando-se *N*-hidroxi-ACC, que em seguida seria transformado em etileno e ácido cianofórmico. Esta última substância é extremamente lábil e se fragmenta de modo espontâneo em dióxido de carbono e cianeto de hidrogênio (HCN). Esta teoria foi reforçada por estudos de Peiser *et al.* (1983), que relataram a incorporação de [1-¹⁴C] ACC em [4-¹⁴C] asparagina em hipocótilos de feijão-mungo em níveis similares aos da produção de etileno. Estas descobertas, associadas aos estudos de Miller e Conn (1980), que demonstraram a incorporação de Na-CN na asparagina em feijão-mungo, sugerem a seguinte via:



A identificação do complexo EFE foi finalmente realizada com base na clonagem molecular de tomates (Slater *et al.*, 1983). O primeiro gene ACO foi descoberto através da expressão de um clone, pTOM13 (Holdsworth *et al.*, 1987). O papel dessa enzima na síntese do etileno foi em seguida confirmado pela expressão de pTOM13 em levedura e em oócitos de *Xenopus* (Hamilton *et al.*, 1990; Spanu *et al.*, 1991). Outros genes ACO foram identificados em tomates e outras frutas climatéricas como maçãs, abacates, bananas e melões (Holdsworth *et al.*,

1988; Barry *et al.*, 1996; Blume e Grierson, 1997; Nakatsuka *et al.*, 1998; Jiang e Fu, 2000; Llop-Tous *et al.*, 2000). Ververidis e John (1991) extraíram atividade de EFE de melão com gás N₂ e adição de Fe²⁺ e de ascorbato. Estas condições permitiram a recuperação da atividade do EFE e após fracionamento por centrifugação, a enzima foi recuperada na fração solúvel. Ververidis e John (1991) propuseram que EFE fosse conhecido como ACO oxidase (ACO) uma vez que parece estar relacionado com 2-oxoglutarato-dioxigenase que requer Fe²⁺ e ascorbato para atividade *in vitro*. A ACO tem sido extraída da maçã (Dong *et al.*, 1992; Fernandes-Maculet e Yang, 1992; Kuai e Dille, 1992) e do abacate (McGarvey e Christoffersen, 1992). Dong *et al.* (1992) afirmaram que a atividade de ACO foi aumentada *in vivo* na presença por dióxido de carbono e *in vitro* é totalmente dependente da presença de dióxido de carbono. Além do mais, observaram que o ACO possui uma necessidade absoluta de Fe²⁺ e de ascorbato, mas não de 2-oxoglutarato. Com base nestas observações eles postularam a estequiometria seguinte para a conversão de ACC em etileno:



O papel do íon Fe(II) é o de unir o ACC ao O₂ simultaneamente e assim promover a transferência de elétrons, o que inicia a catálise do ACC em etileno (Pirrung, 1999; Rocklin *et al.*, 1999).

B. Regulação do etileno no amadurecimento das frutas

1. ACC sintase e ACC oxidase

O aumento climatérico nas frutas é associado com o aumento da produção de etileno no início do processo de maturação. Uma regulação pelo produto final positiva da biossíntese do etileno é um aspecto característico das frutas em maturação. A exposição ao etileno exógeno desencadeia um grande aumento na produção de etileno graças à indução de duas enzimas-chave, a ACS e a ACO (Chang e Bleecker, 2004; Génard e Gouble, 2005; Li *et al.*, 2011). As alterações dos teores intracelulares de ACC foram examinadas por Hoffman e Yang (1980) durante a maturação de abacates assim como o efeito do ACC exógeno na síntese do etileno em frutas pré-climatéricas. Os resultados, observados na Figura 2.5 mostram que o ACC estava presente em níveis muito baixos na fruta pré-climatérica (< 0,1 nmol/g), mas aumentaram muito no início da aplicação de etileno, diminuindo de 5 nmol/g em frutas demasiado maduras. O baixo nível de ACC nas frutas pré-climatéricas foi atribuído à inabilidade de conversão de SAM a ACC. A adição de ACC exógeno aos tecidos préclimatéricos aumentou a produção de etileno, porém em teor limitado (Adams e Yang, 1977; 1979). A formação de ACC a partir de SAM, portanto, parece ser o processo controlador da biossíntese do etileno (Yang, 1980). Este fato também foi confirmado por Liu *et al.* (1985), que estudaram o efeito do tratamento do etileno na produção de etileno em frutas climatéricas como o tomate e o melão cantalupo. Seus estudos demonstraram que quando expostas a etileno exógeno a atividade estimulada da enzima formadora do etileno (ACO) é estimulada e precede todos os aumentos na sintase de ACC em frutas pré-climatéricas. Uma análise dos padrões da expressão ACOmRNA em tecidos diferentes em vários estágios de desenvolvimento, confirmaram o papel de controle do ACO na produção de etileno durante a maturação (Holdsworth *et al.*, 1987; Hamilton *et al.*, 1990; Balague *et al.*, 1993; Barry *et al.*, 1996; Alexander e Grierson, 2002).

Muitos tipos de estresses diferentes como fermentos, hipoxia, resfriamento, congelamento ou seca podem induzir à biossíntese do etileno por causa do aumento da atividade da ACC sintase (Wang *et al.*, 2002). Morin *et al.* (1985) descobriram que a estocagem refrigerada de peras “passe-crassane” é necessária para dar início à maturação por etileno e induzir à síntese do ACC livre ou conjugada. Durante a estocagem refrigerada (0°C) tanto a ACC livre como a conjugada aumentaram, junto com os ribossomos e o mRNA. Quando as peras foram

transferidas a uma atmosfera de 15°C, ocorreu um aumento significativo da concentração de etileno, seguido pela fase do climatérico (Hartmann *et al.*, 1987).

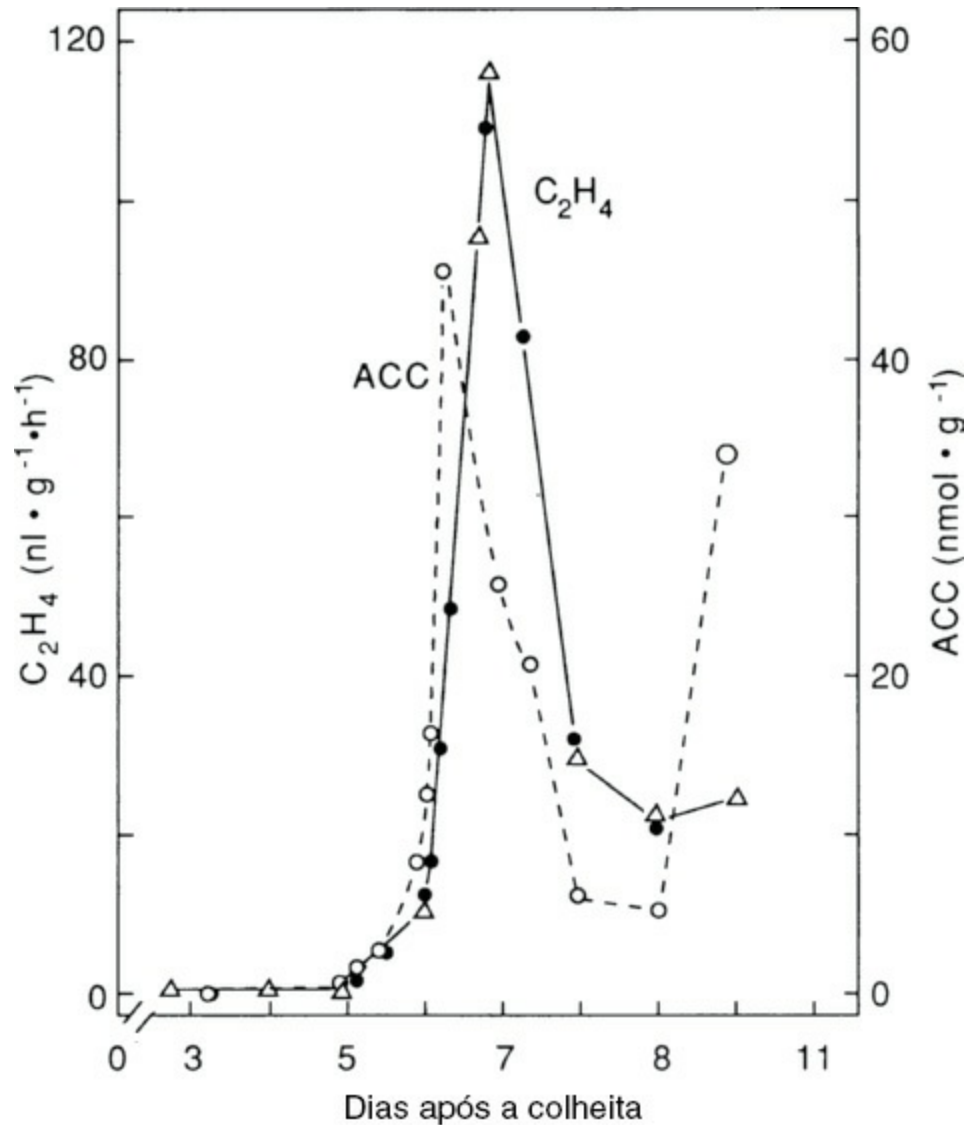


FIGURA 2.5 Alterações no conteúdo de ACC no abacate em vários estados de maturação. Cada valor de ACC vem de uma única fruta cuja produção de etileno foi monitorada e à qual foi atribuído um estágio aleatório de maturação em comparação com os padrões climatéricos estabelecidos de produção de etileno. Hoffman e Yang (1980).

2. Cianeto

A produção de cianeto na biossíntese do etileno a partir de ACC foi demonstrada nos estudos de Peiser *et al.* (1984) e Pirrung (1985). Pirrung e Brauman (1987) sugeriram que o cianeto pode regular a formação de etileno durante o período climatérico. Propuseram que na biossíntese do etileno as vias do citocromo e da cadeia respiratória cianeto-resistentes se conectam via citocromo *c* oxidase. A inibição da citocromo *c* oxidase pelo cianeto durante a biossíntese do etileno favorece a via alternativa, o que, por sua vez, conduz à síntese do ACC. A expressão gênica da ACC sintase como consequência da via respiratória alternativa pode explicar as diferenças entre frutas climatéricas e não climatéricas. Há, no entanto, evidências de que os tecidos vegetais possuem ampla capacidade de detoxificar o HCN que é produzido durante a biossíntese do etileno e que a concentração de HCN é mantida em teor muito baixo nas células (Yip e Yang, 1988). A enzima-chave para a desintoxicação de HCN é a β -cianoalanina sintase (EC 4.4.1.9). A β -cianoalanina é metabolizada em seguida transformando-se em asparagina ou γ -glutamil- β -cianoalanina.

3. Ácidos orgânicos

De Pooter *et al.* (1982) observaram um aumento na produção de dióxido de carbono e maturação precoce em maçãs intactas “Golden Delicious” tratadas com ácidos propiônico e butírico. Esta alteração foi idêntica à ocorrida com maçãs tratadas com etileno, o que sugere que estes ácidos possuem uma função na produção de etileno. Parece viável que o etileno possa ser produzido por estes ácidos carboxílicos de acordo com o sistema 1, que posteriormente desencadeia a produção de etileno normal através do sistema 2. Trabalho posterior destes pesquisadores (De Pooter *et al.*, 1984) confirmaram a maturação prematura de maçãs “Golden Delicious” intactas quando tratadas com vapores de ácidos acéticos ou propiônicos. Uma pequena porção do ácido propiônico [^{14}C] marcado foi transformada em [^{14}C]etileno, que atuou como desencadeador da maturação (sistema 2). O grau de maturidade da fruta era considerado um fator importante, o que sugeria que nas maçãs não maturadas a pequena quantidade de etileno produzida era provavelmente derivada dos ácidos orgânicos simples. A concentração na qual o etileno desencadeia a maturação depende da disponibilidade de ácidos orgânicos simples. A capacidade do dióxido de carbono de retardar o início da maturação das frutas foi demonstrada por Bufler (1984) ser decorrente, em parte, da inibição do desenvolvimento da ACC sintase (Figura 2.6).

4. Peroxidação lipídica: lipoxigenase

A produção de etileno tem sido correlacionada com as mudanças nos teores de hidroperóxido, da atividade de peroxidase, assim como dos aumentos na atividade da lipoxigenase na maturação das frutas (Meigh *et al.*, 1967; Frenkel e Eskin, 1977; Frenkel, 1979; Marcelle, 1991; Sheng *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008). Estudos de Adams e Yang (1979) e de Konze *et al.* (1980) sugerem a peroxidação como um mecanismo para a formação de etileno a partir de ACC; contudo, o envolvimento da peroxidação não foi confirmado por pesquisadores posteriores (Machackova e Zmrhal, 1981; Rohwer e Mader, 1981). A conversão enzimática de ACC em etileno em um sistema de células livres mostrou ser sensível à catalase e pode ser inibida pelo peróxido de hidrogênio (Konze e Kende, 1979; McRae *et al.*, 1982). O efeito dos hidroperóxidos na conversão enzimática de ACC em etileno foi pesquisado por Legge e Thompson (1983) utilizando um sistema modelo composto de membranas microssomais de ervilhas descoloridas por falta de luz. A adição de hidroperóxidos estimulou a produção de etileno em sistemas modelo contendo ACC, como pode ser visto na Figura 2.7. O peróxido de hidrogênio, um inibidor conhecido da lipoxigenase, inibiu a formação de etileno. A lipoxigenase forma hidroperóxidos lipídicos a partir de ácido linoleico (Eskin *et al.*, 1977). Um aumento de 1,5 vez na produção de etileno ocorreu depois da adição de ácido linoleico aos sistemas modelo que continham a enzima. Parece ocorrer uma interação entre a atividade de lipoxigenase, o derivado do hidroperóxido e as enzimas formadoras do etileno (ACO). McRae *et al.* (1982) demonstraram com base em dados fornecidos pela técnica de captura de elétrons (*spin-trapping*) que o oxigênio está envolvido na formação do etileno a partir de ACC pelas membranas microssomais de ervilhas. Uma vez que os hidroperóxidos facilitam a ativação do oxigênio, a promoção de oxigênio por meio desse mecanismo pode conduzir à formação de etileno. Legge *et al.* (1982) detectaram a formação de radicais-livres utilizando a técnica de captura de elétrons 4-MePyBN que requer ACC, oxigênio e hidroperóxidos. Os resultados sugerem que os radicais-livres derivam do ACC do sistema microssomal que produz etileno. A conversão de ACC em etileno por membranas microssomais de ervilhas é mediada por um radical livre intermediário que requer hidroperóxidos e oxigênio. O aumento na formação de radicais livres foi atribuído por Kacperska e Kubacka-Zabalska (1984) à oxidação mediada pela lipoxigenase dos ácidos graxos poli-insaturados. Este fato foi confirmado por estudos feitos por Kacperska e Kubacka-Zabalska (1985) *in vitro* e *in vivo*. Constatou-se um aumento no etileno derivado de ACC em discos de folhas que caíram do caule no inverno resultantes da atividade de lipoxigenase. Observações similares foram relatadas por Bousquet e Thimann (1984) utilizando pedaços de folhas de aveia. Estudos mais recentes que estabelecem relações entre a atividade de lipoxigenase (LOX) e a biossíntese do etileno foram observadas em kiwi

(Xu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), tomate (Sheng *et al.*, 2000) e em cultivares de peras orientais (Xu *et al.*, 2008). No entanto, a atividade LOX pode estar presente na biossíntese do etileno assim como em vários aspectos da maturação das frutas que afetam o desenvolvimento do gosto e do aroma e resposta a temperaturas baixas.

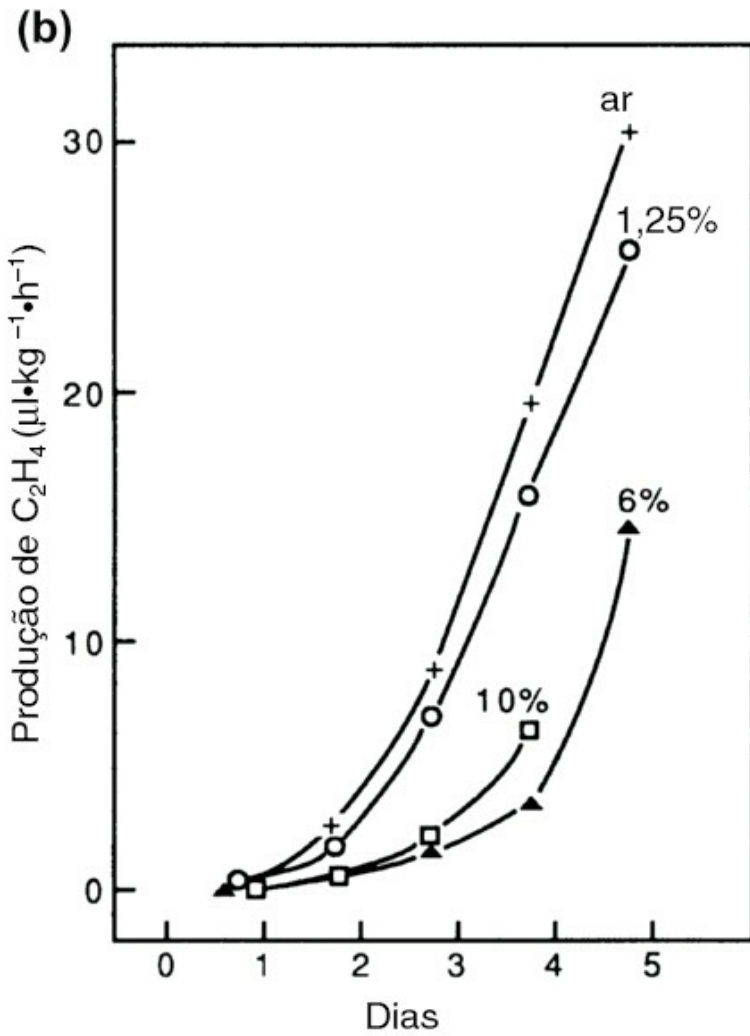
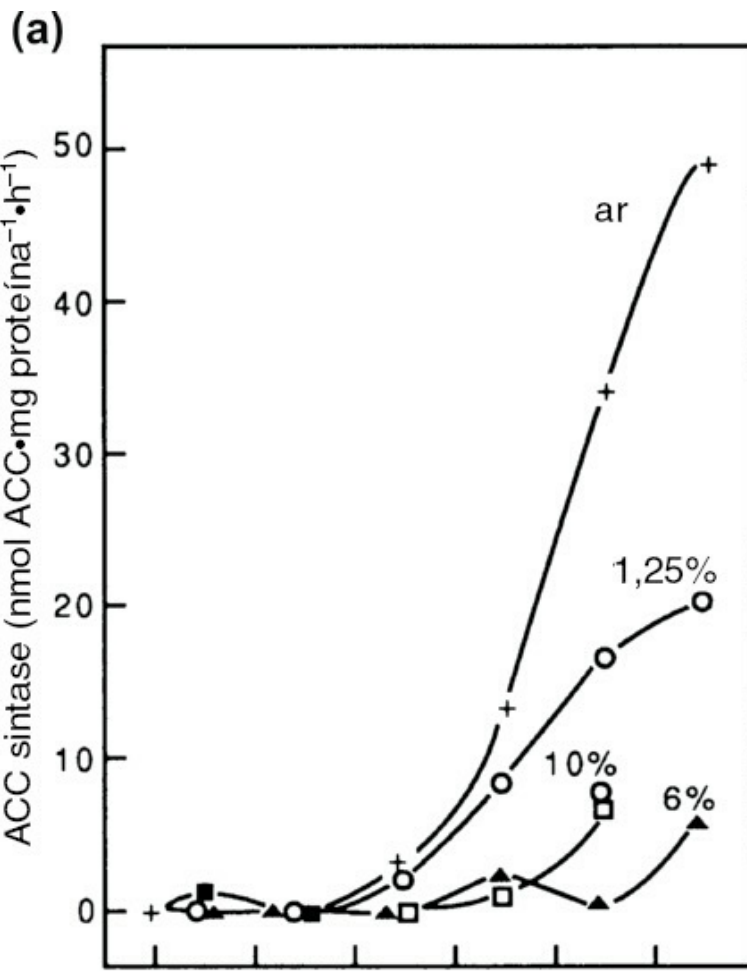


FIGURA 2.6 Efeito de diferentes concentrações de CO₂ na indução e no desenvolvimento da atividade de ACC sintase (a) e produção de etileno (b) em maçãs pré-climatéricas tratadas (Bufler, 1984). As maçãs foram transferidas da estocagem hiperbárica para a pressão normal e 25 °C e imediatamente tratadas com ar (+), 1.25% (O), 6% (

) ou 10% (□) CO₂ (Bufler, 1984). Reimpressão autorizada pelo proprietário dos direitos autorais, American Society of Plant Physiology (ASPP).

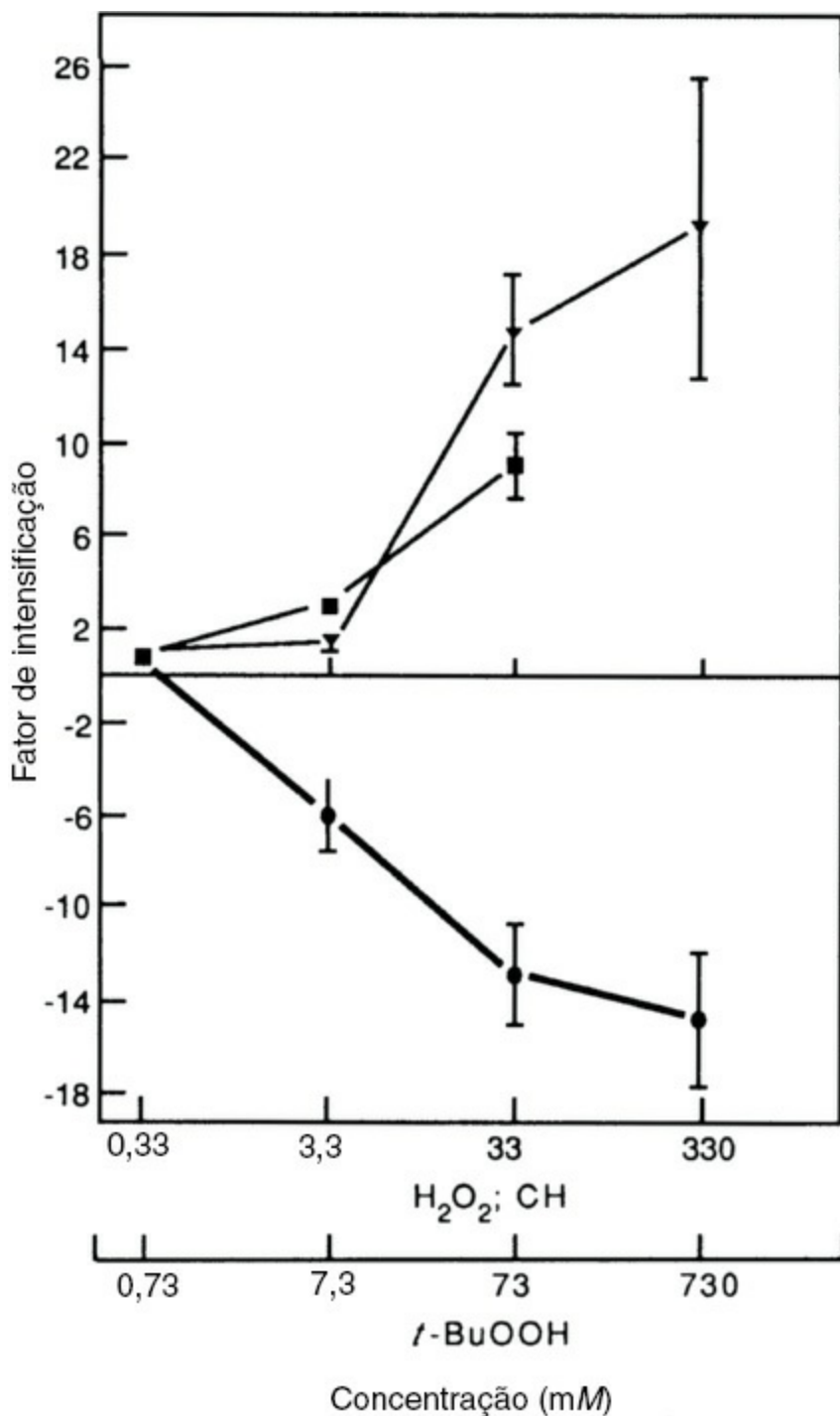


FIGURA 2.7 Efeitos do peróxido de hidrogênio (●), *t*-butil-hidroperóxido (

) e cumeno hidroperóxido (■) na conversão de ACC para etileno por membranas microsossomais de ervilhas. As concentrações finais de hidroperóxido adicionadas à mistura da reação básica estão indicadas ao longo da abscissa. O fator de aumento é a proporção do etileno produzido na presença do hidroperóxido adicionado em relação ao que foi produzido na ausência deste. Valores representam a média ± SE (*n* = 3) (Legge e Thompson, 1983). Reimpressão autorizada. Copyright ©: Pergamon Press.

Pesquisas de Gross (1985) e, mais tarde, de Kim *et al.* (1987) mostraram que a produção de etileno é estimulada pela galactose durante a maturação do tomate. A galactose é um produto da síntese de galactanas da parede celular e da alta atividade da β -galactosidase que libera resíduos galactosil da parede da célula (Lackey *et al.*, 1980; Pressey, 1983). O estímulo da atividade de ACC sintase por galactose exógena ao tecido do pericarpo de tomates verdes sugere que existe uma relação entre a modificação contínua da parede celular e a biossíntese do etileno em frutas do tomate em maturação (Kim *et al.*, 1987, 1991). Outras análises confirmaram que os fragmentos de parede de célula estimulam ou induzem a produção de etileno (Tong *et al.*, 1986; Brecht e Huber, 1988). Estudos posteriores indicaram que há relações entre oligogalacturonídeos de cadeia curta e a indução e expressão de um gene codificador de ACO em plantas de tomate e o modo de regulação dos fatores de transcrição (Simpson *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2011). De modo similar, as relações entre a expressão do gene PG e o amolecimento além da produção de etileno também foram relatadas na fruta de kiwi (Wang *et al.*, 2000).

V. ALTERAÇÕES DA COR

Uma das primeiras alterações observadas durante a maturação de muitas frutas é a perda da cor verde. Essa perda é seguida pelo desenvolvimento de cores avermelhadas em algumas frutas e vegetais em consequência da formação das antocianinas. As mudanças nas cores de algumas frutas podem ser consultadas na Tabela 2.3. Estas mudanças ocorrem imediatamente depois do aumento climatérico da respiração e são acompanhadas por alterações na textura da fruta. No caso de vegetais folhosos como o repolho, alface, couve de Bruxelas, a perda de clorofila também é responsável pelo amarelamento durante a senescência (Lipton, 1987; Lipton e Ryder, 1989).

TABELA 2.3 Alterações na cor de algumas frutas durante a maturação

Fruta	Estágio de maturação	
	Imatura	Madura
Maçã	Verde	Amarela/vermelha*
Banana	Verde	Amarela
Pera	Verde	Amarela
Morango	Verde	Vermelha

*Dependendo da variedade

A. Alterações na clorofila durante a maturação

Tem sido atribuída ao etileno a promoção da degradação da clorofila durante a maturação da fruta (Burg e Burg, 1965). Hardy *et al.* (1971) observaram estímulo da biossíntese da clorofila por etileno e luz em cotilédones extraídos de sementes de pepinos (*Cucumis sativus*). Pesquisa posterior realizada por Alscher e Castelfranco (1972) demonstrou que o estímulo para a síntese da clorofila ocorre somente no escuro uma vez que a exposição à luz inibiu a síntese da clorofila. Poucas referências são encontradas a respeito do estímulo da síntese da clorofila por etileno, apesar de o pepino ter fornecido um excelente sistema para o estudo da produção da clorofila durante a década de 1980 (Pardo *et al.*, 1980; Chereskin *et al.*, 1982; Fuesler *et al.*, 1982; Hanamoto e Castelfranco, 1983). Em contraste ao estímulo da biossíntese da clorofila pelo etileno que ocorre no escuro, a biossíntese de antocianina em repolho roxo só é estimulada pelo etileno quando exposta à luz.

B. Biossíntese da clorofila

As clorofilas, os principais tetrapirróis encontrados em vegetais, são essenciais para a vida humana e animal pelo

seu papel na fotossíntese. A biossíntese da clorofila é um processo altamente coordenado e envolve um grande número de enzimas (Beale, 1999). A aplicação de técnicas genéticas moleculares possibilitou a identificação e caracterização dos genes codificadores destas enzimas (Beale, 2005) (Tabela 2.4). A biossíntese da clorofila parece ocorrer em três fases distintas (Tanaka e Tanaka, 2006). A primeira fase é a biossíntese da clorofila *a* a partir do glutamato (Vavilin e Vermass, 2002; Willows, 2003; Eckhardt e Grimm, 2004; Grossman *et al.*, 2004). A segunda fase, também conhecida como ciclo da clorofila, envolve a interconversão da clorofila *a* para a clorofila *b* (Ruediger, 2002). A terceira fase final do metabolismo da clorofila diz respeito à degradação da clorofila *a* (Pinta *et al.*, 2000; Eckhardt e Grimm, 2004).

1. Fase 1: Do glutamato à clorofila

Shemin e Russell (1953) demonstraram pela primeira vez o papel do ácido δ -aminolevulínico (ALA) na biossíntese do núcleo tetrapirrólico da clorofila. A biossíntese da ALA envolve duas vias independentes (von Wettstein *et al.*, 1995). Uma das vias, utilizada por animais (para o grupo heme), leveduras e várias bactérias, envolve a condensação do succinil-CoA e da glicina pela enzima ácido 5-aminolevulínica sintase (EC 2.3.1.37) que contém piridoxal-P (Gibson *et al.*, 1958; Kikuchi *et al.*, 1958). A segunda via característica em vegetais superiores e em algas, conhecida como via dos C_5 , é uma via de três passos na qual o glutamato é convertido em seguida em 5-aminolevulinato. Utilizando o glutamato marcado ^{14}C demonstrou-se que o esqueleto de cinco carbonos foi incorporado diretamente ao 5-aminolevulinato (Beale *et al.*, 1975; Meller *et al.*, 1975; Porra, 1986). A conversão para ALA requer a ativação do glutamato no α -carbonil através de ligação a tRNA^{Glu} (Kannangara *et al.*, 1984). A formação de ALA, o primeiro passo na biossíntese da clorofila, foi interpretada como sendo o regulador da quantidade total de tetrapirróis formados (Beale, 1999). Pesquisas subsequentes sugeriram que a síntese do ALA é regulada pelo produto final heme e inibida, no escuro, pela FU, uma proteína reguladora (Meskauskiene *et al.*, 2001; Goslings *et al.*, 2004). As reações iniciais responsáveis pela síntese do ALA em vegetais superiores podem ser observadas no Esquema 2.4.

TABELA 2.4 Genes codificadores das enzimas no processo de biossíntese da clorofila em angiospermas (Beale, 2005)

Fase ^a	Nome da enzima	Nome do gene ^b
1	Glutamil-tRNA redutase	HEMA1
		HEMA2
		HEMA3
2	Glutamato 1-semialdeído aminotransferase (glutamato 1 semialdeído aminomutase)	GSA1 (HEM1)
		GSA2 (HEM2)
3	Porfobilinogênio sintase (5-aminolevulinato desidratase)	HEMB1
		HEMB2
4	Hidroximetilbilano sintase (porfobilinogênio desaminase)	HEMC
5	Uroporfirinogênio III sintase (Uroporfirinogênio III co-sintase)	HEMD
6	(Uroporfirinogênio descarboxilase)	HEME1
		HEME2
7	Descarboxilase oxidativa do coproporfirinogênio	HEMF1
		HEMF2
8	Protoporfirinogênio oxidase	HEMG1
		HEMG2
9	Subunidade D de Mg quelatase	CHLD
	Subunidade H de Mg quelatase	CHLH
	Subunidade I de Mg quelatase	CHLI1
		CHLI2
10	Mg-protoporfirinogênio IX metiltransferase	CHLM

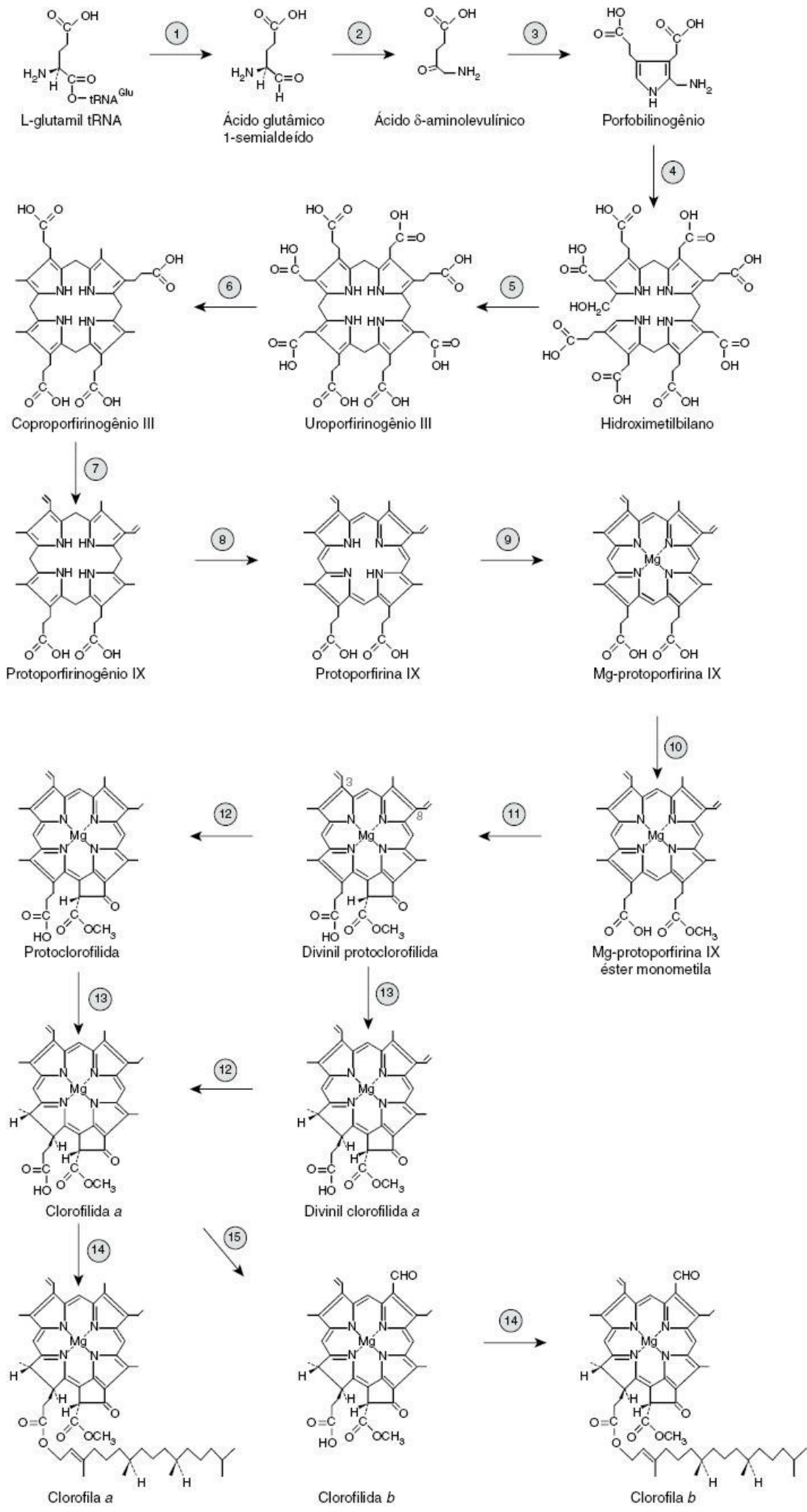
11	Mg-protoporfirinogênio IX monometilester ciclase	CRD1 (ACSF)
12	Divinil redutase	DVR PORA
13	NADPH: protoclorofilida oxidorreductase	PORB PORC
14	Clorofila sintase	CHLG
15	Clorofilida α oxigenase	CAO (CHL)

^a Os números das fases correspondem aos do Esquema 2.4.

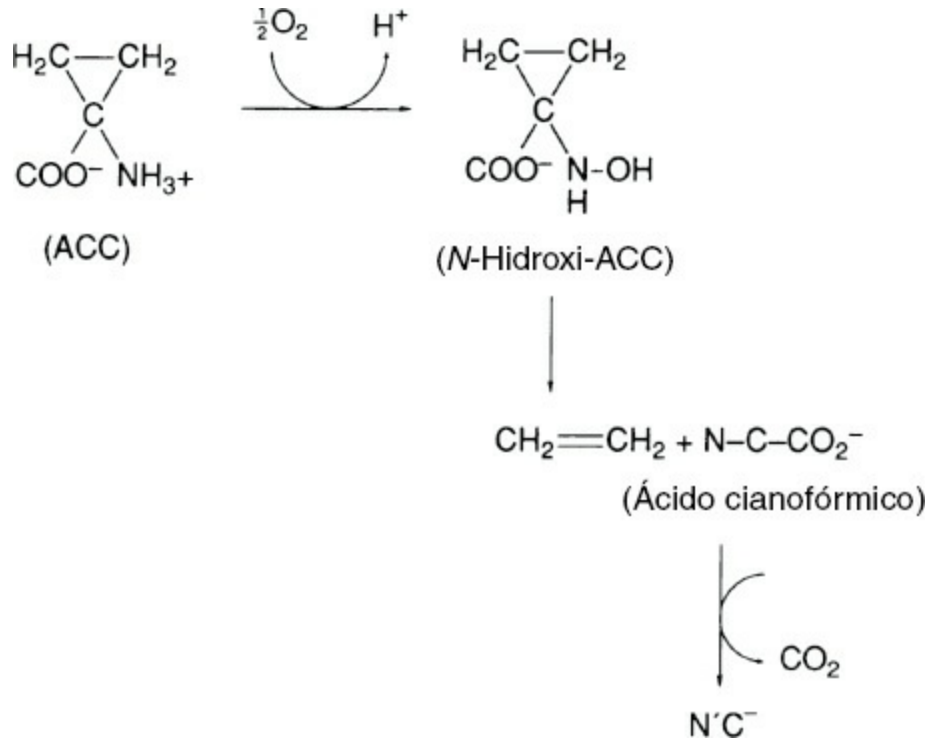
^b Os nomes dos genes são aqueles para *Arabidopsis thaliana*. Nomes alternativos para as enzimas e os genes estão indicados entre parênteses. Múltiplos genes para uma dada enzima estão indicados por sufixos numéricos, menos para genes POR (fase 13), para os quais foram usados sufixos de letras.

A ativação do glutamato para glutamil tRNA pela glutamil-tRNA sintase (EC 6.1.1.17) envolve a ligação do tRNA^{Glu}, um processo normalmente associado com a síntese de plastídios. O grupo carboxil ativado do glutamil tRNA é então reduzido a um grupo formil pela glutamil-tRNA redutase (GluTR), resultando na formação do glutamato-1-semialdeído (GSA). Esse processo é seguido pelas reações de troca intermoleculares de grupos amino nas quais o GSA é convertido em ALA (Tanaka e Tanaka, 2007). O glutamato 1-semialdeído aminotransferase (EC 5.4.3.8) catalisa a reação com o piridoxal-P ou piridoxamina-P como cofator. O mecanismo parece envolver a catálise de duas reações de transformação sucessivas (Mau e Wang, 1988; Mayer *et al.*, 1993). Um intermediário diamínico, o ácido 4,5-diaminovalérico, é transformado primeiro em um grupo amino a partir da piridoxamina-P para GSA, formando o piridoxal-P.

Na segunda reação, o grupo amino é transferido de volta para o piridoxal-P, regenerando a piridoxamina-P e formando a ALA. Isto é comprovado por estudos cinéticos baseados em medidas espectrofotométricas (Smith *et al.*, 1998). Depois de a ALA ser formada, duas moléculas condensam-se para formar porfobilinogênio (PBG), catalisado pela desidratase ALA [5-aminolevulinato hidrolase (ALAD), EC 4.2.1.24] (Dresel e Falk, 1953; Schmid e Shemin, 1955). É durante essa etapa que o composto alifático é convertido em aromático.

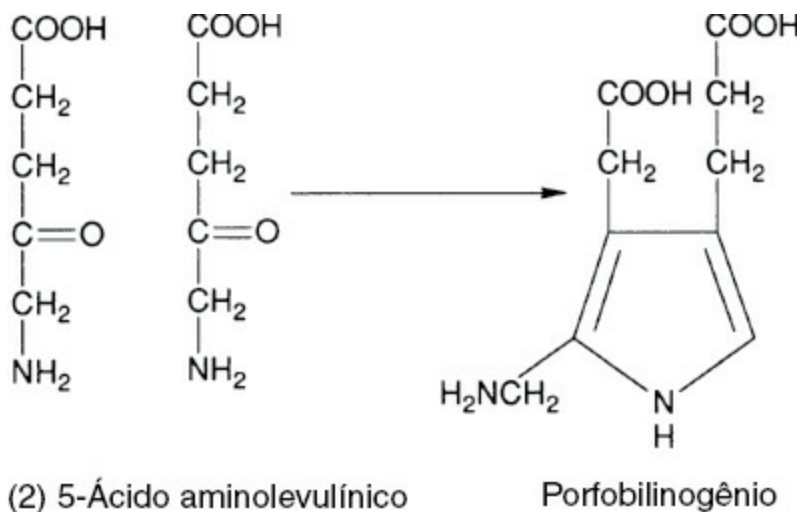


ESQUEMA 2.4 Biossíntese da clorofila em vegetais superiores. As setas numeradas referem-se às enzimas listadas na Tabela 2.4. As reações 12 e 13 podem ocorrer em qualquer uma das ordens, dependendo da viabilidade dos substratos. A reação 14 pode utilizar qualquer dos substratos indicados. Os números de posição dos dois grupos vinil estão indicados por 3,8-divinil protoclorofilida. Beale (2005).



O ALAD foi estudado exaustivamente em tecidos animais e em bactérias fotossintéticas além de algumas plantas que incluem, por exemplo, o trigo (Nandi e Waygood, 1967), cultura de tecidos de soja (Tigier *et al.*, 1968, 1970), feijão (Prasad e Prasad, 1987) e espinafre (Liedgens *et al.*, 1983). Resíduos do ALAD são encontrados nos cloroplastos, onde aparecem na forma solúvel no estroma do plastídio ou unidos fracamente nas lamelas.

O primeiro tetrapirrólico intermediário, um precursor linear da hidroximetilbilano porfirina foi identificado por Battersby *et al.* (1979) e Jordan e Seehra (1979). Isto resulta da condensação da cabeça e cauda de quatro moléculas de PBG catalisadas por PBG desaminase. Esta molécula linear é ciclizada enzimaticamente pela uroporfirinogeno III sintase para formar o primeiro ciclo de tetrapirrol, o uroporfirinogeno III.



Os passos que conduzem à formação da protoporfirina IX, mostrados no Esquema 2.5, serão discutidos brevemente uma vez que uma exposição detalhada pode ser encontrada em artigos excelentes (Avisar e Moberg, 1995; Jaffe, 2003; 2004; Shoolingin-Jordan, 2003; Beale, 2005). O uroporfirinogênio III é convertido em coproporfirinogênio III por uroporfirinogênio III descarboxilase, que descarboxila os grupos de ácidos acéticos nos anéis de pirrol A, B, C e D (Jackson *et al.*, 1976). Este passo é seguido por descarboxilação oxidativa dos

A Mg-protoporfirina-Me éster é convertida, em seguida, pela Mg-protoporfirina IX monometil ciclase (MgCy) a 3,8-divinil protoclorofilida incorporando um átomo de oxigênio. A protoclorofilida oxidoredutase (POR) reduz, em seguida, o anel D de 3,8-divinil protoclorofilida a 3,8-divinil clorofilida. O substituinte 8-vinil na cadeia lateral do anel B de pirrólico é então reduzido pela divinil clorofilida redutase (DVR) a 3-vinil clorofilida *a* (monovinil clorofilida *a*). DVR também pode reduzir 3,8-divinil protoclorofilida, mas a eficiência desse substrato foi descrita por Tanaka e Tanaka (2007) como substancialmente mais baixa do que a 3,8-divinil clorofilida. Com base neste dado, eles revisaram os passos da reação convencional ao colocar a reação DVR após a reação com POR. O último passo foi a biossíntese da clorofila *a* a partir de 3-vinil clorofilida. A clorofila sintase esterifica o substituinte 17-propionato no anel D de monovinil clorofilida *a* com geranyl geraniol, que é reduzido para fitol.

2. Fase 2: Ciclo da clorofila

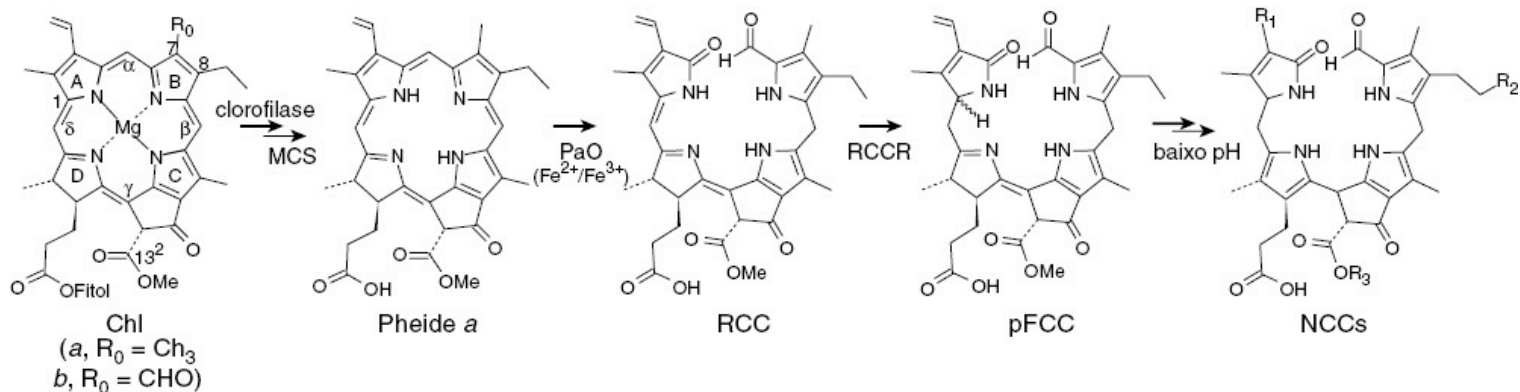
Nesta fase, uma porção da reserva de clorofila *a* é convertida em clorofila *b* (Esquema 2.5). Este é um processo de duas etapas catalisadas por um único polipeptídeo. A enzima envolvida nesta etapa, do tipo Rieske monoxigenase, clorofilida oxigenase *a* (CAO) foi caracterizada pela primeira vez por Tanaka e seus colaboradores (Tanaka *et al.*, 1998; Espineda *et al.*, 1999). Clonagem e expressão funcional do gene CAO demonstraram subsequentemente que o CAO catalisou duas etapas de oxigenação nos quais a clorofilida *a* foi convertida em clorofilida *b* (Oster *et al.*, 2000). A primeira etapa da oxigenação por CAO produziu o intermediário 7-hidroximetilclorofila *a*, que foi em seguida oxigenado para clorofilida *b*. Esta última substância é em seguida fitilada por clorofila sintase para clorofila *b*. Uma revisão recente de Tanaka e Tanaka (2011) inclui um texto sobre como as plantas usam o ciclo da clorofila para regular a síntese e destruição de um subconjunto de complexos coletores de luz.

C. Regulação da biossíntese da clorofila

Entre as três fases envolvidas na síntese de ALA, a redução de glutamyl-tRNA parece ser aquela que limita a biossíntese de clorofila (Tanaka e Tanaka, 2007). Recentes evidências sugerem que a atividade de glutamyl tRNA reductase (GluTR) é regulada por um mecanismo de inibição pelo produto final (Meskauskiene *et al.*, 2001). Um segundo regulador negativo da biossíntese de tetrapirrol foi descoberto mais tarde, a proteína FLU, que parece controlar a biossíntese da clorofila interagindo diretamente com o GluTR (Goslings *et al.*, 2004). Outros reguladores possíveis incluem a conversão do CAO da clorofila *a* em clorofila *b* (Tanaka *et al.*, 2001; Tanaka e Tanaka, 2005; Pattanayak *et al.*, 2005). Para uma discussão mais detalhada sobre estes reguladores recomendamos o trabalho de Tanaka e Tanaka (2007).

D. Degradação da clorofila: processamento e estocagem

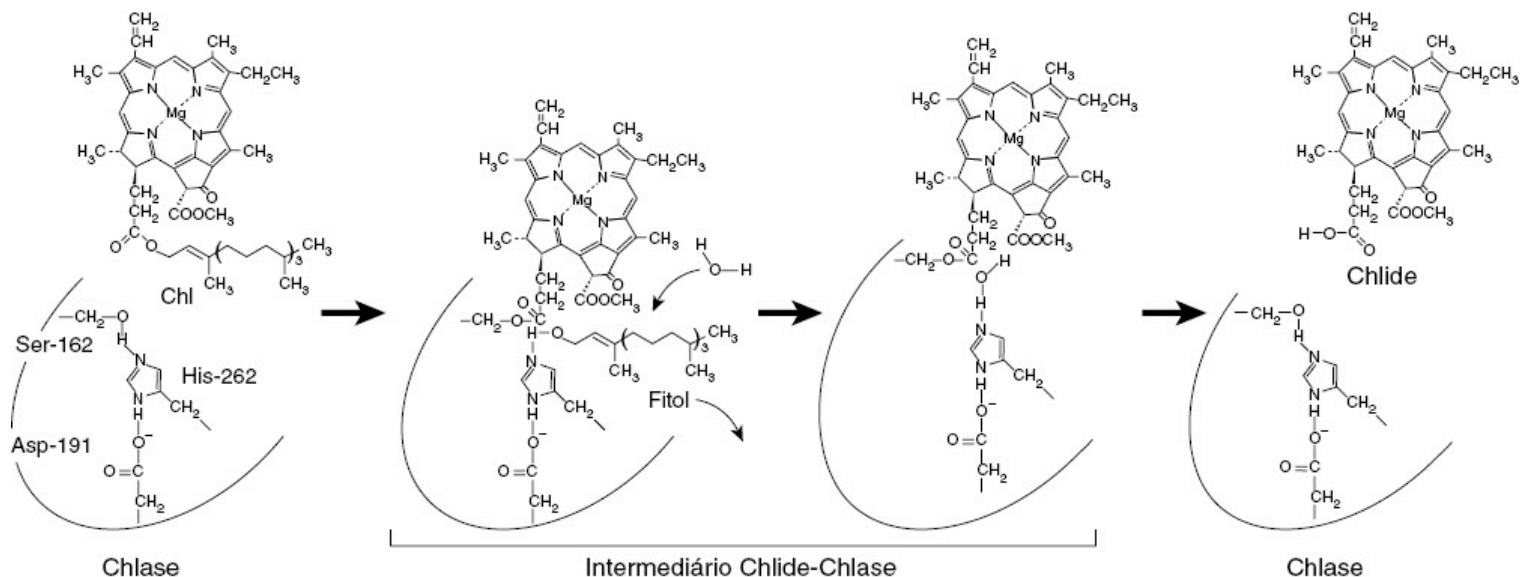
A terceira e última fase do metabolismo da clorofila envolve a degradação da clorofila (Takamiya *et al.*, 2000; Eckhardt e Grimm, 2004). Essa fase é fundamental na senescência e maturação das frutas, com o mecanismo de reação tendo sido bem esclarecido desde a última edição deste livro (Matile *et al.*, 1999; Hortensteiner, 1999; Krautler, 2003; Eckhardt *et al.*, 2004). O mecanismo da degradação da clorofila envolve a sua conversão em catabólitos não fluorescentes e incolores (NCCs) como pode ser visto no Esquema 2.6.



ESQUEMA 2.6 O mecanismo da degradação da clorofila em plantas superiores. As constituições da clorofila e dos catabólitos da clorofila estão apresentadas. Anéis de pirrol (A–D), pontes de metino (α – δ) e átomos relevantes estão rotulados. Locais de modificações periféricas como a presentes em diferentes NCCs são indicadas (R₁–R₃). Chl = clorofila; Pheide *a* = Feoforbídeo *a* (*pheophorbide a*); RCC = catabólito de clorofila vermelha (*red chlorophyll catabolite*); pFCC = catabólito de clorofila fluorescente primária (*primary fluorescent chlorophyll catabolite*); NCC = catabólito de clorofila não fluorescente (*non-fluorescent chlorophyll catabolite*). Pruzinska *et al.* (2005).

A hidrólise da clorofila *a* em plantas envolve quatro etapas consecutivas catalisadas pela clorofilase, a Mg-dequelatase, a feoforbídeo oxigenase *a* e a redutase de catabólitos de clorofila vermelha, respectivamente (Harpaz-Saad *et al.*, 2007). A primeira etapa é a da remoção do fitol pela enzima da clorofilase (clorofil clorofilidehidrolase, EC 3.1.1.14), uma glicoproteína intrínseca localizada no invólucro das membranas tilacoides (Bacon e Holden, 1970; Schoch e Vielwerth, 1983). Essa enzima foi descoberta há um século por Willstater e Stoll (1913). A partir de então muitos estudos têm tentado elucidar o mecanismo da reação. A inibição da *Euglena gracilis* clorofilase pelo ácido *p*-cloromercuribenzoico (PCMB) sugere o possível envolvimento de cisteína. O PCMB, no entanto, provou ser ineficiente contra a clorofilase *Phaeodactylum tricornutum* (Terpstra, 1977). Posteriormente Khalyfa *et al.* (1995) descobriram que o diisopropil fluorofosfato, um inibidor de serinas hidrolases inibiu a clorofilase do *Paseodactylim*. Esses resultados de inibição sugerem que resíduos de aminoácidos envolvidos na reação da clorofilase variam com a fonte da enzima. Clonando o gene da clorofilase do vegetal superior *Chenopodium album*, Tsuchiya *et al.* (2003) descobriram que ela tem um fragmento de lipase com um resíduo de serina ativo. A identificação de serina, histidina e ácido aspártico no sítio ativo da clorofilase indicou que ela é similar à serina hidrolase. Com base nesses resultados foi sugerido o seguinte mecanismo da clorofilase (Esquema 2.7). Azoulay-Shemer *et al.* (2011) descobriram que o processamento N e C terminal estava envolvido na maturação da clorofilase de citrus.

A enzima envolvida na remoção do Mg do clorofilídeo *a* com a formação de feoforbídeo *a* têm sido denominada Mg-dequelatase (Owens e Falkowski, 1988; Ziegler *et al.*, 1988; Shimokawa *et al.*, 1990; Shioi *et al.*, 1991). Ao utilizar clorofilina, a Mg-dequelatase foi analisada em cotilédones de colza por Vicentini *et al.* (1995). A enzima parece estar na forma latente em tilacoides, mas também está presente em grandes concentrações em cloroplastos pré-senescentes. Apesar de várias pesquisas terem sido feitas na dequelação de Mg, nenhuma delas conseguiu identificar a Mg-dequelatase (Shioi *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2002; Suzuki e Shioi, 2002). Ao utilizar o clorofilídeo *a*, Shioi *et al.* (1996) descobriram que a reação de dequelação de Mg requer uma pequena quantidade de substância termoestável denominada substância quelante de metal (MCS). Suzuki e Shioi (2002) utilizaram um substrato artificial, a clorofilina *a*, e demonstraram que uma proteína purificada que libera Mg de *Chenopodium album* tinha baixa atividade de peroxidase. Esse resultado é consistente com um estudo anterior desenvolvido por Azuma *et al.* (1999), que demonstrou que a peroxidase da raiz-forte inclui atividade Mg-dequelante. Pesquisas posteriores utilizando extratos de *C. album* por Kunieda *et al.* (2005), no entanto, descobriram que a peroxidase e a glutathione *S*-transferase só liberam magnésio a partir do substrato artificial de clorofilina *a*. Este fato elimina a possibilidade de que exerçam um papel na degradação da clorofila uma vez que somente a proteína purificada de baixa massa molecular exibia atividade de dequelação de Mg com o substrato nativo clorofilida *a*.



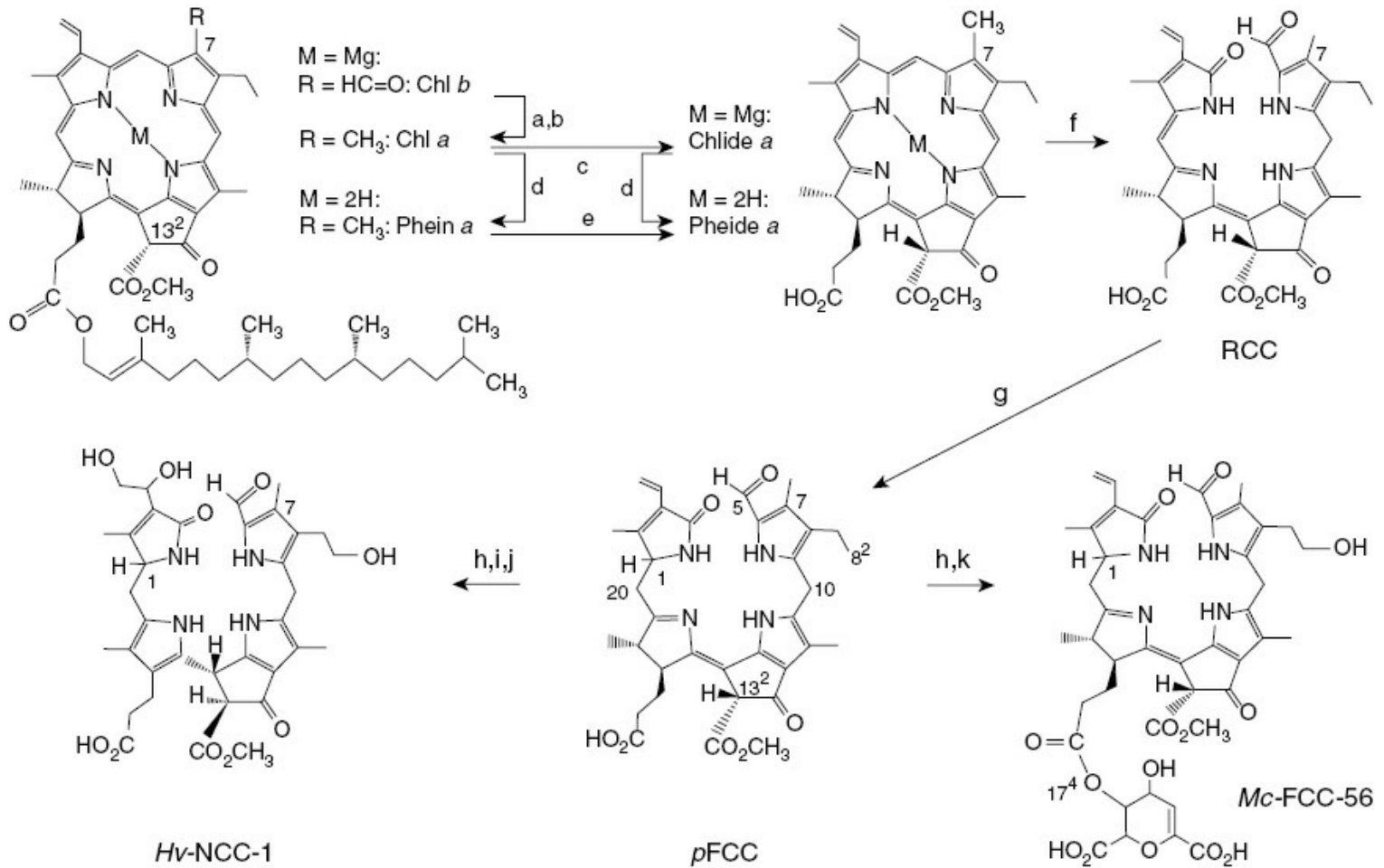
ESQUEMA 2.7 Um modelo sugerido para mecanismo catalítico da clorofilase recombinante *Chenopodium album* (CaCLH). Tschia *et al.* (2003).

A oxigenase feoforbídeo *a* (PAO), identificada na fração proteica solúvel de *C. alba* por Shioi *et al.* (1995), catalisa a conversão de feoforbídeo *a* em pirofeoforbídeo *a*. A PAO, uma oxigenase ferro-enxofre de tipo Rieske (Pruzinska *et al.*, 2003; 2005), é a enzima-chave responsável pela abertura do macrociclo de clorina do feoforbídeo *a* (Hortensteiner e Krautler, 2011). Tentativas sem sucesso de caracterizar a PAO bioquimicamente em membranas isoladas de cloroplasto levaram à identificação de uma segunda enzima, a catabólito redutase de clorofila vermelha (RCCR). Somente após a adição de proteínas estromais que continham RCCR a atividade da PAO pôde ser determinada. Juntas, as duas enzimas catalisam a formação de um catabólito de clorofila fluorescente não polar (FCC) como FCC primário (pFCC). A abertura do macrociclo do feoforbídeo *a* pela oxigenase PAO formou um catabólito de clorofila vermelha (RCC), não definido, que foi reduzido, em seguida, pelo RCCR para FCC. O pFCC foi em seguida modificado novamente por enzimas hidroxilantes não identificadas formando uma variedade de produtos finais incolores (Esquema 2.8).

A retenção da clorofila é usada geralmente como medida de qualidade em vegetais verdes uma vez que a degradação da clorofila ocorre em tecidos danificados durante o branqueamento e o processamento (Sweeney e Martin, 1961; Heaton e Marangoni, 1996; Tijkens *et al.*, 2001). Vários mecanismos foram propostos para a perda de clorofila durante o processo de estocagem de frutas e vegetais. Além das enzimas, ácidos fracos, oxigênio, luz e calor podem levar à degradação da clorofila. A perda da cor verde pode ser indesejável e essas mudanças devem ser minimizadas. Uma das principais reações é a substituição do átomo Mg^{2+} da clorofila pelo hidrogênio em condições ácidas com a formação de feofitina (Minguez-Mosquera *et al.*, 1989). Este pigmento é associado à alteração da cor verde vivo para verde-oliva fosco. A reação foi reconhecida primeiro por Campbell (1937) com a descoloração em ervilhas congeladas estocadas. A influência do pH na conversão da clorofila em feofitina é geralmente considerada o principal fator de descoloração de alimentos durante seu processamento. Os vegetais, assim, tornam-se cor verde-oliva fosco quando são aquecidos ou processados em ambiente ácido (Gold e Weckel, 1959; Gunawan e Barringer, 2000). Como consequência, os esforços no sentido de manter a clorofila durante processos de aquecimento incluíram o controle do pH, processamento rápido em altas temperaturas ou uma combinação dos dois (HTST) (Gupte e Francis, 1964; Buckle e Edwards, 1970; Schwartz e Lorenzo, 1991).

A taxa de conversão da clorofila em feofitina mostrou comportar-se de modo diretamente proporcional à concentração de ácido (Joslyn e Mackinney, 1938). A formação da feofitina foi objeto de um grande número de pesquisas (Gupte *et al.*, 1964; Hermann, 1970; LaJollo *et al.*, 1971; Robertson e Swinburne, 1981). Uma relação linear foi relatada por Walker (1964) entre a aparência e a formação da feofitina em feijões congelados estocados por até um ano. LaJollo *et al.* (1971) observaram que a formação da feofitina é a reação predominante em teores de

atividade de água (a_w) maiores que 0,32 em purê de espinafre branqueado e liofilizado, armazenado a 37°C e 55°C em atmosfera de nitrogênio e ar. A clorofila *a* degradou-se muito mais rapidamente do que a clorofila *b*, em um fator de 2,5-30, consistente com estudos anteriores (Schanderl *et al.*, 1962; Gupte *et al.*, 1964). LaJollo *et al.* (1971) relataram haver uma relação linear entre a_w e o logaritmo do tempo decorrido para perder 20% de clorofila (Figura 2.8). Esses primeiros estudos utilizaram principalmente métodos espectrofotométricos e colorimétricos para estabelecer a cinética da degradação da clorofila. Mais tarde os pesquisadores utilizaram HPLC para quantificar as clorofilas *a* e *b* (Steet e Tong, 1996; Mangos e Berger, 1997; Weemaes *et al.*, 1999). Ao utilizar o HPLC, Koca *et al.* (2006) confirmaram a degradação da clorofila como uma reação de primeira ordem em ervilhas verdes branqueadas em temperaturas variando de 70°C-100°C em soluções tampão de pH de 5,5; 6,5 e 7,5. Com o sistema de medida de cor CIE- $L^*a^*b^*$, foi descoberta uma correlação significativa entre alterações em parâmetros de padrões visuais (valores $-a$, $-b$ e h) e a degradação da clorofila.



ESQUEMA 2.8 Esboço estrutural representativo de importantes catabólitos que delineiam os principais processos de degradação da clorofila em vegetais superiores (Krautler e Hortensteiner, 2006; Moser *et al.*, 2009). Hortensteiner e Krautler (2011).

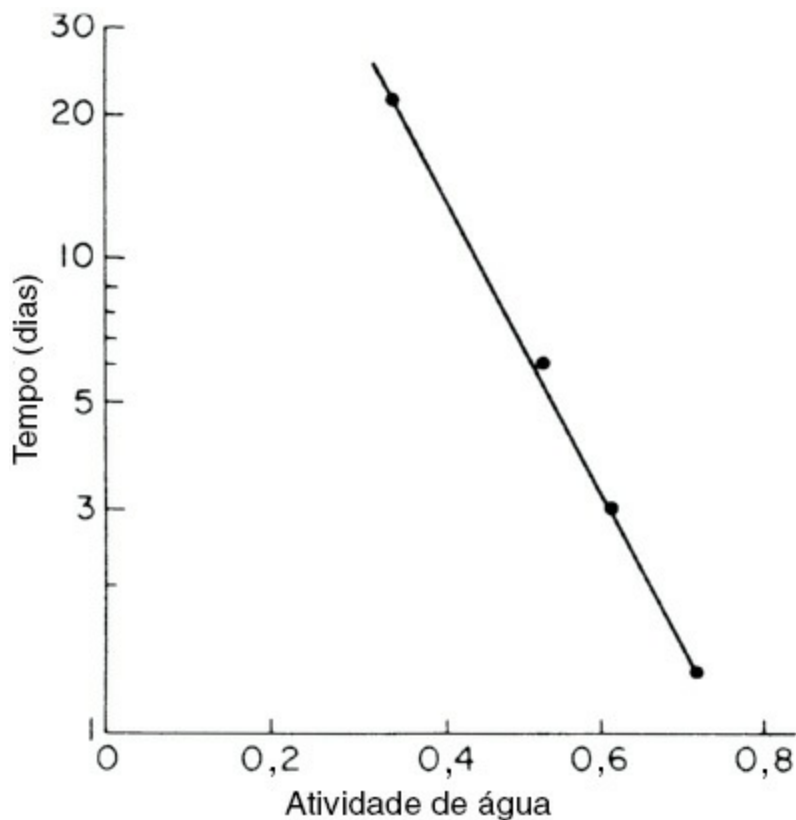
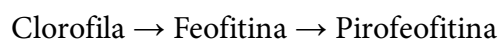


FIGURA 2.8 Tempo necessário para perda de 20% de clorofila no espinafre em diferentes atividades de água (37°C em atmosfera de ar) (La Jollo *et al.*, 1971). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

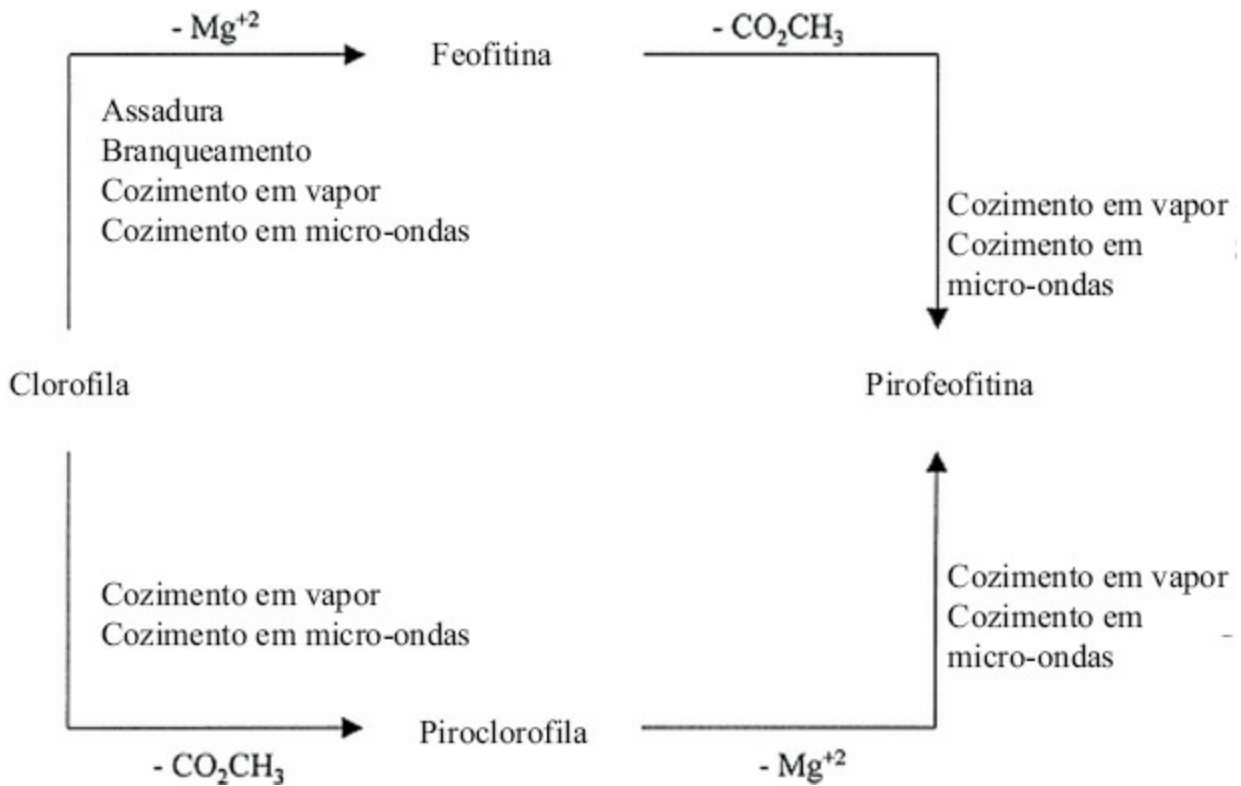
Além da feofitinação, a clorofilase converte a clorofila em clorofilídeos com a perda de grupo de fitol. A ação combinada da clorofilase e ácido resulta em perda de Mg^{2+} e do grupo de fitol com a formação de feoforbídeos (White *et al.*, 1963). O feoforbídeo também é o principal produto de degradação de pepinos em salmoura (Jones *et al.*, 1961; 1963). Muitos novos produtos foram identificados por Schwartz *et al.* (1981) no purê de espinafre aquecido, incluindo as pirofeofitinas *a* e *b*. Estes foram formados a partir das feofitinas correspondentes como resultado da perda do grupo de carbometoxi e separados por HPLC. Schwartz e von Elbe (1983) examinaram a formação das pirofeofitinas em espinafre aquecido. Ambas as feofitinas *a* e *b* foram detectadas após serem aquecidas a 121°C por até 15 minutos; em seguida, porém, ocorreu um declínio desses pigmentos. Aquecimento posterior levou à formação de pirofeofitina *a* depois de 4 minutos enquanto *b* não tinha sido observado antes de 15 minutos. Uma amostra de purê de espinafre branqueado aquecido durante quase 2 horas a 126°C produziu apenas pirofeofitinas *a* e *b*. Nenhuma outra alteração foi notada, indicando que estes foram os produtos finais da degradação da clorofila. A cor verde-oliva associada aos vegetais enlatados foi atribuída às pirofeofitinas. Estes derivados de pigmentos provavelmente incluem os pigmentos não identificados relatados por Buckle e Edwards (1969) e LaJollo *et al.* (1971) representando 20-30% do total de pigmentos na amostra. A inabilidade desses pesquisadores em detectar pirofeofitinas deve ter sido decorrência da ausência de técnicas cromatográficas de alta resolução necessárias para separar estes derivados. Schwartz e von Elbe (1983) propuseram a ordem cinética a seguir para explicar a formação de pirofeofitinas:



Um estudo posterior de Teng e Chen (1999) examinou as alterações nas clorofilas e em seus derivados durante o aquecimento de folhas de espinafre utilizando HPLC-DAD de arranjo fotodiodos ou espectrometria de bombardeamento de íons positivos (FAB-MS). Eles demonstraram degradação de primeira ordem das duas formas de clorofilas *a* e *b* e que a constante de degradação era maior em fornos de micro-ondas e branqueamento do que em cozimento em vapor e em forno. A maioria dos produtos formados pela degradação foram epímeros e feofitinas formadas durante assadura e branqueamento enquanto as piroclorofilas *a* e *b* foram detectadas depois de

fervura por 30 minutos ou cozimento em forno de micro-ondas por um minuto. O cozimento em forno de micro-ondas parece favorecer a formação de piroclorofilas *a* e *b*, enquanto o cozimento a vapor favoreceu a formação de pirofeofitinas *a* e *b*. A formação desses derivados da clorofila durante o aquecimento de folhas de espinafre descrito pelos pesquisadores está ilustrada no Esquema 2.9. Para preservar a cor verde desejável nos vegetais o uso potencial de complexos de metaloclorofila foi examinado. Um fenômeno de reverdecimento foi observado envolvendo a formação de complexos que resultam da introdução de cobre (Cu) e zinco (Zn) no anel de pirrol da clorofila. Isso parece formar uma ligação forte que é mais resistente ao ácido e ao calor do que o magnésio (Mg^{2+}) da clorofila normal (Humphrey, 1980). As formas da feofitina *a*, pirofeofitina *a* e feoforbídeo *a* apresentaram maior reatividade com o zinco do que as formas *b* correspondentes (von Elbe *et al.*, 1986; LaBorde e von Elbe, 1990).

Várias patentes foram publicadas para processos que melhorassem a cor em vegetais verdes por meio de branqueamento ou empacotamento de vegetais verdes em zinco ou soluções de cobre (Leake e Kirk, 1992; LaBorde e von Elbe, 1996). Uma pesquisa feita por Canjura *et al.* (1999) demonstrou uma melhora na cor verde em ervilhas processadas assepticamente frescas e congeladas quando branqueadas em solução de $ZnCl_2$, processo que pode tornar-se viável na preservação da cor verde nos vegetais.



ESQUEMA 2.9 Processo de formação de piroclorofilas e seus derivados em folhas de espinafre durante aquecimento. Teng e Chan (1999).

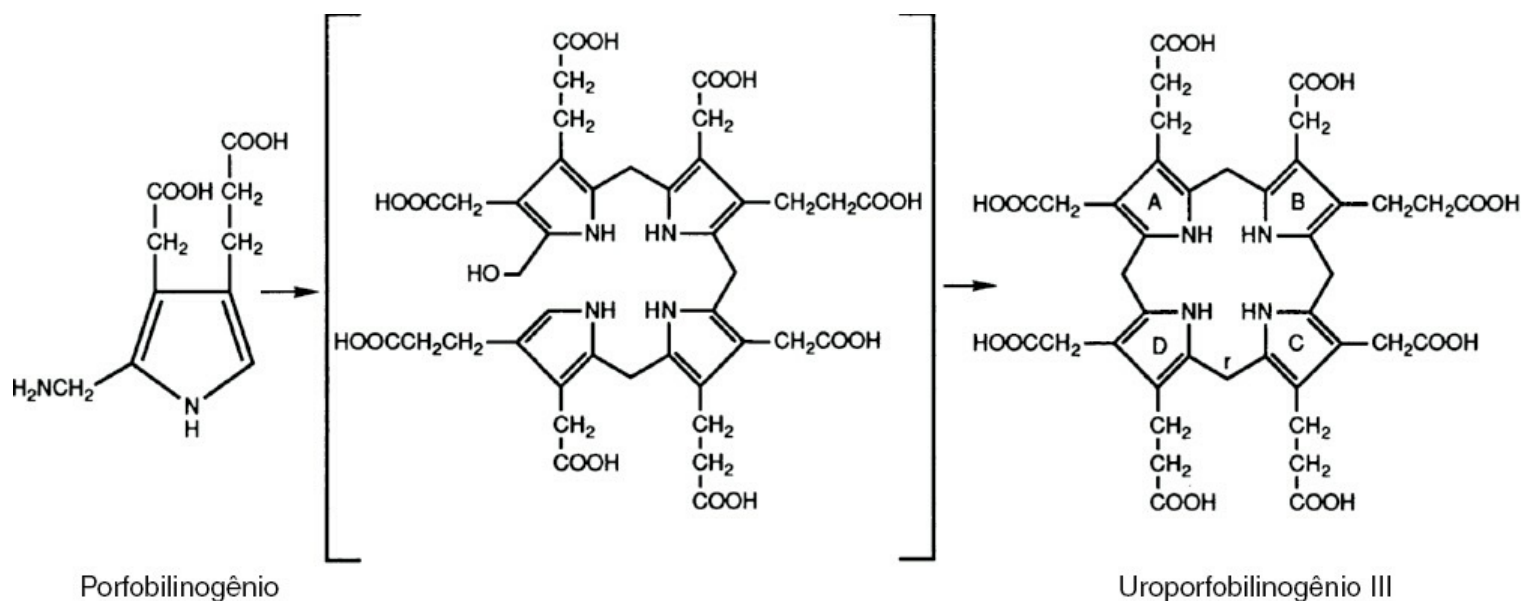
Holden (1965) também atribuiu a descoloração da clorofila em sementes de legumes à oxidação de ácidos graxos por lipoxigenase (LOX) em hidroperóxidos. Essa reação foi acoplada à degradação de ácidos graxos em hidroperóxidos e demandou a presença de fator termolábil no extrato bruto. Pesquisas posteriores realizadas por Zimmerman e Vick (1970) identificaram uma enzima, a linoleato hidroperóxido isomerase como o fator lábil ao aquecimento. O efeito de branqueamento na clorofila foi atribuído a uma reação de oxidorredução na qual o ácido graxo ceto-hidróxi, o produto isomerizado formado pela isomerase de hidroperóxido, e a porção do sistema de duplas ligações conjugadas da clorofila estão envolvidos. Imamura e Shimizu (1974) não comprovaram o envolvimento da hidroperóxido isomerase, mas confirmaram o papel do LOX no branqueamento da clorofila. Pesquisadores confirmaram, posteriormente, que isoenzimas LOX diferentes possuem um papel no branqueamento da clorofila e carotenos (Grosch *et al.*, 1976; Ramadoss *et al.*, 1978). A participação das diferentes

isoenzimas LOX no branqueamento do caroteno e da clorofila foi objeto de diversos estudos (Hilderbrand e Hymovitz, 1982; Reynolds e Klein, 1982; Cohen *et al.*, 1984; King e Klein, 1987). O efeito da LOX-1 de soja em cloroplastos de trigo foi investigado por Kockritz *et al.* (1985) e sugerem que essa enzima, que ataca seletivamente ácidos graxos livres, pode estar envolvida na senescência e na degradação do cloroplasto. A atividade LOX já havia sido relatada anteriormente em cloroplastos de ervilhas (Borisova e Budnitskaya, 1975; Douillard e Bergeron, 1978). Em função de seu papel na deterioração da qualidade dos vegetais, a LOX foi considerada uma enzima que poderia ser o indicador da otimização do branqueamento antes do congelamento. No entanto, Gokmen *et al.* (2005) demonstraram claramente que a peroxidase (POD) é mais estável perante o calor do que o LOX, de modo que a inativação do POD é um indicador melhor da adequação do branqueamento.

E. Carotenoides

Durante a maturação de muitas frutas há alterações em sua cor que passa do verde para o laranja ou vermelho. Isto ocorre em decorrência da perda de clorofila e do desmascaramento e biossíntese de carotenoides (MacKinney, 1961). Tais mudanças na pigmentação são acompanhadas por mudanças estruturais nos cloroplastos. A rede granal-intergranal desorganiza-se resultando na formação de cromoplastos (Thomson, 1966; Spurr e Harris, 1968; Camara e Brangeon, 1981). Os cromoplastos deixam de conter clorofila ou pigmentos fotossintéticos, mas tornam-se o principal local de biossíntese de carotenoides (Camara e Brangeon, 1981).

Carotenoides são compostos isoprenoides C_{40} constituídos por unidades de isoprenos ligados cabeça-cauda, formando um sistema de duplas ligações conjugadas (Eskin, 1979). São classificados em dois grupos, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são estruturalmente relacionados com os hidrocarbonetos enquanto as xantofilas incluem os derivados oxidados correspondentes (compostos de hidróxi, epóxi e oxo) e frequentemente são esterificados. Exemplos de carotenos são os α e β -carotenos de cenouras e o licopeno em tomates, enquanto as xantofilas incluem a capsantina e a capsorrubina encontradas na pimenta vermelha.



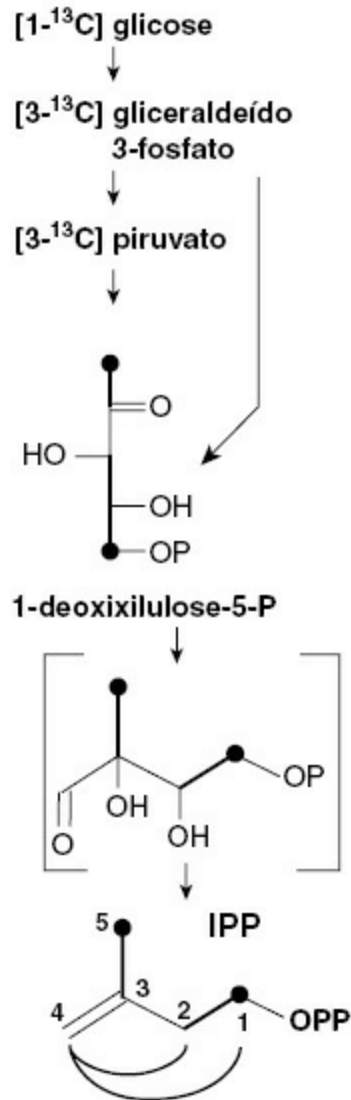
Os carotenoides são sintetizados no interior do cromoplasto a partir do isopentil pirofosfato (IPP). Há algum tempo acreditava-se que a biossíntese dos IPPs ocorria mediante um único mecanismo envolvendo acetato/mevalonato (Britton, 1982). Um segundo mecanismo, no entanto, foi descoberto na eubactéria, em algas verdes e em vegetais superiores nos quais o IPP é formado por gliceraldeído 3-fosfato e piruvato (Lichtenthaler *et al.*, 1997a, b). Ambos os mecanismos estão presentes em vegetais superiores, mas diferem na sua localização. As enzimas do mecanismo do mevalonato encontram-se no citosol enquanto o mecanismo do gliceraldeído-3-fosfato, denominado 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato (DXP), opera no plastídio (Esquema 2.10).

Ainda não está claro se o acetil-CoA é sintetizado no interior do cloroplasto ou se tem uma origem extraplastídica. Grumbach e Forn (1980) demonstraram com clareza que o acetil-CoA forma-se no interior do cloroplasto e pode sintetizar carotenoides autonomamente. Os cromoplastos da pimenta vermelha e dos narcisos vermelhos mostraram poder sintetizar carotenoides a partir de isopentil fosfatos (Beyer *et al.*, 1980; Camara *et al.*, 1982). A presença de enzimas capazes de sintetizar acetil-CoA sugere que uma autonomia similar pode existir nos cromoplastos, capazes de sintetizar carotenoides.

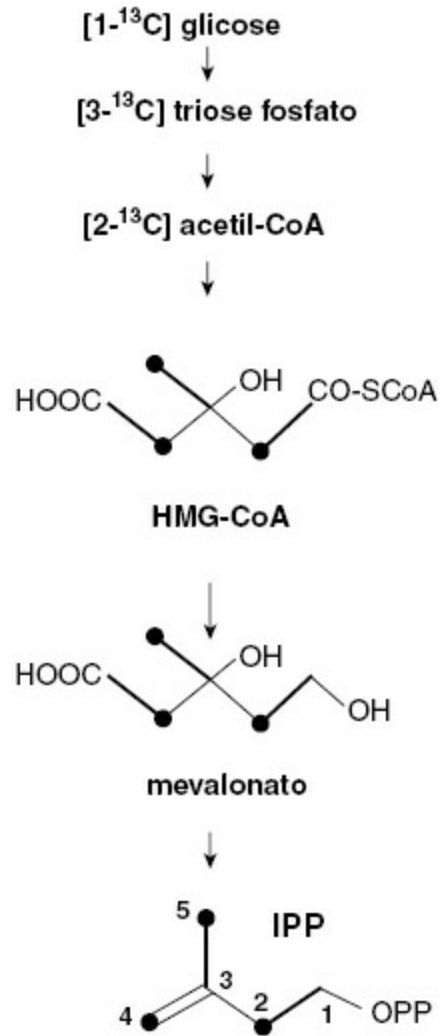
A formação de geranylgeranyl pirofosfato a partir de ácido mevalônico (MVA) envolve a fosforilação pela mevalonato quinase (ATP:mevalonato 5-fosfotransferase, EC 27.1.3.6). Esta enzima foi identificada em várias plantas, incluindo sementes de abóbora (Loomis e Battaille, 1963), folhas verdes e cotilédones etiolados de feijões franceses (*Phaseolus vulgaris*) (Rogers *et al.*, 1966; Gray e Keckwick, 1969; 1973), em gomos de suco de laranja (Potty e Breumer, 1970) e em cotilédones de melão (*Cucumis mello*) (Gray e Keckwick, 1972). A fosforilação de MVA-5P em MVA-5 pirofosfato (MVA-5PP) é em seguida catalisada por 5-fosfomevalonate quinase (ATP:fosfomevalonato fosfotransferase, EC 2.7.4.2). O MVA-5 PP é, em seguida, descarboxilado por pirofosfomevalonato descarboxilase [carboxilase de ATP:5-pirofosfomevalonato (desidratação), EC 4.1.1.33]. Esta enzima catalisa uma reação bimolecular na qual o ATP e o 5-pirofosfomevalonato são convertidos em isopentil pirofosfato, ADP, fosfato e dióxido de dióxido (Esquema 2.11).

A isomerização do pirofosfato de isopentil em pirofosfato de dimetilalil é catalisada pela isopentil pirofosfato isomerase (EC 5.3.3.2). A dupla ligação é então isomerizada da posição 3 do isopentil pirofosfato para a posição 2 em dimetilalil pirofosfato. Esta enzima foi isolada de abóbora por Ogura *et al.* (1968). Uma molécula de dimetilalil pirofosfato é então condensada com uma, duas ou três moléculas de isopentil pirofosfato levando à formação de pirofosfato de geranylgeranyl (Esquema 2.12). As últimas reações são catalisadas por um grupo de enzimas conhecidas como prenil transferases. A enzima responsável pela síntese do farnesil pirofosfato foi parcialmente purificada da semente da abóbora (Eberhardt e Rilling, 1975).

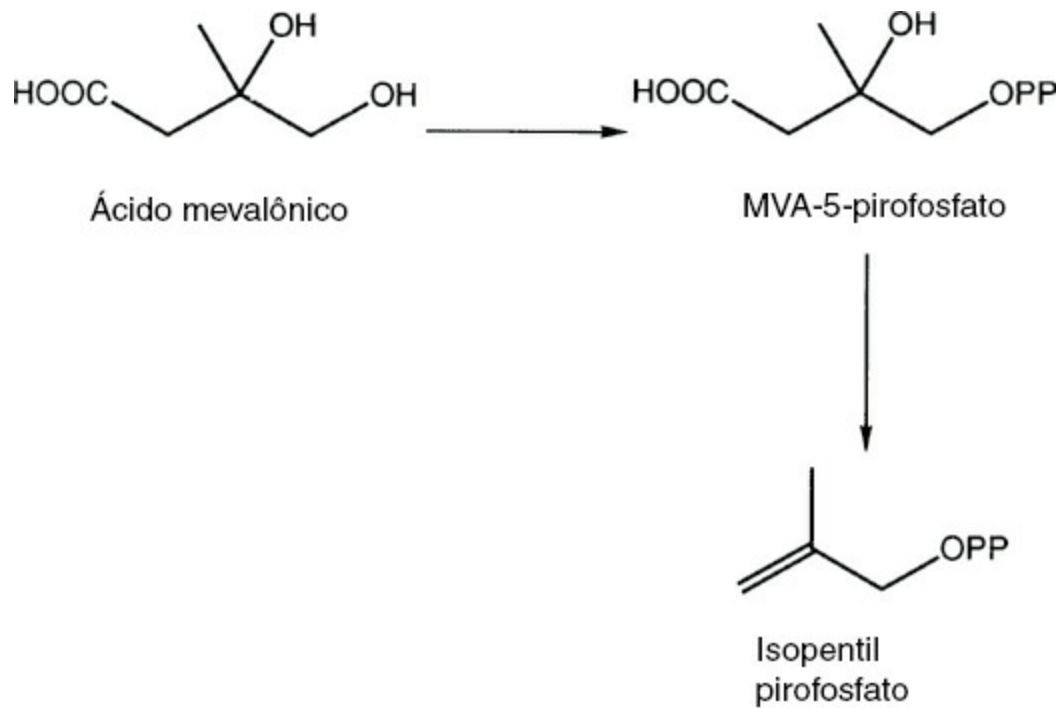
(a) Processo alternativo IPP



(b) Processo clássico acetate/mevalonato

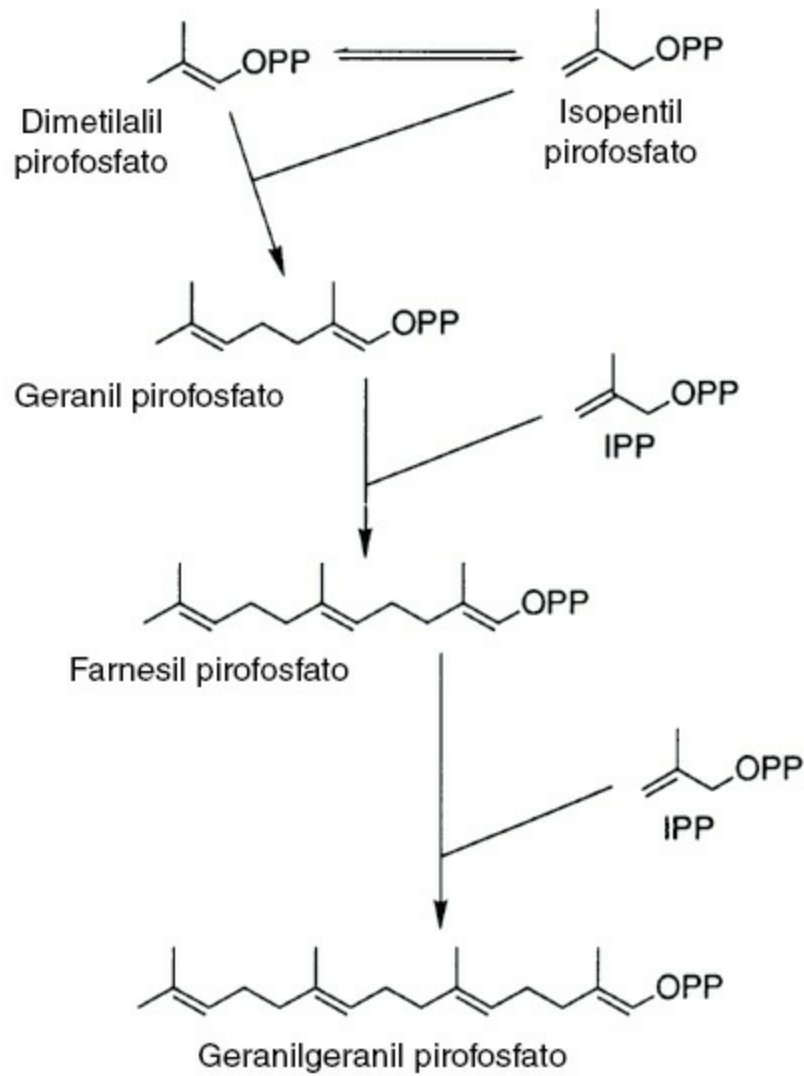


ESQUEMA 2.10 Classificação isopentil difosfato (IPP) a partir de [¹³C]glicose via (a) uma nova alternativa e (b) o processo clássico acetato/mevalonato da biossíntese do IDPP. Lichtenthaler *et al.* (1997b).

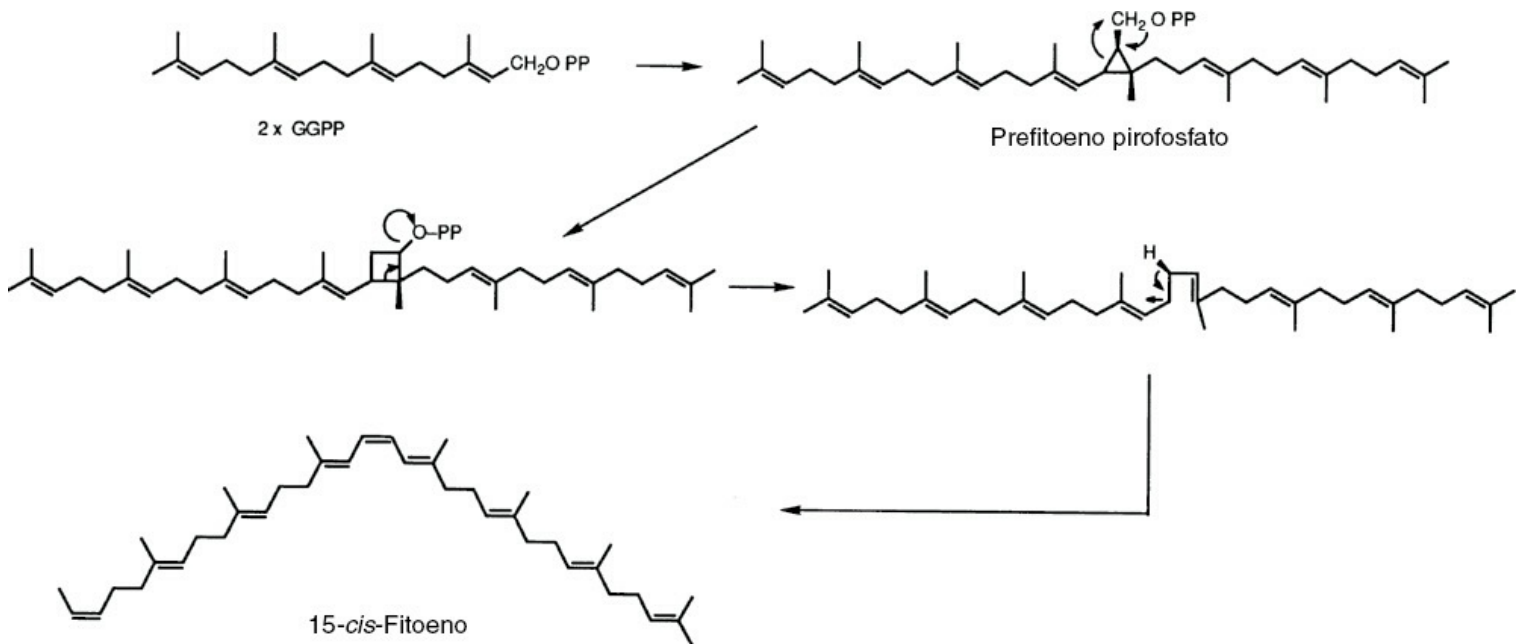


ESQUEMA 2.11 Produção de IPP a partir do ácido mevalônico.

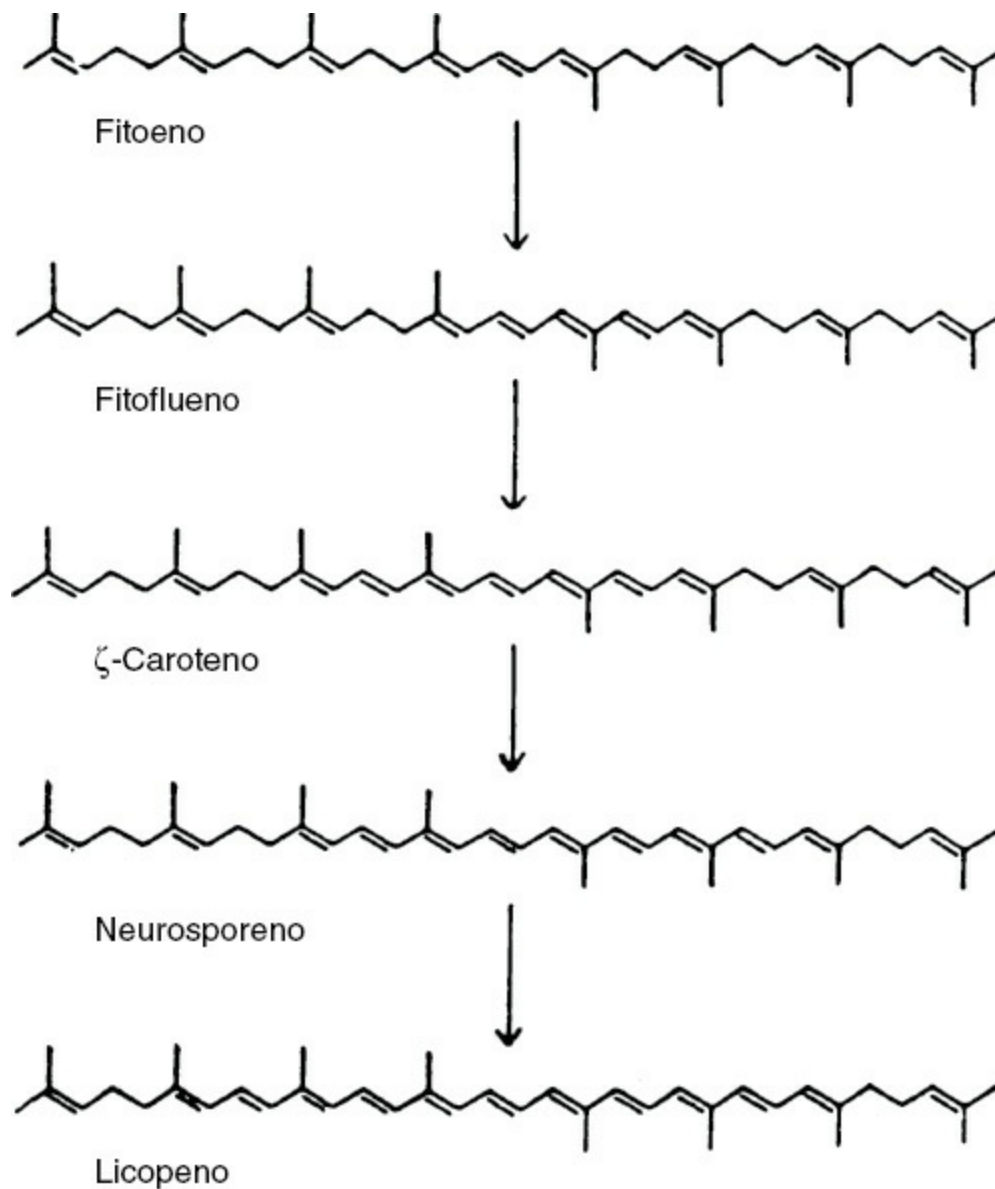
A formação do primeiro hidrocarboneto C_{40} , o 15-*cis*-fitoeno resulta da condensação de duas moléculas de pirofosfato de geranylgeranyl (C_{20}) (Esquema 2.13). O intermediário dessa reação, o prefitoeno pirofosfato, perde um próton, o que resulta em uma dupla ligação na posição C15. Maudinas *et al.* (1975) identificaram um sistema de enzimas solúveis em plastídios de tomates que sintetiza o *cis*-fitoeno a partir de isopentil pirofosfato. O fitoeno é incolor e é convertido em carotenoides coloridos através de uma série de processos de dessaturação que produzem um sistema de duplas ligações conjugadas. Ao contrário do fitoeno, que é um isômero 15-*cis*, os carotenoides coloridos são, todos eles, *trans*, de modo que a isomerização para o formato *trans* precisa ocorrer durante o processo de dessaturação. Este mecanismo envolve a perda de hidrogênio por *trans*-eliminação e pode ser mediado por um complexo de enzimas da membrana, talvez envolvendo íons de metálicos ou citocromos em um sistema simples de transferência de elétrons (Britton, 1979). A dessaturação sequencial do fitoeno em licopeno foi proposta por Porter e Lincoln (1950) e pode ser vista no Esquema 2.14. Um sistema similar de enzimas foi relatado por Qureshi *et al.* (1974) em tomates mutantes capazes de converter todo o *cis*- β -caroteno em *trans* caroteno. A conversão do neurosporeno em licopeno só tem sido encontrada em sistemas fúngicos (Davies, 1973; Bramley *et al.*, 1977).



ESQUEMA 2.12 Biossíntese do geranilgeranil pirofosfato a partir do IPP.

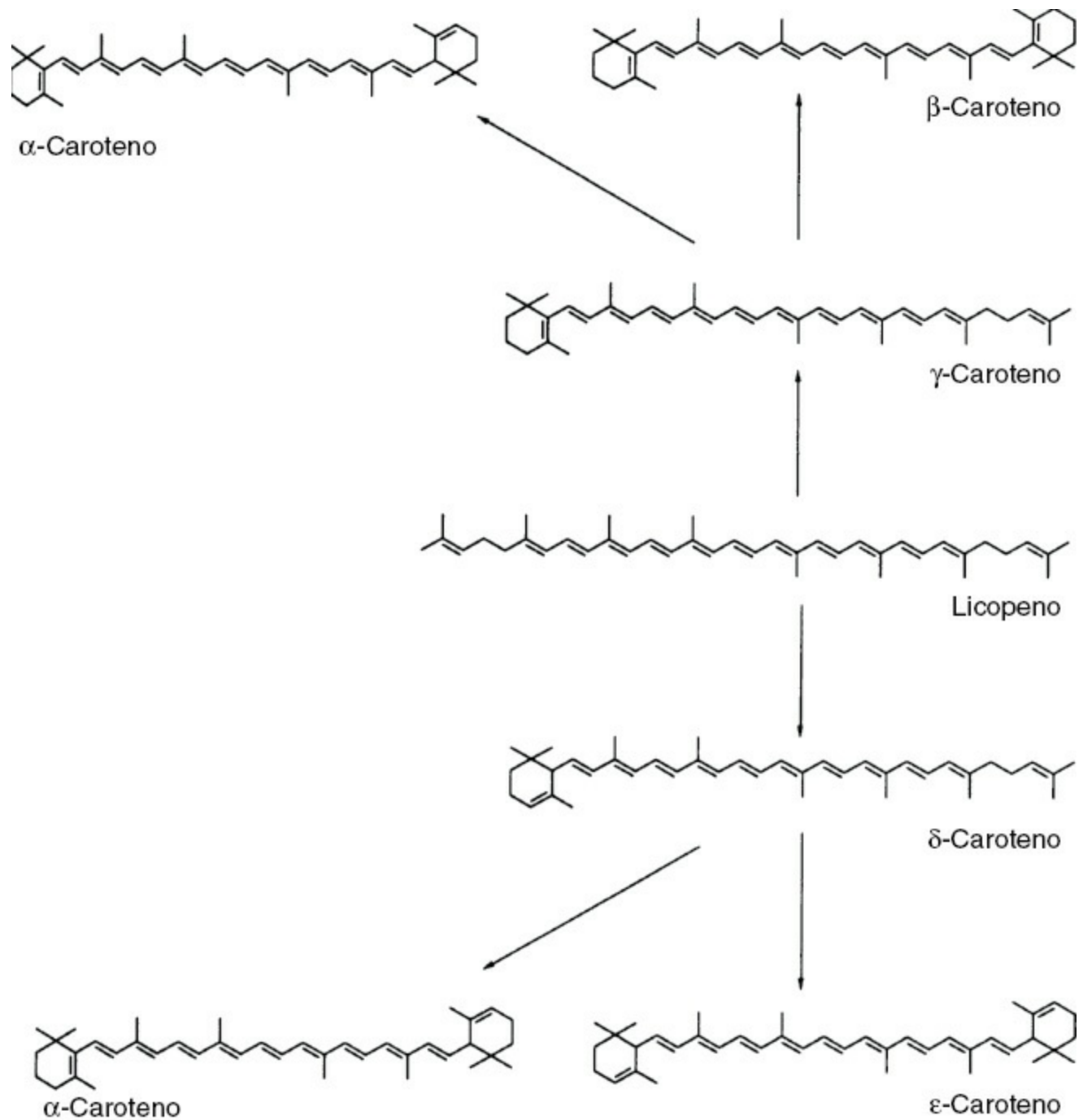


ESQUEMA 2.13 Mecanismo de biossíntese do fitoeno. Britton (1982).



ESQUEMA 2.14 Sequência das reações de dessaturação do fitoeno e formação de licopeno.

O passo final na biossíntese de carotenoides é a ciclização com a formação de pelo menos um ou dois grupos finais cíclicos nos carotenoides (Esquema 2.15). A conversão do licopeno para α -, β e γ -carotenos foram demonstrados na presença de enzimas solúveis de plastídios de tomate e cloroplastos do espinafre por Kuwasha *et al.* (1969). A ciclização demonstrou ser inibida pela nicotina e CPTA [cloreto de 2-(4-clorofenil) trietil amônio] ocasionando o acúmulo de licopeno em frutas cítricas tratadas com esses inibidores (Britton, 1982). Após a ciclização, o oxigênio é incorporado na forma de grupo hidroxil em C3 ou epóxido na posição de 5,6 (Takeguchi e Yamamoto, 1968; Britton, 1976). A última fase envolve uma série de reações conhecidas como o ciclo da xantofila.



ESQUEMA 2.15 Esquema abrangente para a biossíntese de carotenos bicíclicos a partir do neurosporeno. Britton (1982).

Camara *et al.* (1982) examinaram o local da biossíntese de carotenoides em cromoplastos de pimentas semimaduras (*Capsicum annuum* L.). A incubação de difosfato isopentil [$1-^{14}\text{C}$] com diferentes frações de cromoplastos demonstrou que a membrana era incapaz de sintetizar carotenoides ao passo que o estroma sintetizou os primeiros carotenoides sem cor, os fitoenos (Tabela 2.4). Portanto, a fitoeno sintetase, a enzima responsável, pode ser um indicador útil do estroma do cromoplasto. Um aumento na incorporação do substrato marcado na presença de membranas de cromoplasto foi atribuído a seus sistemas de dessaturação e ciclização, que produzem carotenoides. Esse estudo demonstrou que as enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides estão compartimentalizadas nos cromoplastos. O estroma sintetiza o fitoeno que é sujeito à dessaturação e ciclização em carotenoides coloridos da membrana. Esses pesquisadores propuseram que uma proteína portadora transferiu fitoeno à membrana do cromoplasto ou que, alternativamente, a fitoeno sintetase esteja vinculada à membrana, local onde liberou fitoeno para reações posteriores.

1. Alterações dos carotenoides durante o amadurecimento

Ebert e Gross (1985) examinaram os pigmentos carotenoides na casca de caquis em maturação (*Diospyros kaki* cv. “Triumph”). Um declínio regular na clorofila (*a* e *b*) foi observado durante a maturação que, no entanto, desapareceu uma vez que a fruta ficou madura (Tabela 2.5). Os carotenoides de cloroplastos (α - e β -carotenos, luteína, violaxantina e neoxantina) diminuíram, seguidos pela síntese gradual dos carotenoides de cromoplastos (criptoxantina, anteraxantina e zeaxantina). Ikemefuna e Adamson (1985) monitoraram as alterações nos pigmentos de clorofila e carotenoides em frutos da palma em maturação (*Elaeis quineeris* “Palma”) e notaram uma degeneração similar de cloroplastos e formação de cromoplastos. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento na carotenogênese com a formação de α - e β -carotenos como os principais pigmentos presentes na fruta madura.

Farin *et al.* (1983) examinaram a mudança nos carotenoides durante a maturação da tangerina híbrida israelense “Michal” (*Citrus reticulata*). Essa fruta, em particular, é a mais colorida entre as frutas cítricas, com cor avermelhada brilhante. A clorofila total diminuiu rapidamente na casca e desapareceu por completo no estágio maduro (Tabela 2.6). O total de carotenoides diminuiu na fase da perda de cor por causa do declínio dos carotenoides dos cloroplastos, δ -carotene, luteína, violaxantina e neoxantina. Um aumento significativo da carotenogênese ocorreu em seguida, com aumento dos carotenoides do cromoplasto, criptoxantina e apocarotenoides C_{30} . Os dois apocarotenoides C_{30} , β -citraurina e β -citraurino, representaram 26,1% e 9,9%, respectivamente, do total de carotenoides na fruta madura. Sua formação parece necessitar uma degradação assimétrica de um fragmento C_{40} do lado C_1 de um carotenoide, a criptoxantina.

TABELA 2.5 Alterações de carotenoide na pele do caqui (*Diospyros kaki* cv. “Triumph”) durante a maturação pós-colheita

	Estágio de maturação		
	Colheita	Intermediário	Totalmente maduro
Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$ fr. wt)	128,0	366,0	491,0
Padrão de carotenoide (% dos carotenoides totais)			
Fitoflueno	–	–	0,4
α -Caroteno	1,6	1,2	1,0
β -Caroteno	9,4	7,6	6,7
Mutato cromo	–	0,7	–
γ -Caroteno	–	0,4	–
Licopeno	1,1	0,5	8,2
β -Criptoxantina	29,2	50,0	48,2
Criptoxantina 5,6 epoxida	0,9	1,2	1,9
Criptoflavina	0,7	2,1	2,9
Luteína	12,4	5,5	4,1
Zeaxantina	9,3	9,7	5,9
Mutato xantina	0,8	4,7	1,8
Isoluteína	0,5	–	0,3
<i>trans</i> -Anteraxantina	5,4	2,0	4,8
<i>cis</i> -Anteraxantina	6,2	2,2	2,3
Luteoxantina	1,7	1,8	1,9
<i>trans</i> -Violaxantina	6,9	3,7	3,8
<i>cis</i> -Violaxantina	6,7	1,5	2,0
Neoxantina	7,2	5,2	3,8

De Ebert e Gross (1985). Reimpressão autorizada. Copyright ©: Pergamon Press.

Gross *et al.* (1983) estudaram as alterações nos pigmentos e na ultraestrutura durante a maturação da toranja (*Citrus grandis* Osbeck). A clorofila diminuiu de 90 $\mu\text{g/g}$ na etapa de imaturidade (verde) para 11 $\mu\text{g/g}$ na fruta madura, amarelo-pálida, até desaparecer totalmente na etapa de completa maturidade. Os carotenoides dos

cloroplastos, o β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina, decresceram durante a maturação, sendo que o β -caroteno desapareceu totalmente. O acúmulo de fitoflueno ficou evidenciado quando apareceu coloração alaranjada, atingindo 67% do total de carotenoides na fruta madura. Além do fitoflueno, outros carotenoides de cromoplastos foram detectados, incluindo o δ -caroteno, neurosporeno, criptoxantina e criptoflavina.

Essas pesquisas demonstraram que alterações na composição nos carotenoides durante a maturação refletem a transformação de cloroplastos em cromoplastos. Pesquisas anteriores desenvolvidas por Eilati *et al.* (1975) sobre alterações de carotenoides em cascas de laranja Shamouti mostraram que transformações ocorrem antes da colheita ou pós-colheita. A transformação dos cloroplastos em cromoplastos durante o desverdecimento de frutas cítricas foi relatado por Huff (1984) como sendo regulado pelo acúmulo de açúcar no epicarpo. Foi descoberto que a transformação reversa associada ao reverdecimento de certas espécies cítricas foi acompanhada pelo desaparecimento dos açúcares. Este fenômeno de reverdecimento do epicarpo do fruto *Citrus sinensis* foi observado por Thomson *et al.* (1967) e foi atribuído à reversão de cromoplastos a cloroplastos. A sacarose, portanto, é que promove a formação de cromoplastos enquanto o nitrogênio estabiliza os cloroplastos ao retardar o processo de desverdecimento.

TABELA 2.6 Distribuição pigmentar no flavedo de tangerina híbrida (*Citrus reticulata* cv. "Michal") durante a maturação

	Casca		
	Verde	Verde-alaranjada	Madura
Diâmetro da fruta (cm)	4,70	4,85	5,10
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$)	240,0	52,6	–
Clorofila <i>b</i> (fr. wt)	86,0	15,8	–
Total de carotenoides	143,4	51,0	174,1
Padrão de carotenoide (% dos carotenoides totais)			
Fitoflueno	–	5,2	3,1
α -Caroteneo	9,7	2,4	0,2
β -Caroteno	6,9	2,5	0,3
ζ -Caroteno	–	–	0,4
δ -Caroteno	–	–	0,1
Mutatocromo	–	–	0,5
Licopeno	–	–	–
β -Apo-8'-carotenal	0,7	0,7	1,3
α -Criptoxantina	1,9	–	–
β -Criptoxantina	–	3,1	6,4
Criptoxantina 5,6-epóxide	–	–	0,4
Criptoxantina 5',6'-epóxide	–	–	0,3
β -Citaurineno	–	9,5	9,9
β -Citaurina	–	12,3	26,1
Luteína	23,5	12,8	2,6
Zeaxantina	3,9	1,6	1,0
Mutato xantina	1,5	0,2	0,2
<i>trans</i> -Anteraxantina	3,6	4,3	1,8
<i>cis</i> -Anteraxantina	–	–	2,5
Luteoxantina	5,8	5,6	9,1
<i>trans</i> -Violaxantina	14,0	11,7	9,8
<i>cis</i> -Violaxantina	11,0	18,2	19,8
<i>trans</i> -Neoxantina	11,7	6,6	4,2
<i>cis</i> -Neoxantina	3,6	3,3	–
Neocromo	–	–	–
<i>trans</i> -Troxantina	–	–	–

Trolicromo	-	-	-
Desconhecido	2,2	-	-

Adaptado de Farin *et al.* (1983). Reimpressão autorizada. Copyright © Pergamon Press.

2. Degradação dos carotenoides: processamento e armazenamento

Os carotenoides são responsáveis pela maior parte da cor amarela e laranja de frutas e vegetais como abacaxis e cenouras. A natureza insaturada torna os carotenoides extremamente suscetíveis à isomerização e oxidação, resultando em uma perda da cor que é mais pronunciada depois da oxidação. Esta última pode ser resultado da ação da lipoxigenase, que pode branquear os carotenoides (Eskin *et al.*, 1977). Pesquisas recentes indicam que as diferenças na capacidade da lipoxigenase em diferentes frutas e vegetais para oxidar carotenoides dependem das isoenzimas presentes. As isoenzimas da lipoxigenase são classificadas em tipos 1 ou 2, dependendo do seu pH ótimo de atividade e especificidade do produto. Dos dois tipos de isoenzimas, a lipoxigenase-2 apresenta maior atividade em pH ácido e está envolvida nas reações de co-oxidação que conduzem à descoloração de pigmentos (Klein e Grossman, 1985). Por exemplo, Arens *et al.* (1973) demonstraram que a lipoxigenase-2 de ervilha é um oxidante eficaz de carotenoides. Chepurenko *et al.* (1978) atribuíram o branqueamento de carotenoides ao efeito combinado das isoenzimas da lipoxigenase de ervilha e não somente à lipoxigenase-2. Yoon e Klein (1979) mostraram haver diferenças bem definidas entre as taxas de oxidação de carotenoides para essas duas isoenzimas de lipoxigenase de ervilhas. Essas enzimas também atuam na biossíntese de ácido traumático, um hormônio que cura ferimentos, assim como o ácido jasmônico, regulador do crescimento das plantas (Zimmerman e Coudron, 1979; Vick e Zimmerman, 1983).

Os carotenoides são extremamente suscetíveis à oxidação não enzimática em frutas e vegetais desidratados. Cenouras desidratadas em pó, por exemplo, perderam 21% de seus carotenoides segundo relato de MacKinney *et al.* (1958) quando armazenadas ao ar livre. O conteúdo de umidade presente nos produtos desidratados é particularmente importante para a estabilidade dos carotenoides. O efeito de a_w na degradação de β -caroteno em sistemas modelo foi estudado por Chou e Breene (1972). Os pesquisadores mostraram que na a_w de 0,44 a descoloração oxidativa do β -caroteno foi reduzida comparada ao sistema seco correspondente com ou sem a presença do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) (Figura 2.9). Ficou claro, a partir dessa pesquisa, que a água atua como barreira para a difusão do oxigênio.

Quando os carotenoides são aquecidos na ausência de ar, algumas das duplas ligações *trans* sofrem isomerização para os isômeros *cis* correspondentes. Ácidos também catalisam a isomerização do formato da *trans* para o isômero *cis* correspondente. A alteração da forma associada aos isômeros *cis* reduz a ressonância na molécula bem como a intensidade da cor. Essas reações foram responsáveis pela diferença da qualidade entre abacaxis frescos e enlatados (Singleton *et al.*, 1961). Uma mudança no espectro dos pigmentos de carotenoides extraídos foi encontrada em abacaxis enlatados, incluindo a perda do pico a 466 nm, junto com picos de comprimento de ondas menores. Tal mudança no espectro, apesar de ser sutil demais para os olhos humanos, causou uma pequena alteração de cor de laranja-amarelado em abacaxis frescos para um amarelo tendendo para o limão na fruta enlatada.

Essa alteração foi atribuída à isomerização dos carotenoides com grupos com 5,6-epóxido aos correspondentes óxidos 5,6-furanoide. Na fruta intacta os ácidos naturais dos vacúolos das células possuem efeitos catalíticos e entram em contato com plastídios que possuem carotenoides quando as membranas celulares são rompidas durante manipulação ou processamento. Vários estudos examinaram o efeito do cozimento de cenouras na formação de isômeros *cis*. Klaui (1973), no entanto, sugeriu que os efeitos do cozimento na cor e no conteúdo de caroteno são insignificantes.

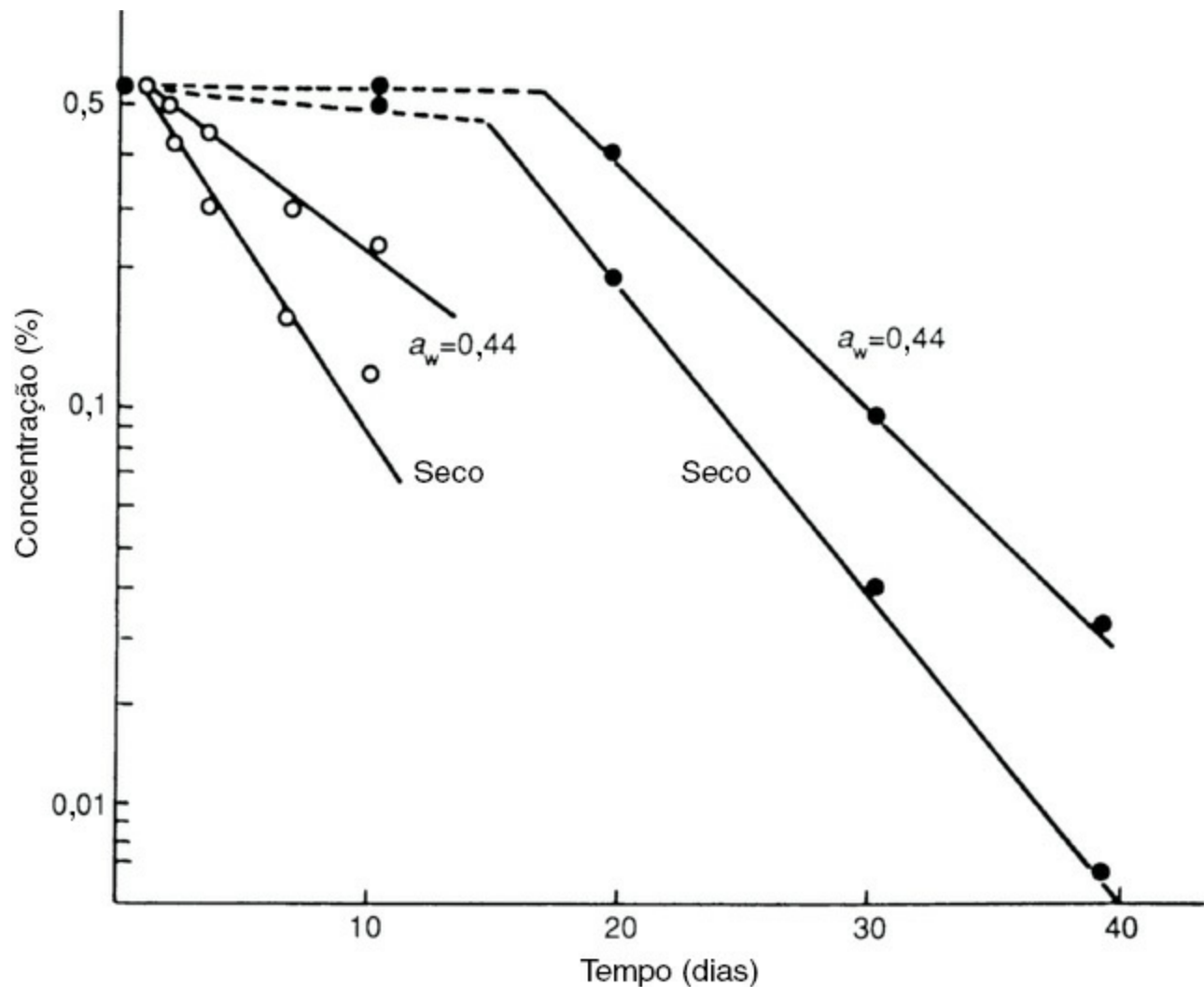
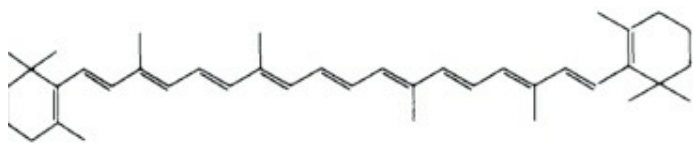


FIGURA 2.9 Descoloração de β -caroteno em sistemas modelo. Seco refere-se a sistemas mantendo CaCl_2 sólido; $a_w = 0,44$ para sistemas contendo K_2CO_3 saturado (O: controle; •: BHT-hidroxitolueno butilado). Chou e Breene (1972). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

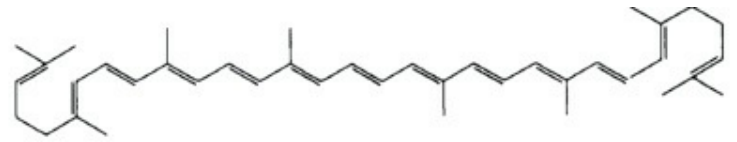
F. Antocianinas

As antocianinas são responsáveis pelas cores atraentes rosa, vermelha, violeta e azul de flores, folhas, frutas e vegetais (Harborne, 1967). São pigmentos solúveis em água que se acumulam nas células da epiderme de frutas assim como em raízes e folhas (Timberlake e Bridle, 1975, 1982; Harborne, 1976). Esses pigmentos são formados à medida que as frutas amadurecem e ficam maduras, como é evidenciado no caso de morangos (Fuleki, 1969), algumas variedades de cerejas, framboesas, oxicocos e maçãs (Zapsalis e Francis, 1965; Proctor e Creasy, 1971; Cansfield e Francis, 1970; Craker e Wetherbee, 1973; Bishop e Klein, 1975), uvas pretas (Liao e Luh, 1970) e mirtilos (Suomalainen e Keranen, 1961), assim como em vegetais como repolho roxo, batata vermelha, rabanetes e cebolas vermelhas (Fuleki, 1971; Small e Pecket, 1982). A função principal das antocianinas é atrair insetos ou pássaros para a polinização de flores e disseminação de sementes de frutas por animais (Brouillard, 1983).

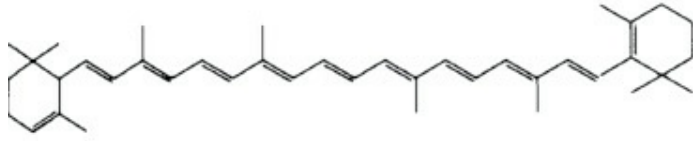
As antocianinas são pigmentos flavonoides cuja estrutura é baseada em núcleos de fenilpropanoides. Elas ocorrem na natureza como glicosídeos nos quais as formas agliconas ou antocianidinas, são substituídas por sais flavilium. A fórmula estrutural do cátion de flavilium é a seguinte:



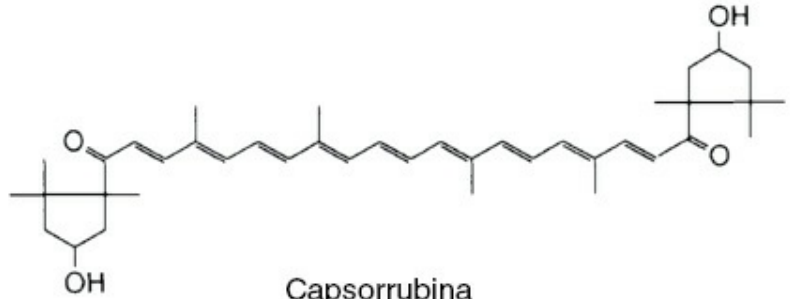
β -Caroteno



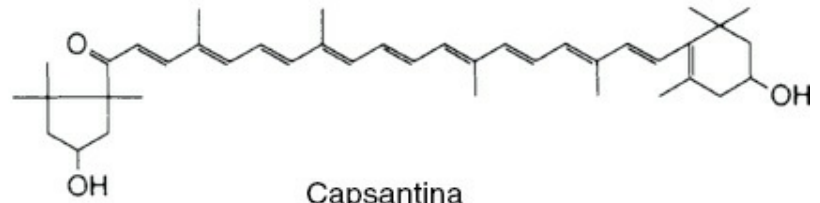
Licopeno



α -Caroteno



Capsorrubina



Capsantina

As antocianidinas, ou agliconas, são um pouco menos estáveis do que os glicosídeos correspondentes. Estes últimos são compostos, basicamente, de 3-glicosídeos e 3,5-glicosídeos. As principais antocianidinas ou agliconas nas frutas estão ilustradas no Esquema 2.16. A d-glicose, d-lactose, L-ramnose e d-xilose são os principais açúcares ligados às antocianidinas na posição-3. A intensidade da cor é determinada pela natureza do pigmento, sua concentração e pH, assim como pela presença de misturas de pigmentos, copigmentos e determinados íons metálicos (Brouillard, 1983). As antocianinas estão dissolvidas na seiva vascular aquosa das células da planta, que é levemente ácida. Estes pigmentos tendem a se tornar mais estáveis quando submetidos a estas condições ácidas. Os diferentes tons nas cores das antocianidinas refletem a natureza de seus padrões de hidroxilação e metoxilação. Um aumento da hidroxilação é acompanhado por uma maior intensidade na cor azul enquanto a metoxilação intensifica a cor vermelha (Braverman, 1963). A distribuição das antocianidinas em algumas frutas comestíveis é mostrada na Tabela 2.7.

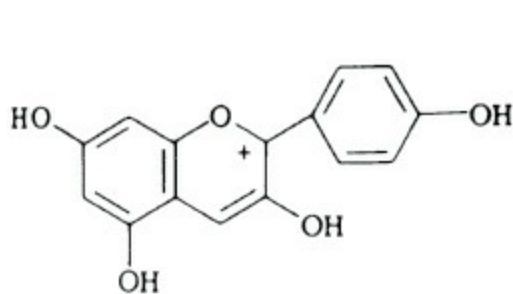
TABELA 2.7 Distribuição de antocianinas em algumas frutas comestíveis

Antocianidina

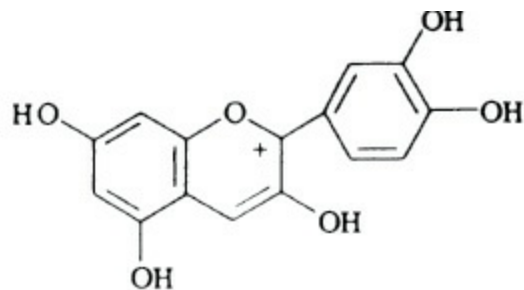
- Cianidina
- Cianidina, delphinidina
- Cianidina, peonidina
- Cianidina, pelargonidina

Fruta

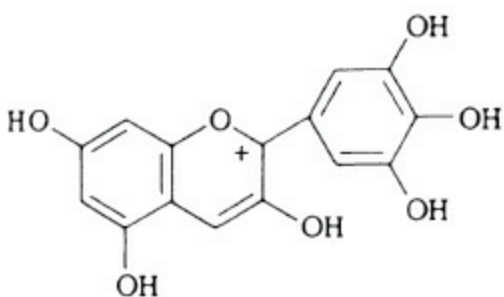
- Amora, ruibarbo
- Groselha preta
- Cereja
- Morango



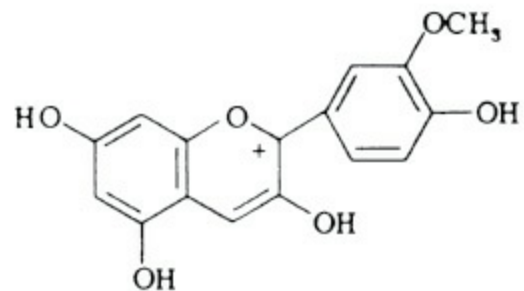
Pelargonidina (cátion 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxylflavilium)



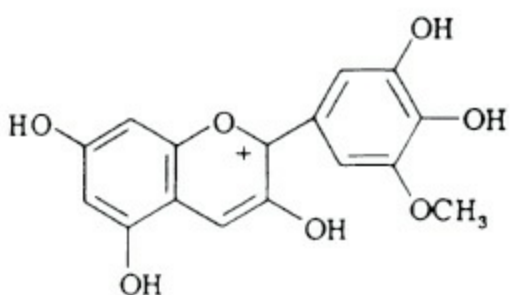
Cianidina (cátion 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxylflavilium)



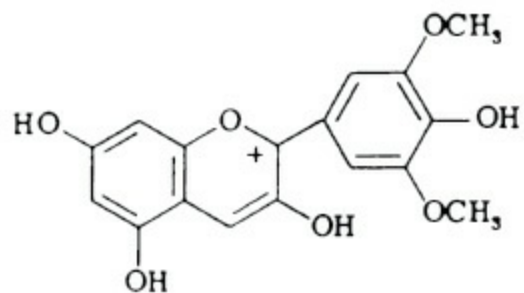
Delfinidina (cátion 3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahydroxylflavilium)



Peonidina (cátion 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxy-3'-metoxyflavilium)



Petunidina (cátion 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxy-5'-methoxyflavilium)



Malvidina dimetoxiflavilium (cátion 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxy-3', 5'-dimetoxiflavilium)

ESQUEMA 2.16 Principais antocianinas de alimentos.

1. Biossíntese de antocianinas

A biossíntese das antocianinas é bem conhecida (Mol *et al.*, 1989; Forkmann, 1991) e seu perfil geral está ilustrado no Esquema 2.17 (Holton e Cornish, 1995). A síntese dos aminoácidos aromáticos nas plantas é realizada pela via do ácido chiquímico. A síntese de todos os flavonoides, inclusive das antocianinas, envolve três enzimas-chave: a chalcona sintase (CHS), a chalcona isomerase (CHI) e a flavonoide 3-hidroxilase (F₃H) (Gou *et al.*, 2011).

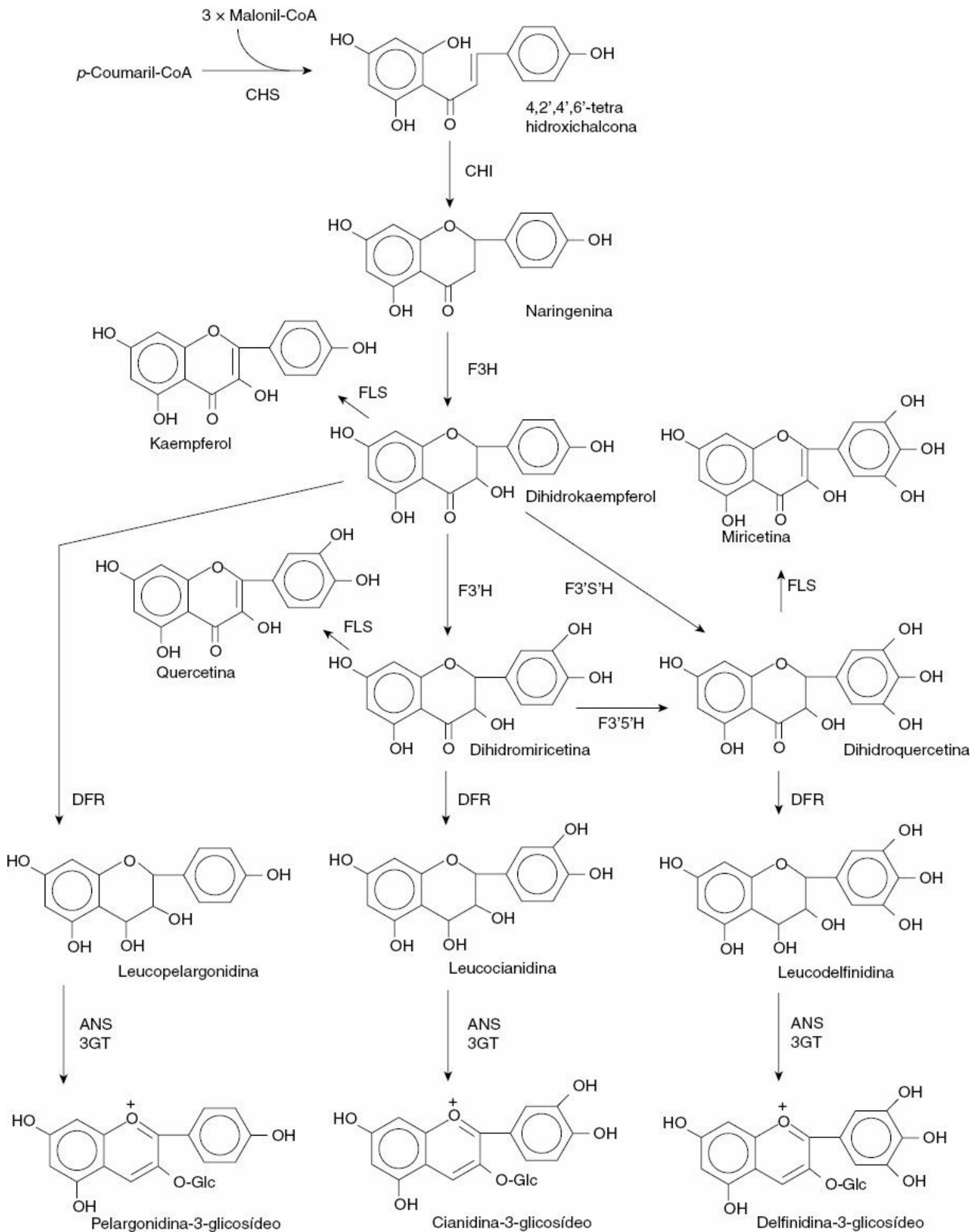
Essas enzimas parecem estar presentes como complexos de enzimas de multiproteínas (conhecidas como metabolonas) canalizando o substrato através de subvias específicas (Winkel, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005). Por exemplo, CHS, CHI, F₃H e dihidroflavonoide-4-redutase (DFR) estão, todas elas, localizadas no retículo endoplasmático em *Arabidopsis* (Lepiniec *et al.*, 2006). A CHS é responsável pela condensação, passo a passo, do precursor fenilpropanoide, o *p*-coumaril-CoA, com três moléculas de malonil-CoA para formar a tetrahydroxichalcona. A próxima enzima, CHI, isomeriza a chalcona de cor amarela em naringenina sem cor. O

terceiro passo, a formação de dihidrokaemferol, é catalisado por F₃H. O CHI é responsável pela formação do anel heterocíclico de seis C da flavonona, que foi isolada pela primeira vez por Moustafa e Wong (1967). Em seguida, três outras enzimas catalisam a conversão de dihidroflavonóis em antocianinas. O DFR reduz o dihidroflavol para flavan-3,4-ci-dióis (leucoantocianidinas) que, em seguida, sofrem oxidação, desidratação e glicosilação para formar vários pigmentos de antocianinas, perlogonidinas cor de tijolo vermelho, cianidina vermelha e delphinidina azul (Holton e Cornish, 1995).

O primeiro gene envolvido na biossíntese de flavonoides foi o gene CHS isolado da salsa (Kreuzaler *et al.*, 1983). Esse fato levou ao isolamento de clones de dois genes CHS diferentes nas petúnias (Reif *et al.*, 1985). Entre os 12 diferentes genes CHS identificados posteriormente nas petúnias apenas 4 parecem ser expressos (Koes *et al.*, 1989). Nas duas últimas décadas o controle da transcrição da biossíntese dos flavonoides tem sido extensivamente estudado (Broun, 2005). Estudos genéticos têm identificado várias classes de reguladores de transcrição (Rubin *et al.*, 2009). Para informações mais detalhadas sobre os reguladores da biossíntese da antocianina é recomendado o texto de Gou *et al.* (2011).

2. Antocianinas: efeito do processamento

As antocianinas são geralmente instáveis durante seu processamento, com uma perda total de cor durante o enlatamento, o engarrafamento e outras operações térmicas de processamento. Frutas e vegetais contêm muitas enzimas capazes de descolorir antocianinas; no entanto, podem ser inativadas pelo branqueamento. Estas enzimas incluem polifenoloxidase, antocianase e peroxidase (Grommeck e Markakis, 1964; Peng e Markakis, 1963; Sakamura *et al.*, 1966). Além das enzimas, estresses térmicos, pH, oxigênio e luz têm sido apontados como aceleradores da degradação da antocianina (Eskin, 1979; Brouillard, 1983; Hubbermann, 2005; Bordignon *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2009; Patras *et al.*, 2010). Uma pesquisa recente de Hillman *et al.* (2011) apontou que a degradação das antocianinas no suco e concentrado de uva aumentou com o aumento da temperatura e da concentração do suco. No entanto, destes, o pH é o fator mais importante que afeta a estabilidade da antocianina (Mazza e Brouillard, 1987).



ESQUEMA 2.17 Processo de biosíntese de antocianina e de flavonoide. Holton e Cornish (1995).

As antocianinas são estáveis em condições ácidas apesar de sistemas modelos demonstrarem que, na maioria

dos casos, estão nas formas sem coloração. A capacidade das antocianinas em reter suas cores nas plantas é atribuída à formação de complexos com compostos fenólicos, ácidos nucleicos, açúcares e aminoácidos, assim como íons metálicos como cálcio, magnésio e potássio (Brouillard, 1983). Muitas antocianinas aciladas têm sido identificadas em flores que possuem extraordinária estabilidade em soluções neutras ou fracamente ácidas. Um desses pigmentos isolados em pétalas de campânulas chinesas (*Platycodon grandiflorium*) é a platiconina (Saito *et al.*, 1971). Sua estrutura foi confirmada posteriormente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H (NMR) (Goto *et al.*, 1983). Os dois grupos de acil dessa antocianina, um localizado acima do anel de pirílio e o outro abaixo dele, resultam em estabilidade em soluções neutras. A presença de dois ou mais resíduos de acil ligados a açúcares parece fornecer uma ótima estabilidade de cor em condições neutras (Mazza e Brouillard, 1987). Antocianinas aciladas têm sido, desde então, identificadas em muitas frutas e vegetais incluindo a cebola vermelha, repolho roxo, batatas-roxas, brócolis, cenouras pretas, rabanetes, batatas-doces roxas e uvas (Giusti e Wrolstadt, 2003; Stintzing e Carle, 2004; Pliszka *et al.*, 2009). Sua estabilidade aumentada os torna muito atrativos como colorantes de alimentos. Terahara *et al.* (2004) identificaram quatro antocianinas aciladas nos calos induzidos de batatas-doces roxas (*Ipomoea batatas* L.) estocadas. Todos exibiram alta estabilidade em pH neutro assim como maior capacidade para remoção de radicais, testada com DPPH, quando comparadas com as antocianinas não aciladas correspondentes.

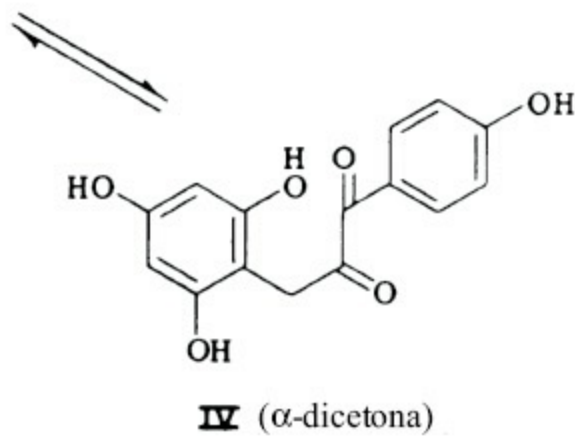
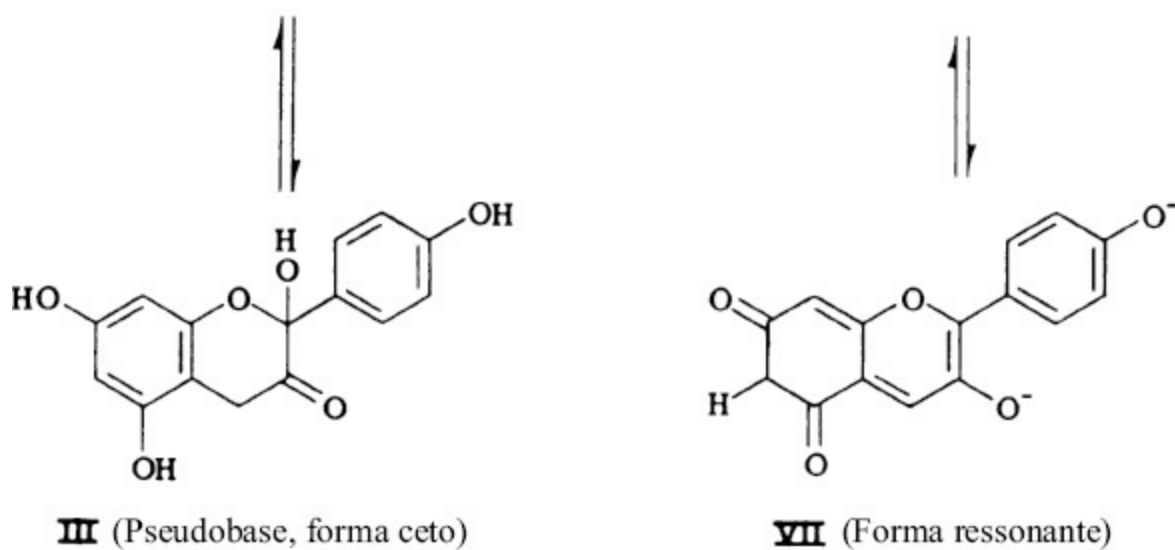
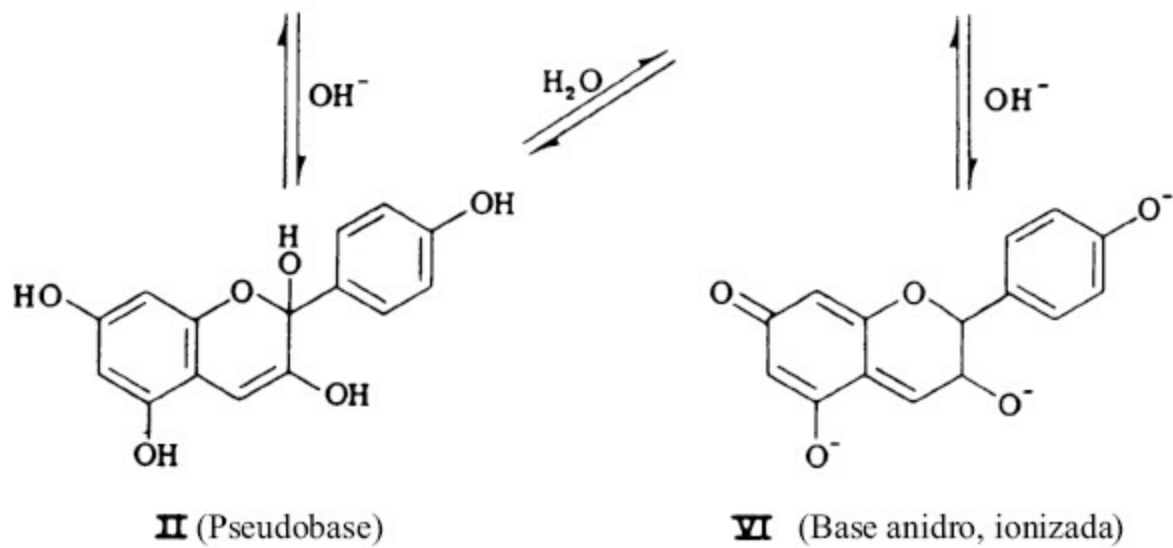
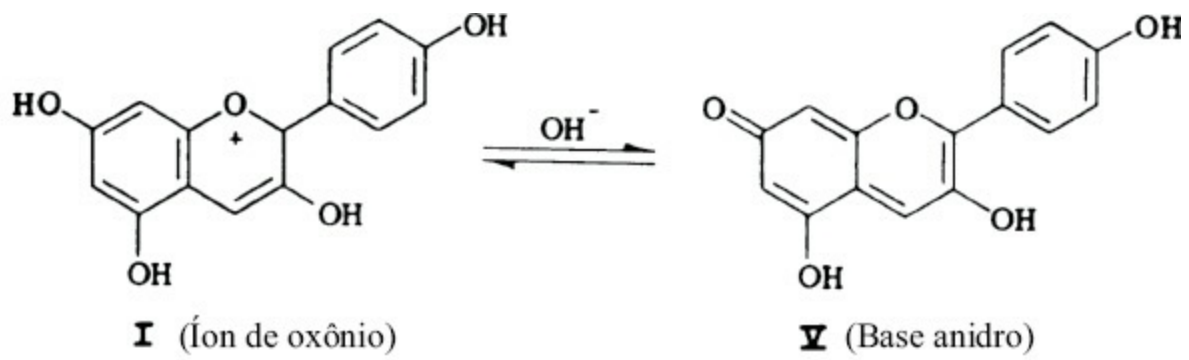
O efeito do pH na coloração das antocianinas é bem conhecido. Harper (1968) demonstrou que o cloreto de perlargonidina é bastante estável na faixa de pH 1-3 e é encontrado como íon de oxônio vermelho-intenso (I). À medida que o pH aumenta em direção à neutralidade, foi observada uma perda da cor vermelha decorrente da formação de uma pseudobase sem cor (II), que fica em equilíbrio com sua forma ceto (III). Esta última, por sua vez, sofre abertura do anel formando α -dicetona (IV), na faixa de pH 3-7. Acima de pH 7, a base de anidro (V) passa a predominar, produzindo uma cor púrpura que rapidamente se descolore abaixo de pH 7 pela formação da pseudobase (II) e α -dicetona. Ao aumentar o pH para condições mais alcalinas a cor púrpura altera-se de malva para azul como consequência da formação de base anidro ionizado (VI). A formação de um precipitado marrom deve-se à degradação da cetona, responsável pela descoloração de frutas que contêm antocianina durante estocagem prolongada (Esquema 2.18).

Gonnet (1998), porém, demonstrou que variações espectrais para descrever as mudanças de coloração em soluções de antocianina, quando afetadas por pH, devem incluir a curva espectral inteira e não somente o seu λ_{max} visível. A descrição da coloração deve incluir também três estímulos de cor que são atributos do tom, saturação e luminosidade. Enquanto a escala CIELAB tem sido descrita com uma ampla escala de cores, sucos, extratos e flores, além de algumas antocianinas puras, Torskangerpoll e Anderson (2005) notaram que nenhum trabalho tinha sido realizado sobre a variação da coloração durante as estocagens prolongadas de antocianinas em toda a escala de pH. Esses pesquisadores estudaram, por exemplo, o efeito da substituição 5-glicosídica e acilação aromática na estrutura da antocianina, na estabilidade da cor depois de 98 dias de estocagem a 10°C, na faixa de pH de 1,1-10,5. Nessas condições, três pigmentos da antocianina foram analisados: a cianidina 3-glicosídeo, a cianidina-3-(2'-glucosilglucosídeo)-5-glicosídeo e cianidina-3-(2'-(2'-sinapoilglucosil)-6'-sinapoilglucosídeo)-5-glicosídeo. Os autores confirmaram a importância da estrutura na determinação das propriedades das antocianinas, uma vez que a antocianina acilada demonstrou ter maior estabilidade em todos os valores de pH exceto em pH 1,1 e em condições mais alcalinas. Com pH 1,1 todos os pigmentos mantiveram a coloração durante o armazenamento, enquanto todos apresentaram grandes alterações na coloração quando sujeitos a condições mais alcalinas.

VI. TEXTURA

A textura de frutas e vegetais depende da estrutura e organização da parede celular das plantas e das substâncias de

cimentação intercelular (Eskin, 1979). A arquitetura da parede da célula foi estudada por muitos pesquisadores e os resultados sugerem que ela é composta por fibrilas de celulose localizadas em uma matriz de substâncias pécticas, hemicelulose, proteínas, ligninas, solutos de baixa massa molecular e água (Van Buren, 1979). Em plantas comestíveis a parede primária da célula é de interesse vital uma vez que a parede celular secundária está virtualmente ausente nas frutas maduras (Nelmes e Preston, 1968). De fato, a parede celular primária fornece a maior parte das fibras de nossa alimentação (Jarvis, 2011). Durante a maturação das frutas, a perda de textura resulta da deterioração dos constituintes da parede celular primária. Tal fato contrasta fortemente com a maturação dos vegetais, que é acompanhada por um endurecimento dos tecidos. Este fenômeno descoberto nos vegetais ocorre por causa do desenvolvimento da parede celular secundária nos vegetais, o que contribui para uma textura mais dura e fibrosa em consequência da deposição de linhina.



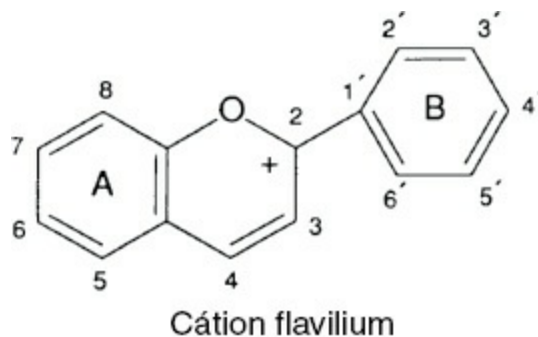
A. Parede celular

As paredes celulares das plantas são compostas, principalmente, por carboidratos complexos (Northcote, 1963; Jarvis, 2011). A presença de uma fração de proteína foi descoberta posteriormente na parede celular primária nas plantas (Lamport, 1965). Pela complexidade da parede celular, vários modelos foram propostos, incluindo o primeiro modelo completo, o de Keegstra *et al.* (1973). Esses modelos tendem a levantar mais questões do que respostas, na medida em que nenhum descreve a estrutura da parede celular adequadamente. A abordagem geral tem sido obter fragmentos hidrolisados, caracterizá-los e reconstruir os fragmentos individuais. Pesquisas anteriores sugeriam que proteínas ricas em hidroxiprolina estão ligadas covalentemente às substâncias pécicas pela fração de hemicelulose xiloglucana (Hayashi, 1989). Desde então, três famílias principais que incluem glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) foram identificadas (Kieliszewski e Shpak, 2001). Alterações da textura que ocorrem durante a maturação das frutas são consequência, principalmente, de alterações enzimáticas na arquitetura da parede celular. A substância mais afetada é a lamela média, um cimento intercelular existente entre as células adjacentes da parede celular primária e que é particularmente rica em substâncias pécicas.

1. Componentes da parede celular

a. Polissacarídeos

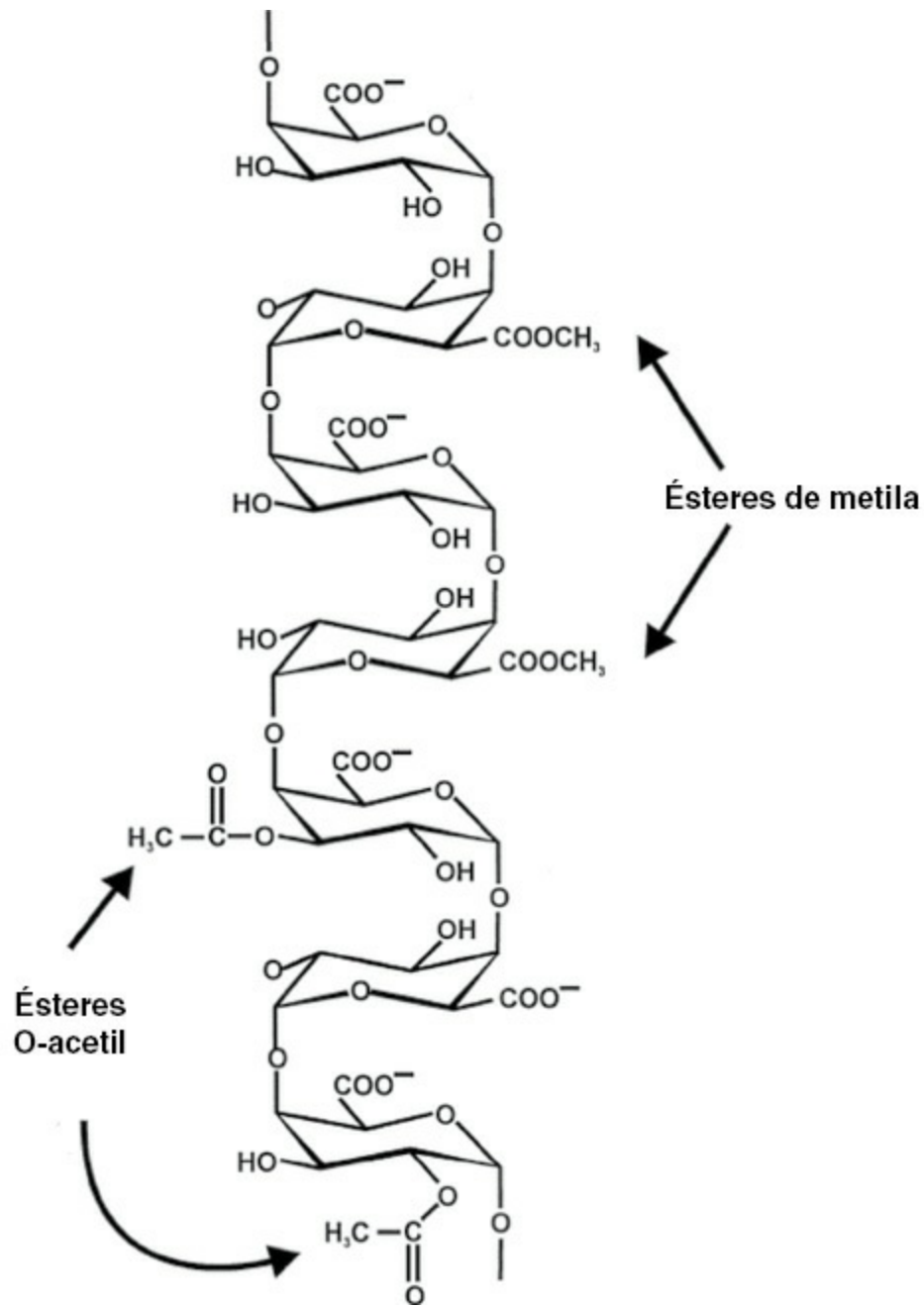
Um constituinte importante da parede celular primária de plantas superiores é a celulose. Está presente como agregado linear ou microfibrilas de aproximadamente 36 cadeias de β -1,4-glucanas de cerca de 3 nm de diâmetro (Somerville, 2006). As cadeias individuais são mantidas juntas por pontes de hidrogênio através de grupos de hidroxil do carbono-6 de uma cadeia de celulose com oxigênios glicosídicos das cadeias adjacentes (Northcote, 1972). No interior das microfibrilas há regiões altamente organizadas ou cristalinas assim como algumas regiões amorfas. A celulose serve como um esqueleto que liga outros componentes da parede celular (Lerouxel *et al.*, 2006). Para o aprofundamento sobre a estrutura da celulose e da biossíntese recomendam-se as seguintes revisões: Doblin *et al.* (2003); Hayashi *et al.* (2005); Saxena e Brown (2005) e Joshi e Mansfield (2007).



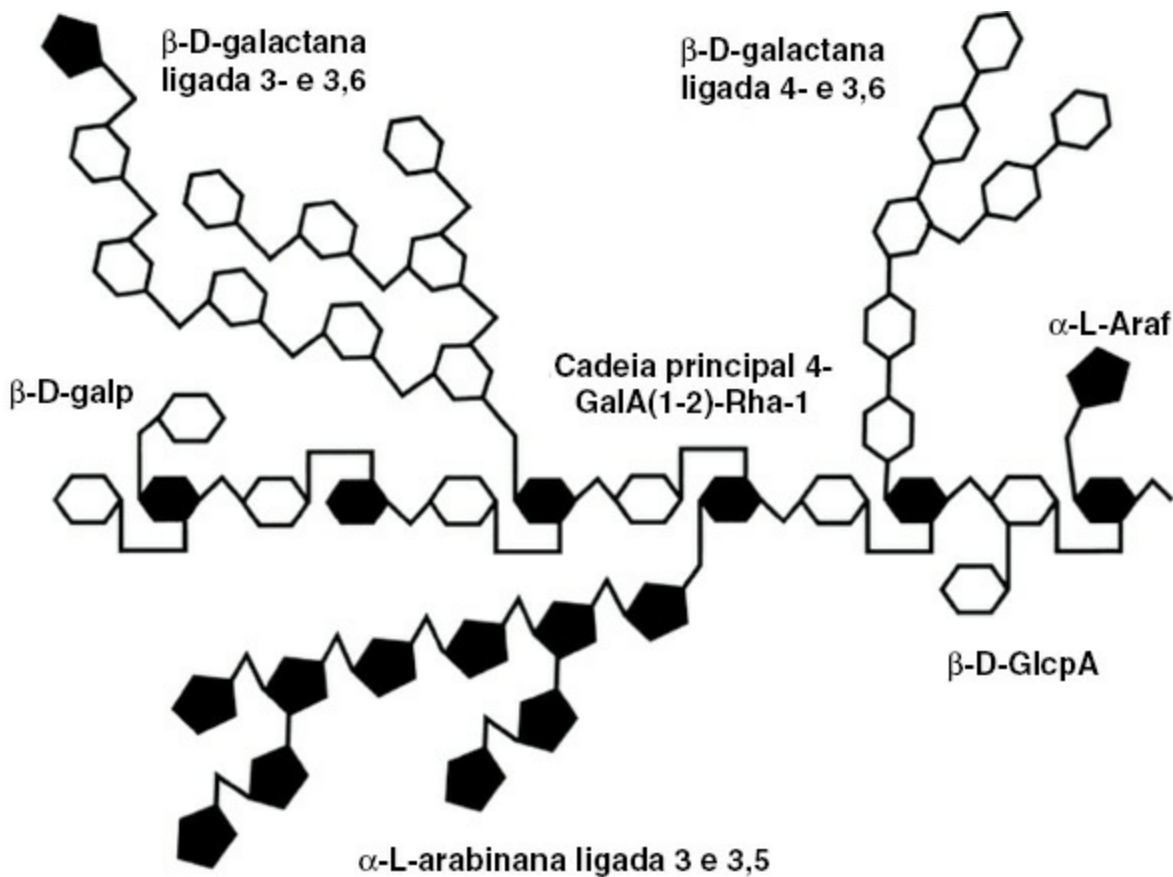
b. Substâncias pécicas

As substâncias pécicas constituem um terço das substâncias secas da parede celular primária de frutas e vegetais (Van Buren, 1979). Trata-se de polissacarídeos complexos que incluem os domínios da homogalacturona (HG) e da ramnogalacturona I (RG-I) contendo também pequena quantidade de ramnogalacturona II (RG-II) (Lerouxel *et al.*, 2006). A estrutura básica da HG, que é responsável por mais de 60% das pectinas das paredes das células, consiste em um polímero de ácido α -1,4-d-galaturônico no qual alguns dos grupos de carboxila são esterificados

por metila (Esquema 2.19) (Ridley *et al.*, 2001). Em algumas plantas a HG pode ser composta parcialmente de O-acetilado no O₂ e O₃ (Ishii, 1995, 1997). A HG é ligada covalentemente a RG-I e RG-II e foi sugerido como hipótese de que é unida por ligações covalentes cruzadas à fração de hemiceluloses, a xiloglucana (XG) (Popper e Fry, 2008).



ESQUEMA 2.19 Estrutura primária da homogalacturona. Ridley *et al.* (2001).



ESQUEMA 2.20 Modelo das características estruturais da ramnogalacturona I. Ridley *et al.* (2001).

A parede celular da batata é rica em HG, que é especialmente densa na lamela média (Bush, 2001). A HG das paredes celulares de tomates e mangas parece conter cerca de 35% e 52% de ácido urônico, respectivamente (Muda *et al.*, 1995). O RG-1 é composto de uma cadeia principal de dissacarídeos repetidos nos quais os resíduos de GalpA podem ser acetilados no C2 e/ou C3 (Komalavilas e Mort, 1989) (Esquema 2.20).

A RG-II é, em termos estruturais, muito diferente, com uma cadeia principal de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap-(1}\rightarrow]$ (O'Neill *et al.*, 1990) (Esquema 2.21). Para uma descrição mais detalhada das pectinas, recomendam-se as revisões de Ridley *et al.* (2001) e de Caffall e Mohnen (2009).

c. Hemicelulose

Hemiceluloses, o terceiro grupo heterogêneo de polissacarídeos das paredes celulares das plantas, possuem, todas, cadeia principal do $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$ com uma configuração equatorial (Scheller e Ulvskov, 2010). Os grupos principais presentes em todas as plantas terrestres incluem xiloglucana, xilanas, mananas, glucomananase $\beta\text{-(1}\rightarrow 3,1\rightarrow 4)\text{-glucanas}$. Há algum tempo as galactanas, arabinanas e arabinogalactanas eram também consideradas hemiceluloses. Contudo, Scheller e Ulvskov (2010) apontaram para o fato de que parecem ser parte de moléculas de pectinas e não ter ligações $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$ na estrutura da cadeia principal. A xiloglucana, a principal hemicelulose da paredecelular primária, é um polissacarídeo neutro composto por uma cadeia principal de $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-d-glicose}$ com cadeias laterais ricas de $\alpha\text{-d-xilose}$, $\beta\text{-d-gulactose}$ e, ocasionalmente, alguns resíduos de $\alpha\text{-fucose}$ (Popper e Fry, 2008). Para mais detalhes das hemiceluloses, recomenda-se o artigo de revisão de Scheller e Uvskov (2010).

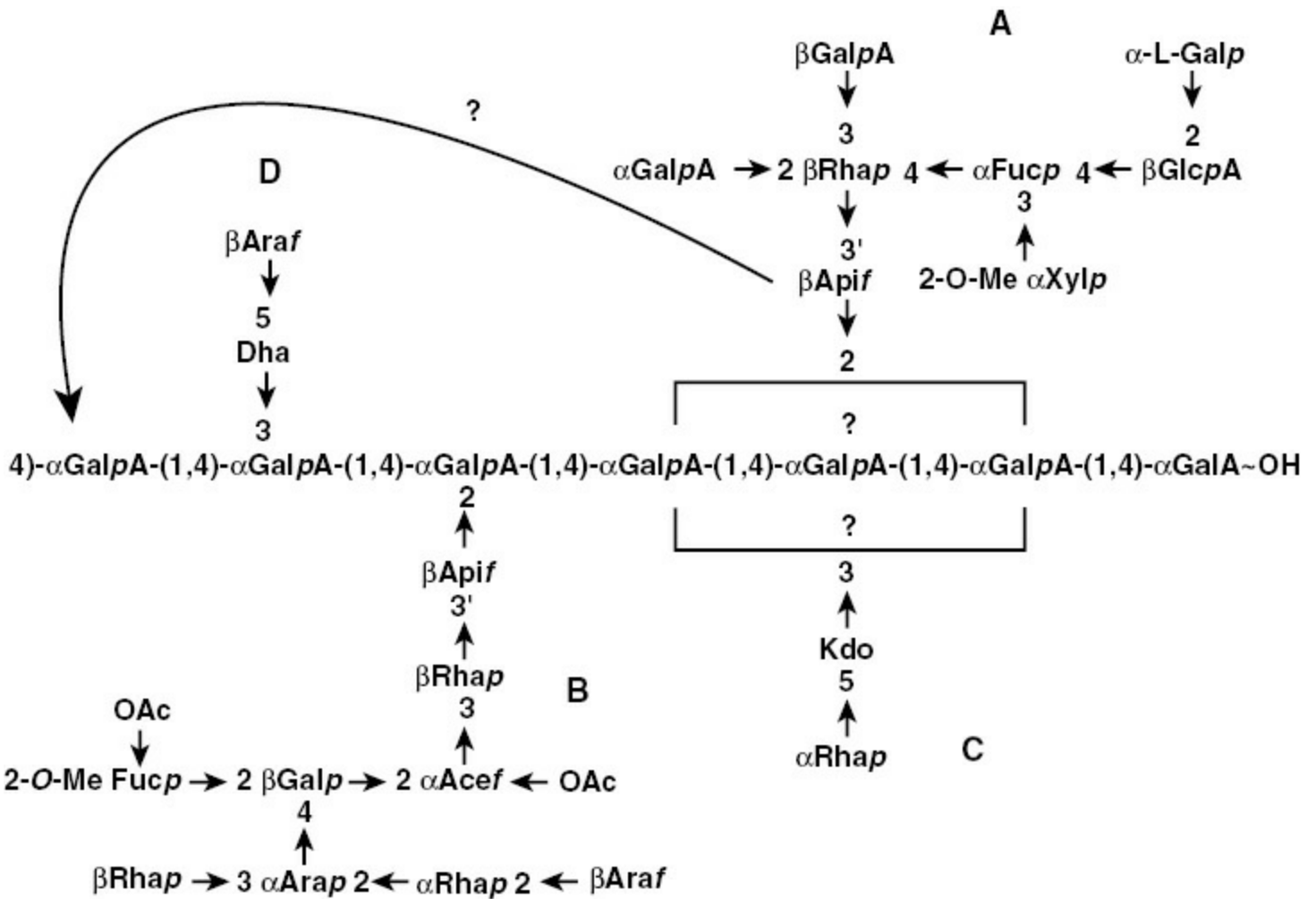
d. Proteínas

As proteínas identificadas na parede celular primária das plantas incluem aquelas ricas em hidroxiprolina. Essa família de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) inclui três grupos principais, as proteínas ricas em

prolina levemente arabinosiladas encontradas com alta frequência e periodicamente (PRPs), as extensinas altamente arabinosiladas encontradas periodicamente e as proteínas arabinogalactana altamente glicosilada, encontradas com menor periodicidade (Kieliszewski e Shpak, 2001). Além de proteínas ricas em hidroxil-prolina e extensina, um terceiro grupo de proteínas foi identificado nas paredes das células das plantas. São as proteínas ricas em glicinas que também fazem parte dos componentes estruturais da parede celular das plantas (Ringli *et al.*, 2001). Uma abordagem proteômica das proteínas da parede celular das plantas foi descrita por Jamet *et al.* (2006).

e. Lignina

A lignina inclui um grande grupo de polímeros aromáticos produzidos por meio do acoplamento oxidativo de 4-hidroxifenilpropanoides (C₆-C₃) (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004). Esses polímeros estão principalmente depositados na parede celular secundária e fornecem força mecânica à parede celular da planta. São responsáveis pelo endurecimento de vegetais como o aipo e o aspargo (Seegerlind e Herner, 1972; Herner, 1973). Para mais detalhes sobre a lignina recomenda-se uma revisão recente de Vanholme *et al.* (2010).



ESQUEMA 2.21 Estrutura primária da ramnagalacturona II. Ridley *et al.* (2001).

f. Biossíntese da parede da célula

Progressos consideráveis foram feitos nas últimas duas décadas sobre a biossíntese dos polissacarídeos complexos e sua deposição na parede da célula das plantas (Lerouxel *et al.*, 2006; Joshi e Mansfield, 2007; Caffall e Mohnen, 2009). Apesar de ainda haver lacunas no conhecimento, temos uma compreensão muito maior de sua regulação (Zhong e Ye, 2007).

A biossíntese das pectinas ocorre no complexo de Golgi, uma organela composta de diversas vesículas achatadas contendo proteínas. O modelo atual da biossíntese das pectinas sugere que açúcares-nucleotídeos são sintetizados no lado citosólico do complexo de Golgi e transportados para o lúmen do complexo por proteínas transportadoras que se estendem pelas membranas ou alternativamente são sintetizadas no lúmen do complexo de Golgi (Scheller *et al.*, 1999; Scheible e Pauly, 2004; Mohnen, 2008; Mohnen *et al.*, 2008). Atividades múltiplas são necessárias para a biossíntese completa da HG, RG-I e RG-II, com envolvimento de muitas glicosiltransferases (GT) (Scheller *et al.*, 1999; Moyne *et al.*, 1999, 2008). Por exemplo, a síntese completa da HG requer vários catalisadores específicos α -1,4-GalAT (HG:GalAT), para transferir d-GalA a partir de UDP-d-GalA para o aumento do polímero HG (Caffall e Mohnen, 2010). O HG:GalAT foi encontrado em tomates e nabos (Lin *et al.*, 1966; Bolwell e Northcote, 1983), ervilhas (Sterling *et al.*, 2001) e abóboras (Ishii, 2002).

Depois de formado, o GHHG pode ser modificado pela adição de grupo metil ao grupo carboxilado C6 ou acetil no O2 e O3 dos resíduos de GalA (Willats *et al.*, 2001). As pectina metiltransferases (PMTs) em seguida agem especificamente nos polissacarídeos pécticos no complexo de Golgi transferindo um grupo metil a partir do doador S-adenosil-metionina (SAM) (Villemez *et al.*, 1966; Kauss *et al.*, 1967; Bruyant-Vannier *et al.*, 1996) e liberando-o na forma altamente metilesterificada (Li *et al.*, 1997; Lennon e Lord, 2001). Múltiplas enzimas PMT são necessárias para a síntese da pectina, uma vez que diferentes isoformas foram descobertas, cada uma delas com pH ótimo de atividade e especificidade quanto ao substrato (Krupkova *et al.*, 2007). Recomenda-se, para um aprofundamento sobre a biossíntese da RG-I e RG-II, o artigo de Caffall e Mohnen (2009).

A biossíntese da glucana do tipo celulose (1 \rightarrow 4) envolve várias enzimas do citosol e enzimas ligadas a membranas que produzem, principalmente, UDP-glicose. Estas últimas fornecem o principal substrato para a celulose sintase (Carpita e McCann, 2000). Foram encontradas duas vias que produzem diretamente a UDP-glicose (Joshi e Mansfield, 2007). Na primeira via, a sacarose é clivada pela sacarose sintase, liberando UDP-glicose e frutose. A segunda via é muito mais dependente do acúmulo hexose fosfato com UDP-glicose pirofosforilase (UGPase) fosforilando a glicose 1-fosfato. Existe uma alternativa, um caminho indireto para a produção de UDP-glicose por meio da hidrólise da sacarose pela invertase. Independentemente de como a UDP-glicose é produzida, ela é em seguida utilizada pela glicosiltransferase para formar o polímero de celulose. Esta enzima é conhecida pela capacidade de inversão, já que o resíduo de glicosil na UDP-glicose está na configuração α , que deve ser convertida para ligação β , exclusiva da celulose (Guerriero *et al.*, 2010). Um grande progresso no entendimento da biossíntese da parede celular foi a identificação dos genes que codificam a celulose sintase (*Ces*) na fibra de algodão (Pear *et al.*, 1996; Delmer, 1999). A celulase sintase (*Ces*) foi identificada, em seguida, em outras plantas superiores. Recomendam-se, para um aprofundamento da biossíntese da celulose, incluindo a formação das microfibrilas, os seguintes artigos de revisão: Lerouxel *et al.* (2006), Joshi e Mansfield (2007) e Guerriero *et al.* (2010).

2. Degradação da parede celular

O amolecimento das frutas durante a maturação é atribuído a alterações na pectina (Kertesz, 1951; Hobson, 1967; Tavakoli e Wiley, 1968; Pressey *et al.*, 1971). Isto é caracterizado por um declínio do teor da pectina insolúvel (protopectina) com um aumento concomitante das substâncias pécticas solúveis (Ben-Arie *et al.*, 1979). Protopectina é o nome genérico atribuído às substâncias da pectina de alta massa molecular insolúvel à água em frutas imaturas. Pouco se sabe sobre este polímero além do fato de sua hidrólise liberar, durante a maturação, poliuronídeos solúveis, pectinas e ácidos pectínicos (Worth, 1967; Eskin, 1979; John e Dey, 1986). Esses ácidos são polímeros ácidos poligalaturônicos que variam em seu grau de metilação. O material péctico localizado na lamela média é muito diferente daquele encontrado na parede celular primária e consiste em substâncias pécticas em estado livre ou como pectato de cálcio correspondentes (Eskin, 1979). A degradação da pectina solúvel fracamente ligada é responsável pelo amolecimento das frutas durante a maturação (Doreyappa *et al.*, 2001). As enzimas que

degradam pectinas são classificadas de acordo com seu modo de ação na pectina ou nas substâncias pécnicas e incluem poligalacturonases (PG) (EC 3.2.1.15), pectina metilesterases (PM) (EC 3.1.1.11) e pectina liase e pectatoliase (PL) (EC 4.2.2.2) (Sakai *et al.*, 1993; Wong, 1995; Chauhan, 2001).

a. Poligalacturonases

A poligalacturonase (PG), uma importante glicanase pectolítica, foi inicialmente implicada no amolecimento da fruta durante a maturação (Poovaiah e Nukuya, 1979). É considerada a principal enzima responsável pela dissolução da lamela média durante a maturação (Jackman e Stanley, 1995; Voragen *et al.*, 1995). Uma vez que o substrato preferido dessas enzimas é a d-galacturonana, Rexova-Benkova e Markovic (1976) referem-se a elas como d-galacturonases. Essas enzimas foram encontradas em várias frutas, incluindo pêssegos (Pressey e Avants, 1973a), peras (McCready e McComb, 1954; Pressey e Avants, 1976; Bartley e Knee, 1982) e tomates (Foda, 1957; Patel e Phaff, 1960a, b; Hobson, 1964). A atividade dessas enzimas aumenta durante o processo de maturação, quando hidrolisa material pécnico da lamela média e das paredes celulares (Hobson, 1965; Pressey, 1977). A alteração na atividade de poligalacturonase durante a maturação de pêssegos é ilustrada na Figura 2.10. Pressey *et al.* (1971) verificaram que o aumento na atividade enzimática foi acompanhado por um aumento na pectina solúvel em água e no amolecimento da fruta.

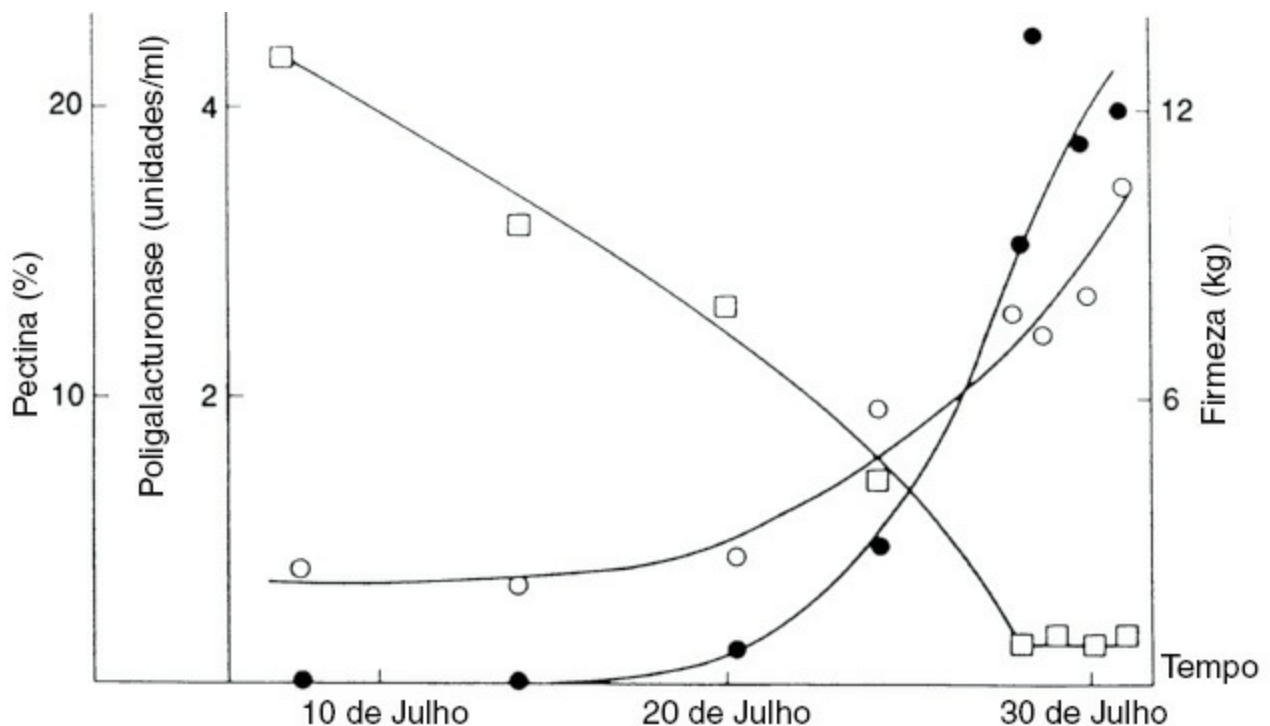
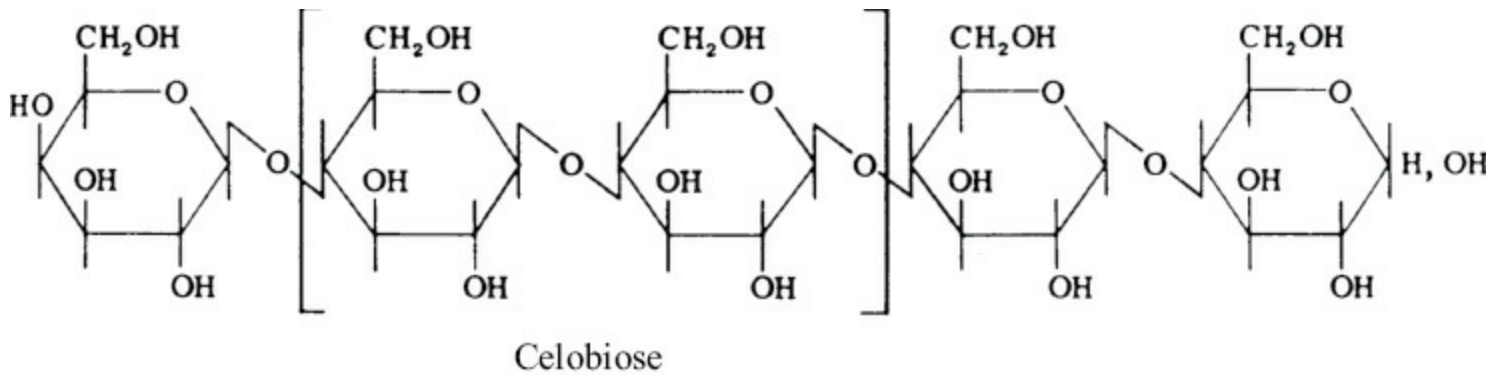
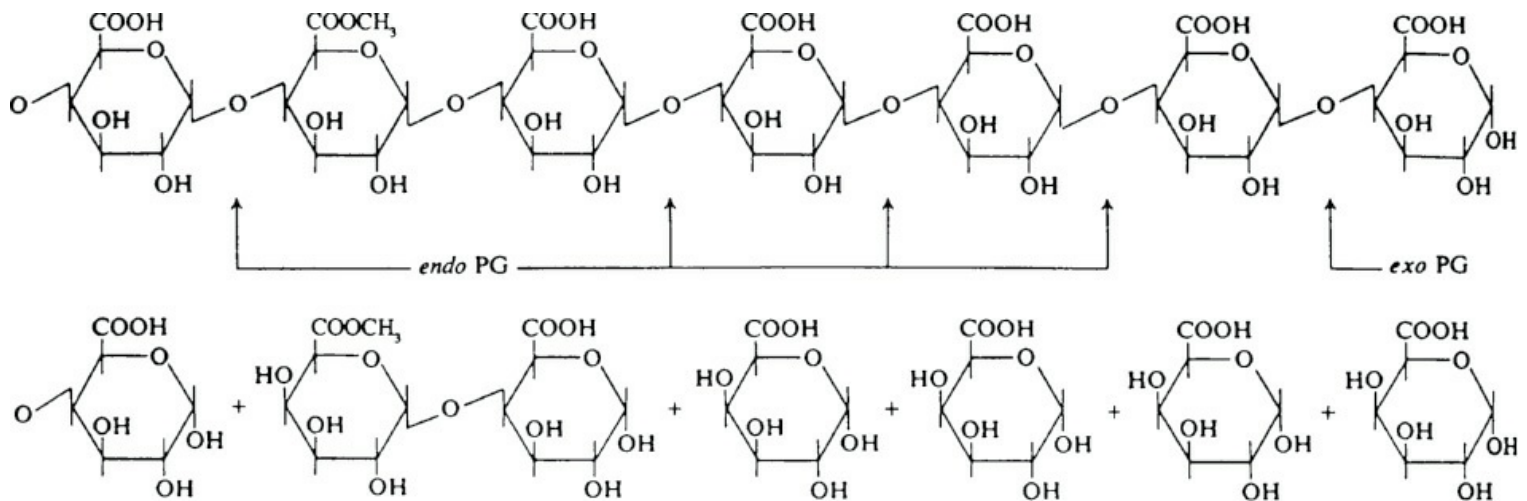


FIGURA 2.10 Alterações na firmeza (□), atividade PGA (●) e pectina solúvel em água (○) em pêssegos Elberta. Pressey *et al.* (1971). Copyright ©: Institute of Food Technologists.

Dois tipos de poligalacturonases ou d-galacturonases foram identificados, o endo e o exo. O primeiro hidrolisa aleatoriamente as ligações glicosídicas na molécula da pectina enquanto a exoenzima atua a partir da extremidade da molécula da pectina (Esquema 2.22). Na presença da endopoligalacturonase, as moléculas de pectina degradam-se rapidamente em unidades menores acompanhadas por uma diminuição significativa de viscosidade. Ambas as formas da enzima são encontradas em peras (Pressey e Avants, 1976; Bartley e Knee, 1982) e pêssegos (Pressey e Avants, 1978). No entanto, algumas espécies de frutas não possuem nenhuma endo-PG detectável, incluindo maçãs (Brackmann *et al.*, 1996; Goulao *et al.*, 2007), morangos (Abeles e Takeda, 1990) e uvas (Nunan *et al.*, 2001). O maior grau de amolecimento reportado por Pressey e Avants (1978) em pêssegos “freestone” se comparados com pêssegos “clingstone” foi atribuído à ausência de endopoligalacturonase na fruta de tipo “clingstone”. A degradação aleatória da pectina pela endopoligalacturonase junto com a exopoligalacturonase solubilizou rapidamente a pectina nos pêssegos “freestone”. A ausência de endopoligalacturonase em pêssegos “clingstone” foi evidenciada pela maior retenção de protopectina durante a maturação.



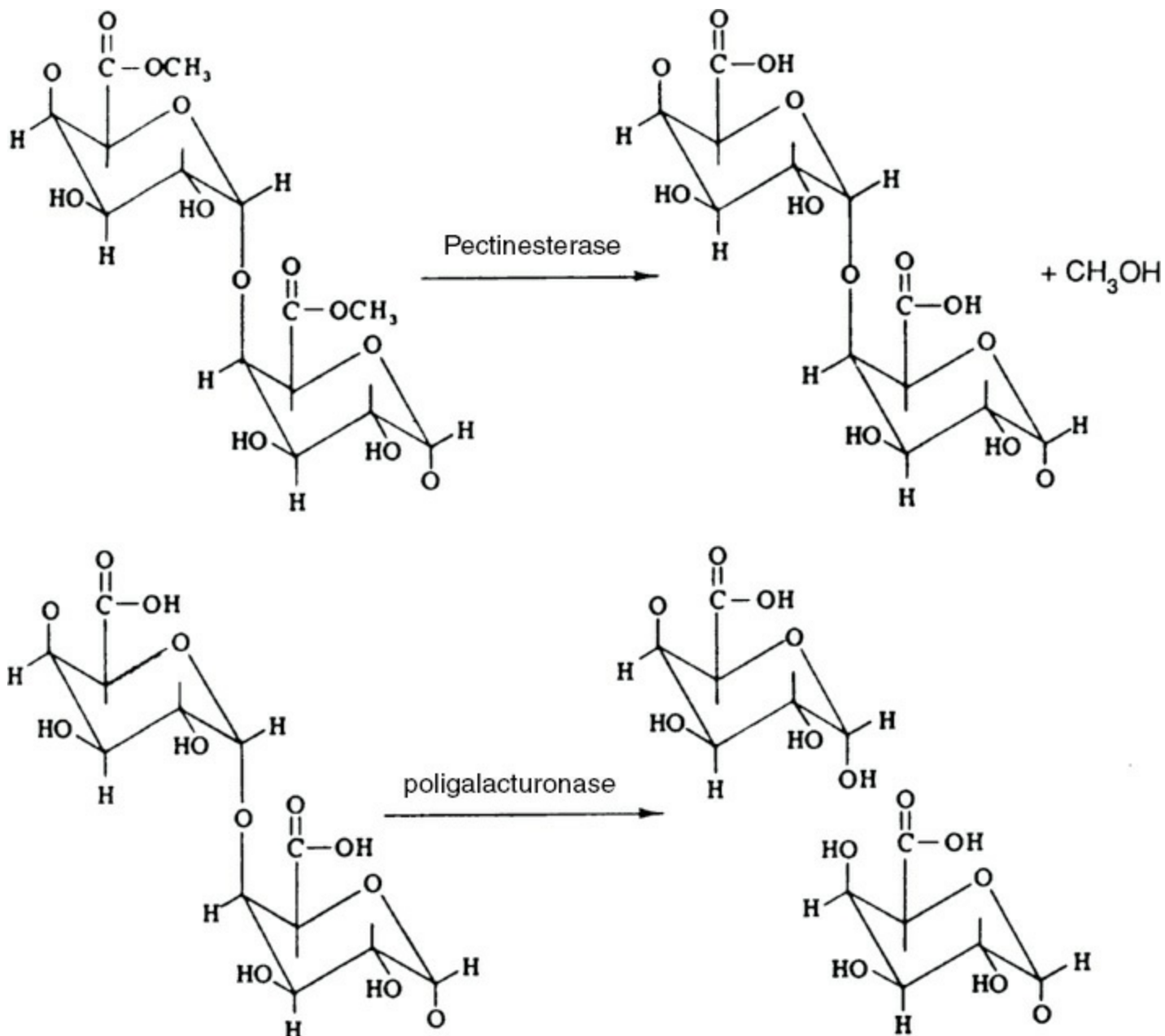
ESQUEMA 2.22 Ação das exo e endogalacturonases.

As exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67) foram identificadas em pêssegos (Pressey e Avants, 1973a), peras (Pressey e Avants, 1976), pepinos (Pressey e Avants, 1975; McFeeters *et al.*, 1980) e bananas (Markovic *et al.*, 1975). A exopoligalacturonase é a única d-galacturonase encontrada em maçãs e é responsável pela liberação de ácido galacturônico e poliuronídeos (Bartley, 1978). Estudos usando paredes celulares isoladas de tomates (Wallner e Bloom, 1977; Gross e Wallner, 1979; Themmen *et al.*, 1982) e peras (Ahmed e Labavitch, 1980) demonstraram que as endopoligalacturonases têm papel importante na degradação da pectina durante a maturação. A liberação do polímero solúvel em água (WSP) com massa molecular de 20.000 contendo ácidogalacturônico e ramnose por endopoligalacturonase da parede celular de tomates vermelhos foi relatada por Gross e Wallner (1979) como idêntica ao polímero liberado pela mesma enzima da parede celular de tomates verdes completamente desenvolvidos. Enquanto a atividade de poligalacturonase em tomates vermelhos maduros segue predominantemente a forma endo, é a forma exo que prepondera nas frutas verdes correspondentes (Pressey e Avants, 1973b; Tucker *et al.*, 1980). Apesar de a exopoligalacturonase representar apenas uma pequena fração da atividade de poligalacturonase, foi encontrada durante a maturação de tomates em teores bastante constantes. Pressey (1987) sugeriu, portanto, que é pouco provável que a exopoligalacturonase tenha um papel importante na degradação da pectina, mas pode ter outro papel no crescimento e desenvolvimento do tomate.

As isoenzimas da PG têm sido identificadas em uma vasta gama de frutas incluindo bananas (Pathak e Sanwal, 1998), morangos (Nogota *et al.*, 1993) e pêssegos (Pressey e Avants, 1973a). Duas isoformas de endo-PG, PG₁ e PG₂, foram encontradas em tomates (Pressey e Avants, 1973b). Estudos subsequentes realizados por Tucker *et al.* (1980) sugeriram que a PG₁ é um dímero da PG₂. Trabalhos posteriores de Pressey (1986a; 1986b) propõem que a PG₁ é uma combinação da PG₂ e uma subunidade β.

b. Pectina metil esterase: pectinesterase

Pectina metil esterases (PMs), ou pectinesterases, são amplamente distribuídas em diversas frutas, incluindo bananas (Buescher e Tigchelaar, 1975), pêssegos (Nagel e Patterson, 1967) e morangos (Barnes e Patchett, 1976). Há muita confusão em torno das primeiras pesquisas sobre a PM durante a maturação. Por exemplo, Hultin e Levine (1965) notaram um aumento na atividade da PM durante a maturação de bananas que não foi observada por De Swardt e Maxie (1967) quando estes usaram polivinilpirrolidina (PVP) para remover polifenóis. Brady (1976) também encontrou poucas alterações na atividade da PM em extratos de banana após a adição de 2-mercaptobenzotiazol, potente inibidor da polifenoloxidase da banana. Posteriormente, Awad e Young (1980) verificaram que PVP suprime a atividade da PM, apesar de nenhum efeito inibidor ter sido exercido pelos fenóis endógenos. As PMs não parecem ter papel maior no amolecimento das frutas uma vez que é encontrada em altos teores em frutas não desenvolvidas como tomates e bananas, antes da maturação (Barnes e Patchett, 1976; Brady, 1976; Pressey e Avants, 1982a; Tucker *et al.*, 1982). No caso de abacates, ocorre uma forte queda na atividade de PME imediatamente anterior à maturação, fato que foi relatado como um índice útil da maturidade das frutas (Zauberman e Schiffman-Nadel, 1972). Uma diminuição na atividade da PM da ordem de 50% antes do climatério provou ser um indicador confiável do tempo do amolecimento quando estocado em atmosferas controladas (Barmore e Rouse, 1976). Uma queda de 80% na atividade de PME também foi observada em abacates por Awad e Young (1980).



A opinião tradicional sobre a PM é de desesterificação das galacturonas da parede celular seguida pela ação da poligalacturonase. Vários pesquisadores (Dahodwala *et al.*, 1974; Rexova-Benkova e Markovic, 1976) verificaram que a desesterificação das galacturonas aumenta a atividade das endo e exopoligalacturonases. O estímulo das endopoligalacturonases nos tomates pela PM foi relatado por Pressey e Avants (1982b), apesar de tais enzimas serem capazes de hidrolisar substratos de pH 3,5 altamente esterificados. A presença de pectina com altos níveis de metilação durante a maturação de abacates (Dolendo *et al.*, 1966), maçãs (Knee, 1978) e pêssegos (Shewfelt *et al.*, 1971) indica que a PM tem um papel bastante limitado no amolecimento das frutas. Ben-Arie e Sonogo (1980) atribuíram o desenvolvimento da lanosidade em pêssego durante a estocagem refrigerada à inibição da atividade da poligalacturonase e ao aumento da PM. Esse fenômeno foi atribuído à falta de capacidade dos pêssegos de sofrer alterações de textura desejáveis associadas ao desenvolvimento normal. Pesquisas desenvolvidas por von Mollendorff e De Villiers (1988), no entanto, demonstraram que a causa principal da lanosidade nos pêssegos é o súbito aumento no teor de poligalacturonase, enquanto o papel do PME não foi esclarecido. Apesar disso, a causa da lanosidade nos pêssegos continua confusa, já que algumas pesquisas a associaram com o aumento na atividade da PM (Brummell *et al.*, 2004; Girardi *et al.*, 2005), com uma diminuição da atividade da PM (Buescher e Furmanski, 1978; Ben-Arie e Sonogo, 1980) ou ainda com a falta de expressão da PM (Obeland e Carroll, 2000; Zhou *et al.*, 2000).

Esses debates evidenciam que o amolecimento das frutas ocorre por causa de alterações na composição da parede celular das frutas, mediadas pela atividade combinada das poligalacturonases e da PME. Isto resulta na liberação de poliuronídeo solúvel aliada à diminuição da massa molecular do polímero de poliuronídeo (Gross e Wallner, 1979; Huber, 1983; Seymour *et al.*, 1987a). A ação da poligalacturonase, como já discutido previamente, pode ser limitada às regiões demetiladas da poligalacturona, que ocorre pela ação da PM. A produção estimulada de poliuronídeos foi reportada por Pressey e Avants (1982b) em paredes celulares isoladas de tomates verdes completamente desenvolvidos, quando na presença de PME. Seymour *et al.* (1987a), utilizando preparações de parede celular com as enzimas inativadas com o objetivo de eliminar o efeito de quaisquer enzimas endógenas, descobriram que a separação do poliuronídeo foi muito mais baixa *in vivo* do que *in vitro*. O fato de a pectina não ter sido completamente desesterificada, apesar dos altos teores de PM, sugerem que essa enzima pode ficar restrita quando *in vivo*. Estudos posteriores por Seymour *et al.* (1987b) em tomates também evidenciaram baixa solubilização dos poliuronídeos *in vivo*, fato que foi atribuído à restrição da ação da PM. A liberação de oligômeros de dois tamanhos, junto com ácido galacturônico, sugere que a ação pectolítica combinada não foi completamente aleatória. Esses pesquisadores indicaram a importância da identificação de tais oligômeros *in vivo* depois da descoberta recente de elicitadores na parede celular.

c. Liase péctica

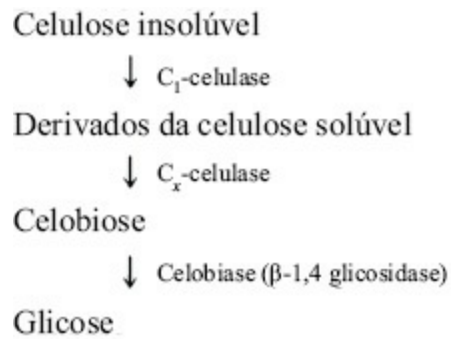
A liase péctica (PL), a [poli(1,4- α -dgalacturonídeo) liase EC 4.2.2.1] rompe as unidades de galacturonato desesterificadas ou esterificadas de pectina pela β -transelimação do hidrogênio nas posições C4 e C5 do ácido galacturônico (Prasanna *et al.*, 2007). Apesar de haver formas de PL exo e endo, a maior parte das enzimas estudadas é do tipo endo, que age aleatoriamente (Wong, 1995).



O gene da pectato liase foi isolado de morangos maduros e foi considerado o causador da degradação da pectina e da perda da firmeza das frutas (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Utilizando morangos transgênicos, Jimenez-Bermudez *et al.* (2002) manipularam o amolecimento por meio da expressão antisense do gene da pectato liase. Os resultados indicaram que o amolecimento rápido dos morangos pode ser retardado com o gene da pectato liase. Pesquisas recentes feitas por Payasi e Sanwal (2003) demonstraram a atividade da pectato liase na maturação das bananas. Uma purificação posterior da liase pectato por Payasi *et al.* (2008) mostrou que Mg^{2+} , além de Ca^{2+} é requerido para atividade máxima da enzima.

d. Celulase

A degradação da celulose também ocorre durante a maturação de tomates (Babbitt *et al.*, 1973; Pharr e Dickinson, 1973; Sobotka e Stelzig, 1974), morangos (Barnes e Patchett, 1976), abacates (Pesis *et al.*, 1978; Awad e Young, 1980) e pera japonesa (Yamaki e Kakiuchi, 1979). A enzima envolvida, a celulase, é composta por várias enzimas distintas conhecidas como “complexo de celulase” (King e Vessal, 1969). Estas incluem C_1 -celulase, C_x -celulase, celobiase e exocelulase, que, juntas, catalisam a degradação da celulose, detalhada a seguir:



A degradação da celulose insolúvel para derivados solúveis não é bem conhecida, mas parece envolver C₁-celulase. A quebra da celulose solúvel é mediada por C_x-celulase, também conhecida pelo nome de 1,4-glucana-4-glucanohidrolase, que rompe, aleatoriamente, as ligações internas da cadeia de celulose. Relatos conflitantes na literatura sugerem que a atividade da celulase estava ausente ou presente em níveis mínimos em frutas imaturas, enquanto outros pesquisadores encontraram atividade de celulase em frutas do tomate imaturas (Hobson, 1968; Babbitt *et al.*, 1973). Informações sobre o complexo de celulase derivam quase exclusivamente de estudos sobre a celulase microbiana. A primeira pesquisa a identificar um complexo similar em plantas foi a de Sobotka e Stelzig (1974), que purificaram parcialmente quatro frações de celulase de tomates utilizando fracionamento de sulfato de amônio. Esses pesquisadores identificaram C₁-celulase, C_x-celulase, β-glicosidase e celobiase como o primeiro complexo de celulase capaz de degradar completamente a celulose insolúvel em plantas. Pharr e Dickinson (1973) não conseguiram identificar uma enzima na fruta do tomate que possa degradar celulose insolúvel, apesar de terem relatado a presença de C_x-celulase (EC 3.2.1.4) e de celobiase (EC 3.2.1.21). A presença de um complexo de celulase em plantas ainda precisa ser comprovada.

O papel da celulase no amolecimento de frutas ainda é parcialmente especulativo. A única prova direta quanto ao envolvimento da celulase foi reportada por Babbitt *et al.* (1973). Os pesquisadores investigaram o efeito dos reguladores de crescimento etefon e ácido giberélico nas atividades da celulase e poligalacturonase na maturação de tomates. A atividade da celulase, na presença de etefon, inicialmente aumentou e depois de seis dias declinou, enquanto a atividade da poligalacturonase aumentou (Figura 2.11). Este fato contrastou com a quase total inibição da atividade de poligalacturonase pelo ácido giberélico enquanto a atividade da celulase continuou a aumentar. O declínio na firmeza geral da fruta do tomate na presença do ácido giberélico sugere haver um papel definido da celulase no amolecimento das frutas. Os pesquisadores propuseram que a celulase inicia o amolecimento das frutas ao degradar as fibrilas da celulose da parede celular, fato que permite às enzimas pécticas penetrar a lamela intermediária. Isto pode explicar a observação de Awad e Young (1979), que relataram que um aumento na atividade da celulase precede aumentos na produção de poligalacturonase e etileno nos abacates em maturação e seu amolecimento subsequente (Figura 2.12).

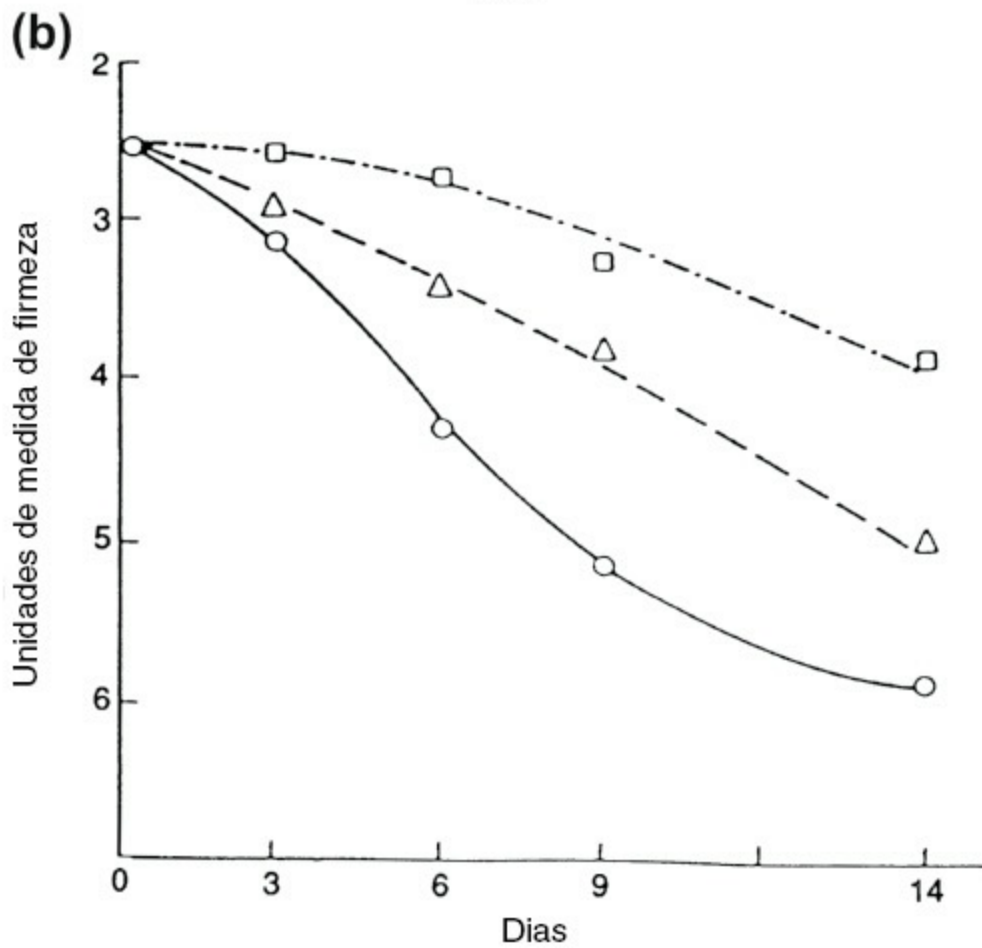
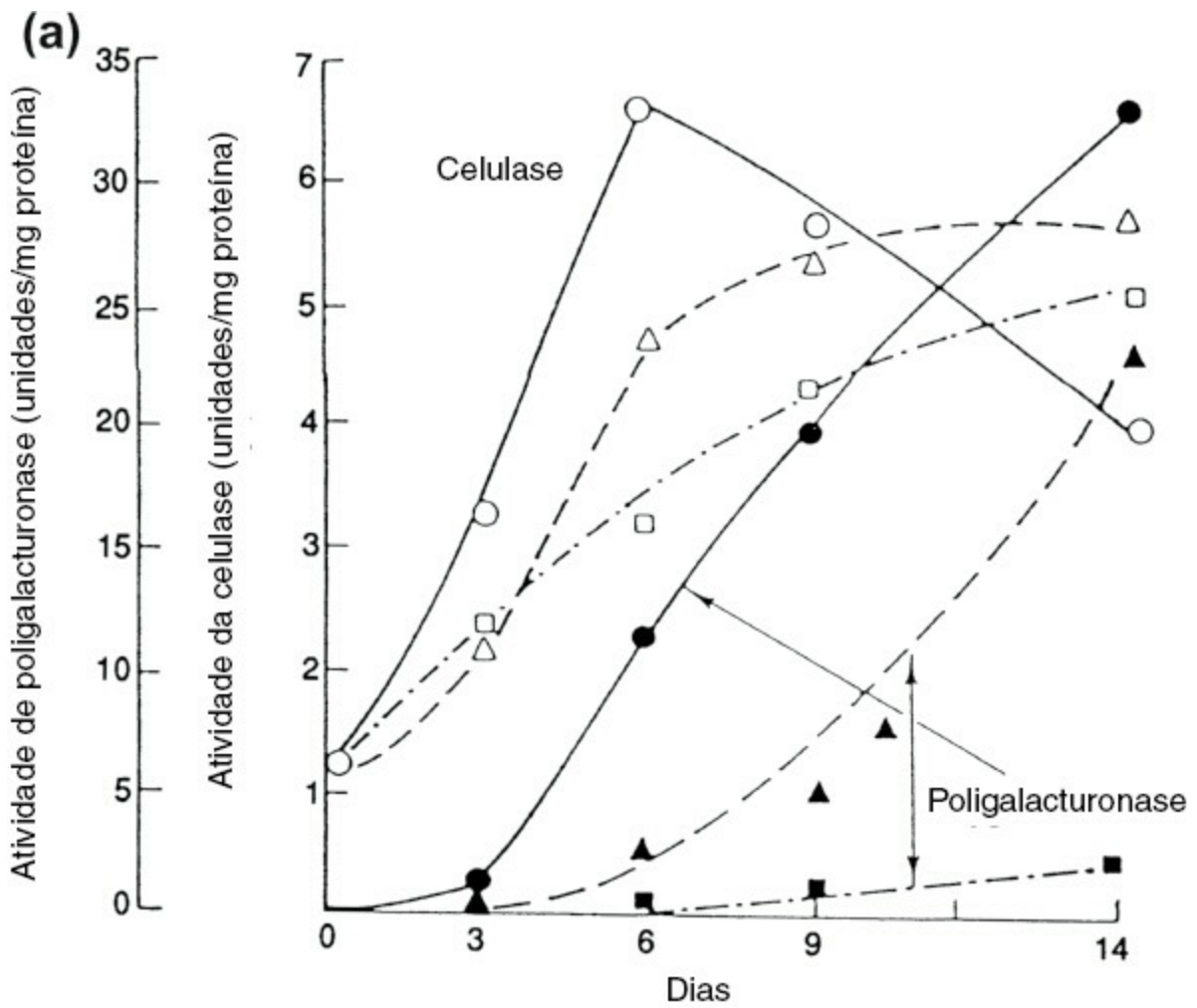


FIGURA 2.11 Efeito de etefon (O) e ácido giberélico (□) nas atividades enzimáticas (a) e firmeza (b) de tomates (Δ, controle). Babbitt *et al.* (1973).

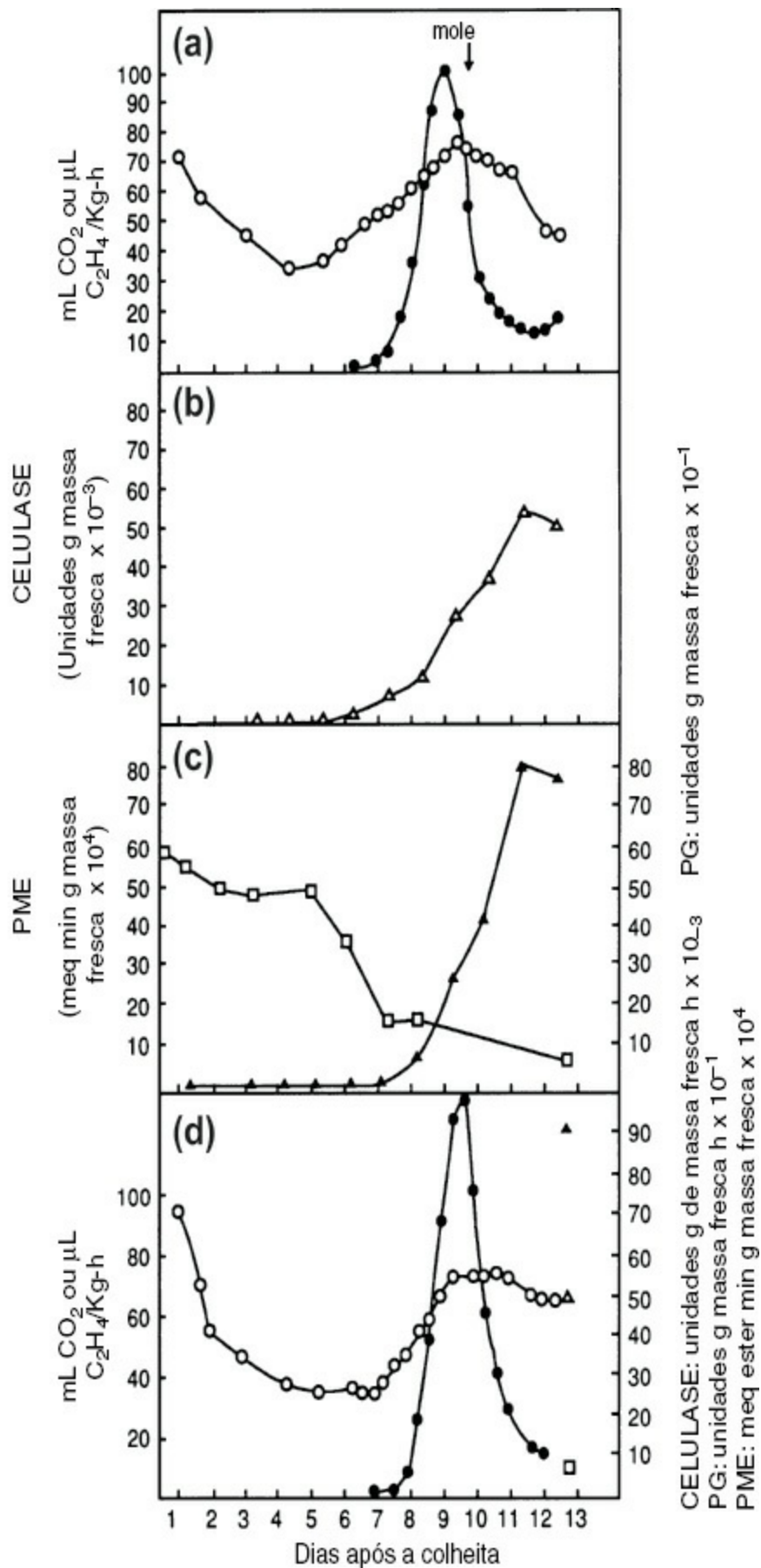


FIGURA 2.12 Tendências na pós-colheita na atividade de celulase (Δ), PG (\square) e na produção de CO_2 (o) e C_2H_4 (\bullet) em um abacate Fuerte. A fruta estava (a) comestível e mole após 9,5 dias e (d) após 10,5 dias. Awad e Young (1979).

Ao utilizar isoeletrofocalização (IEF), Kanellis e Kalaitzis (1992) isolaram múltiplas formas ativas de celulase no mesocarpo de abacates. As celulases foram separadas em 11 formas distintas capazes de degradar carboximetilcelulose (CMC) em géis de CMC-agarose. Sexton *et al.* (1997) localizaram celulases em regiões de

framboesas vermelhas associadas à abscisão, sugerindo que ela possa estar envolvida na separação das frutas assim como no amolecimento.

e. β -Galactosidase

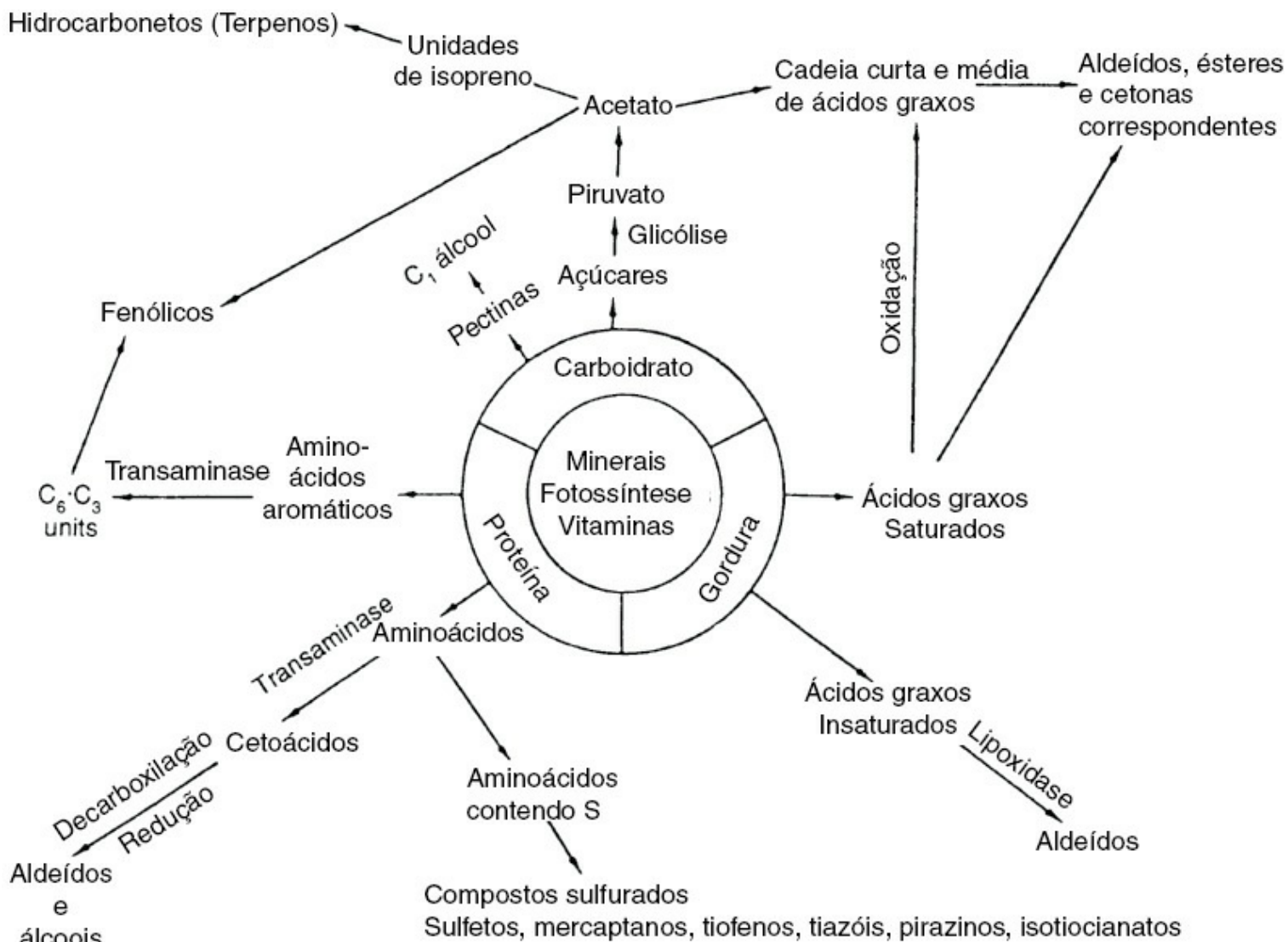
A perda de galactose da parede celular de maçãs, morangos e tomates durante a maturação é resultado da ação da β -galactosidase (EC 3.2.1.23). A atividade aumentada dessa enzima foi correlacionada com a perda da firmeza durante o período de maturação e armazenamento de maçãs (Bartley, 1974; 1978; Wallner, 1978; Berard *et al.*, 1982). Evidência disso foi o declínio no conteúdo de galactose do córtex da parede celular de maçãs (Knee, 1973), o aumento do conteúdo de poliuronídeo solúvel (Knee, 1975), a capacidade da β -galactosidase de hidrolisar β -(1 \rightarrow 4)-galactana (Bartley, 1974) e a liberação de galactose de preparações de parede celular (Bartley, 1978). Dick *et al.* (1984) forneceram evidências preliminares da regulação da atividade de β -galactosidase em maçãs “McIntosh” na presença de inibidor endógeno. Ao contrário da β -galactosidase em maçãs, aquela encontrada em tomates não parece estar envolvida na hidrólise de galactanas da parede celular (Gross e Wallner, 1979). Os pesquisadores, na realidade, não foram capazes de detectar qualquer atividade de β -galactosidase durante a maturação de tomates. O fato contrastou com um estudo posterior de Pressey (1983), que isolou três enzimas responsáveis pela atividade de β -galactosidase em tomates. Uma dessas enzimas hidrolisou galactanas de tomates e teve sua atividade aumentada durante o processo de maturação. Isto sugere que há possibilidade de um papel da β -galactosidase no amolecimento de frutas. Uma vez que o polissacarídeo de galactana em frutas do tomate contém ligações (1 \rightarrow 4), a β -galactosidase envolvida deve ser a β -1,4-galactosidase. A não detecção, por parte de Gross e Wallner (1979), de qualquer atividade de galactanase foi atribuída à preparação de seus extratos a partir de frutas congeladas. Como foi apontado por Pressey (1983), o rendimento na extração de β -galactosidase em frutas congeladas é muito baixo quando comparado àquele correspondente a extratos de tomate frescos. Ranwala *et al.* (1992) monitoraram as alterações nas β -galactosidas solúveis e ligadas à parede durante a maturação da fruta do melão cantalupo. Eles demonstraram o envolvimento das β -galactosidas na modificação dos componentes pécnicos e de hemiceluloses, indicando uma sua possível função no amolecimento do melão cantalupo.

VII. SABOR E AROMA

O sabor das frutas e vegetais é uma interação complexa entre o aroma e o gosto. O aroma é produzido pelo material volátil sintetizado durante a maturação da fruta, que inclui compostos de aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, lactonas, terpenos e compostos sulfurados (Baldwin, 2004; Pérez e Sanz, 2008). Com poucas exceções, os vegetais tendem a ter um sabor mais suave. Seus aromas são determinados por metabólitos secundários como terpenos, fenólicos, glucosinolatos, cisteína sulfóxidos (Jones, 2008). O gosto é proporcionado pelos vários componentes não voláteis, incluindo basicamente açúcares e ácidos, assim como componentes com gosto amargo ou adstringência presentes na polpa da fruta ou no tecido do vegetal.

A. Aroma

Os compostos voláteis responsáveis pelo aroma originam-se de proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas como pode ser visto no Esquema 2.23.



ESQUEMA 2.23 Formação de aroma volátil em frutas e vegetais. Reprodução autorizada, Salunkhe *et al.* (1976).

O aroma característico de cada fruta ou vegetal é determinado pela genética assim como pelos fatores de pré-colheita, colheita e pós-colheita e normalmente se desenvolve durante a maturação (Kader, 2008). Muitas substâncias voláteis foram identificadas na literatura e foram revisadas por Salunkhe e Do, em 1976. A partir de então estudos com ampla variedade de frutos têm sido desenvolvidos. Uma fruta muito pesquisada é a maçã, na qual o impacto dos fatores de pré e pós-colheita foram analisados extensivamente. Mais de 300 compostos voláteis são produzidos pela maçã e entre os grupos mais abundantes estão os ésteres (Yahia, 1994; Dixon e Hewett, 2000). Mais de 400 compostos voláteis são produzidos pelos tomates (Hobson e Grierson, 1993) e as diferenças de sabor entre as variedades se devem à variação do aroma na produção de compostos voláteis (Brauss *et al.*, 1998). Diferenças qualitativas e quantitativas nos resultados de compostos voláteis entre os grupos de pesquisas, no entanto, podem ser causadas pelo uso de uma vasta gama de métodos de extração e analíticos (Saevens *et al.*, 2004). Além do mais, a análise instrumental dessas substâncias voláteis deve ser combinada com análises sensoriais que forneçam critérios sobre os impactos dos compostos voláteis na percepção do sabor (Baldwin *et al.*, 2007; Song, 2007). Uma nova abordagem para elucidar respostas sobre os receptores humanos de compostos de aromas inclui a ciência sensorial molecular (Greger e Schieberle, 2007; Schmiech *et al.*, 2008). Para otimizar e aprimorar o sabor das frutas e vegetais e obter um melhor conhecimento da produção e regulação dos sabores voláteis pesquisas recentes têm sido direcionadas visando o isolamento dos genes que codificam as enzimas-chave envolvidas na biossíntese dos aromas voláteis (Song, 2007; Pech *et al.*, 2008), com base nas pesquisas de décadas recentes focalizando a identificação e a biossíntese das substâncias voláteis. O controle da formação de substâncias voláteis depende de muitos fatores, por exemplo, os genes envolvidos e, portanto, de sua expressão e transcrição, da

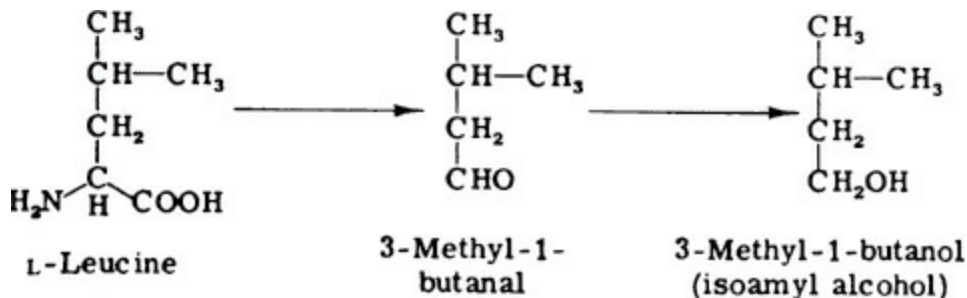
funcionalidade das enzimas catalisadoras que modificam os substratos das substâncias voláteis e da disponibilidade de substratos ou precursores, e de energia das células (Saquet *et al.*, 2003b; Souleyre *et al.*, 2005; Song, 2007; Schwab, 2008; Wyllie, 2008). Esta seção vai focar rapidamente alguns dos mecanismos biogênicos envolvidos na formação de substâncias voláteis durante a maturação.

1. Aldeídos, álcoois e ésteres

Aldeídos e álcoois de cadeias curtas e insaturadas, assim como ésteres de cadeias lineares e ramificadas contribuem de maneira importante para os aromas voláteis das frutas. Eles são formados durante o curto período de maturação, associados ao aumento climatérico da respiração (Paillard, 1968; Romani e Ku, 1968; Tressl *et al.*, 1970; Song e Bangerth, 2003; Lara *et al.*, 2003; Souleyre *et al.*, 2005). Pesquisas com maçãs, bananas, peras e tomates demonstraram que eles são sintetizados a partir de aminoácidos ou ácidos graxos (Eskin *et al.*, 1977; Eskin, 1979; Song e Bangerth, 2003; Rapparini e Predieri, 2003).

a. Aminoácidos como precursores

Um aumento das substâncias voláteis 3-metil-1-butanol, acetato de isopentil, butirato de isopentile isovalerato foi observado por Dalal (1965) durante a maturação do tomate. Ao mesmo tempo, o 3-metil-1-butanal aumentou até que metade da fruta apresentou coloração avermelhada e em seguida diminuiu. A similaridade entre a porção alcóolica destes ésteres e o esqueleto de carbono de 3-metil-1-butanal fez que Yu *et al.* (1968a) sugerissem que eram sintetizados deste aldeído. Uma vez que a leucina possui um esqueleto de carbono idêntico ao do 3-metil-1-butanal, a possível função desse aminoácido na síntese deste aldeído foi investigado por Yu *et al.* (1968c). Com base em seu trabalho com l-leucina [^{14}C], o seguinte mecanismo foi proposto:

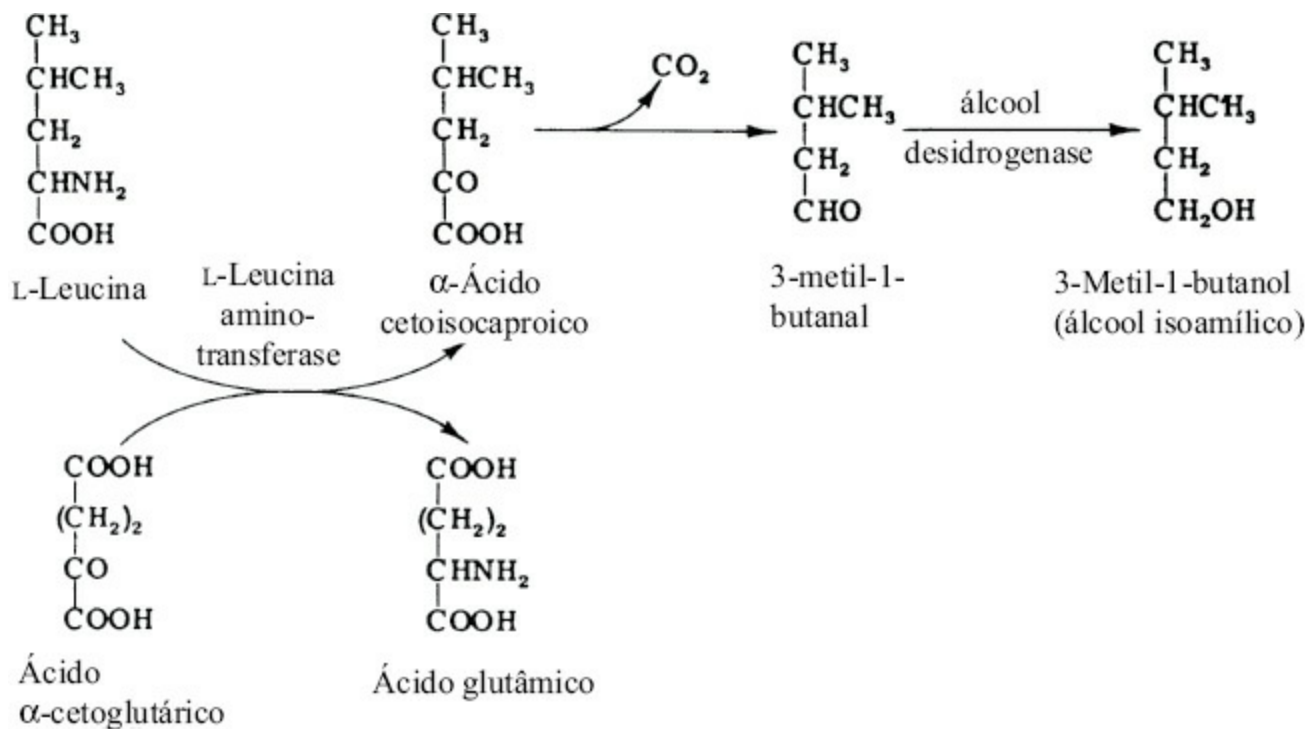


Foi demonstrado que, além da leucina, ácido aspártico, alanina e valina podem originar compostos carbonílicos quando adicionados a extratos de tomate (Yu *et al.*, 1968c; Buttery e Ling, 1993). O declínio dos teores desses aminoácidos durante a maturação aponta para a presença de enzimas capazes de utilizá-los. A fração solúvel obtida pela centrifugação de extratos de tomates mostrou-se bastante ativa sobre a leucina, enquanto o ácido aspártico e a alanina foram metabolizados pela fração mitocondrial. Com base na detecção de grande quantidade de ácido glutâmico nos extratos de tomate, Freeman e Woodbridge (1960) e Yu *et al.* (1967) apontaram para a presença de transaminases ativas. Este fato foi confirmado em uma pesquisa posterior feita por Yu *et al.* (1968b), que encontraram grande quantidade de ácido glutâmico quando extratos de tomates crescidos no campo no estágio verde e maduro foram incubados com esses aminoácidos. Yu e Spencer (1969) incubaram l-leucina em extratos de tomates frescos e isolaram o ácido α -ceto-isocaproico entre os produtos formados. A confirmação com leucina marcada [^{14}C] comprovou a presença de l-leucina: 2 ceto-glutarato amino transferase em tomates. O Esquema 2.24 resume as reações que conduzem ao 3-metil-1-butanol a partir da l-leucina. Pesquisas com substratos marcados com deutério em maçãs corroboraram tais descobertas (Rowan *et al.*, 1996; 1999). Por fim, aminoácidos aromáticos podem ser convertidos em ésteres pelo mesmo mecanismo em frutas diferentes (Tressl e Albrecht, 1986; Tikunov *et al.*, 2005).

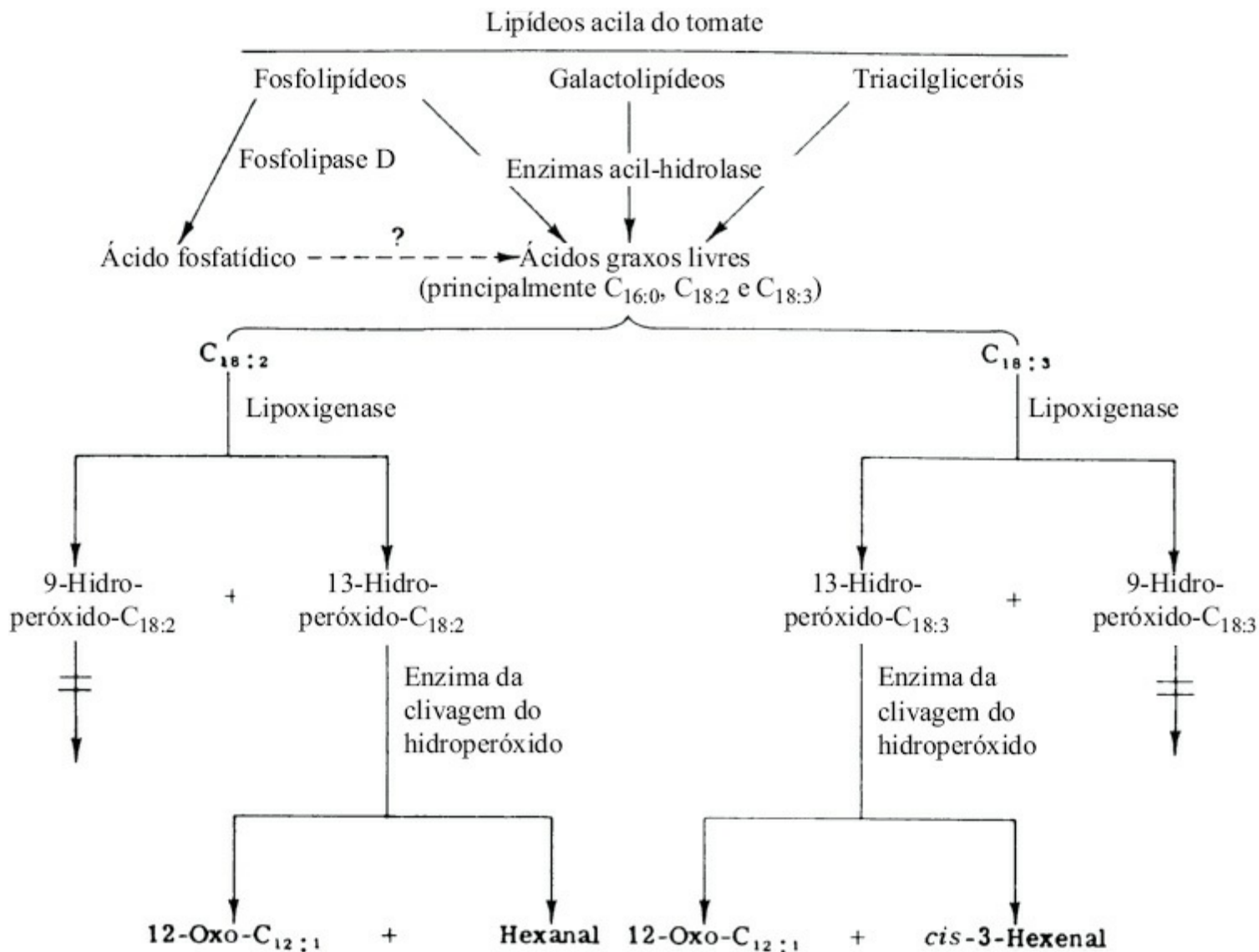
b. Ácidos graxos como precursores

Os compostos carbonílicos voláteis responsáveis pelo aroma dos tomates e das bananas assim como outras frutas são sintetizados a partir de ácidos graxos insaturados (Goldstein e Wick, 1969; Jadhav *et al.*, 1972; Song e Bangerth, 2003). As vias da β -oxidação e da lipoxigenase são os principais mecanismos metabólicos para a produção dos aromas nas frutas (Baker *et al.*, 2006). Os principais ácidos graxos insaturados no pericarpo dos tomates foram comprovados como o oleico, linoleico e o linolênico (Kapp, 1966). Jadhav *et al.* (1972) reportaram um declínio nos teores dos ácidos linoleico e linolênico à medida que os tomates amadureceram. Uma diminuição significativa no ácido linoleico também foi observada por Goldstein e Wick (1969) na polpa das bananas maduras, o que sugere a possibilidade de uma relação entre este ácido graxo e a produção de substâncias voláteis. De maneira semelhante, Song e Bangerth (2003) relataram que os ácidos graxos servem como precursores das substâncias voláteis do aroma de maçãs nas fases pré-climatérica e climatérica.

A incorporação de ácidos linoleicos e linolênicos marcados com ^{14}C em hexanal utilizando fatias ou extratos de tomate livres de células sugeriram a Jadhav *et al.* (1972) haver envolvimento da lipoxigenase. Este fato foi confirmado pela inibição total de carbonílicos na presença de peróxido de hidrogênio, um reconhecido inibidor da lipoxigenase. Esta enzima foi, em consequência, monitorada durante a maturação de tomates e verificou-se um aumento da atividade no início do climatério. O fato parece explicar o aumento de substâncias voláteis que ocorre durante a maturação dos tomates (Dalal *et al.*, 1968). Kazeniak e Hall (1970) relataram a presença de teores mais altos de *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal e de *n*-hexanol em tomates totalmente maduros. A formação de *de**trans*-2-hexenal resultou da instabilidade do *cis*-3-hexenal na polpa ácida e suco de tomate com a isomerização do isômero *trans*. Stone *et al.* (1975) demonstraram que o *cis*-3-hexenal é a principal substância volátil de destilados de tomate, enquanto Jadhav *et al.* (1972) descobriram que o *n*-hexanol é a principal substância volátil formada. Essa discrepância deu a ideia a Stone *et al.* (1975) que o *cis*-3-hexenal poderia ser um precursor do *n*-hexanol, mas essa sugestão foi deixada de lado quando apenas 2% do *cis*-3- ^{14}C hexenal foi incorporado na forma de álcool. Jadhav *et al.* (1972) atribuíram a presença do hexanol, propanol, 2,4-decadienal, 2,6-heptadieno e do *cis*-3-hexenal em substâncias voláteis do tomate na formação de 9-, 12- e 16-hidroperóxidos pela ação da lipoxigenase em ácidos linoleicos e linolênicos. Gaillard e Matthew (1977), no entanto, relataram que o principal hidroperóxido de ácidos graxos formados pelos ácidos linoleico e linolênico são os 9- e 13-hidroperóxidos a uma razão de 95:5. Entre eles, somente o 13-hidroperóxido foi clivado formando o composto ácido não volátil 12-oxo-dodec-*cis*-9-enoico, assim como o hexanal e o *cis*-3-hexenal a partir dos ácidos linoleicos e linolênicos, respectivamente (Esquema 2.25).



ESQUEMA 2.24 Biogênese do álcool isoamílico a partir da l-Leucina no tomate.



ESQUEMA 2.25 Processo proposto para a formação de fragmentos de carbonil pela degradação enzimática de lipídeos acila em tomates rompidos. Galliard e Matthew (1977).

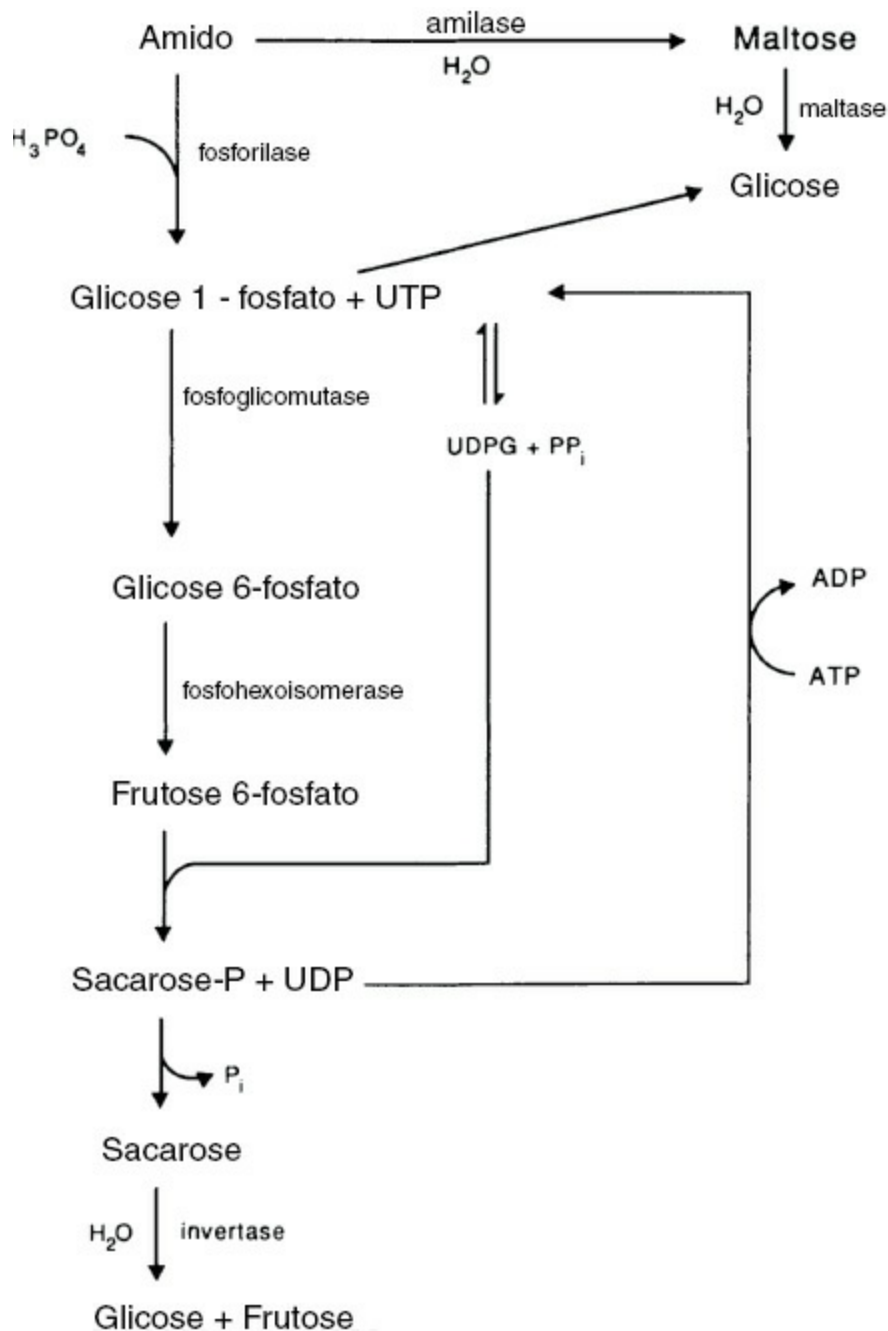
Zamora *et al.* (1987) caracterizaram a lipoxigenase do tomate e confirmaram que o isômero 9-hidroperóxido é o principal deles, formado pelo ácido linoleico. A razão de isômeros de 9- e 13-hidroperóxido produzidos pelo ácido linoleico foi descoberta como equivalente a 24:1, permanecendo assim bem próximo do que tinha sido observado anteriormente por Gaillard e Matthew (1977).

Buttery e colegas (1987) desenvolveram métodos de captura aprimorados para análises quantitativas das principais substâncias voláteis C₄-C₆ em tomates. Além de inativar as enzimas do tomate que afetam as substâncias voláteis durante o isolamento, eles conseguiram superar o problema da isomerização de *cis*-3-hexenal para *trans*-2-hexenal relatado por Kazeniak e Hall (1970). Utilizando seus procedimentos, que envolvem captura em Tenax e a inativação da enzima com CaCl₂, eles identificaram o *cis*-3-hexenal entre os principais produtos voláteis presentes. Esses pesquisadores atribuíram a falta de sabor dos tomates adquiridos nos supermercados aos menores teores de *cis*-3-hexenal presentes quando comparados aos maiores teores presentes em tomates maturados na planta. Além disso, os pesquisadores reportaram que estocar tomates em geladeiras causa maior perda de sabor, em parte por causa dos menores teores de *cis*-3-hexenal. Tal efeito da estocagem refrigerada no aroma do tomate está em concordância com o trabalho anterior de Lammers (1981). Além do *cis*-3-hexenal, outras importantes substâncias voláteis que contribuem para o sabor são a β-ionona, 1-penten-3-ona, hexanal, *cis*-3-hexanol, *trans*-2-hexenal, 2- e 3-metilbutanol, 2-iso-butiltiazol e 6-metil-5-hepten-2-ona.

O *trans*-2-hexenal também foi identificado entre as substâncias voláteis das bananas “Gros Michel” por Issenberg e Wick (1963). Usando uma técnica de enriquecimento de voláteis, Tressl e Jennings (1972) confirmaram a presença de *trans*-2-hexenal na fase gasosa de sistema fechado com bananas em maturação. A separação de frações voláteis das bananas por Palmer (1971) comprovou a presença de *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal e de *n*-hexanal entre os aldeídos formados. Tressl e Drawert (1973) descobriram que os homogeneizados das bananas verdes produzem *trans*-2-, *cis*-6-nonadienal, *trans*-2-nonenal e ácido 9-oxanonanoico, similar àqueles encontrados em pepinos (Fleming *et al.*, 1968). Tressl e Drawert (1973) detectaram hexanal, *trans*-2-hexenal e ácido 12-oxo-*trans*-10-dodecenoico quando bananas verdes ficam expostas a etileno e estocadas por 4 dias a 15°C. A incorporação de ácidos linoleico e linolênico marcados com ¹⁴C- nessas substâncias voláteis demonstrou o envolvimento da lipoxigenase. Ácidos 13- e 9-hidroperoxioctadecadienoico marcados incubados com extratos de bananas verdes foram convertidos para C₆-C₉ aldeídos como pode ser visto no Esquema 2.26. A aldeído liase, a enzima responsável pelo rompimento dos derivados hidroperóxidos também foi encontrada em sementes de melancias em germinação por Vick e Zimmerman (1976). Essa enzima catalisa a formação do ácido 12-oxo-*trans*-10-dodecenoico e hexanal a partir do ácido 13-hidroperoxi-*cis*-9,*trans*-11-octadecanoico. Esta última difere da enzima de clivagem de hidroperóxido dos tomates ao produzir *trans*-2-enais como produtos primários.

sacarose e de ácido l-málico, juntos, assim como o perfil de proteínas foi sugerido por Gorin (1973) como parâmetros para avaliar a qualidade das maçãs “Golden Delicious”. Hammett *et al.* (1977) encontraram uma correlação alta entre a razão de sólidos solúveis e o conteúdo de ácidos, com os dias da floração total (DFFB) para maçãs “Golden Delicious”. A razão de açúcares ou de sólidos solúveis e ácidos indica a qualidade de frutas cítricas e de outras frutas (Vangdal, 1985; Fellers, 1991; Mitchell *et al.*, 1991). Açúcares e ácidos não contribuem apenas para o sabor doce ou ácido dos tomates, mas também são responsáveis pela intensidade geral do sabor (Kader *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1979; Jones e Scott, 1983). O sabor doce e, portanto, os açúcares contribuem para os consumidores gostarem de cenouras. Pesquisas sobre cenouras indicam que os açúcares, além de elicitar doçura, suprimem o gosto amargo do 6-metoximeleina (isocumarina) (Seljasen *et al.*, 2001a; 2001b; Höhn *et al.*, 2003; Varming *et al.*, 2004; Kreutzmann *et al.*, 2007).

Além desses componentes, a presença de compostos de taninos e de fenólicos classificados como hidrolisáveis ou não hidrolisáveis afetam o sabor (Lesschaeve e Noble, 2005). Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, que liberam ácido gálico e glicose na hidrólise enzimática, os taninos não hidrolisáveis resistem à hidrólise enzimática. Este último parece ser responsável pela adstringência em várias frutas imaturas. A perda da adstringência em caquis foi atribuída, por Matsuo e Ito (1982), à imobilização do tanino com acetaldeído formado durante a maturação. Nenhuma alteração substancial na composição ou quantidade de polifenóis na fruta *Rubus* sp. foi detectada durante a maturação, por muitos pesquisadores (Haslam *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1982a; 1982b). Com base nas pesquisas com sistemas modelos, Ozawa *et al.* (1987) propuseram que a perda da adstringência durante a maturação da fruta deve-se, em parte, a uma possível interação entre polifenóis e proteínas das frutas.



ESQUEMA 2.27 Conversão de amido em açúcar.

1. Conversão amido-açúcar

Açúcar e amido temporário são sintetizados na planta em desenvolvimento pela fotossíntese. E são deslocados, principalmente na forma de sacarose, a partir de cloroplastos via floema para as células em desenvolvimento na planta, onde são resintetizadas em amido. A conversão de sacarose para amido parece envolver uma sequência de reações ilustradas no Esquema 2.27.

Durante o período de pós-colheita, o amido é transformado em sacarose, glicose e frutose. Esse processo é afetado pelas condições fisiológicas das frutas e vegetais assim como pelo tempo e temperatura de estocagem. A hidrólise do amido é uma das transformações mais notáveis que ocorrem durante a maturação de muitas frutas climatéricas. Por exemplo, um declínio no conteúdo de amido de 22% para 1% foi relatado por Palmer (1971) em bananas quando passaram da fase pré-climatérica à climatérica. Em outras frutas, como maçãs e peras, a progressão da degradação do amido é utilizada para determinar o estágio de maturação e a data de colheita (Smith *et al.*, 1979; De Jager *et al.*, 1996). No entanto, o conteúdo de amido em maçãs e peras é menor do que o de bananas e,

portanto, o aumento de açúcares pela conversão de amido é, em geral, moderado (Murayama *et al.*, 2002; Travers *et al.*, 2002). A presença das enzimas fosforilase e amilase foi observada em tecidos de estocagem de muitas frutas, apesar de suas respectivas funções nos processos de amadurecimento ainda não estarem claras. Young *et al.* (1974) observaram um aumento da atividade de α -amilase durante a maturação de bananas, mas não conseguiram confirmar seu envolvimento na hidrólise de amido. A β -amilase e fosforilase também foram encontradas durante a maturação, mas a presença de inibidores de enzimas impediu a análise durante a fase climatérica. Yang e Ho (1958) sugeriram que a fosforilase tem uma função na degradação do amido durante o climatério. O fato foi confirmado mais tarde em bananas tipo “Cavendish” irradiadas com raios gama por Surendranathan e Nair (1973). Três fosforilases foram parcialmente purificadas a partir de bananas maduras por Singh e Sanwall (1973; 1975; 1976), cada uma delas demonstrando propriedades bioquímicas diferentes.

A hidrólise do amido foi examinada por Chitarra e LaJollo (1981) durante a maturação de bananas híbridas “Marmello”. Este híbrido demonstrou ter um comportamento fora do normal uma vez que a casca, cor, aroma e textura não sofreram alterações em geral associadas à maturação. Além disso, o conteúdo de amido diminuiu para 5% durante a maturação pela presença potencial de inibidores. O aumento da temperatura da estocagem de 20°C para 25°C acelerou o climatério e reduziu o tempo necessário para estabilizar o teor do amido de 24,5% para 5% em 8 dias. O teor de amido em bananas pode ser reduzido ainda mais, alcançando 3,3% se a estocagem for feita a 30°C. Nesses casos, as frutas ficaram maduras demais e deterioraram rapidamente. Isto contrastou com as bananas “Dwarf Cavendish” nas quais a degradação total do amido (97,7%) ocorreu durante o climatério. O conteúdo mais baixo de açúcar na banana de tipo “Marmello” é responsável pela diferença no gosto quando comparada à variedade “Cavendish”. A atividade de fosforilase nas bananas “Marmello” foi relatada como tendo permanecido constante durante o pré-climatério apesar de ter acompanhado as alterações no conteúdo de amido. Esse fato diferiu da banana “Cavendish”, na qual 50% do aumento na atividade da fosforilase foi verificada antes do climatério e precedeu a degradação de amido. Estes resultados apontam para um possível envolvimento da fosforilase nas transformações de amido-sacarose assim como da sacarose sintetase (Areas e LaJollo, 1981). O envolvimento exclusivo da α -amilase na degradação do amido foi seriamente questionado uma vez que ocorreu antes de qualquer aumento da atividade de α -amilase. A inibição da síntese de α -amilase por cicloheximida durante a maturação das bananas não bloqueou a degradação do amido, fato que confirmou a existência de uma função para a fosforilase.

A atividade da fosforilase tem sido associada com a estocagem refrigerada de tubérculos de batatas a 4 °C (Hyde e Morrison, 1964). Essa enzima é responsável pela reação inicial de adoçamento de batatas induzidas pelo frio (Isherwood, 1976). O resultado final é um aumento significativo do conteúdo de açúcar nas batatas, o que resulta na produção de batatas fritas com coloração escura inaceitável (Talburt e Smith, 1975). Para evitar que isso ocorra, as batatas são estocadas, em geral, em temperaturas iguais ou acima de 10°C, o que é denominado de “condicionamento”. O mecanismo bioquímico envolvido nas transformações amido/açúcar permanece não esclarecido, apesar de o efeito da temperatura da estocagem em várias enzimas ter sido relatado (Kennedy e Isherwood, 1975; Pollock e ap Rees, 1975; Isherwood, 1976; Dixon e ap Rees, 1980). Um aumento nos açúcares fosfatos e na sacarose foi atribuído por Pollock e ap Rees (1975) à instabilidade ao frio de algumas das enzimas glicolíticas. Uma delas, a fosfofrutoquinase, demonstrou ser uma das causas principais do adoçamento dos tubérculos das batatas a baixas temperaturas (Dixon *et al.*, 1981). A instabilidade dessa enzima ao frio parece ser decorrência da denaturação de seu complexo de enzimas oligoméricas e de sua dissociação em subunidades. Em decorrência disso, a enzima não consegue oxidar as hexoses fosfato resultando em seu acúmulo e conversão em sacarose.

2. Ácidos orgânicos

A maturação das frutas é acompanhada por mudanças nos ácidos orgânicos. Eles alcançam um máximo durante o crescimento e desenvolvimento da fruta ainda na árvore, mas diminuem durante a estocagem e também são muito dependentes da temperatura. O ciclo Krebs é ativo nas células das plantas superiores e produz uma variedade de ácidos orgânicos, incluindo o cítrico, málico e succínico. Os ácidos málico e cítrico são componentes importantes da maioria das frutas, e as laranjas, limões e morangos possuem altos teores de ácido cítrico e maçãs, peras e ameixas têm grande quantidade de ácido málico. Durante a maturação, esses ácidos orgânicos diminuem à medida que são usados para a respiração. O esgotamento dos ácidos é acompanhado por um declínio no conteúdo de amido e um aumento dos açúcares responsáveis pela doçura das frutas e diminuição de sua acidez (Schifferstein e Frijters, 1990; Ackermann *et al.*, 1992; Harker *et al.*, 2002). Akhavan e Wrolstadt (1980) relataram que a maturação de peras do tipo “Bartlett” atingiu um conteúdo máximo de açúcar de 13,5% (Figura 2.13) e uma acidez total de 6 miliequivalentes e a firmeza de sua polpa de 6 lbs no quarto dia após a maturação. Ácidos málico e cítrico são responsáveis pelas alterações principais da acidez total tanto antes como depois da maturação (Figura 2.14). Um aumento similar dos açúcares e dos ácidos acompanhado por um aumento do aroma foi observado em peras do tipo “Conference” (Höhn *et al.*, 1996). Esses ácidos orgânicos contribuem com o pH dos tomates, que é de fundamental importância para o processamento (Davies e Hobson, 1981). Picha (1987) reportou que os ácidos cítrico e málico são os principais ácidos orgânicos nos tomates cereja. Durante a maturação, alterações nestes ácidos orgânicos são evidentes com o ácido cítrico aumentando do estágio da fruta imatura verde para o da fruta verde completamente desenvolvida, enquanto o ácido málico diminuiu no estágio verde maduro para o estágio maduro pronto para consumo. Além do mais, os teores de ácido e de açúcar afetam a qualidade do sabor dos tomates e de outras frutas (Malundo *et al.*, 1995).

Além desses ácidos orgânicos, o ácido ascórbico é predominante nas frutas. Ele é encontrado nos tecidos das plantas, principalmente em sua forma reduzida, mas pode ser oxidizado para ácido dehidroascórbico pela ação da enzima ácido ascórbico oxidase (consultar o Capítulo 10). A presença do ácido l-quínicico, um ácido orgânico minoritário, também foi encontrada em várias frutas, incluindo peras (Akhavan e Wrolstad, 1980). Outros ácidos orgânicos encontrados incluem os ácidos oxálicos e citramálicos.

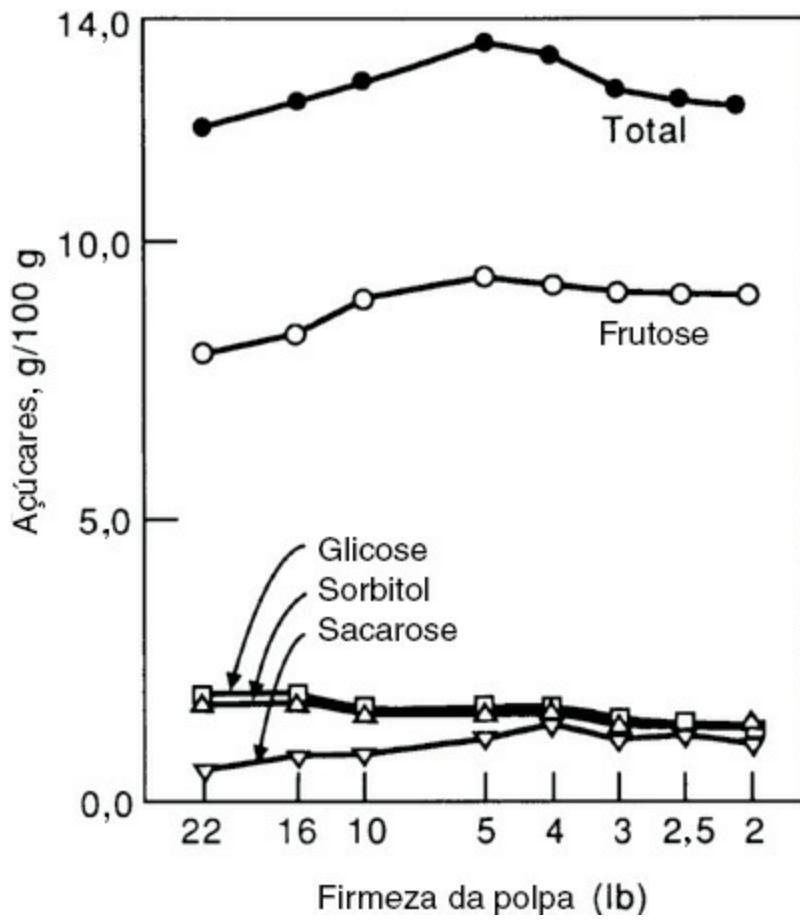


FIGURA 2.13 Alterações nos açúcares durante a maturação de peras Bartlett. Akhavan e Wrolstad (1980). Copyright © Institute of Food Technologists.

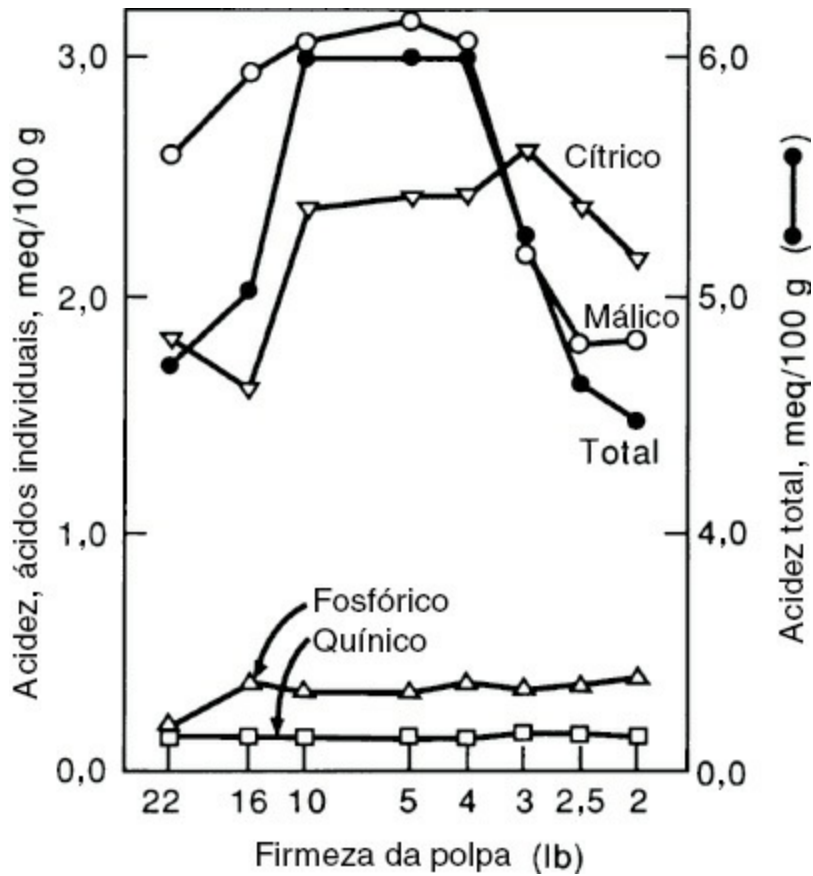


FIGURA 2.14 Alterações nos ácidos durante a maturação de peras Bartlett. Akhavan e Wrolstad (1980). Copyright © Institute of Food Technologists.

VIII. ESTOCAGEM

Para assegurar um adequado suprimento aos consumidores, durante o ano todo, de frutas e vegetais, assim como para a indústria de alimentos, vários métodos de estocagem foram desenvolvidos. O método mais antigo é a estocagem a frio ou refrigerado no caso de produtos perecíveis, ao passo que outros utilizam atmosfera modificada (MA) ou empacotamento com atmosfera modificada (MAP) e atmosfera de estocagem controlada (CA). A tecnologia moderna é cara em termos das instalações, equipamentos e manutenção. Todas estas tecnologias têm em comum o fato de que as frutas e verduras permanecem vivas e continuam a desenvolver os processos de todos os tecidos vivos, fato que contrasta com as outras técnicas de preservação como processamento por calor, desidratação ou congelamento, assim como as que interrompem a respiração e outros processos metabólicos. Interesses comerciais no desenvolvimento e aplicação de MA ou CA para o transporte e estocagem de frutas e vegetais fez com que surgissem novas e elaboradas pesquisas nestas áreas nas últimas décadas e criou uma busca contínua por novos desenvolvimentos e refinamento na aplicação destas tecnologias em todo o mundo.

A. Armazenamento pelo frio

O método mais antigo e popular para prolongar a vida útil de produtos perecíveis é a estocagem a frio. Isso se baseia no fato de que reações biológicas tais como a respiração e outros processos metabólicos, por exemplo, a deterioração, dependem da temperatura. A regra de Van't Hoff indica que a velocidade da reação diminui de duas a três vezes para cada diminuição de 10°C na temperatura. A estocagem de frutas e vegetais, portanto, em temperaturas bem baixas, pouco acima do congelamento, parece ser benéfica em termos de aumento do tempo de estocagem. No entanto, algumas frutas e vegetais apresentam danos quando expostos a baixa temperatura, mas não de congelamento. A maioria dos produtos tropicais e subtropicais, além de algumas culturas de regiões temperadas é sensível a danos pelo frio. Alterações fisiológicas e bioquímicas, portanto, podem ocorrer em espécies sensíveis à exposição a baixas temperaturas e resultam no desenvolvimento de sintomas de dano pelo frio, tais como manchas na superfície, descoloração, rompimento interno, escurecimento da polpa da fruta, falha na maturação, perda de sabor e apodrecimento (Ministério da Agricultura de Ontário, 1998; Perez-Tello *et al.*, 2009; Schotsmans *et al.*, 2009). A temperatura crítica para danos pelo frio varia conforme a fruta ou vegetal, cultivar e é, portanto, geneticamente determinada. Além disso, a sensibilidade das frutas ou vegetais pode ser afetada pelas condições da pré-colheita como fatores climáticos e práticas culturais. As condições de estocagem recomendadas oficialmente para frutas e vegetais levam tais fatos em conta e, portanto, as temperaturas recomendadas para a estocagem não atingem temperaturas críticas (USDA, 2004). Há outros fatores, no entanto, que afetam a vida útil de diversas mercadorias durante a estocagem, incluindo a umidade relativa adequada e a presença de etileno na atmosfera do armazenamento. Para a maioria dos vegetais, é necessário um alto teor de umidade para evitar que murchem ou fiquem enrugados. Por outro lado, uma taxa entre -1°C e +3°C associada a uma umidade relativa de 70-75% e boa ventilação são fatores que têm sido recomendados para aumentar a vida útil de cebolas no período do inverno. Uma boa ventilação em um ambiente frio evita o acúmulo de etileno e de outros componentes voláteis na atmosfera de armazenamento. O etileno aumenta a atividade respiratória da maioria das frutas e vegetais e, portanto, diminui a vida na armazenagem. Além disso, pode apresentar efeitos benéficos tanto como danosos (Saltveit, 2005). Alguns dos efeitos danosos são aceleração da senescência, perda de clorofila e amolecimento excessivo, fatores que podem causar perdas inaceitáveis. O etileno na atmosfera de estocagem pode alterar o sabor de frutas e vegetais. Um caso bem documentado descreve o sabor amargo das cenouras induzido por traços de etileno (Seljasen, 2001a). O potencial de estocagem de frutas e vegetais pode depender da concentração de alguns constituintes do produto colhido; assim, Hanaoka e Ito (1957) relataram que um alto conteúdo de açúcar solúvel em bulbos de cebolas é um bom indicador do potencial de estocagem. Outros pesquisadores, posteriormente,

também descobriram que o metabolismo de carboidratos em cebolas estava relacionado com o tempo de armazenamento (Kato, 1966; Toul e Popsilova, 1966). Uma pesquisa mais detalhada do metabolismo de carboidratos em cebolas armazenadas, desenvolvida por Rutherford e Whittle (1982), demonstrou que um aumento da frutose era resultado da hidrólise dos oligossacarídeos armazenados. Um conteúdo baixo de frutose em bulbos de cebolas recém-colhidas indicava baixo potencial para estocagem, sendo o contrário verdadeiro para bulbos de cebola com alto conteúdo de frutose. A determinação da invertase alcalina em cebolas realizada por Rutherford e Whittle (1984) demonstrou que a sua atividade refletia o teor de frutose presente. O monitoramento do conteúdo de frutose e da atividade da invertase em cebolas colhidas forneceu um bom indicador para avaliar sua estabilidade na estocagem a frio.

B. Armazenamento em atmosfera controlada

A estocagem com atmosfera controlada (CA) refere-se ao armazenamento em atmosferas com ar diferente do normal (20-21% de O₂, cerca de 0,03% de CO₂, 78-79% de N₂ e quantidades mínimas de outros gases) e seu controle restrito durante todo o tempo de estocagem. A MA e a MAP também se baseiam no armazenamento e transporte do produto em atmosferas diferentes do ar normalmente utilizado, mas em contraste com a CA, a atmosfera não é controlada depois de ser estabelecida. Portanto, a manutenção do controle estrito da temperatura é obrigatória para obter um impacto positivo da MA e da MAP na qualidade e vida útil das frutas e vegetais. Condições atmosféricas modificadas ou controladas reduzem ou retardam processos bioquímicos tais como a respiração, amadurecimento e amarelecimento de frutas e vegetais. O ambiente modificado contém, tipicamente, baixos níveis de oxigênio e altos teores de dióxido de carbono, que diminui os processos catabólicos, particularmente a respiração, assim como o envelhecimento, prolongando, portanto, a vida útil de frutas e vegetais estocados. Vale lembrar o efeito do etileno: oxigênio é necessário para a sua síntese e ambos, o oxigênio e o dióxido de carbono afetam a atividade biológica. Atmosferas controladas ou modificadas, portanto, diminuem a síntese e a atividade do etileno durante a estocagem.

Nos anos 1960, ficou evidenciado que manter baixos os níveis de oxigênio de acordo com a tolerância pelos produtos é vantajoso. Este fato foi refletido na terminologia utilizada para métodos de estocagem diferentes como, por exemplo, estocagem com LO (oxigênio baixo) ou ULO (oxigênio ultra-baixo) (Hoehn *et al.*, 2009). Em geral, concentração mais baixa possível de oxigênio corresponde ao ponto de compensação anaeróbico (ACP) (Figura 2.15). A ACP é a concentração de oxigênio na qual a produção de dióxido de carbono é mínima (Boersig *et al.*, 1988).

O benefício geral da estocagem por CA é que os produtos podem reter seu frescor e qualidade para a alimentação por períodos mais longos. Nem todas as frutas e vegetais, no entanto, podem ser armazenadas nessas condições. Várias pesquisas foram desenvolvidas em uma vasta gama de produtos, mas as maçãs continuam sendo as principais frutas estocadas nessas condições e comercializadas em todo o mundo. Outras frutas e vegetais estocadas ou transportadas em atmosferas controladas incluem peras, kiwis, frutas vermelhas, repolhos, cebolas, alfaces, abacates, aspargos e bananas. Um dos maiores problemas associados com a estocagem CA é que condições diferentes são necessárias para a estocagem de cultivares diferentes. Maçãs, por exemplo, têm sido pesquisadas extensivamente e há listas das condições recomendadas para cultivares específicas disponíveis nas diferentes regiões dos EUA, Inglaterra e Europa (Stoll, 1970; 1973; Blanpied, 1977; Fidler *et al.*, 1977; Porritt, 1977; Kader, 2003; Kupferman, 2003; Saltveit, 2003b; Brecht, 2006; Erkan e Wang, 2006). Isso torna a estocagem CA muito cara, uma vez que as condições precisam ser adequadas a cada uma das cultivares assim como para diferentes frutas e vegetais.

C. Novos desenvolvimentos no armazenamento pós-colheita

O estabelecimento de aplicações comerciais da tecnologia de estocagem CA era baseado em pesquisas dos efeitos do oxigênio, dióxido de carbono e etileno (C_2H_2) na respiração e maturação de frutas como e bagas por Kidd e West (1927; 1930b; 1937; 1950). Desde então, essa tecnologia tem sido continuamente aprimorada e refinada (Dilley, 2006). No novo milênio, dois novos desenvolvimentos foram implementados. O primeiro foi a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP) como tratamento químico pós-colheita (Sisler e Blankenship, 1996). O 1-MCP é um composto de baixo ponto de ebulição. Para uso comercial ele é complexado com α -ciclodextrina para produzir um pó solúvel em água (Daly e Kourelis, 2000). Para aplicação, o pó solúvel é misturado à água, liberando 1-MCP na forma de gás, que é dispersado ao redor dos produtos. As taxas de aplicação recomendadas são de 0,2–1 ppm (Kostansek e Pereira, 2003). O tratamento dura geralmente de 12 a 24 horas, tempo suficiente para obtenção de uma resposta completa. Desde 2012 o 1-MCP foi aprovado para aplicação, em maçãs pós-colheita, em muitos países (Prange e DeLong, 2003). Em alguns países a aplicação desse composto em bananas foi aprovada, enquanto para outros produtos a aprovação governamental ainda está pendente. O 1-MCP se liga a receptores de etileno e inibe a ação do etileno endógeno e exógeno, o que leva a um retardamento considerável do processo de maturação. No entanto, cada fruta ou vegetal responde de modo diferente ao 1-MCP (Watkins, 2002; Blankenship e Dole, 2003) e mais pesquisas precisam ser realizadas sobre os seus efeitos nas plantas nos processos anteriores e posteriores às colheitas.

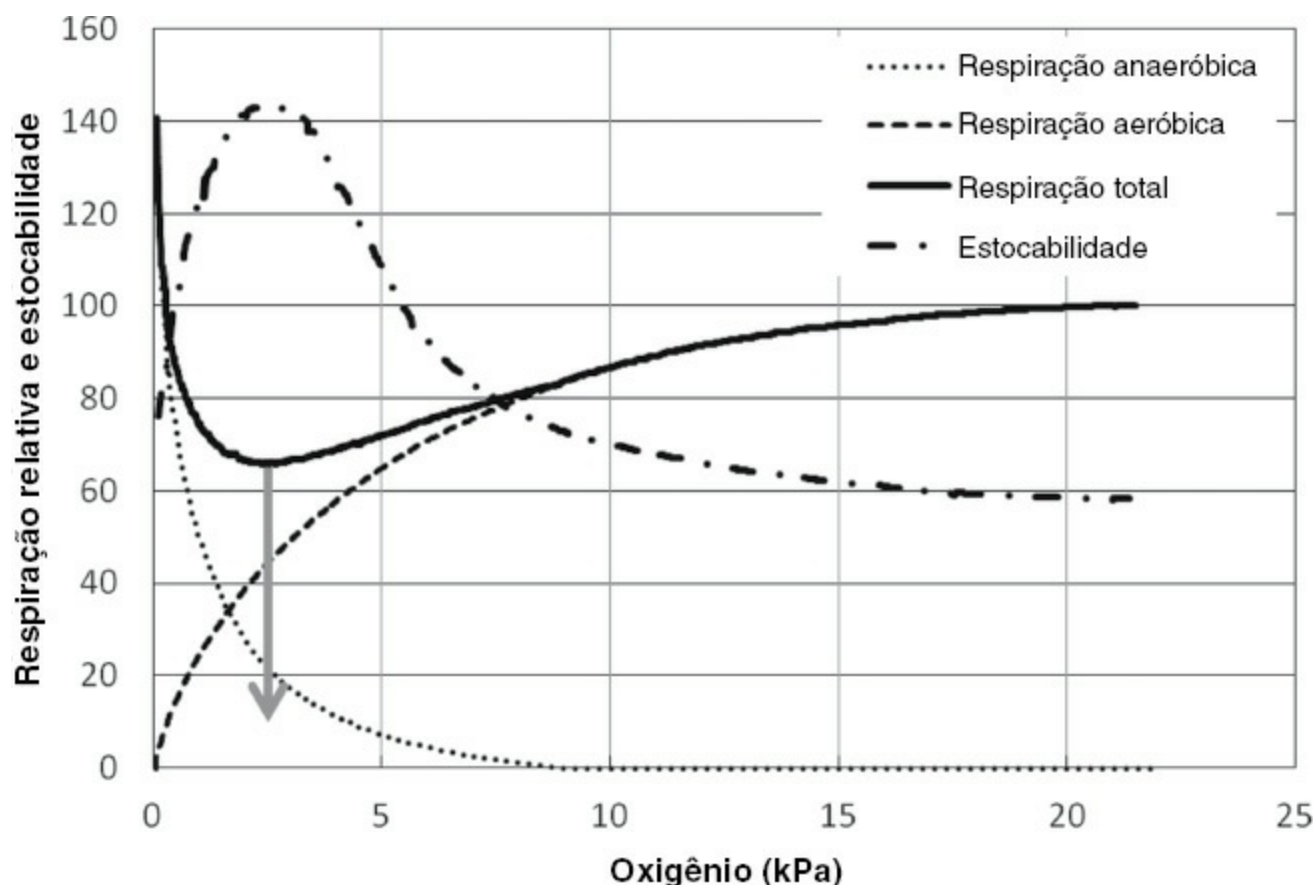


FIGURA 2.15 Efeito da concentração de oxigênio sobre a respiração e ponto de compensação aeróbica (ACP). ACP é a concentração de O_2 na qual a respiração (produção de CO_2) é mínima. De Gasser *et al.* (2008); reproduzido com autorização.

Um segundo novo desenvolvimento nas técnicas de pós-colheita abrange o controle dinâmico e adaptativo da estocagem em atmosfera controlada (DCA). As recomendações para o uso da CA e da DCA em frutas e vegetais são baseadas, em geral, em inúmeros ensaios de armazenamento na tentativa de encontrar as condições ótimas para a CA. As condições em que foram obtidos os melhores resultados são as normalmente recomendadas e mantidas do início até o final do armazenamento (Prange *et al.*, 2005; Gasser *et al.*, 2008). Uma vez que as frutas e vegetais

estocados são tecidos vivos, é razoável esperar que seu metabolismo seja de natureza dinâmica durante o armazenamento. Condições estáticas de CA, portanto, não devem ser provavelmente ótimas e podem até ser incorretas em algum momento da estocagem. Saltveit (2003b) enfatizaram este aspecto e sugeriram haver a necessidade do CA ser dinâmico. Uma técnica promissora para controlar a CA de modo dinâmico parece ser as determinações fluorescentes da clorofila (Prange *et al.*, 2003; 2005; Gasser *et al.*, 2005). A fluorescência da clorofila é afetada pelo baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono (DeEll *et al.*, 1995; 1998) e pesquisas indicam que esta técnica detecta o mais baixo nível de oxigênio tolerado por frutas e vegetais estocados. Essa concentração de oxigênio corresponde ao ACP (Gasser *et al.*, 2005; 2007). Com base no princípio da fluorescência da clorofila, o sistema Harvest Watch™ foi desenvolvido e depois patentado (Prange *et al.*, 2007). A primeira aplicação comercial do DCA em maçãs foi realizada em 2004 na Itália e nos Estados Unidos e, desde então, sua aplicação na estocagem de maçãs tem aumentado constantemente em todo o mundo. A estocagem de maçãs levemente acima do limite de concentração de oxigênio (ACP) resultou em melhoramento da retenção da qualidade e também foi relatado que essa tecnologia manteve a qualidade da maçã depois da estocagem no mesmo nível, ou melhor, do que com o uso de 1-MCP (Zanella *et al.*, 2005). Um controle adaptativo das condições inclui monitoramento das respostas dos produtos de horticultura a alterações nos parâmetros de estocagem em condições de estresse. Outro indicador envolve o começo da fermentação. Este pode ser monitorado e deduzido através dos aumentos de acetaldeído ou de etanol na atmosfera de estocagem. Dispositivos para monitorar o etanol têm sido desenvolvidos e foram aplicados na estocagem de maçãs de tipo “Elstar” na Holanda (Veltman *et al.*, 2003c). Outras técnicas podem ser incorporadas nos sistemas CA no futuro, como o controle de apodrecimento em armazenamento com compostos antimicrobianos distribuídos em forma de gás durante períodos críticos do armazenamento ou a adição de gases novos (NO, N₂O) para aumentar os benefícios do CA atual (Hoehn *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

- Abeles, F.B., 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Abeles, F.B., Takeda, F., 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruit. *Sci. Hort.*47, 77-87.
- Acaster, M.A., Kende, H., 1983. Properties and partial purification of ACC synthetase. *Plant Physiol.*72, 139-145.
- Ackermann, J., Fischer, M., Amado, R., 1992. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *J. Agric. Food Chem.*40, 1131-1134.
- Adams, D.O., Yang, S.F., 1977. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.*60, 892-896.
- Adams, D.O., Yang, S.F., 1979. Ethylene biosynthesis. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*76, 170-174.
- Aharoni, Y., 1968. Respiration of oranges and grapefruits harvested at different stages of development. *Plant Physiol.*43, 99-102.
- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*12, 647-661.
- Ahmed, A.E., Labavitch, J.M., 1980. Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening “Bartlett” pears. *Plant Physiol.*65, 1014-1016.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1978. Respiration and ethylene production in Mammee apple (*Mammea americana* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*103, 308-310.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1979a. Concentrations of carbon dioxide and ethylene in the cavity of attached papaya fruit. *HortScience*14, 138-139.
- Akamine, E.K., Goo, T., 1979b. Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Pridium* and species of *Eugenia*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*104, 632-635.
- Akhavan, I., Wrolstad, R.E., 1980. Variation of sugars and acids during ripening of pears and in the production and storage of pear concentrate. *J. Food Sci.*45, 499-501.
- Alexander, L., Grierson, D., 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.*53, 2039-2055.
- Alscher, R.G., Castelfranco, P.A., 1972. Stimulation by ethylene of chlorophyll biosynthesis in dark-grown cucumber cotyledons. *Plant Physiol.*50, 400-403.
- Apelbaum, A., Burgoon, A.C., Anderson, J.D., Solomos, T., Lieberman, M., 1981. Some characteristics of the system converting aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol.*67, 80-84.
- Areas, J.A.C., LaJollo, F.M., 1981. Starch transformation during banana ripening: I – The phosphorylase phosphatase behaviour in *Musa acuminata*. *J. Food Biochem.*5, 19-37.
- Arens, D., Seilmeier, W., Weber, E., Kloos, G., Grosch, W., 1973. Purification and properties of a carotene cooxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta*327, 295-305.
- Avissar, Y.J., Moberg, P., 1995. The common origin of the pigments of life-early steps in chlorophyll biosynthesis. *Plant Photosynth. Res.*44, 221-242.
- Awad, M., Young, R.E., 1979. Postharvest variation in cellulose, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.*64, 306-308.
- Awad, M., Young, R.E., 1980. Avocado pectinmethylesterase activity in relation to temperature, ethylene and ripening. *J. Am. Hortic. Sci.*105, 638-641.

- Ayub, R., Guis, M., BenAmor, M., Gillot, L., Roustan, J.P., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biochem.*212, 27-34.
- Azoulay-Shemer, T., Harpaz-Saad, S., Cohen-Peer, R., Mett, A., Spicer, V., Lovat, N., Krokhin, O., Brand, A., Gidoi, D., Standing, K.G., Goldschmidt, E.E., Eyal, Y., 2010. Dual N- and C-terminal processing of citrus chlorophyllase precursor within the plastid membranes leads to the mature enzyme. *Plant Cell Physiol.*52, 70-83.
- Azuma, R., Takahashi, Y., Kurata, H., Kawano, T., Shimokwa, K., Adachi, M., 1999. Does peroxidase act as a "Mg-dechetalase?" *Plant Peroxidase Newslett.*13, 145-151.
- Babbitt, J.K., Powers, M.J., Patterson, M.E., 1973. Effects of growth regulators on cellulase, polygalacturonase, respiration, color and texture of ripening tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*98, 77-81.
- Bacon, M.F., Holden, M., 1970. Chlorophyllase of sugar-beet leaves. *Phytochemistry*9, 115-125.
- Bain, J.A., 1958. Morphological and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck. *Aust. J. Bot.*6, 1-23.
- Baker, A., Graham, I.A., Hodsworth, M., Smith, S.M., 2006. Chewing the fat: β -oxidation in signaling and development. *Trends Plant Sci.*11, 124-132.
- Balague, C., Watson, C.F., Turner, A.J., Rouge, P., Pictou, S., Pech, J.C., Grierson, D., 1993. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur. J. Biochem.*212, 27-34.
- Baldwin, E.A., 2004. Flavor. In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, USDA, ARS. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/contents.html>(18 March 2011).
- Baldwin, E.A., Plotto, A., Goodner, K., 2007. Shelf-life versus flavor-life for fruits and vegetables: how to evaluate this complex trait. *Stewart Postharvest Rev.*1, 1-10.
- Barker, J., Solomos, T., 1962. Mechanisms of carbohydrate breakdown in plants. *Nature (London)*196 189-189.
- Barmore, C.R., Rouse, A.H., 1976. Pectinesterase activity in controlled atmosphere stored avocados. *J. Am. Hortic. Soc.*101, 294-296.
- Barnes, M.F., Patchett, B.J., 1976. Cell wall degrading enzymes, and the softening of senescent strawberry fruit. *J. Food Sci.*41, 1392-1395.
- Barry, C.S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A.J., Grierson, D., 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene family of tomato. *Plant J.*9, 525-535.
- Barry, C.S., Llop-Tous, M.I., Grierson, D., 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-cyclic acid synthase gene expression during transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.*123, 979-986.
- Bartley, I.M., 1974. B-Galactosidase activity in ripening apples. *Phytochemistry*13, 2107-2111.
- Bartley, I.M., 1978. Exo-polygalacturonase of apple. *Phytochemistry*17, 213-216.
- Bartley, I.M., Knee, M., 1982. The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.*9, 47-58.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J.R., Matcham, G.W.J., McDonald, E., Gustafson-Porter, K.E., 1979. Proof of synthesis that unrearranged hydroxymethylbilane is the product from deaminase and the substrate for cosynthetase in the biosynthesis of urogen III. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*316, 155-158.
- Beale, S.I., 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.*60, 45-73.
- Beale, S.I., 2005. Green genes gleaned. *Trends Plant Sci.*10, 309-312.
- Beale, S.I., Gough, S.P., Granick, S., 1975. Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*72, 2719-2723.
- Ben-Arie, R., Sonogo, L., 1980. Pectolytic enzyme involved in wooly breakdown of stored peaches. *Phytochemistry*19, 2553-2555.
- Ben-Arie, R., Sonogo, L., Frenkel, C., 1979. Changes in pectic substances in ripening pears. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*104, 500-505.
- Bendall, D.S., Bonner Jr., D.W., 1971. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol.*47, 236-245.
- Bennett, A.B., Smith, G.M., Nichols, B.G., 1987. Regulation of climacteric respiration in ripening avocado. *Plant Physiol.*83, 973-976.
- Berard, L.S., Loughheed, E.C., Murr, D.P., 1982. β -Galactosidase activity of "McIntosh" apples in storage. *HortScience*17, 660-661.
- Beyer, P.J., Kreuz, K., Kleinig, H., 1980. β -Carotene synthesis in isolated chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus*. *Planta*150, 435-438.
- Biale, J.B., 1960a. The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. *Adv. Food Res.*10, 293-354.
- Biale, J.B., 1960b. Respiration of fruits. In: Ruhland, W. (Ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Vol. 12, Part 2, Springer, Berlin, p. 586.
- Biale, J.B., 1964. Growth, maturation and senescence in fruits: recent knowledge on growth regulation and on biological oxidations has been applied to studies with fruits. *Science*146, 880-888.
- Biale, J.B., 1969. Metabolism at several levels of organization in the fruit of avocado, *Pesca americana*. *Mill. Qual. Plant. Mater. Veg.*19, 141-153.
- Biale, J.B., Barcus, D.E., 1970. Respiration patterns in tropical fruits of the Amazon basin. *Trop. Sci.*12, 93-104.
- Biale, J.B., Young, R.E., 1947. Critical oxygen concentrations for the respiration of lemons. *Am. J. Bot.*34, 301-309.
- Biale, J.B., Young, R.E., 1971. The avocado pear. In: Hulme, A.C. (Ed.), *The Biochemistry of Fruits and their Products*, Vol. 2. Academic Press, London, p. 1-63.
- Biale, J.B., Young, R.E., 1981. Respiration and ripening in fruits - retrospect and prospect. In: Friend, J., Rhodes, M.J.C. (Eds.), *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Academic Press, New York, p. 1-39.
- Biale, J.B., Young, R.E., Olmstead, A.J., 1954. Fruit respiration and ethylene production. *Plant Physiol.*29, 168-174.
- Biale, J.B., Young, R.E., Popper, C.S., Appleman, W.E., 1957. Metabolic processes in cytoplasmic particles of the avocado fruit. 1. Preparative procedure, cofactor requirements, and oxidative phosphorylation. *Physiol. Plant.*10, 48-63.
- Bishop, R.C., Klein, R.M., 1975. Photo-promotion of anthocyanin synthesis in harvested apples. *HortScience*10, 126-127.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.*28, 1-25.
- Blanpied, G.D., 1977. Requirements and recommendations for eastern and midwestern apples. *Mich. State Univ. Hortic. Rep.*28, 225-230.
- Blume, B., Grierson, D., 1997. Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusion in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.*12, 731-746.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*54, 519-546.
- Boersig, M.R., Kader, A.A., Romani, R.J., 1988. Aerobic-anaerobic respiration transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*113, 869-873.
- Boller, T., Herner, R.C., Kende, H., 1979. An assay for the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and studies on its enzymatic formation. *Planta*145, 293-303.
- Bolwell, G.P., Northcote, D.H., 1983. Induction by growth factors of polysaccharide synthases in bean cell suspension cultures. *Biochem. J.*210, 509-515.
- Bordignon, M.T.L., Gauche, C., Gris, E.F., Falcao, L.D., 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT Food Sci. Technol.*40, 594-599.
- Borisova, I.G., Budnitskaya, E.V., 1975. Lipoxygenase of chloroplasts. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*225, 439 (Cited Chem. Abstr. 84: 14788p, 1976).
- Bousquet, J.F., Thimann, K.V., 1984. Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*81, 1724-1727.
- Brackmann, A., Streif, J., Bangerth, F., 1966. Relationship between reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*88, 98-104.
- Bradford, K.J., 2008. Shang Fa Yang: pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Sci.*175, 2-7.

- Brady, C.J., 1976. The pectinesterase of the pulp of banana fruit. *Aust. J. Plant Physiol.*3, 163-172.
- Brady, C.J., Palmer, J.K., O'Connell, P.B.H., Smillie, R.M., 1976. An increase in protein synthesising during ripening of the banana fruit. *Phytochemistry*9, 1037-1047.
- Bramley, P.M., Than, A., Davies, B.H., 1977. Alternative pathways of carotene cyclisation in *Phycomyces blackesleeanus*. *Phytochemistry*16, 235-238.
- Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J., 1998. Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*). *J. Agric. Food Chem.*46, 2287-2292.
- Braverman, J.B.S., 1963. Introduction to the Biochemistry of Foods. Elsevier, Amsterdam.
- Brecht, J.K., 2006. Controlled atmosphere, modified atmosphere and modified atmosphere packaging for vegetables. *Stewart Postharvest Rev.*5 (5), 1-6.
- Brecht, J.K., Huber, D.J., 1988. Products released from enzymically active cell wall stimulate ethylene production and ripening in preclimacteric tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol.*88, 1037-1041.
- Britton, G., 1976. Biosynthesis of carotenoids. In: Goodwin, T.W. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 262-327.
- Britton, G., 1979. Carotenoid biosynthesis – a target for herbicide activity. *Z. Naturforsch.*34C, 979-985.
- Britton, G., 1982. Biosynthesis of carotenoids. In: Goodwin, T.W. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 262-327.
- Brouillard, R., 1983. The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochemistry*22, 1311-1323.
- Broun, P., 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis, a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.*8, 272-279.
- Browse, J., Møller, I.M., Rasmussen, A.G., 2006. Respiration and lipid metabolism. In: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), *Plant Physiology*. Chapter 11. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p. 251-288.
- Brummell, D.A., 2005. Regulation and genetic manipulation of ripening in climacteric fruit. *Stewart Postharvest Rev.*3, 1-19.
- Brummell, D.A., Cin, V.D., Lurie, S., Crisoto, C.H., Labavitch, J.M., 2004. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with assisted disassembly of cell wall pectins. *J. Exp. Bot.*55, 2041-2052.
- Bruyant-Vannier, M.-P., Gaudinet-Schauman, A., Boulard, T., Morvan, C., 1966. Solubilization and partial characterization of pectinmethyltransferase from flax cells. *Plant Physiol. Biochem.*34, 489-499.
- Buckle, K.A., Edwards, R.A., 1969. Chlorophyll degradation products from processed pea puree. *Phytochemistry*8, 1901-1906.
- Buckle, K.A., Edwards, R.A., 1970. Chlorophyll, colour and pH changes in HTST processed green pea puree. *J. Food Technol.*5, 173-186.
- Buescher, R.W., Furmanski, R.J., 1978. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. *J. Food Sci.*43, 264-266.
- Buescher, R.W., Tigchelaar, E.C., 1975. Pectinesterase, polygalacturonase, Cx-cellulase activities and softening of x in the rin tomato mutant. *HortSci*10, 4-25.
- Bufler, G., 1984. Ethylene-enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiol.*75, 192-195.
- Bufler, G., 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiol.*80 539-592.
- Bufler, G., Bangerth, F., 1983. Effects of propylene and oxygen on the ethylene producing system of apples. *Physiol. Plant.*58, 486-492.
- Burg, S.P., 1973. Ethylene in plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*70, 591-597.
- Burg, S.P., Burg, E.A., 1962. Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.*37, 179.
- Burg, S.P., Burg, E.A., 1965. Ethylene action and the ripening of fruits. *Science*148, 1190-1196.
- Burg, S.P., Thimann, K.V., 1959. The physiology of ethylene formation in apples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*45, 335-344.
- Bush, M.S., Marry, M., Huxcham, I.M., Jarvis, M.C., McCann, M.C., 2001. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta*213, 869-880.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., 1993. Volatile compounds of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. *ACS Symp. Ser.*525, 23-34.
- Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C., 1987. Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agric. Food Chem.*35, 540-544.
- Caffall, K.H., Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*344, 1879-1900.
- Camara, B., Brangeon, J., 1981. Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annum* fruit. *Planta*151, 359.
- Camara, B., Badat, F., Monéger, R., 1982. Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.*127, 255-258.
- Campbell, H., 1937. Undesirable color changes in frozen peas stored at insufficiently low temperatures. *J. Food Sci.*2, 55-57.
- Canjura, F.L., Watkins, R.H., Schwartz, S.J., 1999. Color improvement and metallo-chlorophyll complexes in continuous flow aseptically processed peas. *J. Food Sci.*64, 987-990.
- Cansfield, P.E., Francis, F.J., 1970. Quantitative methods for anthocyanins. 5. Separation of cranberry phenolics by electrophoresis and chromatography. *J. Food Sci.*35, 309-311.
- Carnal, N., Black, C.C., 1978. Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*86, 20-26.
- Carpita, N., McCann, M., 2000. The cell wall. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology*. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108.
- Chalmers, D.J., Rowan, K.S., 1971. The climacteric in ripening tomato fruit. *Plant Physiol.*48, 235-240.
- Chang, C., Bleecker, A.B., 2004. Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiol.*136, 2895-2899.
- Chauhan, S.K., Tyagi, S.M., Singh, D., 2001. Pectinolytic liquefaction of apricot, plum, and mango pulps for fruit extraction. *Int. J. Food Prop.*4, 103-109.
- Chepurenko, N.V., Borisova, I.G., Budnitskaya, E.V., 1978. Isolation and characterization of isoenzymes of lipoxygenase from pea seeds. *Biochem. (English Transl.)*43, 480-485.
- Chereskin, B.M., Wong, Y.-S., Castelfranco, P.A., 1982. *In vitro* synthesis of the chlorophyll isocyclic ring. Transformation of magnesium-protoporphyrin IX and magnesium-protoporphyrin mono methyl ester into magnesium-2,4-divinyl pheoporphyrin *a*. *Plant Physiol.*70, 987.
- Chitarra, A.B., LaJollo, F.M., 1981. Phosphorylase, phosphatase, α -amylase activity and starch breakdown during ripening of Marmelo banana (*Musa acuminata* (olla) \times *musubalbisi* (olla) ABB group). *Whole fruit and thin slices. J. Am. Soc. Hortic. Sci.*106, 579-584.
- Chou, H., Breene, N.M., 1972. Oxidative discoloration of β -carotene in low moisture foods. *J. Food Sci.*37, 66-68.
- Cohen, B.-S., Grossman, S., Pinsky, A., Klein, B., 1984. Chlorophyll inhibition of lipoxygenase in growing plants. *J. Agric. Food Chem.*32, 516-519.
- Coleman, J.O.D., Palmer, J.M., 1972. The oxidation of malate by isolated plant mitochondria. *Eur. J. Biochem.*26, 499-509.
- Costa, M.L., Crevello, P.M., Chaves, A.R., Marines, G.A., 2002. Characterization of Mg-dechelataze activity obtained from *Fragaria* \times *ananassa*. *Plant Physiol. Biochem.*40, 111-118.
- Craker, L.E., Wetherbee, P.J., 1973. Ethylene, carbon dioxide, and anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.*52, 177-179.
- Dahodwala, S., Humphrey, A., Weibel, M., 1974. Pectic enzymes: individual and concerted kinetic behavior of pectinesterase and pectinase. *J. Food Sci.*39, 920-926.
- Dalal, K.B., 1965. Investigation into flavor chemistry with special reference to synthesis of volatiles in developing tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) under field and greenhouse growing conditions. PhD thesis Utah State University, Logan, UT.

- Dalal, K.B., Salunkhe, D.K., Olson, L.E., Do, J.Y., Yu, M.H., 1968. Volatile components of developing tomato fruit grown under field and greenhouse conditions. *Plant Cell Physiol.*9, 389-400.
- Daly, J., Kourelis, B., 2000. Synthesis methods, complexes and delivery methods for the safe and convenient storage, transport and application of compounds for inhibiting the ethylene response in plants. US Patent No. 6,017,849 25 January 2000.
- Davies, B.H., 1973. Carotene biosynthesis in fungi. *Pure Appl. Chem.*35, 1-28.
- Davies, J.N., Hobson, G.E., 1981. The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition, and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*15, 205-280.
- Davison, P.A., Schubert, H.L., Reid, J.D., Iorg, C.D., Heroux, A., Hill, C.P., Hunter, C.N., 2005. Structural and biochemical characterization of Gun4 suggests a mechanism for its role in chlorophyll biosynthesis. *Biochemistry*44, 7603-7612.
- De Jager, A., Johnson, D., Höhn, E., 1996. Determination and prediction of optimum harvest date of apples and pears. ECSC-EC-EAEC, Brussels-Luxembourg.
- De Pooter, H.L., Montens, J.P., Dirinck, P.J., Willaert, G.A., Schamp, N.M., 1982. Ripening induced in preclimacteric immature Golden Delicious apples by propionic and butyric acids. *Phytochemistry*21, 1015-1016.
- De Pooter, H.L., D'Ydewalle, Y.E., Willaert, G.A., Dirinck, P.J., Schamp, N.M., 1984. Acetic and propionic acids, inducer of ripening in preclimacteric Golden Delicious apples. *Phytochemistry*23, 23-26.
- De Swardt, G.H., Maxie, E.C., 1967. Pectin methylesterase in the ripening banana. *S. Afr. J. Agric. Res.*10, 501-506.
- DeEll, J.R., Prange, R.K., Murr, D.P., 1995. Chlorophyll fluorescence as a potential indicator of controlled-atmosphere disorders in "Marshall" McIntosh apples. *HortScience*30, 1084-1085.
- DeEll, J.R., Prange, R.K., Murr, D.P., 1998. Chlorophyll fluorescence techniques to detect atmospheric stress in stored apples. *Acta Hort*464, 127-131.
- Delmer, D.P., 1999. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*50, 245-276.
- Dick, A.J., Laskey, G., Lidster, P.D., 1984. Inhibition of β -galactosidase isolated from "McIntosh" apples. *HortScience*19, 552-553.
- Dilley, D.R., 2006. Development of controlled atmosphere storage technologies. *Stewart Postharvest Rev.*6 (5), 1-8.
- Dixon, J., Hewett, E.W., 2000. Factors affecting apple aroma/flavor volatile concentration: a review. *N.Z. J. Crop Hortic. Sci.*28, 155-173.
- Dixon, W.L., ap Rees, T., 1980. Identification of the regulatory steps in glycolysis in potato tubers. *Phytochemistry*19, 1297-1301.
- Dixon, W.L., Franks, F., ap Rees, T., 1981. Cold lability of phosphofructokinase from potato tubers. *Phytochemistry*20, 969-972.
- Doblin, M.S., Vergara, C.E., Read, S.M., Newbigin, E., Bacic, A., 2003. Plant cell wall biosynthesis: making bricks. In: Rose, J.K.C. (Ed.), *The Plant Cell Wall*, Blackwell, Oxford, p. 183-222.
- Dolendo, A.L., Luh, B.S., Pratt, H.K., 1966. Relation of pectic and fatty acid changes to respiration rate during ripening of avocado fruit. *J. Food Sci.*31, 332-336.
- Dong, J.G., Fernandez-Maculet, J.C., Yang, S.F., 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*89, 9789-9793.
- Doreyappa Gowda, I.N., Huddar, A.G., 2001. Studies on ripening changes in mango (*Mangifera indica* L.) fruits. *J. Food Sci. Technol.*38, 135-137.
- Douillard, R., Bergeron, E., 1978. Activite lipoxyginasique de chloroplastes plantules de Ble. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D*286, 753.
- Dresel, E.J.B., Falk, J.E., 1953. Conversion of δ -aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature*172, 1185.
- Dull, G.G., Young, R.E., Biale, J.B., 1967. Respiratory patterns in fruit of pineapple, *Ananas comosus*, detached at different stages of development. *Physiol. Plant.*20, 1059-1065.
- Dürr, P., Röhlin, M., 1981. Development of synthetic apple juice odour. *Lebensm. Wiss. Technol.*14, 313-314.
- Eaks, I.L., 1970. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny. *Plant Physiol.*45, 334-338.
- Eaks, I.L., Morris, L., 1956. Respiration of cucumber fruits associated with physiological injury at chilling temperatures. *Plant Physiol.*31, 308-314.
- Ebert, G., Gross, J., 1985. Carotenoid changes in the peel of ripening persimmon (*Diospyros Kam*) Triumph. *Phytochemistry*24, 29-32.
- Eberhardt, N.L., Rilling, H.C., 1975. Phenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J. Biol. Chem.*250, 863-866.
- Eckhardt, U., Grimm, B., 2004. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol. Biol.*56, 1-14.
- Eckhardt, U., Grimm, B., Hortensteiner, S., 2004. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol. Biol.*56, 1-14.
- von Elbe, J.H., Huang, A.S., Attoe, E.L., Nank, W.K., 1986. Pigment composition and colour of conventional Veri-Green canned beans. *J. Agric. Food Chem.*34, 52-54.
- Eiati, S.K., Budowski, P., Monselise, S.P., 1975. Carotenoid changes in the 'Shamouti' orange peel during chloroplast-chromoplast transformation on and off the tree. *J. Exp. Bot.*26, 624-632.
- Erkan, M., Wang, C.Y., 2006. Modified and controlled atmosphere storage of subtropical crops. *Stewart Postharvest Rev.*5 (4), 1-8.
- Eskin, N.A.M., 1979. *Plant Pigments, Flavors and Textures: The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds*. Academic Press, New York.
- Eskin, N.A.M., Grossmann, S., Pinsky, A., 1977. The biochemistry of lipoygenase in relation to food quality. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*9, 1-40.
- Espineda, C.E., Linford, A.S., Devine, D., Brusslan, J., Yamasato, A., 1999. The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*96, 10507-10511.
- Farin, D., Ikan, R., Gross, J., 1983. The carotenoid pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata*) cv. Michal during ripening. *Phytochemistry*22, 403-408.
- Fellers, P.J., 1991. The relationship between the ratio of degree Brix to percent acid and sensory flavor in grapefruit juice. *Food Technol.*45 68, 70, 72-75.
- Fernandez-Maculet, J.C., Yang, S.F., 1992. Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiol.*99, 751-754.
- Fidler, J.C., Wilkinson, B.B., Edney, K.L., Sharples, R.O., 1977. The biology of apple and pear storage. *Res. Rev. – Commonw. Agric. Bur. Engl.*3, 235.
- Flath, R.A., Black, D.R., Guadagni, D.G., McFadden, W.H., Schultz, T.H., 1967. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *J. Agric. Food Chem.*15, 29-35.
- Fleming, H.P., Cobb, W.Y., Etschells, J.L., Bell, T.A., 1968. The formation of carbonyl compounds in cucumbers. *J. Food Sci.*33, 572-576.
- Flores, F.B., El Yahauoui, F., de Billerbeck, G., Romojaro, F., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Ambid, C., 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charantais Canteloupe melons. *J. Exp. Bot.*53, 201-206.
- Foda, Y.H., 1957. Pectic changes during ripening as related to flesh firmness in the tomato. PhD thesis University of Illinois, Urbana.
- Forkmann, G., 1991. Flavonoids as flower pigments. The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed*106, 1-26.
- Freeman, J.A., Woodbridge, C.G., 1960. Effect of maturation, ripening and truss position on the free amino acid content in tomato fruits. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*76, 515-523.
- Frenkel, C., 1979. Role of oxidative metabolism in the onset of senescence in plant storage. *Z. Ernaehrungswiss*18, 209-212.
- Frenkel, C., Eskin, N.A.M., 1977. Ethylene evolution as related to changes in hydroperoxides in ripening tomato fruit. *HortScience*12, 552-553.
- Frenkel, C., Klein, I., Dilley, D.R., 1968. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. *Plant Physiol.*43, 1146-1153.
- Fuesler, T.P., Hanamoto, C.M., Castelfranco, P.A., 1982. Separation of Mg-protoporphyrin IX and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester synthesized *de novo* by developing cucumber etioplasts. *Plant Physiol.*69, 421-423.
- Fuleki, T., 1969. The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onion. *J. Food Sci.*34, 365-369.
- Fuleki, T., 1971. Anthocyanins in red onion. *Allium cepa*. *J. Food Sci.*36, 101-104.

- Gaillard, T., Matthew, J.A., 1977. Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruits. *Phytochemistry*16, 339-343.
- Games, D.E., Jackson, A.H., Jackson, J.R., Belcher, R.V., Smith, S.G., 1976. Biosynthesis of protoporphyrin-IX from coprotoporphyrinogen III. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*6, 187-189.
- Gane, R., 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature (London)*134 1008-1008.
- Gasser, F., Dättwyler, D., Schneider, K., Naunheim, W., Hoehn, E., 2005. Effects of decreasing oxygen levels in the storage atmosphere on the respiration and production of volatiles of "Idared" apples. *Acta Horti*682, 1585-1592.
- Gasser, F., Eppler, T., Naunheim, W., Gabioud, S., Hoehn, E., 2007. Control of critical oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. *Acta Horti*796, 69-76.
- Gasser, F., Eppler, T., Naunheim, W., Gabioud, S., Höhn, E., 2008. Control of critical oxygen level during dynamic CA storage of apples. *Agrarforschung*15, 98-103.
- Gazzarrini, S., McCourt, P., 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.*4, 339-343.
- Geisler, G., Radler, F., 1963. Developmental and ripening processes in grapes of *Vitis*. *Ber Dtsch. Bot. Ges.*76, 112-119.
- Génard, M., Gouble, B., 2005. ETHY. A theory of fruit climacteric ethylene emission. *Plant Physiol.*139, 531-545.
- Gibson, H.D., Laver, W.G., Neuberger, A., 1958. Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. II. The formation of 5-aminolevulinic acid from glycine and succinyl-CoA by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.*70, 71-81.
- Girardi, C.L., Corrent, A.R., Lucchetta, L., Zanuzo, M.R., da Costa, T.S., Brackmann, A., Twyman, R.M., Nora, F.R., Nora, L., Silva, J.A., Rombaldi, C.V., 2005. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripa) during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*38, 25-38.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.*14, 217-225.
- Gokmen, V., Bahceci, S., Serpen, A., Acar, J., 2005. Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzymic activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *LWT*38, 903-908.
- Gold, H.J., Weckel, K.G., 1959. Degradation of chlorophyll to pheophytin during sterilization of canned green peas. *Food Technol.*13, 281-286.
- Goldstein, J.L., Wick, E.L., 1969. Lipids in ripening banana fruit. *J. Food Sci.*34, 482-484.
- Gonnet, J.F., 1998. Color effects of copigmentation of anthocyanins. Revisited – 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.*63, 409-415.
- Gorin, N., 1973. Several compounds in Golden Delicious apples as possible parameters of acceptability. *J. Agric. Food Chem.*21, 671-673.
- Goslings, D., Meskauskiene, R., Kim, C., Lee, K.P., Nater, M., Apel, K., 2004. Concurrent interactions of heme and FLU with Glut RNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown *Arabidopsis* plants. *Plant J.*40, 957-967.
- Goto, T., Kondo, T., Tamura, H., Kawahori, K., Hatton, H., 1983. Structure of platyconin, a diacylated anthocyanin isolated from the Chinese bell-flower, *Platycondon grandiflorum*. *Tetrahedr. Lett.*24, 2181-2184.
- Gou, J.-Y., Felippes, F.F., Liu, C.-J., Weigel, D., Wang, J.-W., 2011. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell*23, 1512-1522.
- Goulao, L.F., Oliveira, C.M., 2007. Molecular identification of novel differentially expressed mRNAs up-regulated during ripening of apples. *Plant Sci.*172, 306-318.
- Gray, J.C., Keckwick, R.G.O., 1969. Mevalonate kinase from etiolated cotyledons of French beans. *Biochem. J.*113, 37.
- Gray, J.C., Keckwick, R.G.O., 1972. The inhibition of plant mevalonate kinase preparation by phenyl pyrophosphates. *Biochim. Biophys. Acta*279, 290-296.
- Gray, J.C., Keckwick, R.G.O., 1973. Mevalonate kinase in green leaves and etiolated cotyledons of the French bean *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. J.*133, 335-347.
- Greger, V., Schieberle, P., 2007. Characterisation of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of molecular sensory science concepts. *J. Agric. Food Chem.*55, 5221-5228.
- Grommeck, R., Markakis, P., 1964. Effect of peroxidase on anthocyanin pigments. *J. Food Sci.*29, 53-57.
- Grosch, W., Laskaway, G., Weber, F., 1976. Formation of volatile carbonyl compounds and cooxidation of β -carotene by lipoxygenase from wheat, potato, flax and beans. *J. Agric. Food Chem.*24, 456-459.
- Gross, K.C., 1985. Promotion of ethylene evolution and ripening of tomato fruit by galactose. *Plant Physiol.*79, 306-307.
- Gross, K.C., Wallner, S.J., 1979. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*63, 117-120.
- Gross, J., Timberg, R., Graej, M., 1983. Pigment and ultrastructural changes in the developing *Mammalo Citrus grandis* "Goliath". *Bot. Gaz. (Chicago)*144, 401-404.
- Grossman, A.R., Lohr, M., Im, C.S., 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet.*38, 119-173.
- Grumbach, K.H., Forn, B., 1980. Chloroplast autonomy in acetyl coenzyme a formation and terpenoid synthesis. *Z. Naturforsch*35C, 645-648.
- Guerriero, G., Fugelstad, J., Bulone, V., 2010. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants?. *J. Integrative Plant Biol.*52, 161-175.
- Gunawan, M.I., Barringer, S.A., 2000. Green colour degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *J. Food Proc. Pres.*24, 253-263.
- Gupte, S.M., Francis, F.J., 1964. Effect of pH adjustment high-temperature short-time processing on colour and pigment retention in spinach puree. *Food Technol.*18, 1645-1658.
- Gupte, S.M., El-Bisi, H.M., Francis, F.J., 1964. Kinetics of thermal degradation of chlorophyll in spinach puree. *J. Food Sci.*29, 379-382.
- Hamilton, A., Lycett, G.W., Grierson, D., 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*346, 284-287.
- Hammett, L.K., Kirk, H.J., Todd, H.G., Hale, S.A., 1977. Association between soluble solids/acid content and days from full bloom of "Golden Delicious" apple fruits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*102, 429-434.
- Hanamoto, M., Castelfranco, P.A., 1983. Separation of monovinyl and divinyl protochlorophyllides and chlorophyllides from etiolated and phototransformed cucumber cotyledons. *Plant Physiol.*73, 79.
- Hanaoka, T., Ito, K., 1957. Studies on the keeping quality of onions. 1. Relation between the characters of bulbs and their sprouting during storage. *J. Hortic. Assoc. Jpn*26, 129-136.
- Hansen, E., 1942. Quantitative study of ethylene production in relation to respiration of pears. *Bot. Gaz. (Chicago)*103, 543-558.
- Harker, F.R., Marsh, K.B., Young, H., Murray, S.H., Gunson, F.A., Walker, S.B., 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*24, 241-250.
- Harborne, J.B., 1967. Comparative Biochemistry of the Bioflavonoids. Academic Press, New York.
- Harborne, J.B., 1976. Functions of flavonoids in plants. In: Goodwin, T.W. (Ed.), 2nd ed. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 525.
- Hardy, S.I., Castelfranco, P.A., Rebeiz, C.A., 1971. Effect of the hypocotyl hook on chlorophyll accumulation in excised cotyledons of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol.*47, 705-708.
- Harpaz-Saad, S., Azoulay, Y., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shibolet, Y.M., Hortensteiner, S., Gidoni, D., Gal-On, A., Goldschmidt, E.E., Eyal, Y., 2007. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *Plant Cell*19, 1007-1022.
- Harper, K.A., 1968. Structural changes of flavylum salts. IV. Polarographic and spectrometric examination of perlargonidin chloride. *Aust. J. Chem.*21, 221-227.
- Hartmann, C., Drouet, A., Morin, F., 1987. Ethylene and ripening of apple, pear and cherry fruit. *Plant Physiol.*25, 505-512.

- Haslam, E., Gupta, R.K., Al-Shafi, S.M.K., Layden, K., 1982. J. Chem. Soc., Perkin Trans.1, 2525.
- Hayashi, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.46, 139-168.
- Hayashi, T., Yohida, K., Park, Y.W., Konishi, T., Baba, K., 2005. Cellulose metabolism in plants. Int. Rev. Cytol.247, 1-34.
- Heaton, J.W., Marangoni, A.G., 1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. Trends Food Sci. Technol.7, 8-15.
- Hermann, J., 1970. Berechnung der chemischen und seerischen Veränderungen unserer Lebensmittel bei Erhitzungs- und Lagerungsprozessen. Ernährungsforschung15, 279.
- Herner, R.C., 1973. Fiber determination. Progress report on asparagus research. Mich. Agric. Exp. Stn. Rep.217, 11.
- Herner, R.C., Sink, K.C., 1973. Ethylene production and respiratory behaviour of rin tomato mutant. Plant Physiol.52, 38-42.
- Hilderbrand, D.F., Hymovitz, T., 1982. Carotene and chlorophyll bleaching by soybeans with and without seed lipoxygenase. J. Agric. Food Chem.30, 705-708.
- Hillman, C.R., Burin, V.M., Bordignon-Luiz, M.T., 2011. Thermal degradation kinetics of anthocyanins in grape juice and concentrate. Int. J. Food Sci. Technol.46, 1997-2000.
- Hobson, G.E., 1965. The firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. J. Hortic. Sci.40, 66-72.
- Hobson, G., 1967. The effects of alleles at the "never ripe" locus on the ripening tomato fruit. Phytochemistry6, 1337-1341.
- Hobson, G., 1968. Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. J. Food Sci.33, 588-591.
- Hobson, G.E., Grierson, D., 1993. Tomato. In: Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G. (Eds.), Biochemistry of Fruit Ripening, Chapman and Hall, London, p. 405-442.
- Hobson, G.E., Lance, C., Young, R.E., Biale, J.B., 1966. Isolation of active subcellular particles from avocado fruit at various stages of ripeness. Nature (London)209, 1242-1243.
- Hoehn, E., Gasser, F., Guggenbühl, B., Künsch, U., 2003. Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. Postharvest Biol. Technol.27, 27-37.
- Hoehn, E., Prange, R.K., Vigneault, C., 2009. Storage technology and applications. In: Yahia, E.M. (Ed.), Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 160-192.
- Hoffman, N.E., Yang, S.F., 1980. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. J. Am. Soc. Hortic. Sci.105, 492-495.
- Höhn, E., Gasser, F., Dätwyler, D., Jampen, M., 1996. Harvest, storage and ripening of pears. AgrarForschung3, 369-372.
- Höhn, E., Schärer, H., Künsch, U., 2003. Karottengeschmack – Beliebtheit, Süßigkeit und Bitterkeit. AgrarForschung10, 144-149.
- Holden, M., 1965. Chlorophyll bleaching by legume seeds. J. Sci. Food Agric.16, 312-325.
- Holdsworth, M.J., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W., Grierson, D., 1987. Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. Nucleic Acids Res.15, 731-739.
- Holdsworth, M.J., Schuch, W., Grierson, D., 1988. Organization and expression for a wound/ripening-related small multigene family from tomato. Plant Mol. Biol.11, 81-88.
- Holton, T.A., Cornish, E.C., 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell7, 1071-1083.
- Hortensteiner, S., 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. Cell. Mol. Life Sci.56, 330-347.
- Hortensteiner, S., Krautler, B., 2011. Chlorophyll breakdown in high plants. Biochim. Biophys. Acta1807, 977-988.
- Hubbermann, E.M., Heins, A., Stockmann, H., Schwartz, K., 2006. Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich blackcurrant and elderberry concentrates. Eur. Food Res. Technol.223, 83-90.
- Huber, D.J., 1983. Poluronide degradation and hemicellulase modifications in ripening tomato fruit. J. Am. Hortic. Soc.108, 405-409.
- Huff, A., 1984. Sugar regulation of plastid interconversion in epicarp of citrus fruit. Plant Physiol.76, 258-261.
- Hulme, A.C., Jones, J.D., Woolworton, L.S.C., 1963. The respiration climacteric in apple fruits. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B158, 514-535.
- Multin, H.O., Levine, A.S., 1965. Pectinmethylesterase in the ripening banana. J. Food Sci.30, 917.
- Humphrey, A.M., 1980. Chlorophyll. Food Chem.5, 57-67.
- Hyde, R.B., Morrison, J.W., 1964. The effect of storage temperature on reducing sugars, pH and phosphorylase enzyme activity in potato tubers. Am. Potato J.41, 163-168.
- Ikemefuna, J., Adamson, J., 1985. Chlorophyll and carotenoid changes in ripening palm fruit, *Elacis guimneesis*. Phytochemistry23, 1413-1415.
- Imamura, M., Shimizu, S., 1974. Metabolism of chlorophyll in higher plants. IV. Relationship of fatty acid oxidation and chlorophyll bleaching in plant extracts. Plant Cell Physiol.15, 187-190.
- Imaseki, H., Watanabe, A., 1978. Inhibition of ethylene inhibition by osmotic shock. Further evidence for control of ethylene production. Plant Cell Physiol.19, 345-348.
- Isaac, J.E., Rhodes, M.J.C., 1982. Purification and properties of phosphofructokinase from fruits of *Lycopersicon esculentum*. Phytochemistry21, 1553-1556.
- Isaac, J.E., Rhodes, M.J.C., 1987. Phosphofructokinase and ripening in *Lycopersicon esculentum* fruits. Phytochemistry26, 649-653.
- Isherwood, F.A., 1976. Mechanisms of starch sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. Phytochemistry15, 33-41.
- Ishii, T., 1995. Pectic polysaccharides from bamboo shoot cell walls. Mokuzai Gakkaishi41, 669-674.
- Ishii, T., 1997. O-acetylated oligosaccharides from pectins from potato tuber cell walls. Plant Physiol.113, 1265-1272.
- Ishii, T., 2002. A sensitive and rapid bioassay of homogalacturonan synthase using 2- Aminobenzamide-labeled oligogalacturonides. Plant Cell Physiol.43, 1386-1389.
- Issenberg, P., Wick, E.L., 1963. Volatile components of bananas. J. Agric. Food Chem.11, 2-8.
- Jackman, R.L., Stanley, D.W., 1995. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. Trends Food Sci. Technol.6, 187-194.
- Jackson, A., Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Evans, N., Games, D.E., Matlin, S.A., Elder, G.E., Smith, S.G., 1976. Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrins. Philos. Trans. R. Soc. Lond.273, 191-206.
- Jadhav, S., Singh, B., Salunkhe, D.K., 1972. Metabolism of unsaturated fatty acids in tomato fruit. Linoleic and linolenic acid as precursors of hexanal. Plant Cell Physiol.13, 449-459.
- Jaffe, E.K., 2003. An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. Chem. Biol.10, 25-34.
- Jaffe, E.K., 2004. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. Bioorg. Chem.32, 316-325.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lesica, R.F., 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. Trends Plant Sci.11, 33-39.
- Jarvis, M.C., 2011. Plant cell walls: supramolecular assemblies. Food Hydrocoll.25, 257-262.
- Jiang, Y.M., Fu, J.R., 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: molecular aspects. Plant Growth Regul.30, 193-200.
- Jiang, Y., Jiang, Y., Qu, H., Duan, X., Luo, Y., Jang, W., 2007. Energy aspects in ripening and senescence of harvested horticultural crops. Stewart Postharvest Rev.2, 1-5.
- Jimenez-Bermudez, S., Redono-Nevaldo, J., Mufioz-Blanco, J., Caballero, J.L., Lopez-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol.128, 751-759.
- John, M.A., Dey, P.M., 1986. Post harvest changes in fruit cell wall. Adv. Food Res.30, 139-193.
- Jones, I.D., White, R.C., Gibbs, E., 1961. The formation of pheophorbides during brine preservation of cucumber. Food Technol.15, 172.

- Jones, I.D., White, R.C., Gibbs, E., 1963. Influence of bleaching or brining treatments on the formation of chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in green plant tissue. *J. Food Sci.*28, 437.
- Jones, M.G., 2008. Formation of vegetable flavor. In: Brückner, B., Grant Wyllie, S. (Eds.), *Fruit and Vegetable Flavor*. Woodhead, Cambridge, p. 71-102.
- Jones, R.A., Scott, S.J., 1983. Genetic potential to improve tomato flavor in commercial F hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*109, 318.
- Jordan, P.M., Seehra, J.S., 1979. The biosynthesis of uroporphyrinogen III. Order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring. *FEBS Lett.*104, 364-366.
- Jorgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., 2005. Metabolite formation and metabolic channelling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.*8, 280-291.
- Joshi, P., Mansfield, S.D., 2007. The cellulose paradox – simple molecule, complex biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*10, 220-226.
- Joslyn, M.A., Mackinney, G., 1938. The rate of conversion of chlorophyll to pheophytin. *J. Am. Chem. Soc.*60, 1132-1136.
- Kacperska, A., Kubacka-Zabalska, M., 1984. Is lipoxygenase involved in biosynthesis of wound ethylene?. In: Siegenthaler, P.A., Eichenberger, W. (Eds.), *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier, Amsterdam, p. 521-522.
- Kacperska, A., Kubacka-Zabalska, M., 1985. Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC?. *Physiol. Plant*64, 333-338.
- Kader, A.A., 2003. A summary of CA requirements and recommendations for fruits other than apples. *Acta Hort.*600, 737-740.
- Kader, A.A., 2008. Perspective flavor quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*88, 1863-1868.
- Kader, A.A., Stevens, M.A., Albright-Holton, M., Morris, C.C., Algazi, M., 1977. Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*102, 724-731.
- Kanellis, A.K., Kalaitzis, P., 1992. Cellulase occurs in multiple active forms in ripe avocado mesocarp. *Plant Physiol.*98, 530-534.
- Kannangara, C.G., Gough, S.P., Oliver, R.P., Rasmussen, S.K., 1984. Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in greening barley leaves IV. Activation of glutamate by ligation to RNA. *Carlsberg Res. Commun.*43, 185-194.
- Kapp, P.P., 1966. Some effects of variety, maturity, and storage on fatty acids in fruit pericarp of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Diss. Abstr.*27, 77B.
- Kato, T., 1966. Physiological studies on the bulbing and dormancy of onion plant. VIII. Relations between dormancy and organic constituents of bulbs. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*35, 142-151.
- Kauss, H., Swanson, A.L., Hassid, W.Z., 1967. Biosynthesis of the methyl ester groups of pectin by transmethylation from S-adenosyl-L-methionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*26, 234-240.
- Kazeniak, S.J., Hall, R.M., 1970. Flavor chemistry of tomato volatiles. *J. Food Sci.*35, 519-530.
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P., 1973. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.*51, 188-197.
- Kende, H., 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*44, 283-307.
- Kennedy, M.G.H., Isherwood, F.A., 1975. Activity of phosphorylase in *Solanum tuberosum* during low temperature storage. *Phytochemistry*14, 667-670.
- Kertesz, Z.I., 1951. *The Pectic Substances*. Wiley Interscience, New York.
- Khalyfa, A., Kermasha, S., Marsot, P., Goetghebuer, M., 1995. Purification and characterization of chlorophyllase from alga *Phaeodactylum tricorutum* by preparative native electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*53, 11-27.
- Kidd, F., West, C., 1922. "Brown heart", a functional disease of apples and pears. *Food Invest. Board Rep.*1921, 14.
- Kidd, F., West, C., 1927. Gas storage of fruit. Great Britain Department of Scientific Industrial Research Food Investigation Board Report Vol. 30, 87.
- Kidd, F., West, C., 1930. Physiology of fruits: changes in the respiratory activity of apples during senescence at different temperatures. *Proc. R. Soc. Lond.*106, 93-109.
- Kidd, F., West, C., 1930. The gas storage of fruit. II. Optimum temperatures and atmospheres. *J. Pomol. Hortic. Sci.*8, 67-77.
- Kidd, F., West, C., 1937. Action of carbon dioxide on the respiration activity of apples. Effect of ethylene on the respiration activity and climacteric of apples. Individual variation in apples. Great Britain Department of Scientific Industrial Research Food Investigation Board Report, 101-115.
- Kidd, F., West, C., 1950. The refrigerated gas storage of apples. Variation in apples. Great Britain Department of Scientific Industrial Research Food Investigation Board Leaflet No. 6 (rev.), 16.
- Kieliszewski, M., Shpak, E., 2001. Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell Mol. Life Sci.*58, 1386-1398.
- Kikuchi, G., Shemin, D., Bachmann, B.J., 1958. The enzymic synthesis of delta-aminolevulinic acid. *Biochim. Biophys. Acta*28, 219-220.
- Kim, I., Grosch, W., 1979. Partial purification of a lipoxygenase from apples. *J. Agric. Food Chem.*27, 243-246.
- Kim, J.K., Gross, K.C., Solomos, T., 1987. Characterization of the stimulation of ethylene production by galactose in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol.*85, 804-807.
- Kim, J., Gross, K.C., Solomos, T., 1991. Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.*1, 67-80.
- King, D.L., Klein, B.P., 1987. Effect of flavonoids and related compounds on soybean lipoxygenase-1 activity. *J. Food Sci.*52, 220-221.
- King, K.J.N., Vessol, M.J., 1969. Enzymes in the cellulose complex. *Adv. Chem. Ser.*95, 7-25.
- Klaui, H., 1973. Carotinoide in Lebensmitteln. *Func. Prop. Fats Foods, Adv. Study Course* 1971.
- Klein, B., Grossman, S., 1985. Co-oxidation reactions of lipoxygenase in plant systems. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*1, 309-343.
- Knee, M., 1973. Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*12, 1543-1549.
- Knee, M., 1978. Metabolism of polymethylgalacturonate in apple cortical tissue during ripening. *Phytochemistry*17, 1261-1264.
- Koca, N., Karadeniz, F., Burdulu, H.S., 2006. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanch green peas. *Food Chem.*100, 609-615.
- Kockritz, A., Schewe, T., Hieke, B., Hass, W., 1985. The effect of soybean lipoxygenase-1 on chloroplasts from wheat. *Phytochemistry*24, 381-384.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., Mol, J.M., 1989. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol. Biol.*12, 213-225.
- Komalavalis, P., Mort, A.J., 1989. The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich region of pectins. *Carbohydr. Res.*189, 261-272.
- Kostansek, E., Pereira, W., 2003. Successful application of 1-MCP in commercial storage facilities. *Acta Hort.*628, 213-219.
- Konze, J.R., Kende, H., 1979. Ethylene formation from 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. *Planta*146, 293-301.
- Konze, J.R., Jones, J.F., Boller, T., Kende, H., 1980. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on the production of ethylene in senescing flowers of *Ipomoea tricolor* Cav. *Plant Physiol.*66, 566-571.
- Krautler, B., 2003. Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites. In: Kadish, K.M., Smith, K., Guillard, R. (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, Vol. 13. Elsevier, Oxford, p. 183-209.
- Krautler, B., Hortensteiner, S., 2006. Chlorophyll catabolites and the biochemistry of chlorophyll breakdown. In: Grimm, B., Porra, R., Rudiger, W., Scheer, H. (Eds.), *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biophysics, Functions and Applications*. Springer, Dordrecht, p. 237-260.
- Kreutzmann, S., Thybo, A.K., Bredie, W.L.P., 2007. Training of a sensory panel and profiling of winter hardy and coloured carrot genotypes. *Food Qual. Pref.*18, 482-489.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D.N., Hahlbrock, K., 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum*

- hortense*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.80, 2591-2593.
- Krupkova, E., Immerzeel, P., Pauly, M., Smulling, T., 2007. The tumorous shoot development 2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. Plant J.50, 735-750.
- Kuai, J., Dilley, D.R., 1992. Extraction, partial purification, and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruit. Postharvest Biol. Technol.1, 203-211.
- Kuneida, t., Amano, T., Shioi, Y., 2005. Search for chlorophyll degradation enzyme, Mg-dechetalase, from extracts of *Chenopodium album* with native and artificial substrates. Plant Sci.169, 177-183.
- Kupferman, E., 2003. Controlled atmosphere storage of apples and pears. Acta Horti600, 729-735.
- Kuwasha, S.C., Subbarayan, C., Beeler, D.A., Porter, J.W., 1969. The conversion of lycopenes-15,15'H to cyclic carotenes by soluble extracts of higher plant plastids. J. Biol. Chem.244, 3635-3642.
- LaBorde, L.F., von Elbe, J.H., 1990. Zinc complex formation in heated vegetable purees. J. Agric. Food Chem.38, 484-487.
- LaBorde, L.F., von Elbe, J.H., 1996. Method for improving the color of containerized green vegetables. US Patent No. 5,482,727.
- Lackey, G.D., Gross, K.C., Wallner, S.J., 1980. Loss of tomato cell wall galactan may involve reduced rate synthesis. Plant Physiol.66, 532-533.
- LaJollo, F.M., Tannenbaum, S.R., Labuza, T.P., 1971. Reaction of limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation. J. Food Sci.36, 850-853.
- Lammers, S.M., 1981. All About Tomatoes. Ortho Books, p. 93Chevron Chemical Co., San Francisco, CA p. 93.
- Lamport, D.T.A., 1965. The protein component of primary cell walls. Adv. Bot. Res.2, 151-218.
- Lance, C., Hobson, G.E., Young, R.E., Biale, J.B., 1965. Metabolic processes in cytoplasmic particles of the avocado fruit. VII. Oxidative and phosphorylative activities throughout the climacteric cycle. Plant Physiol.40, 1116-1123.
- Lance, C., Hobson, G.E., Young, J.B., Biale, J.B., 1967. Metabolic processes in cytoplasmic particles in avocado fruit. IX. The oxidation of pyruvate and malate during the climacteric cycle. Plant Physiol.42, 471-478.
- Lara, I., Mio, R.M., Fuentes, T., Sayez, G., Graell, J., Lopez, M.L., 2003. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. Postharvest Biol. Technol.29, 29-39.
- Leake, L.H., Kirk, L.K., 1992. Method for color preservation in canned green vegetables. US Patent No. 5,114,724.
- Legge, R.L., Thompson, J.E., 1983. Involvement of hydroperoxides and an ACC-derived free radical in the formation of ethylene. Phytochemistry22, 2161-2166.
- Legge, R.L., Thompson, J.E., Baker, J.E., 1982. Free radical-mediated formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, a spin-trap study. Plant Cell Physiol.23, 171-177.
- Lelievre, J.M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C., 1997. Ethylene and fruit ripening. Physiol. Plant.101, 727-739.
- Lennon, K.A., Lord, E.M., 2001. *In vivo* pollen tube cell of *Arabidopsis thaliana* 1. Tube cell cytoplasm and wall. Protoplasma214, 45-56.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., Caboche, M., 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. Annu. Rev. Plant Biol.57, 405-430.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., Keegstra, K., 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides – a complex process. Curr. Opin. Plant Biol.9, 621-630.
- Lesschaeve, I., Noble, A.C., 2005. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. Am. J. Clin. Nutr.81 (Suppl.), 330S-335S.
- Li, L., Zhu, B., Yang, P., Fu, D., Zhu, Y., Luo, Y., 2011. The regulation mode of RIN transcription factor involved in ethylene biosynthesis in tomato fruit. J. Sci. Food Agric.91, 1822-1828.
- Li, Y.Q., Cai, G., Mascatelli, A., Cresti, M., 1997. Functional interaction among cytoskeleton, membranes and cell wall in the pollen tubes of flowering plants. Int. Rev. Cytol.176, 133-199.
- Liao, F.W.H., Luh, B.S., 1970. Anthocyanin pigments in *Tinto cao* grapes. J. Food Sci.35, 41-46.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M., 1997a. Biosynthesis of isoprenoids in high plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Lett.400, 271-274.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., Schwender, J., 1997b. Two independent biochemical pathways for isopentyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. Physiol. Plant101, 643-652.
- Lieberman, M., Mapson, L., 1964. Genesis and biogenesis of ethylene. Nature (London)204, 343-345.
- Lieberman, M., Mapson, L.W., Kunishi, A.T., Wardale, D.A., 1965. Ethylene production from methionine. Biochem. J.97, 449-459.
- Lieberman, M., Kunishi, A.T., Mapson, L.W., Wardale, D.A., 1966. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. Plant Physiol.41, 376-382.
- Liedgens, W., Lutz, C., Scheider, H.A.N., 1983. Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*. Eur. J. Biochem.135, 35-39.
- Lin, T.-Y., Elbein, A.D., Su, J.D., 1966. Substrate specificity in pectin synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun.22, 650-657.
- Lipton, W.J., 1977. Recommendations for CA storage of broccoli, brussel sprouts, cabbage, cauliflower, asparagus and potatoes. Mich. State Univ. Hortic. Rep.28, 277-280.
- Lipton, W.J., 1987. Senescence in leafy vegetables. HortScience22, 854-859.
- Lipton, W.J., Ryder, E.J., 1989. Lettuce. In: Eskin, N.A.M. (Ed.), Quality and Preservation of Vegetables. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 212-245.
- Liu, X., Liao, M., Deng, G., Chen, S., Ren, Y., 2008. Changes in activity of PG, PE, Cx and LOX in pulp during fruit growth and development of two different ripening-season pear cultivars. Amer. Euras. J. Agric. Environ. Sci.3, 445-450.
- Liu, Y., Hoffman, N.E., Yang, S.F., 1985. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. Plant Physiol.77, 407-411.
- Llop-Tous, I., Barry, C.S., Grierson, D., 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. Plant Physiol.123, 971-978.
- Loomis, W.D., Battaile, J., 1963. Biosynthesis of terpenes. III. Mevalonic kinase from higher plants. Biochim. Biophys. Acta67, 54-63.
- Lurssen, K., Naumann, K., Schroder, R., 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid – An intermediate in the ethylene biosynthesis in higher plants. Z. Pflanzenphysiol.92, 285-294.
- Lyons, J.M., McGlasson, W.B., Pratt, H.K., 1962. Ethylene production, respiration, and internal gas concentrations in cantaloupe fruits at various stages of maturity. Plant Physiol.37, 31-36.
- Machackova, I., Zmrhal, Z., 1981. Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis?. Physiol. Plant.53, 479-482.
- MacKinney, G., 1961. Coloring matters. In: Sinclair, W.B. (Ed.), The Orange: Its Biochemistry and Physiology. University of California, Berkeley, CA, p. 302-333.
- MacKinney, G., Lukton, A., Greenbaum, A., 1958. Carotenoid stability in stored dehydrated carrots. Food Technol.12, 164-166.
- McCready, B.M., McComb, E.A., 1954. Pectic constituents in ripe and unripe fruit. Food Res.19, 530-535.
- McFeeters, R.F., Bell, T.A., Fleming, H.P., 1980. An endopolygalacturonase in cucumber fruit. J. Food Biochem.4, 1.
- McGlasson, W.B., Wade, N.L., Adato, I., 1978. In: Letham, D.S., Goodwin, P.B., Higgins, T.J. (Eds.), Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise, Vol. 1. Academic Press, London, p. 475-519.
- McGarvey, D.J., Christoffersen, R.E., 1992. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. J. Biol. Chem.267, 5964-

- McGlasson, W.B., Palmer, J.K., Vendrell, M., Brady, C., 1971. Metabolic studies with banana fruits. II. Effect of inhibitors on respiration, ethylene production and ripening. *Aust. J. Biol. Sci.*24, 1103-1114.
- McKenzie, K.A., 1932. Respiration studies with lettuce. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*28, 244-248.
- McMurchie, E.J., McGlasson, W.B., Eaks, I.L., 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. *Nature*237, 235-236.
- Macrae, A.R., 1971. Malic enzyme activity of plant mitochondria. *Phytochemistry*10, 2343-2347.
- McRae, D.G., Baker, J.E., Thompson, J.E., 1982. Evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant Cell Physiol.*23, 375-383.
- Malundo, T.M.N., Shewfelt, R.L., Scott, J.W., 1995. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biol. Technol.*6, 103-110.
- Mangos, T.J., Berger, R.G., 1997. Determination of major chlorophyll degradation products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* A204, 345-350.
- Marcelle, R.D., 1991. Relationship between mineral content, lipoxygenase activity, levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene emission in apple fruit flesh disks during storage. *Postharvest Biol. Technol.*1, 101-109.
- Marei, N., Crane, J.C., 1971. Growth and respiratory response of fig (*Ficus carica* L. cv. Mission) fruits to ethylene. *Plant Physiol.*48, 249-254.
- Markovic, O., Heinrichova, K., Lenkey, B., 1975. Pectolytic enzymes from banana. *Collect. Czech. Chem. Commun.*40, 769-774.
- Marx, R., Brinkmann, K., 1978. Characteristics of rotenone-insensitive oxidation of matrix-NADH broad bean mitochondria. *Planta*142, 83-90.
- Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H., 1999. Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*50, 67-95.
- Matsuo, T., Ito, S., 1982. A model experiment for deastringency of persimmon fruit with high carbon dioxide treatment, *in vitro* gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. *Agric. Biol. Chem.*46, 683-689.
- Mattoo, A.K., Lieberman, M., 1977. Localization of the ethylene-synthesising system in apple tissue. *Plant Physiol.*60, 794-799.
- Mau, Y.H., Wang, W.Y., 1988. Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*: study of the transamination mechanism using specifically labeled glutamate. *Plant Physiol.*86, 793-797.
- Maudinas, B., Bucholtz, M.L., Porter, J.W., 1975. The partial purification and properties of a phytoene synthase complex isolated from tomato fruit plastids. *Abstr. 4th Int. Symp. Carotenoids*, 41.
- Mayak, S., Legge, R.L., Thompson, J.E., 1981. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. *Planta*153, 49-55.
- Mayer, S.M., Gawlita, E., Avuissar, Y.J., Anderson, V.E., Beale, S.I., 1993. Intermolecular nitrogen transfer in the enzymic conversion of glutamate to delta-aminolevulinic acid by extracts of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.*10, 1029-1038.
- Mazza, G., Brouillard, R., 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.*25, 207-225.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Moyano, E., Caballeo, J.L., Munoz-Blanco, J., 1997. Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.*34, 867-877.
- Meigh, D.F., Jones, J.D., Hulme, A.C., 1967. The respiration climacteric in the apple. Production of ethylene and fatty acids in fruit attached and detached from the tree. *Phytochemistry*6, 1507-1515.
- Meller, E., Belkin, S., Harel, E., 1975. The biosynthesis δ -aminolevulinic acid in greening maize leaves. *Phytochemistry*14, 2399-2402.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R., Apel, K., 2001. FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*98, 12826-12831.
- Miller, C.O., Conn, E.E., 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol.*65, 1199-1202.
- Miller, A., Bonner, J., Biale, J.B., 1953. The climacteric rise in fruit respiration as controlled by phosphorylative coupling. *Plant Physiol.*28, 521-531.
- Minguez-Mosquera, M.I., Garrido-Fernandez, J., Gandul-Rojas, B., 1989. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *J. Agric. Food Chem.*37, 8-11.
- Mitchell, F.G., Mayer, G., Biasi, G., 1991. Effect of harvest maturity on storage performance of 'Hayward' kiwifruit. *Acta Hort.*297, 617-625.
- Miyazaki, J.H., Yang, S.F., 1987. Inhibition of the methionine cycle enzymes. *Phytochemistry*26, 2655-2660.
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*11, 266-277.
- Mohnen, D., Bar-Peled, M., Somerville, C., 2008. Biosynthesis of plant cell walls. In: Himmel, M.E. (Ed.), *Biomass Recalcitrance*. Blackwell, Oxford, p. 94-187.
- Mol, J., Stuitje, A., Gerats, A., van der Krol, A., Jorgensen, R., 1989. Saying it with genes: molecular flower breeding. *Trends Biotechnol.*7, 148-153.
- von Mollendorff, L.J., De Villiers, O.T., 1988. Role of pectolytic enzymes in the development of wooliness in peaches. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*63, 53-58.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*52, 561-591.
- Moreau, F., Romani, R., 1982. Malate oxidation and cyanide insensitive respiration in avocado mitochondria during the climacteric cycle. *Plant Physiol.*70, 1385-1390.
- Morin, F., Rigault, R., Hartmann, C., 1985. Conséquences d'un séjour au froid sur le métabolisme de l'éthylène au cours de la maturation de la poire Passe-Crassane après récolte. *Physiol. Veg.*23, 353-359.
- Moser, S., Müller, T., Oberhuber, M., Krautler, B., 2009. Chlorophyll catabolites – chemical and structural footprints of a fascinating biological phenomenon. *Eur. J. Org. Chem.*, 21-31.
- Moustafa, E., Wong, E., 1967. Purification and properties of chalcone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*6, 625-632.
- Muda, P., Seymour, G.B., Errington, N., Tucker, G.A., 1995. *Carbohydr. Polym.*26, 255-260.
- Murayama, H., Ikai, S., Fukushima, T., 2002. Changes in starch content in 'La France' pears during storage. *Acta Hort.*596, 871-874.
- Murr, D.P., Yang, S.F., 1975. Inhibition of *in vivo* conversion of methionine to ethylene by L-canaline and 2,4-dinitrophenol. *Plant Physiol.*55, 79-82.
- Nagel, C.W., Patterson, M.E., 1967. Pectic enzymes and development of the pear (*Pyrus communis*). *J. Food Sci.*32, 294.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A., 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.*118, 1295-1305.
- Nandi, D.L., Waygood, G.R., 1967. Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves. *Can. J. Biochem.*45, 322.
- Nelmes, B.J., Preston, R.D., 1968. Wall development in apple fruit: a study of the life history of a parenchyma. *J. Exp. Bot.*19, 496-518.
- Neuburger, M., Douce, R., 1980. Effect of bicarbonate and oxaloacetate on malate oxidation by spinach leaf mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*589, 176-189.
- Nogota, Y., Ohta, H., Voragen, A.G.J., 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*34, 617-620.
- Northcote, D.H., 1963. The biology and chemistry of the cell walls of higher plants, algae and fungi. *Int. Rev. Cytol.*14, 223-265.
- Northcote, D.H., 1972. Chemistry of the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol.*23, 113-122.
- Nunan, K.J., Davies, C., Robinson, S.O., Fincher, G.M., 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape-berry development. *Planta*214, 257-264.
- Obenland, D.M., Carroll, T.R., 2000. Mealiness and pectolytic activity in peaches and nectarines in response to heat treatment and cold storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*125, 723-728.
- Odawara, S., Watanabe, A., Imaseki, H., 1977. Involvement of cellular membranes in regulation of ethylene production. *Plant Cell Physiol.*18, 569-575.

- Oeller, P.W., Wong, L.M., Taylor, L.P., Pike, D.A., Theologis, A., 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*254, 275-286.
- Ogura, K., Nishino, T., Seto, S., 1968. Purification of prenyltransferase and isopentyl pyrophosphate isomerase of pumpkin fruit and some of their properties. *J. Biochem. (Tokyo)*64, 197-203.
- Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N., 1982a. Rugosin D, E, F and G, dimeric and trimeric hydrolyzable tannins. *Chem. Pharm. Bull.*30, 4234-4237.
- Okuda, T., Yoshida, T., Kuwaharu, M., Memon, M., Shingu, T., 1982b. Agrimonin and potentillin, an ellagitannin dimer and monomer having an α -glucose core. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 162-164.
- O'Neill, M., Albersheim, P., Darville, A., 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Dey, D.M. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 2. Academic Press, London, p. 415-441.
- Ontario Ministry of Agriculture Food & Rural Affairs, 1998. Chilling injury of horticultural crops, factsheet. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/98-021.htm> (15 August 2010).
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., Rudiger, W., 2000. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*21, 305-310.
- Owens, T.G., Falkowski, P.G., 1982. Enzymatic degradation of chlorophyll a by marine phytoplankton *in vitro*. *Phytochemistry*21, 979-984.
- Ozawa, T., Lilley, T.H., Haslam, E., 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*26, 2937-2942.
- Paillard, N., 1968. Analyse de l'arome de pommes de la variété Calville blanc par chromatographic sur colonne capillaire. *Fruits*23, 283.
- Palmer, J.K., 1971. The banana. In: Hulme, A.C. (Ed.), *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, Vol. 2. Academic Press, London, p. 65-105.
- Palmer, J.M., 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol.*27, 133-157.
- Pardo, A.D., Chereskin, B.M., Castelfranco, P.A., Franceschi, V.R., Wezelman, B.E., 1980. ATP requirement for higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*24, 129.
- Pathak, N., Sanwal, G.G., 1998. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*48, 249-255.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Technol.*21, 3-11.
- Pattanayak, G.K., Biswal, A.K., Reddy, V.S., Tripathy, V.C., 2005. Light-dependent regulation of chlorophyll b biosynthesis in chlorophyllide a oxygenase overexpressing tobacco plants. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*326, 466-471.
- Payasi, A., Sanwal, G.G., 2003. Pectate lyase during ripening of banana fruit. *Phytochemistry*63, 243-248.
- Payasi, A., Misra, P.C., Sanwal, G.G., 2008. Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits. *Phytochemistry*67, 861-869.
- Peacock, B.C., 1972. Role of ethylene in the initiation of fruit ripening. *Queensl. J. Agric. Sci.*29, 137-145.
- Pear, J.R., Kawagoe, Y., Shreckengost, W.E., Delmer, D.P., Stalker, D.M., 1996. Higher plants contain homologs of bacterial celA genes encoding the catalytic unit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*93, 12637-12642.
- Pech, J.C., Latché, A., van der Resr, B., 2008. Genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles and biotechnical applications. In: Brückner, B., Grant Wyllie, S. (Eds.), *Fruit and Vegetable Flavour*. Woodhead, Cambridge, p. 254-271.
- Peiser, G.D., Wang, T.-T., Hoffman, N.E., Yang, S.F., 1983. Evidence for CN formation from [¹C]ACC during *in vivo* conversion of ACC to ethylene [abstract]. *Plant Physiol. Suppl.*72 (No. 203).
- Peiser, G.D., Wang, T.-T., Hoffman, N.E., Yang, S.F., Liu, H.-W., Walsh, C.T., 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*81, 3059-3063.
- Peng, C.Y., Markakis, P., 1963. Effect of phenolase on anthocyanins. *Nature (London)*.199, 597-598.
- Pérez, A.G., Sanz, C., 2008. Formation of fruit flavor. In: Brückner, B., Grant Wyllie, S. (Eds.), *Fruit and Vegetable Flavor*. Woodhead, Cambridge, p. 41-70.
- Perez-Tello, G.O., Martinez-Tellez, M.A., Vargas-Arisouro, I., Gonzalez-Aguilar, G., 2009. Chilling injury in mamey sapote fruit (*Pouteria sapota*): biochemical and physiological responses. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*4, 137-145.
- Pesis, E., Fuchs, Y., Zauberman, G., 1978. Cellulase activity in avocado. *Plant Physiol.*61, 416-419.
- Peynaud, E., Riberau-Gayon, P., 1971. The grape. In: Hulme, A.C. (Ed.), *The Biochemistry of Fruits and their Products*, Vol. 2. Academic Press, London, p. 171-205.
- Pharr, D.M., Dickinson, D.B., 1973. Partial characterization of Cx cellulase and cellobiase from ripening tomato x fruit. *Plant Physiol.*51, 577-583.
- Picha, D.H., 1987. Sugar and organic acid content of cherry tomato fruit at different ripening stages. *HortScience*22, 94-96.
- Picton, S., Barton, S.L., Bouzayen, M., Hamilton, A.J., Grierson, D., 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.*3, 469-481.
- Pinta, V., Picaud, M., Reiss-Husson, F., Astier, C., 2002. Rubrivivax gelatinous acsF (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester. *J. Bacteriol.*164, 746-753.
- Pirrung, M.C., 1985. Ethylene biosynthesis. 3. Evidence concerning the fate of C1-N1 of ACC. *Bioorg. Chem.*13, 219-226.
- Pirrung, M.C., 1999. Ethylene biosynthesis from 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *Acc. Chem. Res.*32, 711-718.
- Pirrung, M.C., Brauman, J.I., 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem. (Paris)*25, 55-61.
- Platenius, H., 1942. Effect of temperature on the respiration rate and quotient of some vegetables. *Plant Physiol.*17, 179-197.
- Pliszka, B., Huscza-Ciolkowska, G., Mieszko, E., Czaplicki, S., 2009. Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra*). *J. Sci. Food Agric.*89, 1154-1158.
- Pollock, C.J., ap Rees, T., 1975. Activities of enzymes of sugar metabolism in cold-stored tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*14, 613-617.
- Poovaliah, B.W., Nukuya, A., 1979. Polygalacturonase and cellulose enzymes in the normal Rutgers and Mutant rin tomato fruits and their relationship to the respiratory climacteric. *Plant Physiol.*64, 534-537.
- Popper, Z.A., Fry, S.C., 2008. Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta*227, 781-794.
- Porra, R.J., 1986. Labelling of chlorophylls and precursors by [2-¹⁴C]glycine and 2-[1-¹⁴C]oxoglutarate in *Rhodospseudomonas spheroides* and *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.*156, 111-121.
- Porritt, S.W., 1977. Conditions and practices used in CA of apples in Western US and Canada. *Mich. State Univ. Hortic. Rep.*28, 231-232.
- Porter, J.W., Lincoln, P.E., 1950. *Lycopersicon* selection containing a high content of carotenes and colorless polyenes. II. The mechanism of carotene biosynthesis. *Arch. Biochem.*27, 390-403.
- Potty, V.H., Breumer, J., 1970. Formation of isoprenoid pyrophosphates from mevalonate by orange enzymes. *Phytochemistry*9, 1229-1237.
- Poulson, R., Polglase, W.J., 1975. The enzymatic conversion of protoporphyrinogen-IX to protoporphyrin-IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*250, 1269-1274.
- Prange, R.K., DeLong, J.M., 2003. 1-Methylcyclopropene: the 'magic bullet' for horticultural products?. *Chron. Hortic.*43, 11-14.
- Prange, R.K., DeLong, J.M., Daniels-Lake, B.J., Harrison, P.A., 2005. Quality management through respiration control: is there a relationship between lowest acceptable respiration, chlorophyll fluorescence and cytoplasmic acidosis? *Acta Hortic*682, 823-830.
- Prange, R.K., DeLong, J.M., Harrison, P.A., Leyte, J., McLean, S.D., Scrutton, J.G.E., Cullen, J.J., 2007. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. US Patent No. 7,199,376.
- Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K., 1987. Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mungbean seedlings. *Phytochemistry*26, 881-883.

- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N., 2007. Fruit ripening phenomena – an overview. *CRC Crit. Rev. Food Sci.*47, 1-19.
- Pratt, H.K., Groeschl, J.D., 1968. In: Wrightmann, F., Setterfield, G. (Eds.), *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Runge Press, Ottawa, p. 1295-1302.
- Pratt, H.K., Morris, L.L., Tucker, C.L., 1954. Temperature and lettuce deterioration of broccoli varieties. *Proceedings of Conference on Transportation of Perishables*. University of California, Davis, p. 77-83.
- Pressey, R., 1977. Enzymes involved in fruit softening. *ACS Symp. Ser.*47, 172-191.
- Pressey, R., 1983. β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.*71, 132-135.
- Pressey, R., 1986a. Extraction and assay of tomato polygalacturonases. *HortScience*21, 490-492.
- Pressey, R., 1986b. Changes in polygalacturonases isoenzymes and converter in tomatoes during ripening. *HortScience*21, 1183-1185.
- Pressey, R., 1987. Exopolygalacturonase in tomato fruit. *Phytochemistry*26, 1867-1870.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1973a. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiol.*52, 252-256.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1973b. Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochim. Biophys. Acta*309, 363-369.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1975. Cucumber polygalacturonase. *J. Food Sci.*40, 937-939.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1976. Pear polygalacturonases. *Phytochemistry*15, 1349-1351.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1978. Difference in polygalacturonase composition of Clingstone and Freestone peaches. *J. Food Sci.*43, 1415-1417.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1982. Pectic enzymes in Long Keeper tomatoes. *HortScience*17, 398-400.
- Pressey, R., Avants, J.K., 1982. Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: effects of pectinesterase. *J. Food Biochem.*6, 57-74.
- Pressey, R., Hinton, D.M., Avants, J.K., 1971. Development of polygalacturonase activity and solubilisation of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.*36, 1070-1073.
- Proctor, J.T., Creasy, L.L., 1971. Effects of supplementary light on anthocyanin synthesis in "McIntosh" apples. *J. Am. Hortic. Sci.*96, 523-526.
- Pruzinska, A., Tanner, G., Anders, I., Roca, M., Hortensteiner, S., 2003. Chlorophyll breakdown: pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*100, 15259-15264.
- Pruzinska, A., Tanner, G., Aubry, S., Anders, I., Moser, S., Muller, T., Organia, K.-H., Ktutler, B., Youn, J.-Y., Liljegren, S.J., Hortensteiner, S., 2005. Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiol.*139, 52-63.
- Queiroz, F., Oliveira, C., Pinho, O., Ferreira, I.M., 2009. Degradation of anthocyanins and anthocyanidins in blackberry jams/stuffed fish. *J. Agric. Food Chem.*57, 10712-10717.
- Qureshi, A.A., Manok, K., Qureshi, N., Porter, J.W., 1974. The enzymatic conversion of *cis*-[C]phyto-14-fluene, *trans*[C]carotene to poly-*cis* acyclic carotenes by a cell-free preparation of tangerine tomato fruit plastids. *Arch. Biochem. Biophys.*162, 108-116.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W., 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochem. Rev.*3, 29-60.
- Ramadoss, C.S., Pistorius, E.K., Axelrod, B., 1978. Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase requires two isozymes isoenzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*190, 549-552.
- Rando, R.R., 1974. $\beta\gamma$ -Unsaturated amino acids as irreversible inhibitors. *Nature (London)*250, 586-587.
- Ranwala, P., Suematsu, C., Masuda, H., 1992. The role of β -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. *Plant Physiol.*100, 1318-1325.
- Rapparini, F., Predieri, S., 2003. Pear volatiles. *Hortic. Rev.*28, 237-324.
- ap Rees, T., 1974. Pathways of carbohydrate breakdown in higher plants. In: Northcote, D.H. (Ed.), *Plant Biochemistry*. MTP Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. 1, Vol. 11. Butterworth, London, p. 51.
- ap Rees, T., 1977. Conservation of carbohydrate by non-photosynthetic cells of higher plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*31, 7-32.
- ap Rees, T., 1980. Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. In: Davies, D.D. (Ed.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 2. Academic Press, New York, p. 1-29.
- Reif, H.J., Niesbach, U., Salamini, F., Seedler, H., Rohde, W., 1985. Cloning and analysis of two chalcone genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*199, 208-215.
- Rexova-Benkova, L., Markovic, O., 1976. Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*33, 323-385.
- Reynolds, P.A., Klein, B.P., 1982. Purification and characterization of a type-1 lipoxygenase from pea seeds. *J. Agric. Food Chem.*30, 1157-1163.
- Rhodes, M.J.C., 1970. The climacteric and ripening of fruits. In: Hulme, A.C. (Ed.), *The Biochemistry of Fruits and their Products*, Vol. 1. Academic Press, London, p. 524.
- Rhodes, M.J.C., 1971. Respiration and senescence of plant organs. In: Hulme, A.C. (Ed.), *The Biochemistry of Fruits and their Products*, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Rich, P.R., Boveris, A., Bonner, W.D., Moore, A.L., 1976. Hydrogen peroxide generated by the alternative oxidase of higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*3, 695-703.
- Richmond, A., Biale, J.B., 1966. Protein and nucleic acid metabolism in fruits. Studies of amino acid incorporation during the climacteric rise in respiration of the avocado. *Plant Physiol.*41, 1247-1253.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry*57, 929-967.
- Ringli, C., Keller, B., Ryser, U., 2001. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell Mol. Life Sci.*58, 1430-1441.
- Riov, J., Yang, S.F., 1982. Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. Suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiol.*69, 687-690.
- Riov, J., Yang, S.F., 1982. Effects of exogenous ethylene on ethylene production in citrus leaf tissue. *Plant Physiol.*70, 136-141.
- Robertson, G.L., Swinburne, D., 1981. Changes in chlorophyll and pectin after storage and canning of kiwifruit. *J. Food Sci.*46, 1557-1559.
- Rocklin, A.M., Tierney, D.L., Kofman, V., Brunhuber, N.M.W., Hoffman, B.M., Christoffersen, R.E., Reich, N.O., Lipscomb, J.D., Que, L., 1999. Role of the nonheme Fe(II) enter in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*96, 7905-7909.
- Rogers, L.J., Sha, S.P.J., Goodwin, T.W., 1966. Mevalonate-kinase isoenzymes in plant cells. *Biochem. J.*100, 14c.
- Rohwer, F., Mader, M., 1981. The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Z. Pflanzenphysiol.*104, 363-372.
- Romani, R.J., Ku, L., 1968. Direct gas chromatographic analysis of volatiles produced by ripening fruit. *J. Food Sci.*31, 558-560.
- Rowan, D.D., Lane, H.P., Allen, J.M., Fielder, S., Hunt, M.B., 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labelled substrates. *J. Agric. Food Chem.*44, 3276-3285.
- Rowan, D.D., Allen, J.M., Fielder, S., Hunt, M.B., 1999. Biosynthesis of straight chain ester volatiles in red delicious and Granny Smith apples using deuterium-labelled precursors. *J. Agric. Food Chem.*47, 2553-2562.
- Rubin, R., Toghe, T., Matsuda, F., Saito, K., Scheible, W.-R., 2009. Members of the LBD family of transcriptional factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*25, 3567-3584.
- Ruediger, W., 2002. Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. *Photosynth. Res.*74, 187-193.

- Rustin, P., Moreu, F., Lance, C., 1980. Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide insensitive electron transport pathway. *Plant Physiol.*66, 457-462.
- Rutherford, P.P., Whittle, R., 1982. The carbohydrate composition of onions during long-term cold storage. *J. Hortic. Sci.*57, 349-356.
- Rutherford, P.P., Whittle, R., 1984. Methods of predicting the long-term storage of onions. *J. Hortic. Sci.*59, 537.
- Ryall, A.L., Lipton, W.L., 1979. Vegetable as living products – respiration and heat production, 2nd ed. Handling, Transportation, and Storage of Fruits and Vegetables. Vol. 1, Chapter 1. Avi, Westport, CT Chapter 1.
- Saevels, S., Lammertyn, J., Berna, A.Z., Veraverbeke, E.A., Di Natale, C., Nicolai, B.M., 2004. An electronic nose and mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life. *Postharvest Biol. Technol.*31, 9-19.
- Saito, N., Osawa, Y., Hayashi, K., 1971. Platycodin, a new acylated anthocyanin in Chinese bell-flower, *Platycodon grandiflorum*. *Phytochemistry*10, 445-447.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vadamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and application. *Adv. Appl. Microbiol.*39, 213-294.
- Sakamura, S., Shibusa, S., Obata, Y.T., 1966. Separation of a polyphenol oxidase activity for anthocyanin degradation in eggplant. *J. Food Sci.*31, 317-319.
- Salminen, S.O., Young, R.E., 1975. The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiratory climacteric in banana fruit. *Plant Physiol.*55, 45-50.
- Saltveit, M.E., 2003. Is it possible to find an optimal controlled atmosphere?. *Postharvest Biol. Technol.*27, 3-13.
- Saltveit, M.E., 2003. A summary of CA requirements and recommendations for vegetables. *Acta Hort.*600, 723-727.
- Saltveit, M.E., 2004. Respiratory metabolism. In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, USDA, ARS. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb666/contents.html>(18 March 2011).
- Saltveit, M.E., 2005. Ethylene effects. In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, USDA, ARS. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb666/contents.html>(15 August 2010).
- Salunkhe, D.K., Do, J.Y., Maga, J.A., 1976. Biogenesis of aroma constituents of fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*8, 161-190.
- Saquet, A.A., Streif, J., Bangerth, F., 2000. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in “Conference” pears and “Jonagold” apples during controlled atmosphere storage. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*75, 243-249.
- Saquet, A.A., Sttreif, J., Bangerth, F., 2003a. Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in “Conference” pears during delayed controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol. Technol.*30, 123-132.
- Saquet, A.A., Streif, J., Bangerth, F., 2003b. Impaired aroma production of CA-stored ‘Jonagold’ apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentrations. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*78, 695-705.
- Saxena, I.M., Brown Jr., R.M., 2005. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann. Bot.*96, 9-21.
- Schanderl, S.H., Chichester, C.O., Marsh, B.L., 1962. Degradation of chlorophyll and several derivatives in acid solution. *J. Org. Chem.*27, 3865-3868.
- Scheible, W.-R., Pauly, M., 2004. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*7, 285-295.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.*61, 263-289.
- Scheller, H.V., Doong, R.L., Ridley, B.L., Mohnen, D., 1999. Pectin biosynthesis: a solubilised α 1,4-galacturonosyltransferase from tobacco catalyzes the transfer of galacturonic acid from UDP-galacturonic acid onto the nonreducing end of hemogalacturonan. *Planta*207, 512-517.
- Schiffertstein, H.N.J., Frijters, J.E.R., 1990. Sensory integration in citrate/sucrose mixtures. *Chem. Senses*15, 87-109.
- Schmid, R., Shemin, D., 1955. The enzymic formation of porphobilinogen from 5-aminolevulinic acid and its conversion to protoporphyrin. *J. Am. Chem. Soc.*77, 506-508.
- Schmiech, L., Uemura, D., Hofman, T., 2008. Reinvestigation of the bitter compounds in carrots (*Daucus carota* L.) by using a molecular sensory science approach. *J. Agric. Food Chem.*56, 10252-10260.
- Schoch, S., Vielwerth, F.X., 1983. Chlorophyll degradation in senescent tobacco cell culture (*Nicotiana tabacum* var “Samsun”). *Z. Pflanzenphysiol.*110, 309-317.
- Schotsmans, W.C., DeLong, J.M., Larrigaudière, C., Prange, R.K., 2009. Effects of physiological disorders. In: Yahia, E.M. (Ed.), Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 160-192.
- Schwab, W., 2008. Role of metabolome diversity in fruit and vegetable quality: multifunctional enzymes and volatiles. In: Brückner, B., Grant Wyllie, S. (Eds.), Fruit and Vegetable Flavor. Woodhead, Cambridge, p. 272-286.
- Schwartz, S.J., von Elbe, J.H., 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytins in vegetables. *J. Food Sci.*48, 1303-1306.
- Schwartz, S.J., Lorenzo, T.V., 1991. Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. *J. Food Sci.*56, 1059-1062.
- Schwartz, S.J., Wool, S.L., von Elbe, J.H., 1981. High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. *J. Agric. Food Chem.*29, 533-537.
- Segerlind, L.J., Herner, R.C., 1972. On the fiber content problem of processed asparagus. *CASAE Publ.*72, 882.
- Seljasen, R., Hoftun, H., Bengtson, G.B., 2001. Sensory quality of ethylene-exposed carrots (*Daucus carota* L., cv. “Yukon”) related to the contents of 6-methoxymellein, terpenes and sugars. *J. Sci. Food Agric.*81, 54-61.
- Seljasen, R., Bengtsson, G.B., Hoftun, H., Vogt, G., 2001. Sensory and chemical changes in five varieties of carrot (*Daucus carota* L.) in response to mechanical stress at harvest and post-harvest. *J. Sci. Food Agric.*81, 436-447.
- Sexton, R., Palmer, J.M., Whyte, N.A., Littlejohns, S., 1997. Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus ideaus* L. cv. Gen Clova. *Plant Physiol.*80, 371-376.
- Seymour, G.B., Harding, S.E., Taylor, A.J., Hobson, G.E., Tucker, G.A., 1987. Poluronide solubilization during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry*26, 1871-1875.
- Seymour, G.B., Lasslett, Y., Tucker, G.A., 1987. Differential effects of pectolytic enzymes on tomato poluronides *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry*26, 3137-3139.
- Shemin, D., Russell, R.S., 1953. δ -Aminolevulinic acid. Its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.*75, 4873-4874.
- Sheng, J., Luo, Y., Wainwright, H., 2000. Studies on lipoxygenase and the formation of ethylene in tomato. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*75, 69-71.
- Shewfelt, A.L., Panter, V.A., Jen, J.J., 1971. Textural changes and molecular characteristics of pectin constituents in ripening peaches. *J. Food Sci.*36, 573.
- Shimokawa, K., Hashizume, A., Shioi, Y., 1990. Pyropheophorbide a, a catabolite of ethylene-induced chlorophyll a degradation. *Phytochemistry*29, 2105-2106.
- Shioi, Y., Watanabe, K., Takamiya, K., 1966. Enzymatic conversion of pheophorbide a in leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.*37, 1143-1149.
- Shioi, Y., Tatsumi, Y., Shimokawa, K., 1991. Enzymatic degradation of chlorophyll in *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.*32, 87-93.
- Shioi, Y., Masuda, T., Takamiya, K., Shimokawa, K., 1995. Breakdown of chlorophylls by soluble proteins extracted from leaves of *Chenopodium album*. *J. Plant Physiol.*145, 416-421.
- Shioi, Y., Tomita, N., Tsuchiya, T., Takamiya, K., 1996. Conversion of chlorophyllide to pheophorbide by Mg-dechelating substance in extracts of *Chenopodium album*. *Plant Physiol. Biochem.*34, 41-47.
- Shoolingin-Jordan, P.M., 2003. The biosynthesis of coproporphyrinogen III. In: Kadisk, K.M. (Ed.), The Porphyrin Handbook. Elsevier, Amsterdam, p. 33-74.
- Simpson, S.D., Ashford, D.A., Harvey, D.J., Bowles, D.J., 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*8, 579-583.
- Singh, S., Sanwall, G.G., 1973. An allosteric α -glucan phosphorylase from banana fruits. *Biochim. Biophys. Acta*309, 280-288.

- Singh, S., Sanwall, G.G., 1975. Characterization of multiple forms of α -glucan phosphorylase from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry*14, 113-118.
- Singh, S., Sanwall, G.G., 1976. Multiple forms of α -glucan phosphorylase in banana fruits: properties and kinetics. *Phytochemistry*15, 1447-1451.
- Singleton, V.L., Gortner, W.A., Yang, H.Y., 1961. Carotenoid pigments of pineapple fruit. 1. Acid-catalyzed isomerisation of the pigments. *J. Food Sci.*26, 49-52.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M., 1996. Methods of counteracting an ethylene response in plants. US Patent No. 5,518,988 21 May 1996.
- Sisler, E.C., Serek, M., 1997. Inhibition of ethylene response in plants at the receptor level: recent development. *Physiol. Plant.*101, 577-582.
- Slater, A., Maunders, M.L.J., Edwards, K., Schuch, W., Grierson, D., 1983. Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. *Plant Mol. Biol.*5, 137-147.
- Small, C.J., Peckert, R.C., 1982. The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta*154, 97-99.
- Smith, M.A., King, P.T., Grimm, B., 1998. Transient-state kinetic analysis of *Synochococcus* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Biochemistry*37, 319-329.
- Smith, R.B., Lougheed, E.L., Franklin, E.W., McMillan, L., 1979. The starch iodine test for determining stage of maturation in apples. *Can. J. Plant Sci.*59, 725-735.
- Sobotka, F.E., Stelzig, A.A., 1974. An apparent cellulose complex in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *Plant Physiol.*53, 759-763.
- Solomos, T., 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Physiol.*28, 279-297.
- Solomos, T., Laties, G.G., 1973. Cellular organization and fruit ripening. *Nature (London)*245, 390-392.
- Solomos, T., Laties, G.G., 1974. Similarities between ethylene and cyanide action in triggering the rise in respiration in potato slices. *Plant Physiol.*54, 506-511.
- Solomos, T., Laties, G.G., 1976. Induction by ethylene of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues. *Plant Physiol.*58, 47-50.
- Somerville, C.R., 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*22, 53-78.
- Song, J., 2007. Flavour volatile production and regulation in apple fruit. *Stewart Postharvest Rev.*2, 2-8.
- Song, J., Bangerth, F., 2003. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*30, 113-121.
- Song, L.L., Jiang, Y.M., Gao, H.Y., Li, C.T., Liu, H., You, Y.L., Sun, J., 2006. Effects of adenosine triphosphate on browning and quality of harvested litchi fruit. *Am. J. Food Technol.*1, 173-178.
- Souleyre, J.F., Greenwood, D.R., Friel, E.N., Karunairetham, S., 2005. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor. *FEBS J.*272, 3132-3144.
- Spanu, P., Reinhardt, D., Boller, T., 1991. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzymes from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.*10, 2007-2013.
- Spurr, A.R., Harris, W.M., 1968. Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum anuum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. *Am. J. Bot.*55, 1210-1224.
- Steet, J.A., Tong, C.H., 1996. Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC. *J. Food Sci.*61, 924-928.
- Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., Mohnen, D., 2001. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of Golgi. *Plant Physiol.*127, 360-371.
- Stevens, M.A., Kader, A.A., Albright, M., 1979. Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*104, 40-52.
- Stintzing, F.C., Carle, R., 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*15, 19-38.
- Stoll, K., 1970. Apfällagerung in kontrollierter Atmosphäre (CA) unter modifizierten Konditionen. *Schweiz. Z. Obst. Weinbau*106, 334-337.
- Stoll, K., 1973. Tables on the storage of fruits and vegetables in controlled atmospheres. Eidg. Forschungsanst. Obst. Wein Gartenbau, Wädenswil, Flugschr., 78.
- Stone, E.J., Hall, R.M., Kazeniak, S.J., 1975. Formation of aldehydes and alcohols in tomato fruit from UC labelled linolenic and linoleic acids. *J. Food Sci.*40, 1138-1141.
- Suomalainen, H., Keranen, A.J.A., 1961. The first anthocyanins appearing during the ripening of blueberries. *Nature (London)*191, 498-499.
- Surendranathan, K.K., Nair, P.M., 1973. Alterations in carbohydrate metabolism of γ -irradiated Cavendish banana. *Phytochemistry*12, 241-249.
- Suzuki, T., Shioi, Y., 2002. Re-examination of Mg-dechelation reaction in the degradation of chlorophylls using chlorophyllin a as a substrate. *Photosynth. Res.*74, 217-223.
- Sweeney, J.P., Martin, M.E., 1961. Stability of chlorophyll in vegetables as affected by pH. *Food Technol.*15, 263-266.
- Tager, J.M., Biale, J.B., 1957. Carboxylase and aldolase activity in the ripening banana. *Physiol. Plant.*10, 79-85.
- Takamiya, K., Tsichiya, Y., Ohta, H., 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: was gene cloning revealed?. *Trends Plant Sci.*5, 426-431.
- Takeguchi, C.A., Yamamoto, H., 1968. Light-induced oxygen-18 uptake by epoxy xanthophylls in New Zealand spinach leaves (*Tetragonia expansa*). *Biochim. Biophys. Acta*150, 459-465.
- Talbert, W.F., Smith, O., 1975. *Potato Processing*, 3rd ed.. Avi, Westport, CT.
- Tan, L., Okazawa, A., Fukuaki, E., Kobayashi, A., 2000. Removal of magnesium by Mg-dechetalase is a major step in the chlorophyll-degrading pathway in *Ginkgo biloba* in the process of autumnal tints. *Z. Naturforsch.*55c, 923-926.
- Tanaka, A., Tanaka, R., 2005. Effects of chlorophyllide a oxygenase overexpression on light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.*85, 327-340.
- Tanaka, A., Tanaka, R., 2006. Chlorophyll metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*9, 248-255.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Yoshida, K., Okada, K., 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*95, 12719-12723.
- Tanaka, R., Tanaka, A., 2007. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*58, 321-346.
- Tanaka, R., Tanaka, A., 2011. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta*1807, 968-976.
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K., Tanaka, A., 2001. Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*26, 365-373.
- Tavakoli, M., Wiley, R.C., 1968. Relation between trimethylsilyl derivatives of fruit tissue polysaccharides in apple texture. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*92, 780.
- Teng, S.S., Chen, B.H., 1999. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. *Food Chem.*65, 367-373.
- Terahara, N., Konczak, I., Ono, H., Yoshimoto, M., Yamakawa, O., 2004. Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* L. *J. Biomed. Biotechnol.*2004, 279-286.
- Terpstra, W., 1977. A study of the properties and activity of chlorophyllase in photosynthetic membranes. *Z. Pflanzenphysiol.*85, 139-146.
- Themmen, A.P.N., Tucker, G.A., Grierson, D., 1982. Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase *in vitro*. *Plant Physiol.*69, 249.
- Theologis, A., Laties, G.G., 1978. Respiratory contribution of the alternate pathway during various stages of ripening in avocado and banana fruit. *Plant Physiol.*62, 249-256.
- Theologis, A., Oeller, P.W., Wong, L.M., Rottmann, W.H., Gantz, D.M., 1993. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. *Dev. Genet.*14, 282-295.
- Thiault, J., 1970. Etude de criteres objectives de la qualite gustative de pommes Golden Delicious. *Bull. Techn. Inf. Minist. Agric. Paris*248, 191-201.

- Thomson, W.W., 1966. Ultrastructural development of chromoplasts in Valencia oranges. *Bot. Gaz. (Chicago)*127, 133-139.
- Thomson, W.W., Lewis, L.N., Coggins, C.W., 1967. The reversion of chromoplasts to chloroplasts in Valencia oranges. *Cytology*32, 117-124.
- Tigchelaar, E.C., McGlasson, W.B., Buescher, R.W., 1978. Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience*13, 508-513.
- Tigchelaar, E.C., McGlasson, W.B., Franklin, M.J., 1978. Natural and ethephon-stimulated ripening of F hybrids of the ripening inhibitor (*rin*) and non-ripening inhibitor (*nor*) mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Aust. J. Plant Physiol.*5, 449-456.
- Tigier, H.A., Batile, A. M. del C., Locascio, G., 1968. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus system. II. Improved purification and some properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Enzymologia*38, 43-56.
- Tigier, H.A., Batile, A. M. del C., Locascio, G., 1970. Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Biochim. Biophys. Acta*151, 300-302.
- Tijksens, L.M.M., Barringer, S.A., Biekman, E.S.A., 2001. Modelling the effect of pH on the colour degradation of blanched broccoli. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*2, 315-322.
- Tikunov, Y., Lommen, A., Ric De Vos, C.H., Verhoeven, H.A., Bino, R.J., Hall, R.D., Bovy, A.G., 2005. A novel approach for non-targeted data analysis for metabolites. Large scale-profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.*39, 1125-1137.
- Timberlake, C.F., Bridle, P., 1975. Anthocyanins. In: Harorne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (Eds.), *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, p. 214-266.
- Timberlake, C.F., Bridle, P., 1982. Distribution of anthocyanins in food plants. In: Markakis, P. (Ed.), *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press, New York, p. 125.
- Tong, C.B., Labavitch, J.M., Yang, S.F., 1986. The induction of ethylene production from pear cell culture by cell wall fragments. *Plant Physiol.*81, 929-930.
- Torskangerpoll, K., Andersen, O.M., 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem.*89, 427-440.
- Toul, V., Popsilova, J., 1966. Chemical composition of onion varieties (*Allium cepa* L.) *Bull. Hortic. Abstr.*38, 3385.
- Travers, I., Jacquet, A., Brisset, A., Maite, C., 2002. Relationship between the enzymatic determination of starch and the starch iodine index in two varieties of cider apples. *J. Sci. Food Agric.*82, 983-989.
- Tressl, R., Albrecht, W., 1986. Biogenesis of aromas through acyl pathways. In: Parliment, T.H., Croteau, R. (Eds.), *Biogenesis of Aromas*. ACS, Washington DC, p. 560-565.
- Tressl, R., Drawert, F., 1973. Biogenesis of banana volatiles. *J. Agric. Food Chem.*21, 560-565.
- Tressl, R., Jennings, W.G., 1972. Production of volatile compounds in the ripening banana. *J. Agric. Food Chem.*20, 189-192.
- Tressl, R., Drawert, F., Heimann, W., 1970. Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. V. Anreicherung, *Trennung und Identifizierung von Banaenaromastoffen*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*142, 249-263.
- Trout, S.A., Huelin, F.E., Tindale, G.B., 1960. The respiration of Washington navel and Valencia oranges. *Div. Food Preserv. Tech. Pap. (Aust., C.S.I.R.O.)*14, 11.
- Tsuchiya, T., Suzuki, T., Yamada, T., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K., 2003. Chlorophyllase as a serine hydrolase: identification of a putative catalytic triad. *Plant Cell Physiol.*44, 96-101.
- Tucker, G.A., 1993. Introduction. In: Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London, p. 1-51.
- Tucker, G.A., Robertson, N.G., Grierson, D., 1980. Changes in polygalacturonase isoenzymes during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.*112, 119-124.
- Tucker, G.A., Robertson, N.G., Grierson, D., 1982. Purification and changes in activities of tomato pectin-esterase isoenzymes. *J. Sci. Food Agric.*33, 396-400.
- USDA, ARS, 2004. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/contents.html> (15 August 2010).
- Vangdal, E., 1985. Quality criteria for fruit for fresh consumption. *Acta Agric. Scand*35, 41-47.
- Van Buren, J.P., 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Tex. Stud.*10, 1-23.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.*153, 895-905.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*48, 703-734.
- Varming, C., Jensen, K., Møller, S., Brockhoff, P.B., Christiansen, T., Edelenbos, M., Bjørn, G.K., Poll, L., 2004. Eating quality of raw carrots – correlation between flavour compounds, sensory profiling analysis and consumer liking test. *Food Qual. Prefer.*15, 531-540.
- Vavilin, D.V., Vermass, W.F., 2002. Regulation of tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol. Plant*115, 9-24.
- Veltman, R.H., Verschoor, J.A., Ruijsch van Dungsteren, J.H., 2003. Dynamic control systems (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. ("Elstar"): optimal quality through storage based on product response. *Postharvest Biol. Technol.*27, 79-86.
- Vendrell, M., McGlasson, W.B., 1971. Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment. *Aust. J. Biol. Sci.*24, 885-895.
- Vendrell, M., Dominguez-Puigjaner, E., Llop-Tous, L., 2001. Climacteric versus non-climacteric physiology. *Acta Hortic.*553, 345-349.
- Ververidis, P., John, P., 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*30, 725-727.
- Vicentini, F., Iten, F., Matile, P., 1995. Development of an assay for Mg-dechelataase. *Physiol. Plant*94, 57-63.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C., 1976. Lipoyxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol.*57, 780-788.
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C., 1983. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoyxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*111, 470-477.
- Villemez, C.L., Swanson, A.L., Hassid, W.Z., 1966. Properties of a polygalacturonic acid-synthesizing enzyme system from *Phaseolus aureus* seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.*116, 446-452.
- Voragen, A.G.J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.C.G., 1995. Pectins. In: Stephen, A.M. (Ed.), *Food Polysaccharides and their Applications*. Marcel Dekker, New York, p. 287-339.
- Wagner, A.M., Krab, K., 1995. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiol. Plant*95, 318-325.
- Wallner, S.J., 1978. Apple fruit β -galactosidase and softening in storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*103, 364.
- Wallner, S.J., Bloom, H.L., 1977. Characteristics of tomato cell wall degradation *in vitro*. Implications for the study of fruit softening. *Plant Physiol.*55, 94-98.
- Wang, C.Y., 1989. Chilling injury of fruits and vegetables. *Food Rev. Int.*5, 209-236.
- Wang, K.L.-C., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*14 (Suppl. 1), S131-S151.
- Wang, Z.Y., MacRay, E., Wright, M.A., Bolitho, K.M., Ross, G.S., Atkinson, R.G., 2000. Polygalacturonase gene expression in kiwi fruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Mol. Biol.*42, 317-328.
- Watkins, C.B., 2002. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: Knee, M. (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, p. 180-224.
- Weemaes, C., Ooms, V., Van Loey, A.M., Hendricks, M.E., 1999. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *J. Agric. Food Chem.*47, 2404-2409.
- von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C.G., 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*7, 1039-1057.
- White, R.C., Jones, I.D., Gibbs, E., 1963. Determination of chlorophylls, chlorophyllides and pheophorbides in plant material. *J. Food Sci.*28, 431-436.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.*47, 9-27.

- Willows, R.D., 2003. Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat. Prod. Rep*20, 327-341.
- Willstater, R., Stoll, A., 1913. Die wirkungen der chlorophyllase. *Untersuchungen uber Chlorophyll*, Springer, Berlin, p. 172-187.
- Winkle, B.S., 2004. Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*55, 85-107.
- Wong, D.W.S., 1995. Pectic enzymes. *Food Enzymes: Structure and Mechanism*, Chapman and Hall, New York, p. 212-236.
- Workman, M., Pratt, H.K., Morris, L., 1957. Studies on the physiology of tomato fruits. I. Respiration and ripening behavior at 20°C as related to date of harvest. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*69, 352-365.
- Worth, H.G.J., 1967. The chemistry and biochemistry of pectic substances. *Chem. Rev.*67, 465-473.
- Wyllie, S.G., 2008. Flavour quality of fruit and vegetables: are we on the brink of major advances?. In: Brückner, B., Grant Wyllie, S. (Eds.), *Fruit and Vegetable Flavor*. Woodhead, Cambridge, p. 3-10.
- Xu, L., Liao, M., Deng, G., Chen, S., Ren, Y., 2008. Changes in activity of PG, PE, Cx and LOX in pulp during fruit growth and development of two different ripening-season pear cultivars. *Amer. Euras. J. Agric. Environ. Sci.*3, 445-450.
- Xu, W.P., Chen, K.S., Xu, C.J., Zhang, S.L., 2003. Changes of lipoxygenase activity and ethylene biosynthesis in Actinidia fruit stored at 0°C and on shelf at 20°C after cold storage. *Sci. Agric. Sin.*36, 1196-1201.
- Xuan, H., Streif, J., Saquet, A., Romheld, V., Bangerth, F., 2005. Application of boron with calcium affects respiration and the ATP/ADP ratio in "Conference" pears during controlled atmosphere storage. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*80, 633-637.
- Yahia, E.M., 1994. Apple flavor. *Hortic. Rev.*16, 197-234.
- Yamaki, S., Kakiuchi, N., 1979. Changes in hemi-cellulose degrading enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant Cell Physiol.*20, 311-321.
- Yang, S.F., 1974. Ethylene biosynthesis in fruit tissues. *Colloq. Int. C.N.R.S.*238.
- Yang, S.F., 1980. Regulation of ethylene biosynthesis. *HortScience*15, 238-243.
- Yang, S.F., Ho, H.K., 1958. Biochemical studies on postripening banana. *J. Chin. Chem. Soc. (Taiwan)*5, 71-85.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*35, 155-189.
- Yip, W.-K., Yang, S.F., 1988. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiol.*88, 473-476.
- Yoon, S., Klein, B., 1979. Some properties of pea lipoxygenase isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.*27, 955-962.
- Young, R.E., Salimen, S., Sornrivichai, P., 1974. Enzyme regulation associated with ripening in banana fruit. *Colloq. Int. C.N.R.S.*238, 271.
- Yu, M.H., Spencer, M., 1969. Conversion of L-leucine to certain keto acids by a tomato enzyme preparation. *Phytochemistry*8, 1173-1178.
- Yu, M.H., Olson, D.E., Salunkhe, D.K., 1967. Precursors of volatile components in tomato fruit. I. Compositional changes during development. *Phytochemistry*6, 1457-1465.
- Yu, M.H., Salunkhe, D.K., Olson, L.E., 1968. Production of 3-methylbutanol from l-leucine by tomato extract. *Plant Cell Physiol.*9, 633-638.
- Yu, M.H., Olson, D.E., Salunkhe, D.K., 1968. Precursors of volatile components in tomato fruit. III. Enzymatic reaction products. *Phytochemistry*7, 555-565.
- Yu, M.H., Olson, L.E., Salunkhe, D.K., 1968. Precursors of volatile components in tomato fruit. III. Enzymatic reaction products. *Phytochemistry*7, 561-565.
- Yu, U.B., Adams, D.O., Yang, S.F., 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*198, 280-286.
- Yung, K.H., Yang, S.F., 1980. Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiol.*66, 281-285.
- Zamora, R., Olias, J.M., Mesias, J.L., 1987. Purification and characterization of tomato lipoxygenase. *Phytochemistry*26, 345-347.
- Zanella, A., Cazazanelli, P., Panarese, A., Coser, A., Cecchinell, M., Rossi, O., 2005. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. *Acta Hortic*682, 1535-1542.
- Zapsalis, C., Francis, F.J., 1965. Cranberry anthocyanins. *J. Food Sci.*30, 396-399.
- Zauberman, A., Schiffman-Nadel, M., 1972. Pectin methylesterase and polygalacturonase in avocado fruit at various stages of development. *Plant Physiol.*49, 864-865.
- Zeroni, M., Galil, J., Ben-Yehoshua, S., 1976. Autoinhibition of ethylene formation in non ripening stages of the fruit of sycamore fig (*Ficus sycamores* L.). *Plant Physiol.*57, 647-650.
- Zhang, B., Chen, K., Bowen, J., Allan, A., Espley, R., Karunairatnam, S., Ferguson, I., 2006. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J. Exp. Bot.*57, 3825-3836.
- Zhong, R., Ye, Z.H., 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*10, 564-572.
- Zhou, H.-W., Sonogo, L., Khalchitski, A., Ben-Arie, R., Lers, A., Lurie, S., 2000. Cell wall enzymes and cell wall changes in "Flavortop" nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectin and natural polymers during ripening and in wooly fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*125, 630-637.
- Ziegler, R., Blaheta, A., Guha, N., Schonegge, B., 1988. Enzymatic formation of pheophorbide and pyropheophorbide during chlorophyll degradation in a mutant *Chlorella fusca* Shihira et Kraus. *J. Plant Physiol.*132, 327-332.
- Zimmerman, D.C., Coudron, C.A., 1979. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecendic acid. *Plant Physiol.*63, 536-541.
- Zimmerman, D.C., Vick, A.A., 1970. Hydroperoxide isomerase: a new enzyme of lipid metabolism. *Plant Physiol.*46, 445-453.

Carnes e peixes

N. A. Michael Eskin,[‡] Michel Aliani,^{*} Fereidoon Shahidi[†]

I. INTRODUÇÃO

A carne é definida como parte dos animais que é usada como alimento. Uma definição mais precisa é fornecida pela FDA (Food and Drug Administration) (Meyer, 1964): a carne é derivada dos músculos dos animais que têm relação bioquímica próxima aos seres humanos e que possuem, portanto, alto valor nutritivo. As espécies animais convencionalmente utilizadas são os bovinos, caprinos, suínos e as aves, incluindo frangos e perus. Quanto aos peixes, porém, em geral são os músculos brancos a principal fonte nutricional. O consumo de carne *per capita*, nos Estados Unidos, mudou durante a última década, sendo a carne de porco substituída por carne de frango, tornando-se este o segundo músculo mais consumido (Tabela 3.1). Frutos do mar, especialmente peixes, representam cerca de 20% da proteína animal consumida em todo o mundo (Zabel *et al.*, 2003). Nos países em desenvolvimento, na África, Ásia e na América Latina, o consumo de carne e de peixe ainda é extremamente baixo ou inexistente, fato comprovado pela crescente incidência de desnutrição. A falta de proteínas de alta qualidade, e a consequente deficiência em aminoácidos essenciais, ainda é o problema mundial de maior urgência.

Este capítulo vai debater as alterações dinâmicas envolvidas no processo de conversão do músculo em carne ou peixe comestível. Após a morte do animal ou do peixe, muitas mudanças químicas, bioquímicas e físicas ocorrem, levando ao desenvolvimento da maciez *post mortem*. Um conhecimento mais aprofundado dessas mudanças seria uma importante contribuição para a fabricação de produtos de carne e peixe de melhor qualidade. Enquanto a degradação das proteínas miofibrilares e dos cisto esqueletos é desejável para o amaciamento *post mortem* dos músculos mamíferos, tais alterações podem trazer mudanças indesejáveis nos músculos dos peixes (Geesink *et al.*, 2000b). A textura ainda é uma das qualidades mais importantes que afetam a aceitação, por parte do consumidor, de produtos de carne e peixe. Nos produtos da carne, no entanto, a maciez é a mais importante para o consumidor, ao passo que a firmeza é fundamental para a qualidade do peixe (Cheret *et al.*, 2007). Progressos

consideráveis nas últimas duas décadas aprimoraram a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas mudanças na maciez e na textura de carnes e peixes (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006; Terova *et al.*, 2011).

TABELA 3.1 Consumo per capita de carne nos Estados Unidos 1970-2008^a

Ano	Carne bovina	Carneiro	Porco	Vitela	Frango	Peru	Peixe	Carne total
1970	51,8	1,2	28,1	1,0	15,8	4,2	2,8	104,9
1972	52,3	1,2	28,1	0,8	16,3	4,7	2,9	106,3
1974	52,5	0,8	27,4	0,8	15,6	4,5	2,7	104,3
1976	57,7	0,7	23,7	1,3	16,5	4,6	3,4	107,9
1978	53,5	0,6	24,7	1,0	17,5	4,5	3,5	105,3
1980	46,9	0,6	30,4	0,6	18,9	5,3	3,3	108,0
1982	47,2	0,6	26,2	0,7	19,5	5,5	3,1	102,8
1984	48,0	0,6	27,6	0,7	20,4	5,7	3,4	106,4
1986	48,4	0,6	26,4	0,8	21,3	6,7	3,7	107,9
1988	44,6	0,6	28,5	0,6	22,8	8,1	3,7	108,9
1990	41,6	0,6	27,1	0,4	24,4	9,1	3,7	106,9
1992	40,6	0,6	28,7	0,4	26,8	9,2	3,6	109,9
1994	40,9	0,5	28,6	0,4	28,1	9,1	3,9	111,5
1996	41,6	0,5	26,4	0,5	28,1	9,4	3,8	110,3
1998	41,3	0,5	28,1	0,3	29,1	9,1	3,5	111,9
2000	42,0	0,5	27,9	0,3	31,2	9,0	3,4	114,3
2002	42,0	0,5	28,1	0,2	32,7	9,2	3,7	116,4
2004	41,0	0,5	28,0	0,2	34,2	8,8	3,4	116,1
2006	40,8	0,4	26,8	0,2	35,1	8,7	4,0	116,0
2008	38,8	0,4	26,8	0,2	33,8	9,1	3,8	112,9

^a Os dados são adaptados do USDA/Economic Research Service, www.ers.usda.gov, fev. 1, 2011. O "consumo" de carne per capita é medido em libras/ano e reflete o montante total de fornecimento de carne nos Estados Unidos com ajuste de perda. O USDA calcula o "consumo" dividindo o suprimento anual de um produto específico pela população anual e com ajuste do montante para perda subtraindo: 1. o montante estimado de perda de carne no processo de conversão desde a criação até o produto pronto para o mercado; 2. o montante estimado de perda do produto no varejo em decorrência de danos; e 3. a quantidade estimada de perda de carne quando o consumidor a prepara em casa. A categoria peixe inclui tanto o produto congelado quanto o fresco. <http://vegetarian.procon.org/view.resource.php?resourceID=004716#V>

II. A NATUREZA DO MÚSCULO

Enquanto os músculos são classificados em diversos tipos, o estriado e voluntário é o que constitui a carne magra. A unidade básica do músculo é a fibra muscular, uma célula cilíndrica, multinucleada, recoberta por uma membrana externa, o sarcolema. As fibras se associam em feixes que são cobertos por uma bainha de tecidos conectivos, o perimísio. As fibras são mantidas juntas, envoltas por tecido conectivo e cobertas por outra membrana, chamada epimísio. Os tecidos conectivos – importantes para a textura e a comestibilidade de carnes e peixes – incluem proteínas fibrosas, colágeno, reticulina e elastina. Os músculos dos peixes possuem menor quantidade de tecidos conectivos trazendo, portanto, menos problemas relativos ao amaciamento.

A. Estrutura

As fibras de músculos individuais são compostas por miofibrilas com espessura de 1-2 μm que caracterizam as unidades básicas para a contração muscular. O músculo esquelético dos peixes difere do dos mamíferos, sendo que suas fibras organizadas em torno do tecido conectivo são muito mais curtas. O tecido conectivo está presente como camada transversal curta (miocomata), que divide os músculos longos dos peixes em segmentos (miotomos) que correspondem ao número de vértebras (Dunajski, 1979). As miofibrilas individuais são separadas por uma fina rede de túbulos, o retículo sarcoplasmático. No interior de cada fibra, há uma matriz de um líquido

conhecido como sarcoplasma, que contém mitocôndria, enzimas, glicogênio, adenosina trifosfato (ATP), creatina e mioglobina.

Um exame das miofibrilas em microscópio, com luz de contraste de fase, mostra que as fibras são estriadas em faixas em consequência da presença de bandas-A ou escuras e bandas claras ou bandas-I. Essas estruturas parecem ser muito similares em peixes e carnes. A banda-A é atravessada por uma banda mais clara ou zona-H, enquanto a banda-I possui uma linha mais escura no meio, conhecida como linha-Z. Outra linha escura, a linha-M, é observada no centro da zona-H. A unidade básica da miofibrila é o sarcômero, definido como a unidade que fica entre as linhas adjacentes Z, como mostra a Figura 3.1. Um exame do sarcômero por microscopia eletrônica revela dois conjuntos de filamentos no interior das fibrilas: um conjunto espesso que consiste principalmente de miosina, além de um conjunto fino que contém principalmente actina-F.

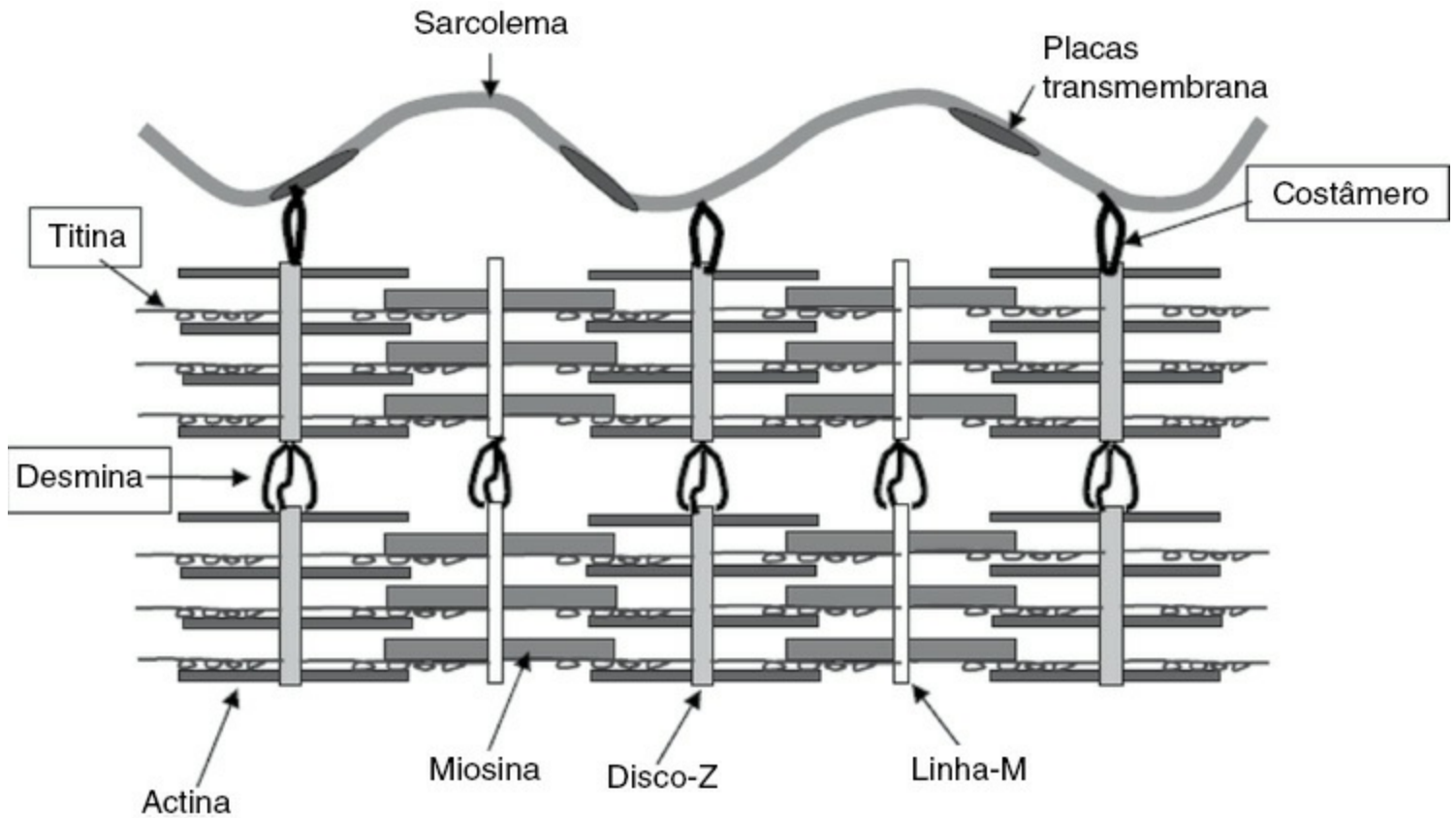


FIGURA 3.1 Representação esquemática de proteínas miofibrilares mostrando os principais componentes do sarcômero. As caixas indicam as estruturas do citoesqueleto e as proteínas susceptíveis à clivagem *post mortem*. Kemp *et al.* (2010).

Além da organização paracristalina dos conjuntos de filamentos espessos e finos, parece haver um filamento do tipo “estrutura citoesqueleto”, composto de conectina e desmina (Young *et al.*, 1980-1981). Atualmente, a conectina é reconhecida como a principal proteína miofibrilar nos “filamentos *gap*” nos músculos e está presente em todo o sarcômero do músculo esquelético (Maruyama *et al.*, 1976a). Locker e Leet (1976a; 1976b) relataram que filamentos *gap* ou filamentos G recobrem a região entre os filamentos espessos e finos das fibras em músculos de carne superextendidos. Locker (1984) propôs que cada filamento *gap* forma um centro de uma banda-A. A conectina foi posteriormente caracterizada como a proteína titina, que consiste em três frações de titina -1, -2 e -3, relatada por Wang *et al.* (1979), constituindo 10% a 15% das proteínas miofibrilares nos peitos de frangos. A titina-3 é reconhecida como uma proteína diferente e é denominada nebulina (Wang e Williamson, 1980). A desmina, por outro lado, foi descrita por vários pesquisadores como substância presente na periferia de cada disco-Z nos músculos esqueléticos de frangos (Lazarides e Hubbard, 1976; Grainger e Lazarides, 1978). Sua função seria a de manter o alinhamento dos sarcômeros adjacentes, que unificam o processo de contração das miofibrilas separadas.

B. Citoesqueleto

O citoesqueleto do músculo é composto por dois elementos: os filamentos G e os filamentos intermediários (Stanley, 1983).

1. Filamentos G

Os filamentos *gap* (filamentos G) foram identificados, primeiramente, por Hanson e Huxley (1955) como “filamentos-S”, finíssimos e elásticos, responsáveis pela manutenção dos filamentos de actina juntos. O modelo na Figura 3.2, proposto por Hoyle, ilustra estes filamentos descontínuos, localizados em paralelo ao eixo da fibra, estendidos entre os discos-Z e denominados “filamentos *gap*” (Sjöstrand, 1962). Esses filamentos foram identificados por Maruyama *et al.* (1976b; 1977) e são compostos por uma proteína insolúvel e similar a borracha denominada “conectina”. Wang *et al.* (1979) identificaram uma proteína de alta massa molecular, que era conhecida como titina. Pesquisas subsequentes demonstraram que os componentes de alta massa molecular da conectina eram a titina (Maruyama *et al.*, 1981). A titina parece ser a principal proteína do citoesqueleto do sarcômero e a responsável pela integridade das células dos músculos (Wang e Ramirez-Mitchell, 1979; 1983a; 1983b). Locker e Leet (1976b) propuseram que todos os filamentos G formam um centro no interior da banda-A e ligam os dois filamentos finos nos sarcômeros adjacentes através da linha-Z. Wang e Ramirez-Mitchell (1984), utilizando quatro anticorpos monoclonais diferentes da titina de coelhos, demonstraram que a titina passou da linha M através da banda A e foi para a banda I, descontinuando, assim, o modelo do núcleo central.

Wang *et al.* (1979) também identificaram uma proteína miofibrilar grande nos músculos esqueléticos de vertebrados, conhecida como nebulina. A proteína foi posteriormente isolada da miofibrila de músculos *psoas* de coelhos e nos músculos peitorais de frangos através de técnicas de eletroforese e imunológicas. Foi observado que ela é diferente da titina (Wang e Williamson, 1980; Murayama *et al.*, 1981; Ridpath *et al.*, 1982; 1984). A nebulina localiza-se na miofibrila na linha N². Wang e Ramirez-Mitchell (1983b) apresentaram um modelo alternativo para os filamentos G, que consiste em uma matriz de filamentos elásticos possuidores de titina e nebulina assim como substâncias adicionais do sarcômero (Locker, 1984).

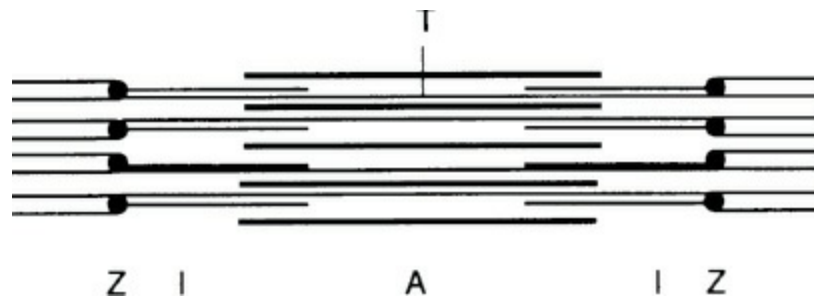


FIGURA 3.2 Diagrama de modelo proposto para músculos incluindo filamentos elásticos extremamente finos (T) estendendo-se entre discos-Z (Z) e paralelos à banda-A (A) e à banda-I (I). Hoyle (1967).

A nebulina caracteriza uma família de proteínas gigantes (600–900 kDa), presentes nos músculos esqueléticos e que formam um conjunto de filamentos inextensíveis ancorados na linha Z (Wang e Wright, 1988). Durante as duas últimas décadas, ela foi considerada por muitos investigadores a reguladora molecular que determinava o comprimento do filamento fino da actina. Muitas propriedades apresentadas pela nebulina permitem sua atuação como reguladora molecular (Horowitz, 2006). Isto inclui, em primeiro lugar, sua habilidade de se estender por toda a linha do filamento fino com seu C-terminal ancorado no disco-Z e seu N-terminal na direção do centro do sarcômero (Wright *et al.*, 1993). Em segundo lugar, o comprimento da nebulina varia em função do entrelaçamento alternativo, possibilitando que ela se correlacione na extensão dos filamentos finos dos diferentes músculos (Kruger *et al.*, 1991; Labeit *et al.*, 1991). Por fim, ela possui uma estrutura proteica única que permite sua

ligação com todos os componentes principais do filamento fino. Seu papel principal é manter a função esquelética adequada, o que foi demonstrado em ratos com deficiência de nebulina, que morreram duas semanas após o nascimento, como resultado da fraqueza muscular (Bang *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2006). Além da função de reguladora molecular, evidências recentes sugerem que a nebulina regula a contração ao otimizar a interação actina-miosina e controlar o cálcio no retículo sarcoplasmático (Root e Wang, 1994; 2001; Ottenheijm *et al.*, 2008; Bang *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2009). A interação do C-terminal da nebulina seria regulada pela desmina, sugerindo seu possível envolvimento na manutenção do alinhamento lateral das miofibrilas, uma propriedade importante para coordenar as contrações de modo eficiente (Bang *et al.*, 2002; Conover *et al.*, 2009; Tonino *et al.*, 2010). Recentemente, Pappas *et al.* (2010) não conseguiram encontrar uma função para a nebulina na polimerização da actina, uma vez que ela parece regular o comprimento dos filamentos finos de actina através de um mecanismo de estabilização que evita a despolimerização da actina. Defeitos no gene da nebulina são associados à miopatia congênita da nemalina, condição que debilita e promove a fraqueza dos músculos (Gokhin *et al.*, 2009). O papel importante da nebulina na saúde e na doença dos músculos foi revisada por Labeit *et al.* (2011).

2. Filamentos intermediários

Esses filamentos que unem as miofibrilas ao sarcolema lateralmente são de tamanho intermediário (10 nm de diâmetro), entre os filamentos da actina (6 nm de diâmetro) e a miosina (14–16 nm de diâmetro) (Ishikawa *et al.*, 1968). Sua proteína isolada – a desmina, também conhecida como esqueletina – está localizada na periferia do disco-Z na forma de filamentos (Lazaride e Hubbard, 1976; Richardson *et al.*, 1981). O papel da desmina no citoesqueleto é o de conectar linhas-Z às miofibrilas adjacentes (O’Shea *et al.*, 1981; Robson *et al.*, 1984).

C. Tecido conectivo

O espaço intersticial nas células dos músculos é ocupado por três proteínas: o colágeno, a reticulina e a elastina que, juntas, são denominadas de tecidos conectivos. A membrana do endomísio, que envolve as fibras dos músculos, é composta de fibrilas colagenosas e reticulares finas, enquanto a elastina é distribuída de modo esparsa no músculo com os sistemas sanguíneo, capilar e nervoso (Asghar *et al.*, 1984). Feixes das fibras de tais músculos são envoltos por um tecido conectivo mais espesso, o perimísio. Estes tecidos tendem a unir-se no final do músculo nas fibras espessas de tendão, como é mostrado na Figura 3.3 (Etherington e Sims, 1981). Quando o músculo se contrai, o movimento é transmitido pelo tendão ao esqueleto. A elasticidade limitada do colágeno no tendão permite a translação da contração do músculo em alto grau de movimento.

1. Colágeno

A principal proteína do tecido conectivo é o colágeno, uma glicoproteína. Pensava-se anteriormente que fosse composto de duas cadeias de polipeptídeos, α_1 - e α_2 -, que formavam uma estrutura helicoidal tríplice. Hoje já se sabe que no mínimo 10 cadeias α parecem ser responsáveis pelos diferentes tipos de colágeno identificados. Dentre eles, o colágeno I e o III são os mais abundantes nos músculos, e os de tipo IV, V, VI, XII, XIV, XV e XIX são encontrados em pequenas quantidades. Eles diferem entre si em sua estrutura primária e composição de aminoácidos (Asghar *et al.*, 1984). Morfologicamente, três depósitos de colágenos distintos – endomísio, perimísio e epimísio – compõem a rede tridimensional das fibras de elastina e colágeno imersas em uma matriz de proteoglicanos (Lepetit, 2008). O endomísio é a camada de tecido conectivo que envolve cada músculo e recobre a membrana da base (McCormick, 1999). O perimísio inclui o revestimento conectivo que envolve os músculos

individuais e contínuos, enquanto o tendão une os outros músculos (McCormick, 1999). Ele é extremamente duro e resistente a cortes e à solubilização. O perimísio é responsável pelo volume do tecido conectivo intramuscular (IMCT) e desempenha importante papel na determinação da diferença das texturas da carne (Lewis e Purlow, 1990). A subunidade da fibra de colágeno é o tropocolágeno, um monômero do colágeno. Ele é composto por três cadeias α de polipeptídeos, organizados em um padrão que permite que cadeias de polipeptídeos se sobreponham de forma flexível uma sobre as outras, como demonstrado no caso do monômero de tropocolágeno do tipo I, na Figura 3.4 (Asghar e Henrickson, 1982).

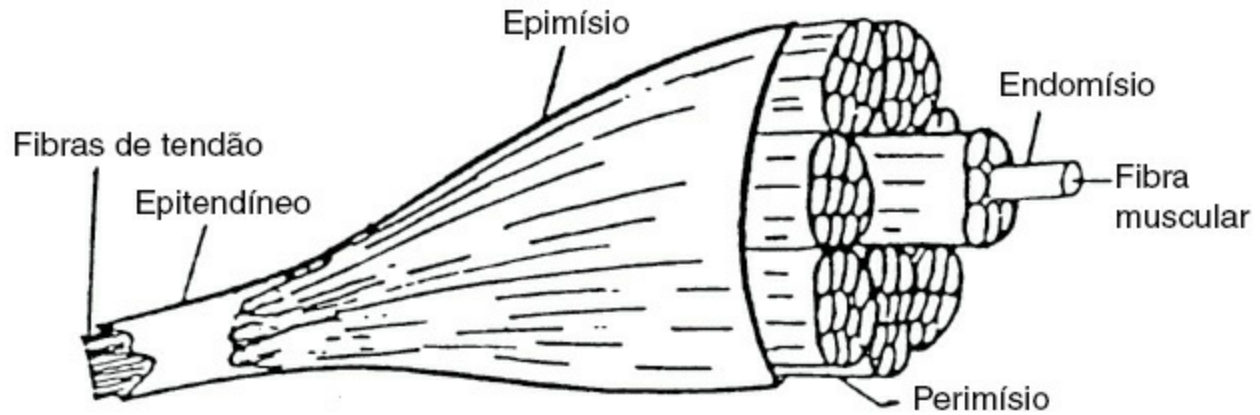


FIGURA 3.3 Tecidos conectivos do músculo. Etherington e Sims (1981).

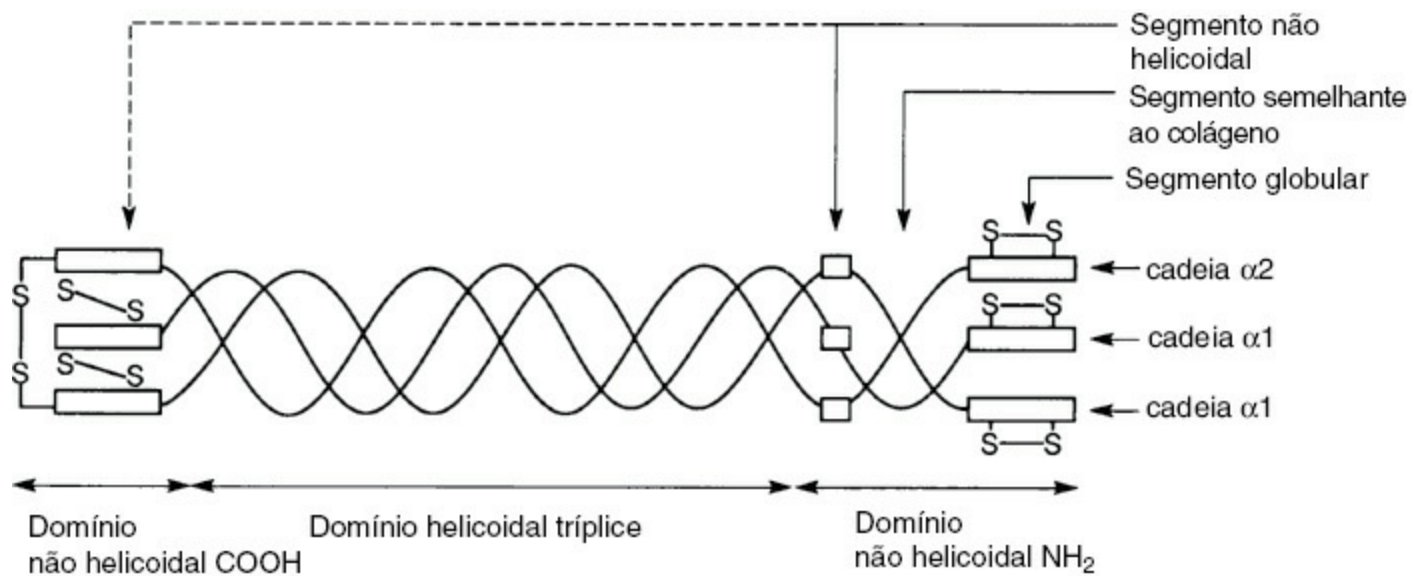


FIGURA 3.4 Representação esquemática do monômero do tropocolágeno tipo I, composto de duas cadeias idênticas pro- α_1 (I) (linhas sólidas) e uma cadeia pro- α_2 (I) (linha pontilhada). Asghar e Henrickson (1982).

O principal componente do colágeno do epimísio e do perimísio é o colágeno de tipo I, enquanto os de tipo III, IV e V ficam localizados no endomísio (Bailey e Peach, 1968; Bailey e Sims, 1977). Uma vez que o colágeno é o componente principal do tecido conectivo, a textura da carne é grandemente influenciada por ele. Bailey (1972) sugeriu que uma textura aceitável da carne requer certo grau de ligações cruzadas de colágeno. A falta ou a superabundância dessas ligações produz carne extremamente mole ou extremamente dura. A dureza associada à carne de animais mais velhos é atribuída ao alto grau de ligações cruzadas estáveis nas fibras de colágeno (Eyre *et al.*, 1984; Reiser *et al.*, 1992). As quantidades relativas das ligações cruzadas parecem determinar a textura da carne cozida (Bailey e Light, 1989; Bailey, 1990).

a. Colágeno e a textura da carne

Tentativas de correlacionar o colágeno total dos músculos com a textura final da carne resultaram em conclusões conflitantes. Dransfield (1977) descobriu uma relação definitiva entre o total de colágeno dos músculos e sua dureza. Outros estudos mostraram que a natureza qualitativa do colágeno, e não a quantitativa, é a que afeta a textura inicial da carne (Bailey, 1972; Shinomokai *et al.*, 1972; Bailey *et al.*, 1979; Bailey e Sims, 1977). Uma pesquisa posterior de Light *et al.* (1985) examinou a função do colágeno do epimísio, perimísio e endomísio na textura de seis músculos bovinos. Eles relataram haver uma correlação entre o diâmetro da fibra de colágeno e o conteúdo do tecido conectivo do perimísio e endomísio na dureza da carne. Uma relação linear foi obtida quando ligações cruzadas estáveis ao calor foram plotadas contra a força compressiva (kg) (Figura 3.5) para seis músculos perimisiais cozidos a 75°C, usando os resultados obtidos por Dransfield (1977). Apesar de não terem obtido resultados definidos, tendências similares foram observadas nas amostras de músculos endomisiais e epimisiais. Com base em tais resultados, tornou-se aparente que as ligações cruzadas possuem papel crucial na determinação da maciez ou dureza da carne. Se a causa principal das fraturas e quebras da carne, de acordo com Purslow (1985), ocorre pelo perimísio ou nas junções do perimísio e endomísio, a natureza das ligações cruzadas entre as fibras pode ser extremamente importante.

A textura da carne de animais mais velhos foi atribuída às mudanças nas ligações cruzadas do colágeno, as quais tendem a ser mediadas por alterações na lisil oxidase quando os animais estão em idade mais avançada (Bailey e Shimokomaki, 1971; Robins *et al.*, 1973). O endurecimento da carne durante o envelhecimento foi relacionado com a diminuição das ligações cruzadas de hidroxilisinocetonorleucina no colágeno imaturo (HLKLN) (Shimokomaki *et al.*, 1972). Supunha-se que, em animais mais velhos, a principal ligação cruzada, a piridinolina (PYR) (Figura 3.6) fosse derivada de dois colágenos HLKLN reduzíveis e estabilizados (Fujimoto, 1977; Eyre e Oguchi, 1980; McCormick, 1999). Descobriu-se que a formação da PYR tem relação com a textura da carne e estabelece pontes nos diferentes tipos de colágenos (Shimokomaki *et al.*, 1990; Nakano *et al.*, 1991; Bosselmann *et al.*, 1995). Uma pesquisa desenvolvida por Coro *et al.* (2002) relatou um aumento no colágeno de 0,448% a 0,568% nos músculos do peito (*pectoralis major*) de frangos tipo Ross, com idades de 20 a 540 dias. Durante este período, a PYR também aumentou de 0,009 para 0,101 mol/mol de colágeno e foi inversamente relacionada com a solubilidade do colágeno. Alterações na textura medidas pelos valores de corte, porém, demonstraram que a diminuição na maciez foi mais afetada pela formação de ligações cruzadas de PYR do que pelo aumento na síntese do colágeno. A diminuição na solubilidade do colágeno também foi diretamente relacionada com o aumento na concentração de PYR. As revisões de Lepetit (2007; 2008) discutem o papel do colágeno na maciez ou dureza da carne.

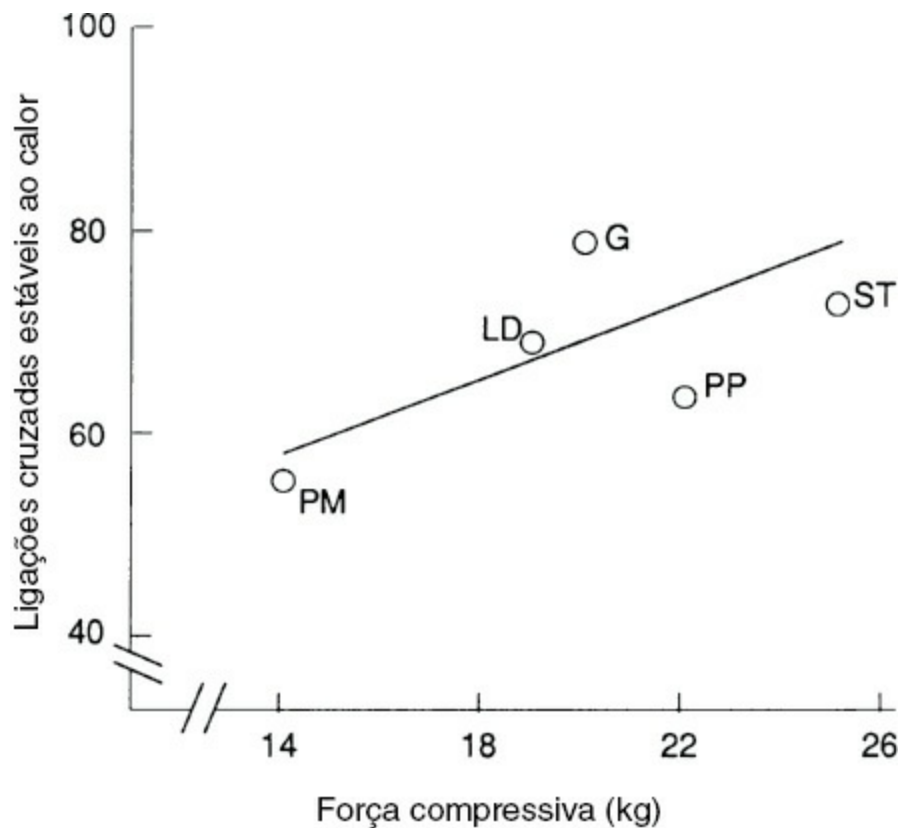


FIGURA 3.5 Gráfico do total de ligações cruzadas estáveis ao calor em seis perimísios versus força compressiva após cozimento do músculo por 1 hora a 75°C (dados de Dransfield, 1977). PM: *Psoas major*; LD: *longissimus dorsi*; PP: *pectoralis profundis*; G: *gastrocnemius*; ST: *semitendinosus*. Light et al. (1985).

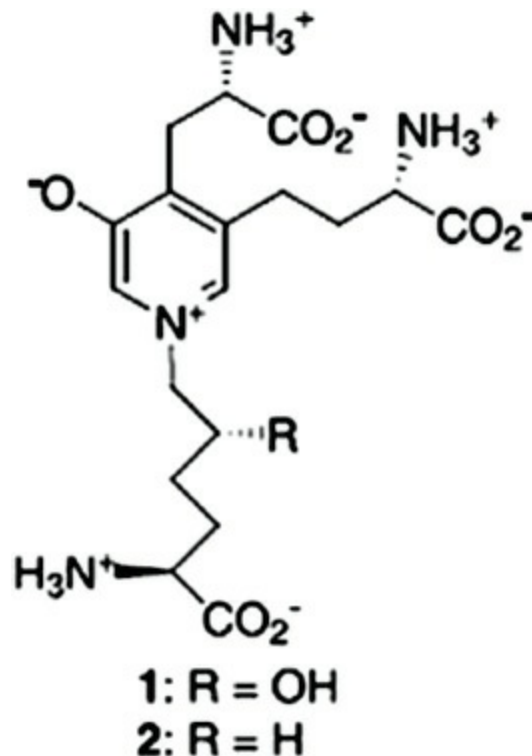


FIGURA 3.6 Piridinolina. Allevi e Anastasia (2003).

b. Colágeno e a textura dos peixes

Em geral, os músculos dos peixes contêm um décimo do colágeno encontrado em carnes vermelhas. Eles são divididos por membranas finas – as miocomatas –, em segmentos ou miotomos, como demonstra a Figura 3.7. As miocomatas são compostas por tecidos conectivos, em que cada fibra de músculo está envolvida por uma parede

de células ou membranas de base, compostas por fibrilas de colágeno. A integridade dos músculos dos peixes é mantida pelo tecido conectivo das fibras da miocomata e do colágeno, que, juntas, formam o retículo endomisial. Se os miotomos não estão conectados à miocomata formam-se fendas e buracos na carne, característico de tecido muscular aberto, o que resulta em deterioração na qualidade do peixe, pois os filés se separam e se tornam inaceitáveis. Love *et al.* (1972) atribuíram o desenvolvimento de tal problema à ruptura da conexão entre o endomísio e a miocomata, por manipulação excessiva ou dobra do peixe enrijecido. A formação de aberturas no tecido muscular do peixe, com conseqüente amolecimento do tecido, decorre de deterioração no período de estocagem e é aumentada por contrações musculares fortes e rápidas durante o rigor (Love, 1988; Bremner, 1999; Taylor *et al.*, 2002). Ofstad *et al.* (2006) examinaram o fenômeno em bacalhau e no peixe-lobo e atribuíram o aumento da formação de aberturas no tecido muscular durante estocagem no gelo à degradação de proteoglicanos e glicoproteínas, os principais constituintes do IMCT. Eles têm função importante na organização espacial das fibras de colágeno, pois ancoram células à matriz extracelular na rede de colágeno. A maior propensão à abertura do tecido muscular no bacalhau, quando comparado ao peixe-lobo, foi justificada pela separação mais rápida entre as miofibras, o que ocorre antes da separação entre os miotomas e os miocomatas (Ofstad *et al.*, 2006). Cerca de 40% da degradação do salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) durante o processamento secundário foi atribuído ou a carne demasiado macia ou a separação do tecido muscular (Michie, 2001). Além disso, foi relatado que o estresse no pré-abate do salmão acelera o amaciamento do filé do peixe, além de aumentar a formação de aberturas no tecido muscular assim como a perda de cor e de água (Kiessling *et al.*, 2004; Erikson e Misimi, 2008; Morkore *et al.*, 2008). Um método novo para testar a tensão, utilizando-se análise mecânica de textura, foi desenvolvido recentemente por Ashton *et al.* (2010) para avaliar a textura e a formação de aberturas em filés de salmão. A contribuição do tecido conectivo na textura do peixe permanece não esclarecida, quando comparada ao seu papel na carne, em conseqüência de menor quantidade. Por exemplo, o alto conteúdo de tecido conectivo no cação requer uma temperatura de cozimento de 45°C, o que é significativamente mais baixa do que o cozimento à temperatura de 92°C durante 1 hora, que é necessário para obter o mesmo grau de maciez na carne.

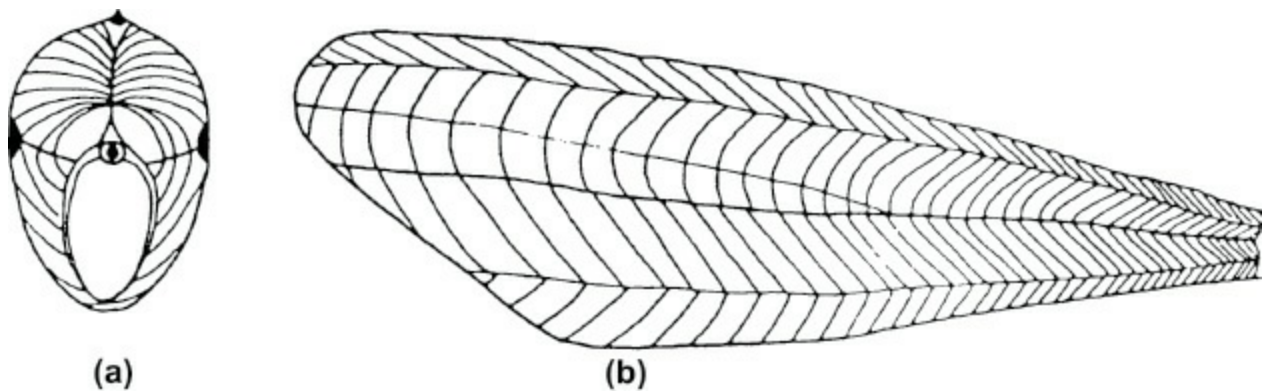
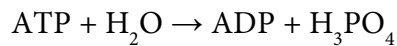


FIGURA 3.7 A estrutura metamérica de músculos de peixes. Os padrões das linhas nos cortes (a) cruzado e (b) longitudinal representam o arranjo de lâminas de tecido conectivo nos músculos. Dunajski (1979).

III. CONTRAÇÃO MUSCULAR

Enquanto a maioria dos estudos dá-se em músculos de mamíferos, é evidente que alterações semelhantes ocorrem nos músculos dos peixes. Comumente, aceita-se o fato de que a contração e o relaxamento de músculos estriados ocorrem através da ação de deslizamento dos filamentos espessos sobre os finos, enquanto o comprimento dos filamentos permanece o mesmo (Rowe, 1974). A miosina apresenta atividade de adenosina trifosfatase (ATPase), o que requer a presença de íons cálcio e magnésio. É a regulação da ATPase miofibrilar que determina a resposta contrátil do músculo. Esta enzima catalisa a clivagem hidrolítica do ATP, liberando, assim, a mais imediata fonte de energia para a contração muscular:



$$\Delta G_{298} \text{ (Alteração da energia livre padrão a } 25^\circ\text{C)} = -11,6 \text{ kcal/mol}$$

Em músculos em repouso, a atividade da ATPase é muito baixa, resultando em uma liberação lenta da adenosina difosfato (ADP) e de fósforo inorgânico nos sítios ativos da miosina e da actina. Quando ocorre um estímulo do músculo, a cabeça da miosina, que contém os sítios enzimáticos e de combinação das actinas, interage com a actina liberando rapidamente ADP e fosfato inorgânico (P_i). O aumento da hidrólise do ATP pode alcançar várias centenas de vezes comparando-se ao valor observado em estado de repouso (Perry, 1979). Este fato é acompanhado por uma alteração da conformação na cabeça da miosina, que provoca uma mudança no seu ângulo de interação com o filamento da actina. O resultado é que o monômero da actina ligado à cabeça da miosina se move para frente cerca de 5–10 nm (Huxley, 1969). Depois que o ADP e P_i são liberados da cabeça da miosina, o monômero da actina se solta e permite que uma nova molécula de Mg-ATP^{2-} seja incorporada ao sítio enzimático na cabeça da miosina e, então, o complexo de substrato de enzima é reestabelecido. A contração muscular é, portanto, caracterizada por uma rápida conversão de ATP para ADP e fosfato inorgânico e, ao se completar, o músculo retorna ao seu estado de repouso, processo caracterizado pela capacidade do complexo substrato-enzima do sítio enzimático da cabeça de miosina ser liberado quando a estimulação ocorre. A hidrólise da miosina na presença da actina foi estudada por muitos pesquisadores, apesar de detalhes de alguns mecanismos ainda não terem sido esclarecidos (Chock *et al.*, 1976; Eccleston *et al.*, 1976).

A. Regulação da contração muscular: troponina e tropomiosina

A regulação da contração muscular parece envolver a liberação de cálcio das vesículas do retículo sarcoplasmático, localizado nas miofibrilas. O cálcio é liberado quando o estímulo é recebido pela fibra muscular através do sistema nervoso central. Ele estimula a ATPase da miosina, liberando, assim, a energia necessária para que o músculo se contraia, facilitando a ação de deslizamento dos filamentos da actina que formam a actomiosina contrátil (Huxley, 1964). Esse processo foi confirmado nos estudos realizados por Goodno *et al.* (1978), que relataram elevação de 100 vezes na atividade de ATPase da miofibrila quando os teores de íons de cálcio (Ca^{2+}) aumentam. O cálcio regula a interação miosina-actina, ligando-se diretamente ao componente troponina C do filamento-I.

A troponina é uma proteína miofibrilar associada aos filamentos finos e parece controlar a interação entre a actina e a miosina. Trata-se de uma molécula alongada, com massa molecular de 80 kDa, ligada à tropomiosina, outra proteína miofibrilar. Ambas atuam como reguladoras do sistema de contração muscular (Ebashi, 1974). A tropomiosina, longa, enrolada e em formato de α -hélice fica localizada nos sulcos das duas pontas, distantes uma da outra, dos monômeros de actina nos filamentos finos (Seymour e O'Brien, 1980). Murray e Weber (1974) mostraram que a troponina (Tn) e a tropomiosina (TM) interagem com sete moléculas de actina (Figura 3.8). A troponina, ao contrário, é encontrada a intervalos de 38 nm ao longo dos filamentos finos de actina e está associada aos filamentos na banda-I. É composta de três subunidades: a troponina C (TnC), a troponina T (TnT) e a troponina I (TnI). Ela teria funções múltiplas e compartimentalizadas, com cada subunidade exercendo um papel específico, incluindo a ligação da tropomiosina ou Ca^{2+} ou inibindo a actomiosina ATPase (Greaser e Gergely, 1973). Quando o músculo é estimulado, em primeiro lugar, a TnC liga Ca^{2+} e, em seguida, neutraliza a inibição da TnI da ATPase da actomiosina, que acarretará alterações conformacionais na proteína por meio da tropomiosina. O papel da TnT permanece obscuro, apesar de ter sido relatado, posteriormente, que aumenta a atividade de ATPase da actomiosina em alta concentração de Ca^{2+} e pode ainda atuar duplamente na regulação dos filamentos (Dahiya *et al.*, 1994; Potter *et al.*, 1995; Tobacman, 1996). Pesquisas recentes feitas por Murakami *et al.* (2008) demonstraram que a polimerização da tropomiosina, da cauda até a cabeça, é importante para a ligação com a actina e para regular a contração da actina-miosina. A estrutura de 2.1Å de cristais em solução contendo

tropomiosina N e C terminal sobrepostas é mostrada na Figura 3.8 A. Os pesquisadores enfatizaram a importância da rotação molecular gerada pela TnT na junção entre tropomiosinas sucessivas para a regulação das contrações de músculos estriados.

Os músculos esqueléticos incluem uma variedade de fibras classificadas como de tipo lento ou rápido, compostos por proteínas miofibrilares múltiplas e complexas. Schiaffino e Reggiani (1996) demonstraram que as principais proteínas responsáveis pelos diferentes tipos de fibras são as isoformas de miosina de cadeias pesadas. Os tipos de fibras parecem ter atividades de ATPase diferentes que podem interferir nos parâmetros de qualidade da carne durante a conversão do músculo em carne. Ouali (1992) sugeriu que as miofibrilas podem ser fatores limitantes no processo de desenvolvimento da textura da carne. Posteriormente, pesquisadores correlacionaram os tipos e dimensões das fibras musculares a aspectos de qualidade da carne em suínos (Chang *et al.*, 2003; Ryu e Kim, 2005) e carne de gado (Crouse *et al.*, 1991; Ozawa *et al.*, 2000; Maltin *et al.*, 2003). Há quatro sítios de captação de cálcio na TnC em músculos rápidos, e três sítios de ligação de cálcio em músculos lentos. Na presença de teores baixos de cálcio, a formação de ligações cruzadas é inibida pelo complexo troponina-tropomiosina. Um aumento no teor de cálcio após estímulo dos músculos resulta na ligação de cálcio na TnC e na formação do complexo de actimiosina. O acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático é obtido contra um gradiente de concentração e requer um sistema de bombeamento de transporte ativo que envolve a ATP. Este é hidrolisado pela ATPase presente nas membranas do retículo sarcoplasmático (de Meis e Vianna, 1979).

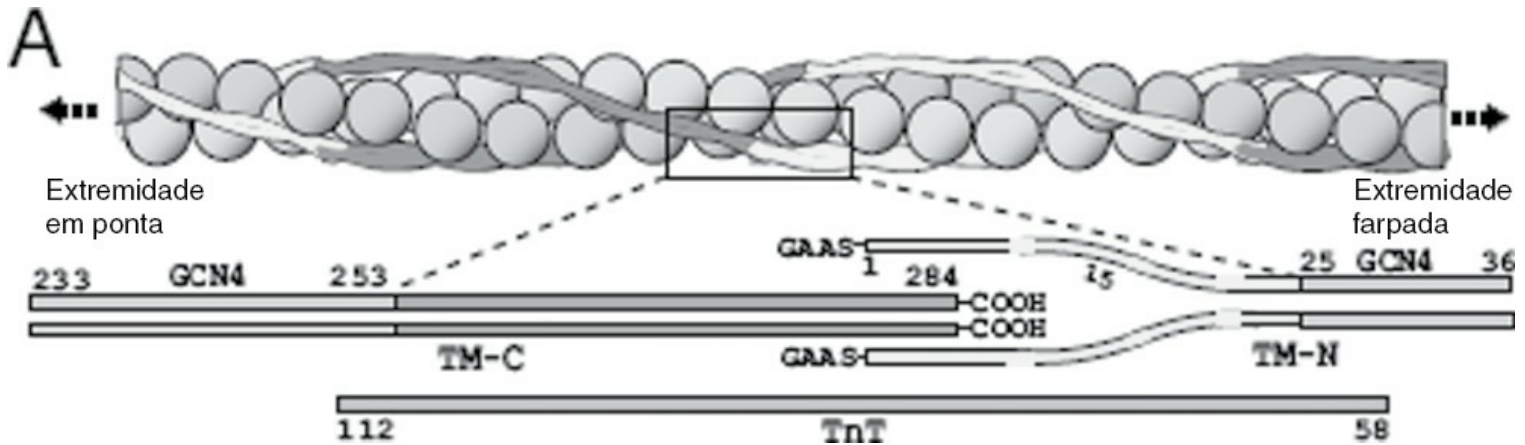


FIGURA 3.8 Vista geral da estrutura de cristal de tropomiosina N (TM-N) e tropomiosina C (TM-C) sobrepostas na junção terminal. A representação esquemática dos construtos usou (O-actina). O C-terminal (TM-C) (resíduos 254-284, precedidos de 20 fragmentos do zíper de leucina GCN4 para estabilizar a dimerização) e N-terminal (TM-N) (resíduos 1-24, seguidos por 12 fragmentos residuais do zíper de leucina, e precedido por N-terminal extensão-GlyAlaAlaSer). Murakami *et al.* (2008).

B. Mecanismo de ação da tropomiosina

Extensos estudos, utilizando micrografos de elétrons de um subfragmento de miosina (S-1), sugerem que a tropomiosina regula as contrações dos músculos ao bloquear ou desbloquear estericamente os locais de interação da miosina nos filamentos dos músculos finos (Haselgrove, 1972; Huxley, 1972b; Parry e Squire, 1973). Essa teoria foi questionada por Seymour e O'Brien (1980), cuja vertente é a de que a tropomiosina localiza-se no lado oposto do eixo hélico dos filamentos finos dos sítios de ligação da miosina S-1 (Moore *et al.*, 1970). Outras pesquisas, realizadas por Taylor e Amos (1981), com base nas reconstruções de imagens tridimensionais feitas nos micrografos de elétrons, dos filamentos finos que apresentam miosina S-1, sugerem que a localização dos sítios de ligação proposta por Moore *et al.* (1970) é incorreta. Taylor e Amos (1981) demonstraram com clareza que a tropomiosina fica localizada no mesmo lado da hélice de actina. Pesquisa posterior, realizada por Mendelson (1982), com reconstruções de dispersão de raios X de alta resolução, do filamento de miosina S-1, confirmou o modelo de ligação da miosina S-1 à actina apresentado por Taylor e Amos (1981). Portanto, a regulação da

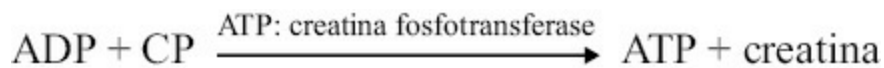
contração muscular parece ocorrer através de bloqueio estérico da interação da actina S-1 e miosina. Amos *et al.* (1982) apresentaram evidências estruturais de que a cabeça da miosina S-1 interage em dois sítios na actina-F. Pensava-se que a tropomiosina em estado ativo ocupava um lugar próximo da metade do sulco da actina, enquanto em estado inibido permanecia do outro lado do sulco, onde podia fazer interface com interações entre S-1 e actina no primeiro ou no segundo sítio. Com base nas reconstruções tridimensionais das imagens, Taylor e Amos (1981) e Amos *et al.* (1982) sugeriram um formato globular, enquanto pesquisas de Garrigos e colegas (1992) defendem um modelo anisométrico, de acordo com outros pesquisadores (Milligan e Flicker, 1987; Karijama, 1988). Para mais detalhes sobre os mecanismos estruturais da dissociação induzida por ATP entre a miosina no rigor e a actina, recomendamos o artigo de Kuhner e Fischer (2011).

As tropomiosinas (TPM) estão presentes em grande número (> 20) de isoformas codificadas por quatro genes: TPM1(α -TM, α -TM_{rápido}), TPM2(β -TM), TPM3(α -TM, α -TM_{lento}), e TPM4 (Perry, 2001). As três principais isoformas expressas em músculos esqueléticos são TPM1, TPM2, e TPM3. Oe *et al.* (2007) determinaram as sequências de cDNA nas isoformas de TPM dos músculos esqueléticos de vacas Holstein. Com base na sequência de aminoácidos de eletroforese bidimensional em gel, identificaram três isoformas de TPM expressas em cinco músculos esqueléticos bovinos fisiologicamente diferentes (masseter, diafragma, *psoas major*, *longissimus thoracicus* e *semitendinosus*). As três isoformas identificadas – TPM1, TPM2 e TPM3 – possuíam 93,3%, 99,6% e 100% de homologia dos aminoácidos da sequência da espécie humana, respectivamente. A TPM2 era responsável por cerca de 50% do TPM de todos os músculos examinados. A presença do TPM2 e TPM3, no entanto, depende de o músculo ser do tipo rápido ou lento. A sequência de maior homologia entre a TPM1 e a TPM3 sugere que a razão de tais TPM pode ser fator determinante das propriedades contráteis dos músculos esqueléticos.

A base estrutural para a ativação da troponina e da tropomiosina dos músculos foi relatada recentemente por Lehman *et al.* (2009), no qual a troponina parece estar envolvida tanto na ativação quanto na inibição da contração dos músculos. Mudanças estruturais importantes na troponina resultaram em efeitos estéricos significativos que controlam a ativação da ATPase da miosina pela actina e sua subsequente contração.

C. ATP e a reação de Lohmann

Ao cessar o estímulo, os íons de cálcio são removidos por um “fator de relaxamento” com o retículo sarcoplasmático atuando como uma bomba de cálcio (Newbold, 1966). Enquanto a fonte principal de ATP para o músculo deriva da ADP através da respiração aeróbica, ele também pode ser ressintetizado a partir do ADP e do fosfato de creatina (CP) pela reação de Lohmann:



ATP: creatina fosfotransferase e creatina fosfato são encontradas, ambas, no sarcoplasma. Esta reação é importante em condições que conduzem à fadiga muscular e representa uma via imediata para a ressíntese do ATP. A atividade muscular, em consequência, pode continuar até quantidades adequadas de ATP serem geradas pela degradação de carboidratos.

D. Contração muscular em peixes

Há dois tipos de músculos nos peixes, vermelho e branco, nos quais as contrações do rigor são diferentes. Enquanto as proporções dos dois tipos de músculos variam entre as espécies, os músculos vermelhos nunca ultrapassam 10% do total de músculos de qualquer espécie, como o atum. O conteúdo dos músculos escuros e claros de 16 espécies foi medido por Obatake e Heya (1985), usando um método gravimétrico direto em peixes

cozidos. Com exceção do lúcio tipo saury, o músculo escuro de todas as outras espécies nunca excederam 10%. A razão do músculo escuro para o músculo total para mais de 12% das espécies de peixes, cuja carne é conhecida como vermelha (por exemplo, sardinhas, lúcio tipo saury, arenque “frigate” e arenque “redondo”), quando comparados a espécies de carne “branca”, possui menos de 3% (sargo amarelo do mar e “silago”). Os músculos escuros ou vermelhos são caracterizados por possuir alto teor de mioglobina assim como proteínas distintas (Hamoir e Konosu, 1965). Obatake *et al.* (1985) observaram que peixes de músculos escuros possuem teores mais altos de nitrogênio, além de creatina, se comparados com músculos brancos.

A contração do rigor é muito maior em peixes de músculos vermelhos se comparados com músculos brancos (Figura 3.9) e corresponde com maior similaridade ao músculo de mamíferos (Buttkus, 1963). O papel da contração, tensão e elasticidade associado ao desenvolvimento do *rigor mortis* nos músculos de peixes *post mortem* ainda não foi bem esclarecido. Bate-Smith e Bendall (1956), ao pesquisar músculos de coelhos, observaram um encurtamento considerável no período de rigor não concomitante com o enrijecimento, e que acontece raramente em temperatura ambiente.

Ao contrário, a extensão do músculo vermelho do bacalhau ling e da truta, com quase sempre contração *post mortem* a 20°C, é explicada pela condição do peixe antes do abate (Buttkus, 1963). Os músculos brancos costumam ser considerados a parte nutritiva do peixe e, em consequência, a maioria das pesquisas se restringe a tal tipo de tecido. A importância do músculo vermelho nas alterações *post mortem* dos peixes, porém, não pode ser ignorada, uma vez que, até hoje, não há mecanismos capazes de separar os dois tipos de músculos na indústria de processamento de peixes.

Trucco *et al.* (1982) relataram que a avaliação visual e a tátil do enrijecimento do peixe nas fases de pré-rigor, rigor total e pós-rigor, propostas primeiro por Cutting (1939), ainda é o método mais fácil de ser reproduzido. Seus resultados, mostrados na Figura 3.10, indicam que para o sargo do mar (*Sparus pagnes*) eram necessárias 10 horas para o *rigor mortis* desenvolver-se, e aproximadamente 30 horas para sua resolução, enquanto que no caso de anchovas são necessárias 55 horas. No entanto, a resolução do processo de *rigor mortis* não fica aparente antes de 80 horas. O desenvolvimento do complexo de actomiosina durante o *rigor mortis* foi monitorado pela redução da viscosidade do extrato de músculo com alta resistência (Crupkin *et al.*, 1979). Assim, o desenvolvimento do *rigor mortis* pode ser avaliado através da medição da viscosidade do extrato (Figura 3.11).

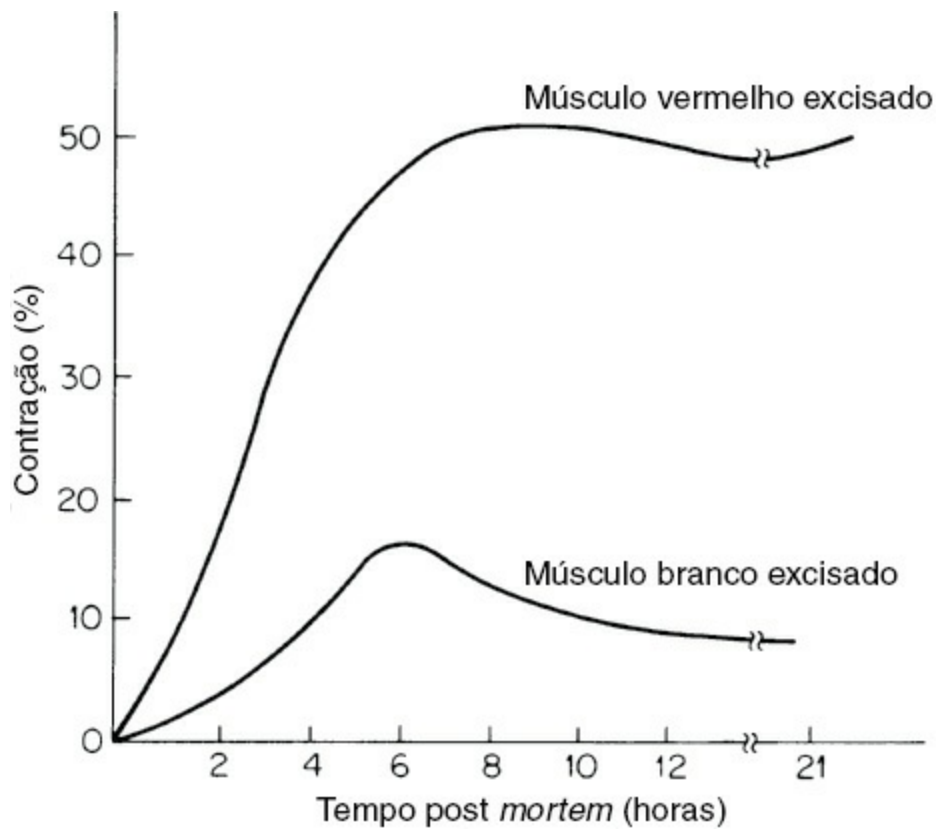


FIGURA 3.9 Contração do rigor de músculo vermelho e músculo branco de bacalhau ling a 20°C. Buttkus (1963).

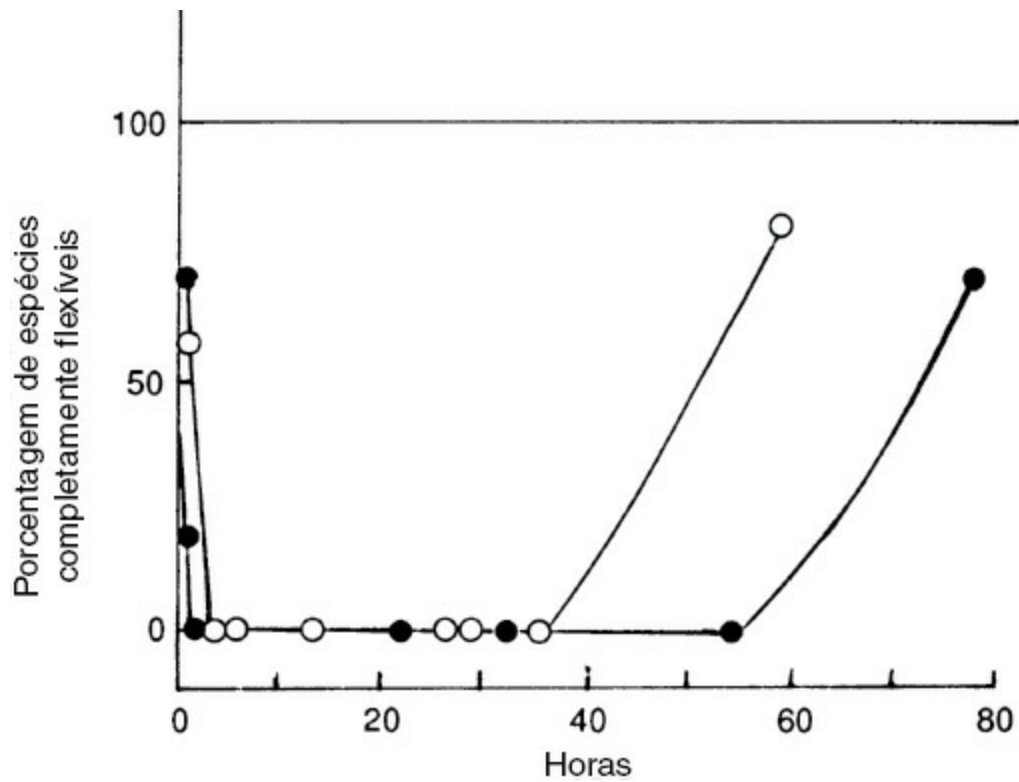


FIGURA 3.10 Evolução do rigor mortis no pargo (O) e na anchova (•). Trucco *et al.* (1982) © Elsevier.

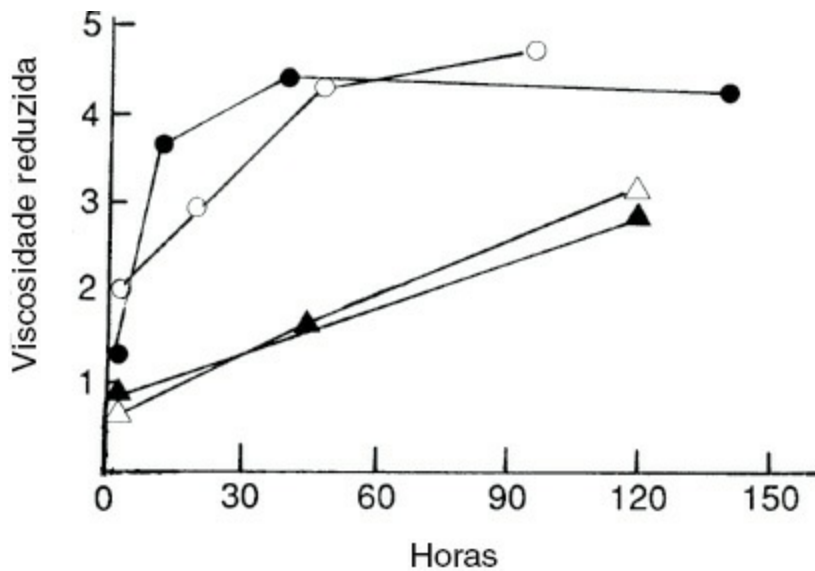


FIGURA 3.11 Viscosidade reduzida do extrato de músculo com alta resistência durante o desenvolvimento do *rigor mortis* em merluza (○), bacalhau da Patagônia (●), pescada (◊), e granadeiro (△). Trucco *et al.* (1982) © Elsevier.

Bitto *et al.* (1983) desenvolveram o índice de enrijecimento/rigor para determinar o estágio do rigor mortis em peixes. A metade superior do peixe inteiro foi colocada de lado sobre uma mesa horizontal, e a parte inferior foi mantida pendurada, fora da superfície da mesa. A distância vertical (L) entre a base da nadadeira da cauda e a superfície da mesa foi medida a determinados intervalos, com o índice de rigor calculado como segue:

$$\text{Índice de rigor (\%)} = [L_0 - L] / L_0 \times 100\%$$

em que L_0 é o valor medido imediatamente após o abate e os valores L foram registrados em intervalos de tempo após a morte.

Com a utilização do índice de rigor, Wang *et al.* (1998) examinaram o *rigor mortis* e a degradação do ATP em salmões do Atlântico (*Salmo salar*), criados em cativeiro. Os dados obtidos seguiram um padrão similar àquele observado por Crupkin *et al.* (1979) para o sargo-do-mar, empregando a viscosidade como índice de rigor. Wang *et al.* (1998) demonstraram que o *rigor mortis* tem início 8 horas após o abate e alcança o ápice entre 24 e 30 horas (Figura 3.12). A resolução completa do *rigor mortis* em salmões do Atlântico ocorreu entre 60 e 70 horas. As diferentes etapas de rigor dos peixes podem ser classificadas como: nenhum enrijecimento durante o pré-rigor (índice de rigor < 10%), totalmente enrijecido em *rigor mortis* (índice de rigor < 100%), e pós-rigor (índice de rigor < 10%). O conteúdo de ATP no músculo do salmão do Atlântico diminuiu de 7,25 $\mu\text{mol/g}$ para 0,14 $\mu\text{mol/g}$ no *rigor mortis*, fato consistente com a diminuição do ATP para menos de 1 $\mu\text{mol/g}$, conforme relataram Iwamoto *et al.* (1987), em linguado americano, quando o índice de *rigor mortis* de 100% tinha sido alcançado. O valor K (veja a seção IV.B, a seguir) em salmões do Atlântico também aumentou, nas várias etapas, de 0,7% a 10,6% e 41,1% nos estágios de pré-rigor, rigor e pós-rigor. Estes valores estão dentro dos limites de variação relatados por Erikson *et al.* (1997) em salmões do Atlântico não estressados, de cativeiro.

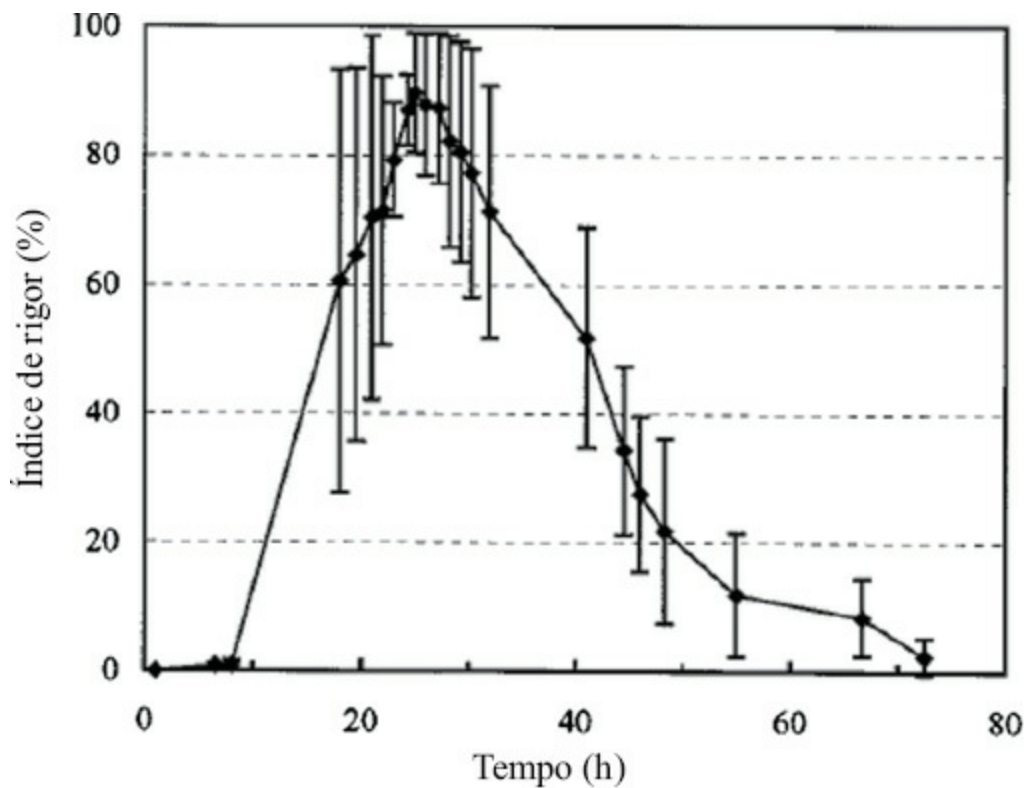


FIGURA 3.12 Histórico de índice de rigor de salmões do Atlântico armazenados a 0°C. A curva mostra o significado de quatro testes replicados e as barras de erro exibem o desvio-padrão. Wang *et al.* (1998).

IV. CONVERSÃO DOS MÚSCULOS PARA CARNES E PEIXES COMESTÍVEIS

Uma grande gama de reações bioquímicas e físico-químicas ocorre após o abate do animal ou do peixe até o consumo como carne ou peixe comestível. Esse período pode ser dividido em três fases diferentes:

1. Estado de pré-rigor, quando o tecido do músculo é mole e maleável. Esta fase é caracterizada, em termos bioquímicos, por diminuição dos teores de ATP e de creatinina fosfato, além de declínio da glicólise ativa. A glicólise no *post mortem* resulta na conversão do glicogênio em ácido lático, causando um declínio do pH. A extensão da variação do pH difere entre as espécies e também entre músculos diferentes. No entanto, entre animais bem alimentados e descansados, as reservas de glicogênio são grandes de modo que no *post mortem* a carne produzida apresenta pH mais baixo do que a carne de animais que estão exaustos na hora do abate.
2. O desenvolvimento da condição de contração e enrijecimento dos músculos no *rigor mortis* ocorre à medida que o pH declina e é associado à formação de actomiosina. A perda de extensibilidade associada à formação de actomiosina ocorre, no início, de forma lenta (período de retardamento), para, depois, se desenvolver com rapidez (fase rápida). O início do *rigor mortis* ocorre normalmente entre 1 e 12 horas após o abate e pode durar por mais 15 a 20 horas em mamíferos, em função de vários fatores que serão discutidos posteriormente. Em geral, os peixes apresentam um período menor de *rigor mortis*, iniciado de 1 a 7 horas após a morte e vários fatores afetam a duração.
3. No estado de pós-rigor os músculos da carne e dos peixes ficam, gradualmente, mais macios e se tornam organolepticamente aceitáveis à medida que o envelhecimento progride. A carne de mamíferos atinge, em geral, um estado considerado ótimo depois de estocada por duas a três semanas a 2°C após a resolução do rigor.

A importância do *rigor mortis* em peixes é conhecida pela indústria, uma vez que, além de retardar o dano decorrente da contaminação microbiana também causa rigidez nos peixes, em geral reconhecida pelos consumidores como sinal de boa qualidade. O período do rigor, porém, pode representar uma desvantagem quando se trata de preparar filés de peixes, por ficarem demasiadamente enrijecidos. O preparo dos filés, portanto, é feito após a dissolução do rigor ou ainda nas traineiras, imediatamente após o abate.

As principais alterações que ocorrem após a morte estão resumidas na Figura 3.13. Após a morte do animal ou peixe, a circulação do sangue cessa, o que resulta em uma série complexa de alterações no tecido muscular. O

sangue, que é um meio ideal para o crescimento de micro-organismos, é retirado, tanto quanto possível, da carcaça do animal, para garantir a segurança alimentar e manter a qualidade da carne. Quanto aos peixes, apenas as espécies maiores são sangradas, uma vez que o sangue em animais de sangue quente coagula mais rapidamente. O advento de traineiras mais modernas, com equipamento para processamento de peixes, trouxe novos problemas, em especial à descoloração de filés congelados de peixes do mar. Esta descoloração ocorre durante o pré-rigor de filés de bacalhau processados, e surge da contaminação da superfície pelo sangue do peixe, na forma de meta-hemoglobina (Kelly e Little, 1966). Tal fenômeno pode ser evitado em filés de peixe de percas marítimas (*Sebastes marinus*) e bacalhau (*Gadhus morhua*), durante o pré-rigor, com métodos corretos de sangramento.

O efeito mais imediato da interrupção da circulação do sangue e da remoção do sangue do músculo do tecido muscular é o esgotamento do suprimento de oxigênio para o tecido e o subsequente declínio de seu potencial de oxirredução. Trata-se de um mecanismo resultante da incapacidade de ressíntese do ATP, uma vez que os mecanismos da cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa não funcionam mais.

A. ATP e as mudanças no *post mortem*

A principal fonte de ATP para as fibras musculares fica desativada após a morte do animal ou peixe, pelo fato de o glicogênio não poder ser oxidado, transformando-se, assim, em dióxido de carbono e água. Por sua vez, o metabolismo anaeróbico continua e resulta na conversão de glicogênio em ácido láctico. Em condições aeróbicas normais, 39 moléculas de ATP são produzidas para cada unidade glicosil de glicogênio oxidado, comparada com apenas 3 moléculas de ATP para cada unidade de hexose catabolisada em condições anaeróbicas. O tempo para a primeira fase do desenvolvimento do *rigor mortis* é determinado pelo teor de ATP. O teor de ATP também é diminuído pela atividade de ATPase não contrátil da miosina, que mantém a integridade estrutural e a temperatura da célula muscular (Bendall, 1973). Isto resulta na produção de fosfato inorgânico, que estimula a degradação do glicogênio em ácido láctico. O fosfato inorgânico é essencial para a fosforólise do glicogênio em glicose-1-fosfato pela fosforilase muscular, que é o passo inicial da degradação do glicogênio. Além da ATPase da miosina, o retículo sarcoplasmático possui atividade de ATPase.

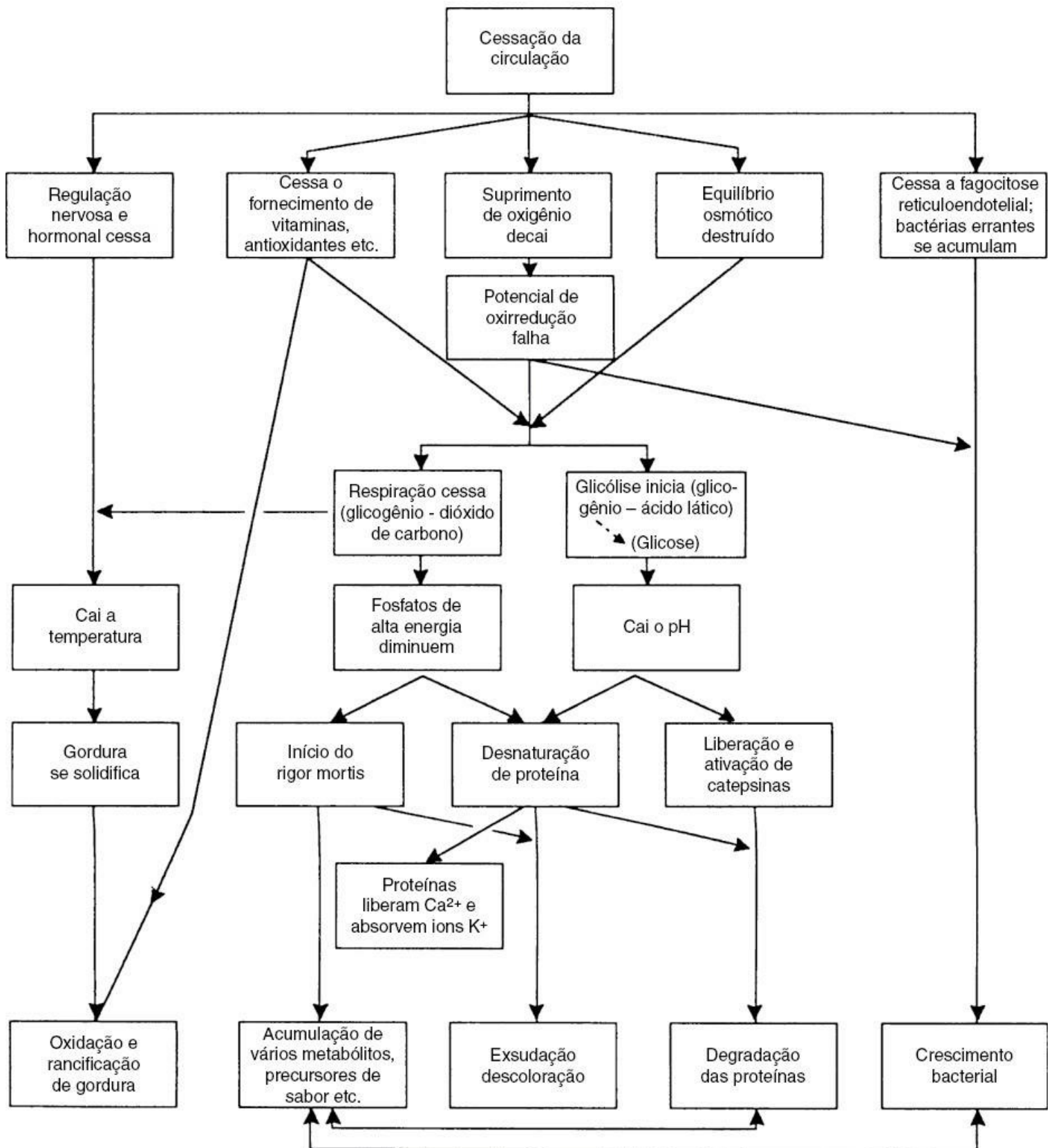


FIGURA 3.13 Conseqüências da cessação de circulação no tecido muscular. Lawrie (1998). Reimpressão autorizada. Copyright © Wood Publishing Ltd.

O teor de ATP é mantido nos músculos após a morte por meio da creatina quinase ativa, que catalisa a ressíntese de ATP a partir de ADP e creatina fosfato (Lawrie, 1966; Newbold, 1966). Assim, no período do início do *post mortem* ou pré-rigor, a concentração de ATP permanece relativamente constante; em seguida, há um rápido declínio nos teores de creatina fosfato. Em estudos com músculos de coelhos descansados e relaxados, os teores de creatina fosfato aumentaram imediatamente após a morte, mas decaíram rapidamente atingindo um terço do teor original antes de qualquer perda detectável de ATP ser observada (Bendall, 1951). Uma queda rápida

nos níveis de creatina fosfato também foi observada nos músculos de aves, acompanhada pela liberação de creatina livre (De Fremery, 1966). O aumento transitório do pH em músculos de frangos imediatamente após a morte foi atribuído à presença de creatina. Pesquisas realizadas por Hamm (1977), em músculo bovino moído, mostraram que o fosfato de creatina foi completamente degradado em 1 a 2 horas após o *post mortem*.

Como já mencionado, o músculo de mamíferos é capaz de manter o teor de ATP por várias horas no *post mortem*, quando comparado com os músculos esqueléticos de peixes, que costumam exibir rápido declínio dos teores de ATP (Tomlinson e Geiger, 1962). Algumas espécies de peixes, contudo, conseguem manter um teor de ATP constante, mas somente quando estão descansados antes do abate. A relação entre os teores de ATP e de creatina fosfato em músculos de mamíferos parece ser similar àquela observada em músculos esqueléticos de peixes (Partmann, 1965).

A atividade contínua das várias ATPases na célula muscular, inclusive as do retículo sarcoplasmático, da mitocôndria, sarcolema e miofibrila, presumivelmente, contribui para o esgotamento do ATP nos músculos. Hamm *et al.* (1973) concluíram que é provável que a ATPase miofibrilar, e não a membrana ou o retículo sarcoplasmático, seja a responsável pela degradação do ATP no músculo esquelético no *post mortem*. Ocorre também um declínio geral no teor de ATP em consequência da atividade da ATPase, uma diminuição da creatina fosfato e a impossibilidade da glicólise de sintetizar o ATP no *post mortem* em ritmo eficiente.

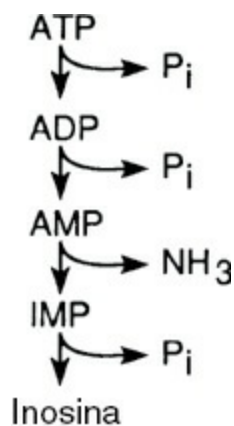
O desenvolvimento do rigor *post mortem* em peixes também está relacionado com a redução do ATP. A diminuição da creatina fosfato, adenosina monofosfato (AMP) e das reservas de glicogênio e a subsequente impossibilidade de ressintetizar moléculas do ATP resultam na formação do complexo de actomiosina, que faz com que o músculo se torne contraído e inextensível. Ao contrário de animais terrestres, o rigor *mortis* em peixes termina muito mais rapidamente. Jones e Murray (1961) observaram que o aparecimento do rigor *mortis* em bacalhau ocorre quando o ATP cai para 5% do teor inicial em peixes descansados. Este fato foi confirmado em vários peixes da Índia, por Nazir e Magar (1963), apesar de algumas espécies entrarem em rigor com teores de fosfato mais altos, como o *Mugil dussumieri* e o *Harporodon nehereus*. Jones *et al.* (1965) pesquisaram o declínio constante do ATP no período *post mortem* do bacalhau até o ponto em que surge o rigor. Os teores de ATP durante o período *post mortem* no músculo do bacalhau, relaxado e não relaxado, foram de 2,35 $\mu\text{mol/g}$ e 0,82 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente, o que demonstrou o efeito do exercício na determinação dos teores de ATP nos quais o rigor se estabelece. Uma redução do tempo necessário para o desenvolvimento do rigor *mortis* também depende do esforço feito pelo peixe durante sua captura, o que foi associado à redução do fosfato de creatina. O desaparecimento do ATP em bacalhau antes do surgimento do rigor nos músculos foi demonstrado por Fraser *et al.* (1961) como sendo de 1,25 $\mu\text{mol/g}$. Iwamoto *et al.* (1987) observaram que no pargo do tipo spike (*Paralichthys olivaceus*), o teor de ATP permanece constante por um tempo curto após a morte, enquanto a creatina fosfato degrada-se antes da hidrólise do ATP. Utilizando o método do índice de rigor desenvolvido por Bito *et al.* (1983), Cappelin e Jessen (2002) monitoraram as alterações no ATP, IMP e glicogênio em 16 músculos de diferentes posições do bacalhau. Quando o peixe foi considerado em rigor, os músculos dorsais e da cauda ainda não estavam em rigor, pois possuíam altos teores de ATP.

B. Metabolismo do ATP no *post mortem*

O desenvolvimento do rigor *mortis* em animais e peixes é consequência direta do declínio do ATP. Bendall e Davey (1957) observaram que a liberação de amônia ocorre quando os músculos voluntários do coelho estavam fatigados ou entravam em rigor. Este processo decorre da deaminação de ácido adenílico para inosina-5'-monofosfato (IMP). Eles postularam haver uma deaminação direta do ADP, na qual a amônia é produzida em proporções equimolares ao desaparecimento dos nucleotídeos de adenosina, principalmente de AMP, durante o desenvolvimento do rigor. Tsai *et al.* (1972) relataram a presença de ATP, ADP e IMP em músculos de suínos em

pré-rigor, assim como quantidades traço de AMP. Os níveis de ATP e de ADP declinaram rapidamente no músculo após a morte, enquanto as concentrações de IMP, inosina e hipoxantina aumentaram de maneira significativa.

Fraser *et al.* (1961) observaram aumento de amônia durante o processo de resolução do rigor nos músculos do bacalhau. A degradação *post mortem* do ATP segue um padrão similar ao dos músculos de mamíferos, nos quais o ATP degrada-se rapidamente para ADP pela ATPase sarcoplasmática e é hidrolisado pela mioquinase em AMP. A AMP, em seguida, é convertida para IMP pela ação da deaminase (Saito e Arai, 1958). Nucleotídeos, em especial IMP, são reconhecidos como fatores que contribuem significativamente para o sabor e a boa qualidade dos peixes (Hashimoto, 1965). O Esquema 3.1 resume a degradação do ATP no *post mortem* em peixes e carnes, no qual o ácido inosínico é desforilizado para inosina.



ESQUEMA 3.1 Degradação de ATP para inosina em carne e peixe.

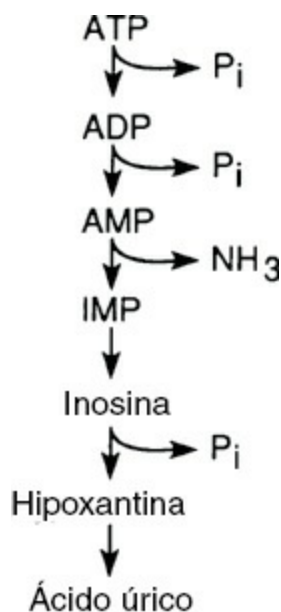
O IMP e a guanosina-5'-monofosfato (GMP) têm sido apontados como compostos que reforçam o sabor da carne e eliminam sabores sulfurosos, gordurosos, queimados, de amido, amargos e hidrolisado de vegetais (Wagner *et al.*, 1963; Kuninaka, 1967). Acentuadores de sabor, como o glutamato de monossódio (MSG), IMP e GMP, são componentes naturais da carne e são vistos como compostos que contribuem para seu sabor (Farmer, 1999). Tem-se confirmado que melhoram o sabor e são usados pelos japoneses há muitos anos para dar o sabor “umami” (Reineccius, 1994; Maga, 1994). Kurtzman e Sjostrom (1964) concluíram que a adição de IMP em sopas de frango enlatadas contendo macarrão não realçou seu sabor. No entanto, outros produtos avaliados, incluindo sopa de carne e macarrão enlatada, tiveram seus sabores reforçados com a adição de IMP.

Em concentrações equimolares, o IMP tem maior efeito no aroma, porém em concentrações como as relatadas na literatura para carne vermelha, ribose, IMP e glicose-6-fosfato há aumento do aroma “de carne” e “assados” (Farmer *et al.*, 1996). Cambero *et al.* (2000) observaram que as propriedades relativas ao sabor em caldos de carne são mais influenciadas pela concentração de IMP do que por concentrações de GMP e de AMP, e que pequenos compostos de nitrogênio não amino-ácidos são mais importantes do que o nitrogênio peptídico com massa molecular maior de 600 Da. Além de sua ação positiva sobre a potencialização do sabor, tem sido demonstrado que o IMP é essencial para o desenvolvimento do gosto de carne durante o cozimento (Batzer *et al.*, 1960; Koehler e Jacobson, 1967). Farmer *et al.* (1996) relataram que, ao aumentar quatro vezes a concentração normalmente utilizada em carne bovina e suína (340 mg/100 g), o IMP teve efeitos importantes na acentuação do aroma “de carne” e de “assado”. Os autores também demonstraram que, em muitos casos, aumentando apenas duas vezes a concentração descrita de IMP, não foi obtido efeito significativo. Mottram e Madruga (1994) observaram um aumento em muitos furanos contendo enxofre, incluindo furanos de 2-metil-3-(metilditio), na adição de IMP em carne em quantidade 10 vezes maior do que a concentração natural. Os autores afirmam que o IMP foi o precursor de 2-metil-3-furantiol e de mercaptocetonas, porém 2-furanmetanetiol não deriva do IMP. O IMP agiria como fonte de tais tióis por meio da reação de Maillard, e esta parece intermediar a formação 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona e dicarbonilas, tais como butanediona e pentanediona, e suas conseqüentes reações com sulfeto de

hidrogênio ou cisteína (Mottram e Madruga, 1994). O IMP também parece suprimir o odor “de verde” que é, provavelmente, causado pelo hexanal, assim como reduzir a formação de *n*-aldeídos e outros produtos da oxidação lipídica (Farmer *et al.*, 1996).

Nucleotídeos e nucleosídeos são precursores em potencial da ribose livre e da ribose fosfato, comumente descritas como componentes nas reações de Maillard durante o processamento e a estocagem da carne (Tarr, 1954; Macy *et al.*, 1964). Durante o processamento térmico de alimentos derivados da carne, a IMP degrada-se em inosina e hipoxantina, que foram descritas como sem sabor ou amargas (Arya e Parhar, 1979).

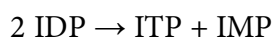
Macy *et al.* (1970) observaram que a concentração de IMP diminui ao passo que os nucleosídeos livres e bases aumentam, quando carne de cordeiro e de porco são assadas. Piskarev *et al.* (1972) relataram que tanto o AMP quanto o IMP aumentam durante a esterilização térmica de carne recém-abatida, mas diminuem em carne abatida há mais tempo. Suryanarayana-Rao *et al.* (1969) observaram que o IMP, a inosina e a hipoxantina diminuem em camarões que são enlatados, embora Hughes e Jones (1966) e Mori *et al.* (1974) tenham relatado que a hipoxantina é estável em temperaturas de enlatamento. Aliani e Farmer (2005a; 2005b) relataram que o IMP é, geralmente, o nucleotídeo mais abundante em músculos de frangos comercializados e possuem quantidades médias de IMP nos músculos peitorais e de coxas, iguais a 83,7 mg e 44,6 mg/100 g, respectivamente. A inosina, um dos produtos da hidrólise enzimática do IMP, foi o segundo maior componente (36,2 mg e 28,5 mg/100 g em músculos peitorais e coxas de aves, respectivamente), enquanto o GMP e a hipoxantina foram detectados em concentrações mais baixas. O AMP foi a substância com menor quantidade na maioria dos frangos analisados nessa pesquisa.



ESQUEMA 3.2 Degradação de ATP em músculos de peixes.

As reações bioquímicas presentes na formação desses nucleotídeos, nucleosídeos e bases na carne têm sido estudadas há várias décadas.

Pesquisas iniciais de Bendall e Davey (1957) demonstraram que tais reações na carne são catalisadas pela ATPase, mioquinase e deaminase a 37°C e 17°C. Além do mais, as reações demonstradas no Esquema 3.1, a presença de ITP e de IDP foram descritas e atribuídas as seguintes reações:



Pequenas quantidades de inosina e de hipoxantina, produtos de degradação do IMP, também foram encontradas nos músculos de mamíferos no pós-rigor. A conversão de ATP para IMP se deu enquanto o pH final era alcançado, ao passo que a degradação do IMP ocorreu depois do estabelecimento do pH final (Lawrie, 1966).

A degradação do ATP em músculos de peixes também leva à formação de IMP, que é, em seguida, hidrolisado em ácido úrico (Saito *et al.*, 1959; Kassemarn *et al.*, 1963; Tarr, 1966) (Esquema 3.2). A presença de atividade de 5'-nucleotidase foi relatada em músculos de carpa por Tomioka e Endo (1984; 1985).

O teor destes nucleotídeos muda drasticamente após a morte do peixe. Muitas estimativas sobre o frescor dos peixes foram feitas com base no teor de nucleotídeos (Saito *et al.*, 1959), amônia (Ota e Nakamura, 1952), aminas (Karube *et al.*, 1980) e ácidos voláteis (Suzuki, 1953). Entre eles, a produção de nucleotídeos a partir do ATP parece ser o indicador de frescor mais confiável em peixes. Enquanto a inosina é comparativamente sem sabor, sua conversão à hipoxantina faz surgir um gosto amargo (Jones, 1965). Relatórios conflitantes negando esse fato surgiram, realizados por diversos pesquisadores japoneses, incluindo Hashimoto (1965), que sugerem que a hipoxantina não tem sabor. A presença de hipoxantina em músculos de peixes foi sugerida como índice químico de frescor e qualidade do peixe (Jones *et al.*, 1964; Spinelli *et al.*, 1964). Dugal (1967) sugeriu que uma taxa média de formação de hipoxantina pode ser obtida para grupos de peixes, o que refletiria o grau de frescor de uma espécie específica de peixes de água doce. Watanabe *et al.* (1984) estimaram o frescor dos peixes monitorando o teor de IMP por intermédio de um sensor de enzimas. Karube *et al.* (1984) desenvolveram um sistema de sensores de enzimas multifuncional para avaliar o frescor dos peixes baseado na mensuração dos teores de IMP, inosina e hipoxantina. O sistema tem como base as alterações observadas nos níveis de ATP, ADP e AMP em percas do mar, "saurel", cavala e "yellowfish" após a morte. A Figura 3.14 ilustra ter havido rápido declínio e redução nos níveis de ATP e ADP 24 horas após a morte, assim como diminuição do ADP para menos de 1 $\mu\text{mol/g}$.

O IMP aumentou drasticamente durante as primeiras 24 horas após a morte e, em seguida, diminuiu gradualmente, fato acompanhado por um aumento na inosina e na hipoxantina. Essas alterações variam entre as espécies de peixes. Desde que o ATP, ADP e AMP ainda estavam presentes em algumas das variedades de peixes até após duas semanas da morte, eles incluíram nucleotídeos com hipoxantina, inosina e IMP na equação geral que define o frescor dos peixes.

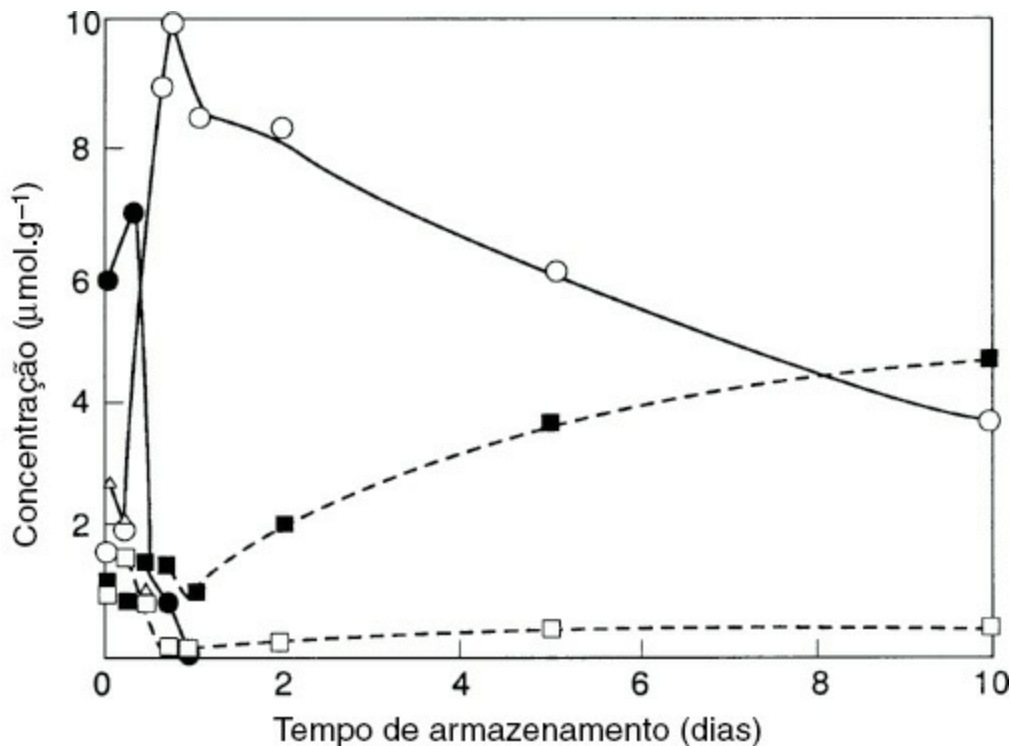


FIGURA 3.14 Progressão da decomposição da ATP e reações associadas em robalo. •: ATP; Δ: ADP; □: AMP; ○: IMP; ■: HxR + Hx. Reimpresso com permissão de Karube *et al.*, 1984. Copyright © by the American Chemical Society.

Saito *et al.* (1959) foram os primeiros a propor os valores "K" como indicadores do frescor em peixes, definidos como a razão de inosina mais hipoxantina em relação à quantidade total de substâncias relacionadas com o ATP. O valor K tem sido usado desde então para expressar o frescor de produtos marinhos (Lee *et al.*, 1982;

Uchiyama e Kakuda, 1984). Ryder (1985) desenvolveu um método rápido para calcular os valores K baseado na determinação quantitativa do ATP e seus produtos de degradação, utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE). Surette *et al.* (1988) monitoraram a concentração dos compostos de degradação do ATP em bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e relataram que a hidrólise da inosina e a formação da hipoxantina eram oriundas de atividades autolítica e enzimática bacteriana. Tais catabólitos de nucleotídeos fornecem um índice da qualidade muito útil, pois suas presenças são afetadas por bactérias deteriorativas, assim como por danos mecânicos ocorridos durante a manipulação. Os pesquisadores sugeriram que um kit de diagnóstico para a determinação de catabólitos, por exemplo, monofosfato de inosina (IMP), inosina (INO) e hipoxantina (Hx), poderia ser útil para avaliar o frescor e a qualidade do bacalhau.

$$K = \frac{[\text{Inosina}] + [\text{Hipoxantina}] \times 100}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + \text{inosina} + \text{hipoxantina}}$$

Os valores G e P derivaram dos valores de K . Burns *et al.* (1985) que definiram o valor G como um índice para avaliar o período de conservação de peixes magros armazenados no gelo, enquanto um segundo indicador de qualidade, o P , foi acrescentado para servir como um indicador da deterioração durante as primeiras fases do armazenamento congelado.

$$P = \frac{\text{Inosina} + \text{Hipoxantina}}{[\text{AMP}] + [\text{IMP}] + \text{inosina} + [\text{Hipoxantina}]}$$

A escolha de um tipo de indicador sobre o outro depende de padrões de degradação dos metabólitos (Shahidi *et al.*, 1994). A aplicabilidade do valor K para avaliar o frescor de carne comestível foi relatada por Nakatani *et al.* (1986). Ao monitorar as alterações de produtos de carne congelada de boi e de coelhos mediante a degradação de ATP, esses pesquisadores propuseram um novo índice, o K_p , no qual a adenosina é representada por AD e xantina por X:

$$\frac{\text{Inosina} + \text{hipoxantina} + \text{xantina} \times 100}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{AD} + \text{INO} + \text{Hx} + \text{X}}$$

Estudos posteriores realizados por Fujita *et al.* (1988) propuseram a utilização desse índice para a avaliação de carne suína e de aves.

A maioria das pesquisas sobre o mecanismo de degradação do ATP através da análise dos produtos finais não menciona as concentrações de ribose e/ou de fosfato-1-ribose (R1P), que podem ser geradas em consequência de hidrólise da inosina formando hipoxantina e ribose 5-fosfato (R5P), que pode ser um produto de hidrólise direta do IMP produzindo hipoxantina (Lee e Newbold, 1963). Estas reações potenciais de hidrólise do IMP estão representadas na Figura 3.15. Já foi sugerido que, em carne bovina, açúcares podem contribuir para o gosto e aromas doces durante aquecimento (MacLeod, 1994).

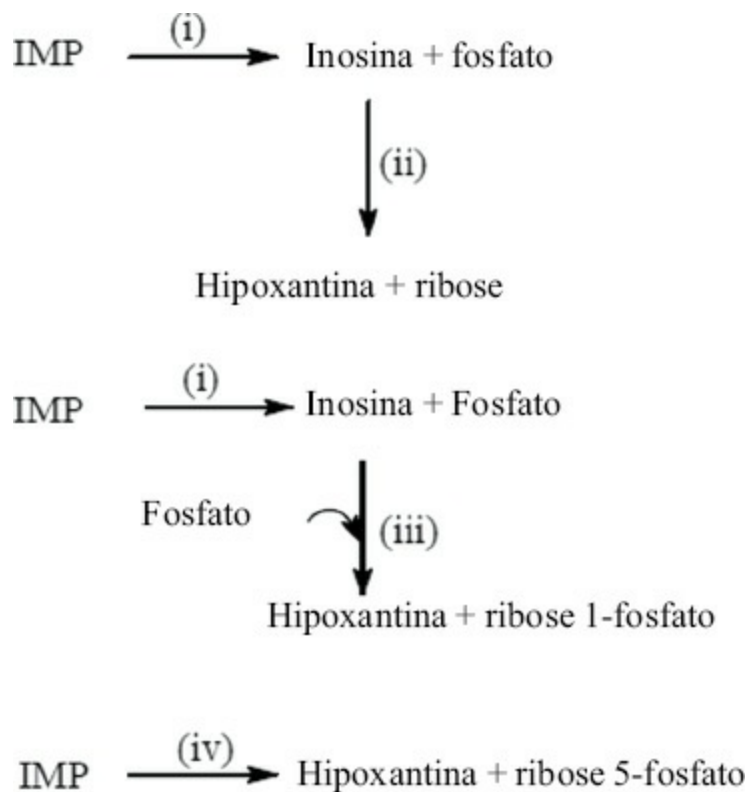


FIGURA 3.15 Degradação do IMP por três caminhos possíveis. Adaptado de Lee e Newbold (1963).

A falta de informação sobre as concentrações naturais dos açúcares na carne pode ser explicada pelo fato de que a maioria dos métodos analíticos utilizados nos últimos anos é adequada para nucleotídeos, não para açúcares. Para tentar superar esse problema, um método de derivação pós-coluna foi utilizado (Aliani e Farmer, 2002) para determinar o açúcar e açúcares fosfatos em peito de frangos (24,7 mg) e coxas (14,1 mg/100 g) de produtos obtidos em cinco fornecedores comerciais diferentes. Foi demonstrado que ribose e R5P são importantes para o desenvolvimento do aroma em sistemas aquecidos e também para as reações de escurecimento desejável da carne. A adição de pequenas quantidades de ribose à carne crua também comprovou intensificar a quantidade de componentes de aromas, assim como um sabor mais forte de carne assada depois de ser processada (Farmer *et al.*, 1999). Aliani *et al.* (2005a; 2005b), utilizando estudos sensoriais diferentes, enfatizaram a importância da ribose como precursora de aroma-chave na carne de frango e sugeriram que um aumento de duas a quatro vezes da concentração natural de ribose (25 mg/100 g peso úmido) pode ser suficiente para melhorar significativamente o aroma e o sabor de frango assado em peitos de frango cozidos (Aliani e Farmer, 2005a; 2005b).

Vários açúcares e açúcares fosfatos, como ribose (Aliani e Farmer, 2005b; Mottram e Nobrega, 1998), R5P (Mottram e Nobrega, 1998), glicose, glicose-6-fosfato (G6P) (Farmer *et al.*, 1999), manose e frutose (Aliani e Farmer, 2005b; Madruga *et al.*, 2010), são normalmente encontrados na maioria dos tipos de carne, tais como frangos (Aliani e Farmer, 2005a), carne de vaca (Koutsidis *et al.*, 2008), suínos (Meinert *et al.*, 2009) e cabra (Madruga *et al.*, 2010), e parecem exercer papel importante na formação de aromas (Meinert *et al.*, 2009).

O condicionamento *post mortem* contribuiu para um aumento nas concentrações de ribose e é provável que tenha grande efeito na formação do aroma (Koutsidis *et al.*, 2008). O teor de ribose aumentou muito com o condicionamento da carne do 1º dia ao 21º dia a 4°C no músculo *longissimus lumborum*. A ribose é considerada o açúcar mais lábil ao calor, enquanto a frutose é mais estável (Macy *et al.*, 1964). A ribose, no entanto, apesar de se degradar em temperaturas altas, pode ser formada pela degradação de R5P (Aliani *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a R5P sofre reações de Maillard muito mais rapidamente do que açúcares e açúcares fosfatos similares (Sandwick *et al.*, 2005). Madruga *et al.* (2010) relataram que todos os açúcares presentes na carne de cabra diminuíram durante o cozimento, com a frutose apresentando a maior perda, de 66%. Este fato pode ser atribuído ao envolvimento dos açúcares nas reações de Maillard, que produzem vários produtos de degradação da pentose e

da hexose, as quais contêm grupos de carbonilas que são os principais reagentes para a formação de importantes compostos heterocíclicos, como pirazinas, tiazoles e piridinas nas substâncias voláteis da carne (Madruga *et al.*, 2010). Os odores obtidos a partir das reações dependem dos aminoácidos, contudo a natureza dos açúcares determina a velocidade da reação (Kiely *et al.*, 1960).

C. Nucleotídeos de Adenosina e a desnaturação proteica

Durante o armazenamento congelado, mudanças deteriorativas na textura de peixes foram observadas como consequência da desnaturação das proteínas (Dyer, 1951; Andou *et al.*, 1979; 1980; Acton *et al.*, 1983). O possível efeito dos nucleotídeos de adenosina na desnaturação das proteínas foi investigado recentemente por Jiang *et al.* (1987). Estes pesquisadores avaliaram a desnaturação de proteínas em peixes congelados a -20°C pela extratibilidade da actomiosina (AM) e monitoraram as atividades da Ca-ATPase e Mg(EGTA)-ATPase [EGTA = etilenoglicol *bis*(2-aminoetileter) do ácido tetra-acético] no AM. Durante a estocagem congelada, a massa molecular da cadeia pesada de miosina e de actina diminuíram. Os músculos menos estáveis foram associados aos teores mais baixos de ATP, ADP, AMP e IMP e aos teores mais altos de inosina e de hipoxantina. Uma correlação de $-0,80$ foi obtida entre a inosina e a hipoxantina e a atividade total de Ca-ATPase a AM comparada a $+0,78$ para ATP, ADP, AMP e IMP (Figuras 3.16 e 3.17). Estes resultados apontam para um possível envolvimento de nucleótídeos de adenosina com a desnaturação das proteínas.

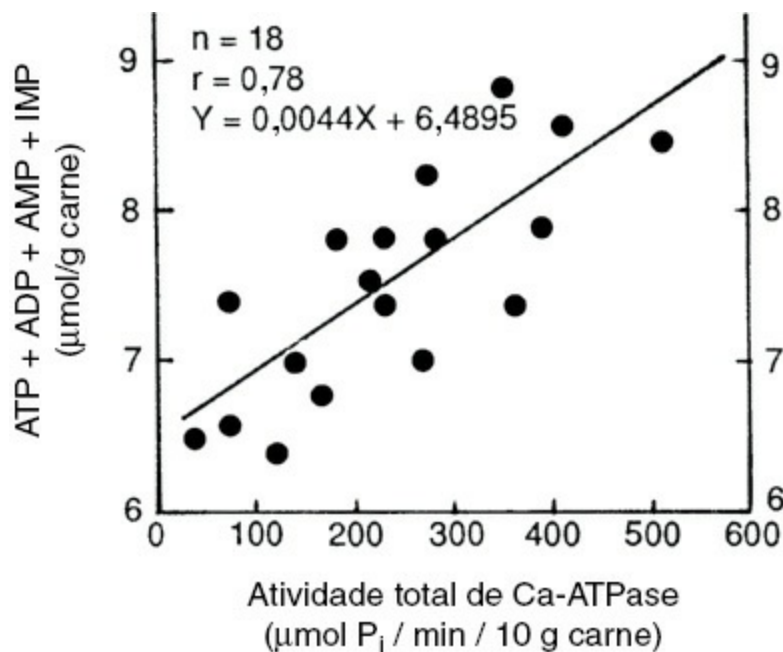


FIGURA 3.16 Relação entre a soma da quantidade de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), e inosina monofosfato (IMP) e atividade total de Ca-ATPase. Reproduzido com permissão de Jiang *et al.* (1987). Copyright © American Chemical Society.

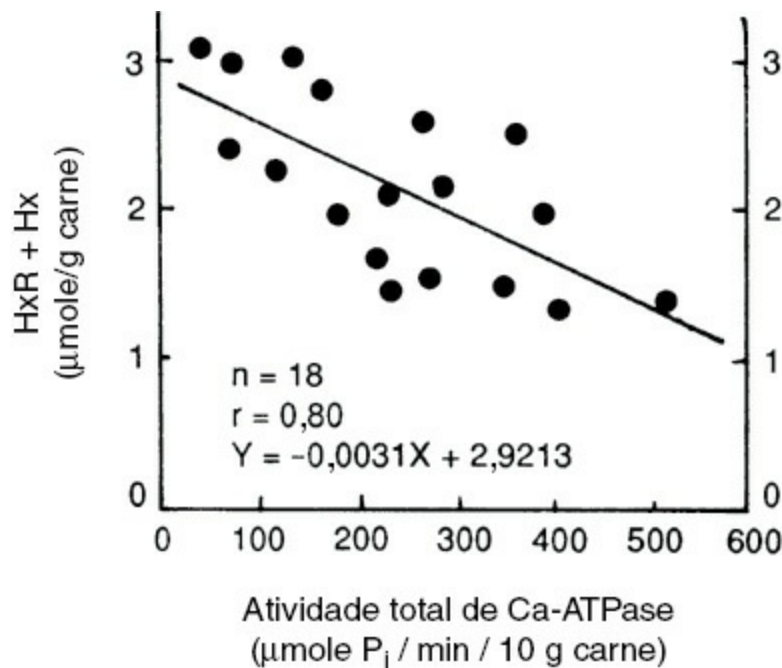


FIGURA 3.17 Relação entre o conteúdo de inosina (HxR) e hipoxantina (Hx) e atividade total de Ca-ATPase. Reproduzido com permissão de Jiang *et al.* (1987). Copyright © American Chemical Society.

Observou-se também que a taxa de hidrólise do ATP é muito mais rápida em músculos com características pálida, macia e exsudativa (PSE) ou escura, firme e seca (DFD), uma vez que possuem teores muito mais baixos de ATP e teores mais altos de IMP, quando comparados a carnes normais (Tsai *et al.*, 1972; Lundstrom *et al.*, 1977; Essen-Gustavson *et al.*, 1991). Um método para a detecção precoce de PSE e DFD em suínos no *post mortem* foi desenvolvido por Honikel e Fischer (1977), utilizando o valor *R* (razão da absorção a 250 e 200 nm). Batlle *et al.* (2000) detectaram PSE em músculos *longissimus dorsi* de carne suína, ao medir os compostos derivados do ATP duas horas após o *post mortem*. As carnes PSE tinham teores significativamente mais baixos de ATP ($p < 0,05$), contudo mais altos de AMP, IMP e hipoxantina, se comparadas com a carne normal. A medição de valores K_o , valores R' e as razões de IMP/ATP comprovou que todas são indicadores úteis do PSE.

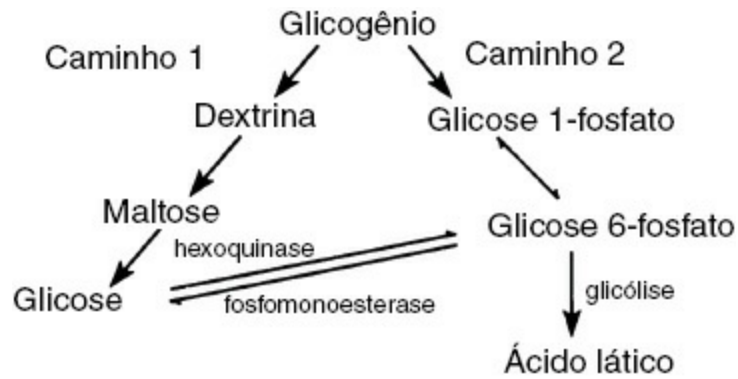
D. Glicólise no *post mortem*

Depois do suprimento de oxigênio para o tecido muscular ter sido esgotado, o glicogênio – principal carboidrato dos músculos de animais e peixes – sofre glicólise anaeróbica e forma ácido láctico. Quando comparado com músculos de mamíferos, o teor de glicogênio em músculos de peixes é muito mais baixo. Tomlinson e Geiger (1962), no entanto, encontraram grande similaridade entre os teores de glicogênio em várias espécies de peixes e animais de sangue quente, fato atribuído à excessiva agitação que normalmente ocorre durante a captura de peixes, o que resulta em uma diminuição do nível de glicogênio, quando comparado a peixes descansados.

Foi sugerido que existem duas vias possíveis envolvidas na degradação de glicogênio nos músculos dos peixes *post mortem*: a via hidrolítica ou amilolítica e a fosforolítica. Elas estão ilustradas no Esquema 3.3.

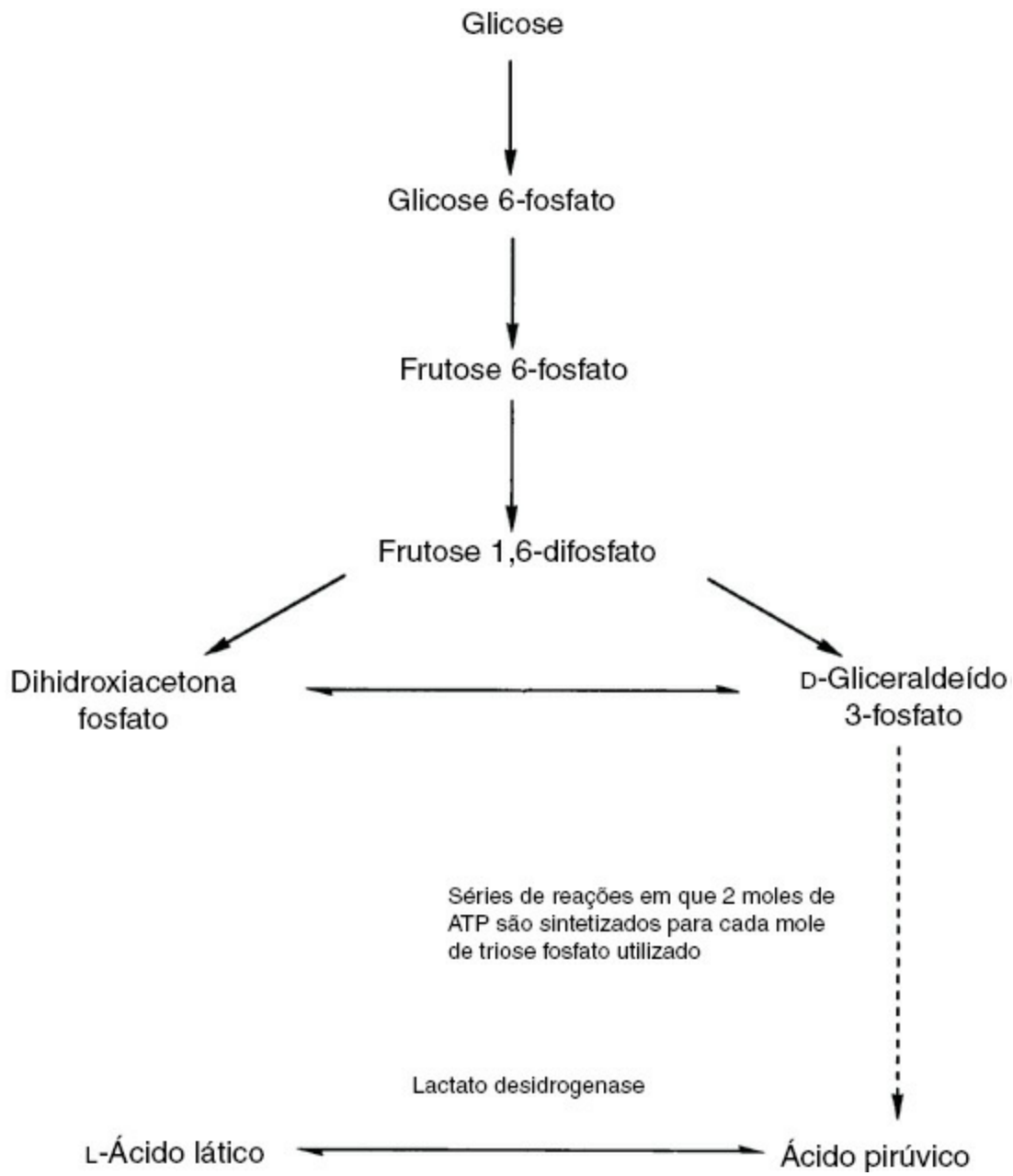
A conversão *post mortem* da glicose-6-fosfato para glicose por fosfomonoesterase ocorre somente até pequena extensão em músculo de peixe. Consequentemente a via hidrolítica, parece ser a mais importante em peixes. Esta via foi postulada pela primeira vez por Ghanekar *et al.* (1956) e, em seguida, foi confirmada como a principal via de degradação do glicogênio em glicose na maioria dos peixes (Tarr, 1965; Burt, 1966; Nagayama, 1966). Nos músculos de mamíferos, porém, é a via fosforolítica a responsável pela degradação do glicogênio. Quando há estresse, a degradação do glicogênio é acelerada pela liberação de catecolaminas dos neurônios simpáticos e da medula adrenal através da ativação do glicogênio fosforilase. Quando ativada, a fosforilase remove rapidamente as

unidades de glicose-1-P das moléculas de glicogênio (Poso e Puolanne, 2005).



ESQUEMA 3.3 Degradação de glicogênio *post mortem*.

Independentemente de qual via está envolvida na hidrólise inicial do glicogênio, a sequência final da glicólise é a mesma nos músculos dos animais e dos peixes. As enzimas responsáveis foram, em sua maioria, caracterizadas e identificadas nos músculos de mamíferos e muitas foram observadas em várias espécies de peixes, incluindo a truta arco-íris (MacLeod *et al.*, 1963; Tarr, 1968). As reações gerais envolvidas na via glicolítica podem ser ilustradas no Esquema 3.4.



ESQUEMA 3.4 Metabolismo de glicose em ácido láctico.

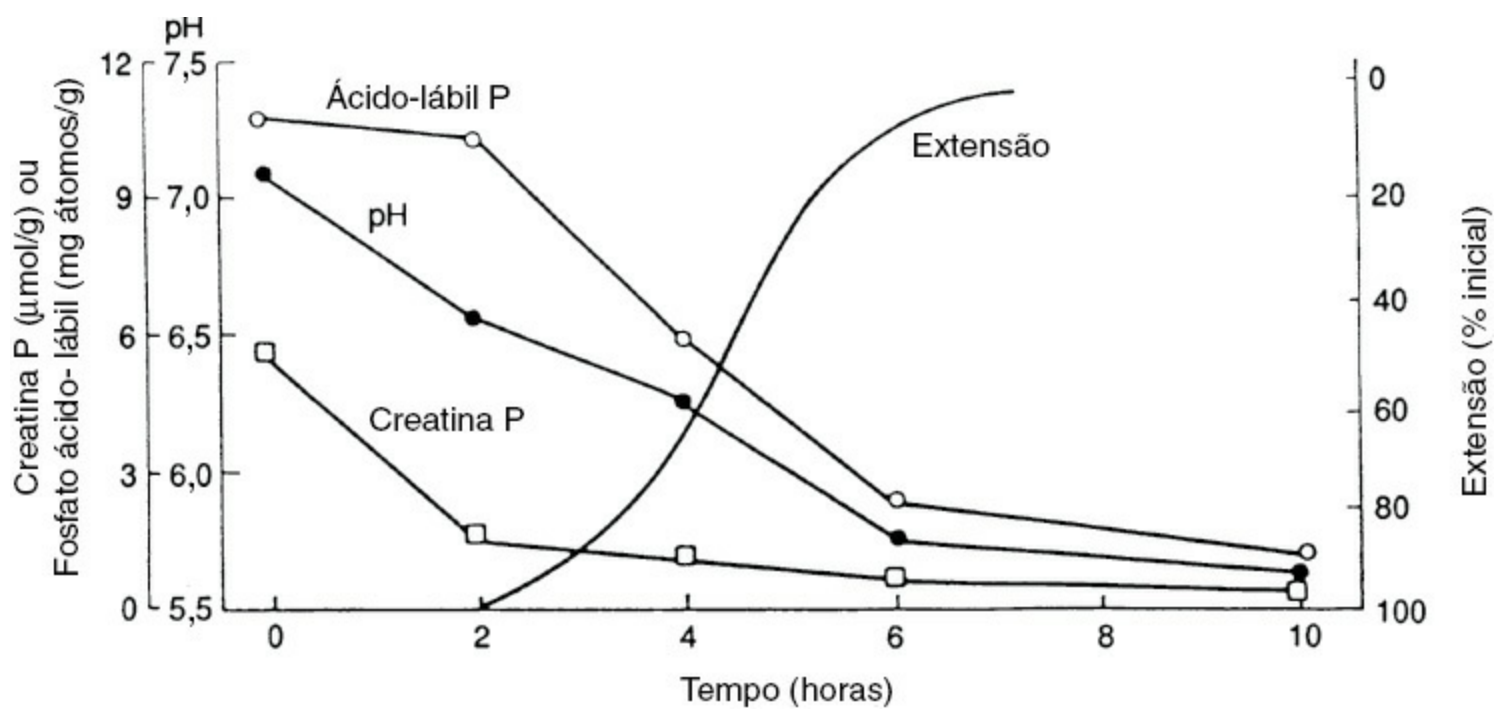


FIGURA 3.18 Alterações químicas e físicas em carne de músculo esternomandibular mantida a 37°C. A extensibilidade das alterações foi registrada em aparelho semelhante ao descrito por Bate-Smith e Bendall (1949) usando uma carga de aproximadamente 60 g/cm² e ciclo de carga-descarga de 8 minutos com e 8 minutos sem. Tempo zero: 1 hora 45 minutos *post mortem*. Newbold (1966).

A velocidade da glicólise *post mortem* nos músculos é afetada pela temperatura, tipo da fibra muscular, pelas secreções hormonais e também pela intensidade dos estímulos nervosos nos músculos antes e durante o abate (Beecher *et al.*, 1965; Disney *et al.*, 1967; Tarrant *et al.*, 1972a; 1972b; Bendall, 1973). O efeito no pH do músculo será discutido na seção a seguir.

E. pH no *post mortem*

A produção de ácido láctico faz com que o pH dos músculos diminua o pH fisiológico de 7,2–7,4 em animais de sangue quente para o último estágio *post mortem* de pH, de cerca de 5,3–5,5. Bate-Smith e Bendall (1949) demonstraram haver relação direta entre a velocidade de diminuição do pH no músculo do coelho no *post mortem* e a produção de ácido láctico. É muito importante obter um pH o mais baixo possível no tecido porque, além de retardar o crescimento de bactérias que deterioram a carne, possibilita uma coloração mais desejável para a carne. No caso de peixes congelados, no entanto, um pH mais alto torna-se mais vantajoso, pois evita uma maior rigidez. O pH final pode ser atingido durante as primeiras 24 horas do período de *post mortem*, uma vez que a via glicolítica está relacionada com a produção de ATP; uma queda rápida é diretamente responsável pelo desenvolvimento do *rigor mortis*. A inter-relação entre o desaparecimento da creatina fosfato, a queda dos níveis de ATP e pH e a diminuição da extensibilidade como medida do *rigor mortis* é mostrada na Figura 3.18. O ATP é a maior fonte de ácido fosfórico instável, enquanto a queda do pH é uma medida da glicólise.

Um pH de 5,3-5,5 *post mortem* é obtido em músculos de animais descansados e bem nutridos no momento do abate, quando o glicogênio está em seu nível máximo. Animais que se debatem muito em abates ficam fatigados antes da morte e apresentam baixos teores de glicogênio, como mostra a ilustração da Tabela 3.2 para músculos peitorais de frangos.

Os teores mais baixos de glicogênio resultam em um pH mais alto *post mortem* final de 6,0-6,5, produzindo, assim, carne escura, seca e com textura mais fechada, muito suscetível a deterioração por micro-organismos (Cassens, 1966; Joseph, 1968a; 1968b). Este tipo de carne, conhecido como DFD, representa um sério problema de qualidade, especialmente em carne bovina (Tarrant, 1981), e será discutida na seção K. O pH final *post mortem* na carne raramente cai abaixo de 5,3, apesar de várias exceções terem sido relatadas. Em músculos *longissimus dorsi* de suínos, por exemplo, valores de pH de 4,78 a 5,1 foram relatados (Lawrie *et al.*, 1958). Carne com pH entre 5,1-5,5 foi encontrada em condições exsudativas, com cor esbranquiçada e textura solta, enquanto carne com pH de 4,78 apresentava fibras musculares anormais. Este não é um fato inesperado, uma vez que o ponto isoelétrico da maior parte das proteínas da carne fica em torno de um pH de 5,5, o que leva a uma perda da capacidade de retenção de água (WHC).

A concentração de ácido láctico nos peixes também depende dos estoques iniciais de glicogênio antes da morte, assim como de seu tratamento. Os músculos dos peixes contêm concentrações de ácido láctico na faixa de 0,29% em haddock (Ritchie, 1926) a 1,2-1,4% em atum (Tomlinson e Geiger, 1962) durante o *rigor mortis*. A maioria dos peixes tem pH mais alto *post mortem* se comparado a animais de sangue quente, ao redor de 6,2 a 6,6 no rigor completo. Uma exceção é o peixe-chato (*flat fish*), que, segundo pesquisas, possui um pH final de 5,5, similar ao dos mamíferos. O esforço dos peixes durante a captura esgota substancialmente seus estoques de glicogênio, resultando em um pH alto, de cerca de 7,0, no rigor, criando uma condição conhecida como “rigor alcalino”. Esta condição foi observada em bacalhau assim como em outras espécies de peixes (Fraser *et al.*, 1961). Uma revisão feita por Wells (1987) registrou que a captura, o transporte e a manipulação dos peixes desencadeiam alterações bioquímicas e fisiológicas substanciais. A extensão dessas mudanças depende das espécies e das condições do meio

ambiente. Eliminar o estresse nos peixes, deixando-os descansar no cativeiro antes da morte, deveria ser o principal objetivo para evitar as mudanças anormais de pH que ocorrem durante a captura.

TABELA 3.2 Efeito das condições do abate sobre a concentração de glicogênio três minutos *post mortem* em músculo de peito de frango

Condição	Nível inicial de glicogênio (mg/g)
Anestesiado	8,3
Atordado	6,0
Agitação	3,4

Adaptado de De Fremery (1966).

Um baixo pH final também foi associado a problemas com a textura em peixes, entre eles o linguado, peixe-cabra do Alasca e atum (Patashnik e Groninger, 1964; Konagaya e Konagaya, 1979; Suzuki, 1981). Love (1975) notou que um pH baixo no rigor produz textura rija; um pH alto produz textura mole e pouco consistente em bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). Isto faz com que os peixes não possam ser filetados e, como consequência, obtêm-se produtos congelados de baixa qualidade (Love *et al.*, 1982; MacCallum *et al.*, 1967). Alterações *post mortem* em bacalhau pescado em Newfoundland, com músculos amolecidos, foram examinadas por Ang e Haard (1985), que relataram pH final mais baixo em bacalhau que se nutria basicamente de badejos antes da captura. Os bacalhaus do Atlântico não se alimentam durante meses antes da desova, que ocorre em maio e junho, mas comem muito depois da desova. Estes pesquisadores descobriram que os músculos dos bacalhaus capturados durante o período de alimentação intensa se caracterizam por um pH baixo, que persiste por até 100 horas após o rigor. Ang e Haard (1985) sugerem que o estado metabólico alterado resulta da alimentação intensa, causando um pH baixo e estável nos músculos do bacalhau, responsáveis por sua textura amolecida.

F. Cinética da glicólise *post mortem*

O pH final no *post mortem* depende do estado fisiológico do músculo, do tipo do músculo e da espécie de animal ou peixe estudado. As diferentes taxas de declínio do pH ao longo do tempo para três tipos de animais estão ilustradas na Figura 3.19.

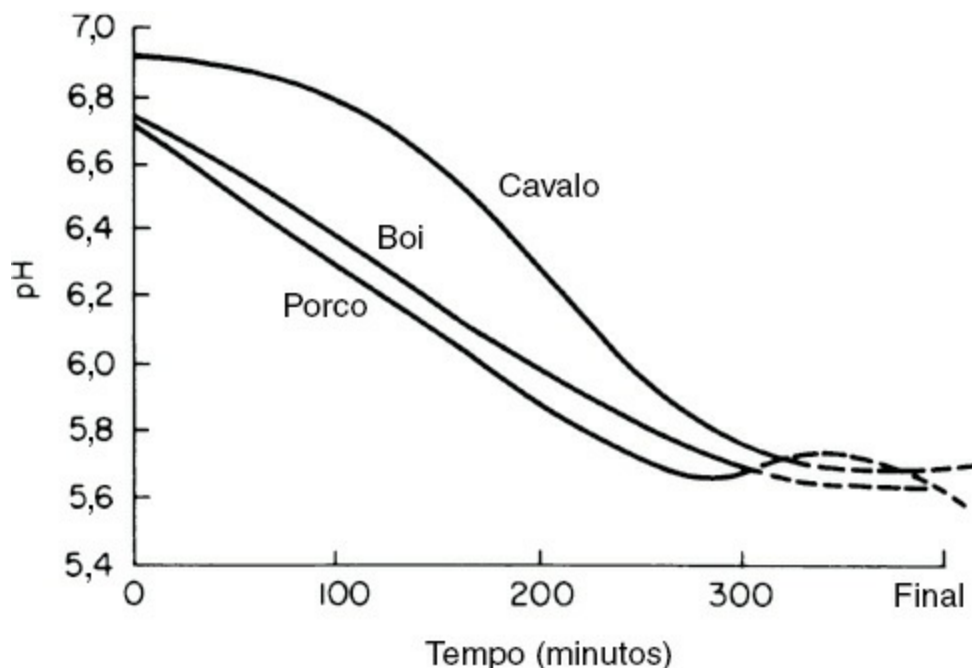


FIGURA 3.19 O efeito das espécies em determinado músculo (*longissimus dorsi*) e em dada temperatura 37°C no progresso de glicólise mensurado pela queda no pH. Lawrie (1966). Reprodução autorizada © Wood Publishing Ltd.

Várias mudanças na carne durante o *post mortem* puderam ser observadas visualmente e estão relacionadas com a velocidade de diminuição do pH e da temperatura. Por exemplo, um declínio rápido do pH na carne, em uma temperatura similar à corporal, resultou em alterações na cor, diminuição do WHC e desnaturação de algumas proteínas musculares (Scopes, 1964; Chaudhry *et al.*, 1969; Lister, 1970; Follett *et al.*, 1974; Locker e Daines, 1975). Em trabalhos anteriores, Cassens (1966) e Briskey *et al.* (1966) estudaram a taxa de glicólise no músculo do porco monitorando a queda do nível do pH. Além das alterações fisiológicas no estado do músculo, eles observaram que alguns porcos são predispostos a glicólise rápida no *post mortem*. As propriedades da carne associadas à queda do pH foram esquematizadas na Tabela 3.3.

Mudanças similares também ocorrem nos músculos dos peixes à medida que o pH cai. Um baixo pH no *post mortem* foi associado à baixa qualidade quanto à textura, baixo WHC e muita perda de água (Kelly, 1969). Um alto conteúdo de água nos músculos de bacalhau foi identificado por Love (1975), em peixes que tinham alto valor de pH *post mortem*, o que traz uma melhor correlação com a textura do peixe cozido.

G. Efeito da temperatura na glicólise durante o *post mortem*: encurtamento a frio

A taxa de glicólise no *post mortem* varia de acordo com a temperatura, como é evidenciado pelas diferenças no pH final de músculos de mamíferos (Marsh, 1954; Cassens e Newbold, 1966; Newbold, 1966; Newbold e Scopes, 1967). Todos estes pesquisadores relataram maior rapidez do *rigor mortis*, quando a temperatura é reduzida de 5°C para 1°C em consequência do aumento da atividade da glicólise e da hidrólise do ATP. O estímulo da ATPase da actomiosina contrátil parece ser potencializada pela liberação de íons Ca^{2+} . Este fenômeno, conhecido como “encurtamento pelo frio” resulta no endurecimento da carne cozida (Marsh e Leet, 1966). Um aumento de 30 a 40 vezes do teor do cálcio iônico foi relatado por Davey e Gilbert (1974) na região da miofibrila do músculo da carne bovina mantido a 0°C, comparado a uma manutenção de 15°C. Jeacocke (1977) examinou a relação entre a temperatura e o declínio do pH *post mortem* no músculo esternomandibular da carne. Os resultados ilustrados na Figura 3.20 indicam um declínio mínimo do pH, na faixa de 10-12°C, que aumentou quando a temperatura diminuiu para 0°C, características do encurtamento pelo frio. Este fato é atribuído ao aumento da glicólise devido ao aumento da atividade da ATPase na actomiosina contrátil. Posteriormente, Cornforth *et al.* (1980) confirmaram uma pesquisa anterior realizada por Buege e Marsh (1975), que afirmava que o conteúdo mitocondrial do músculo estava envolvido no encurtamento pelo frio. Também propuseram uma função para o retículo sarcoplasmático na reversibilidade de tal fenômeno. Isto foi atribuído ao possível efeito da temperatura na membrana do retículo sarcoplasmático e a consequente liberação de íons Ca^{2+} .

Honikel *et al.* (1983) identificaram dois tipos de encurtamento que ocorrem em músculos bovinos. Um deles se dava em temperaturas acima de 20°C, sendo denominado “encurtamento por rigor”, e o outro ocorria abaixo de 15°C e chamado “encurtamento pelo frio”. Em ambos os casos, a contração do músculo foi explicada pela liberação de íons Ca^{2+} no espaço miofibrilar na presença de teores adequados de ATP. A absorção de íons Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático foi particularmente sensível às alterações de temperatura e do pH. Honikel *et al.* (1983), por exemplo, observaram encurtamento por rigor a partir de pH de 6,25 na presença de 2,4 μmol ATP/g por músculo, o que representa condições ótimas para a absorção de íons de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, como observaram anteriormente Cornforth *et al.* (1980) e Whiting (1980). A atividade Mg/Ca-ATPase miofibrilar foi reportada por Bendall (1969) como sendo independente do pH entre 6 e 7. Ambas as teorias explicam o desenvolvimento do encurtamento por rigor em temperaturas de 20°C e mais altas e em pH abaixo de 6,3. Em grande contraste, o encurtamento a frio ocorre em pH 7 e na presença de concentração total de ATP (4 $\mu\text{mole/g}$) no músculo. A ocorrência de encurtamento pelo frio foi atribuída por Cornforth *et al.* (1980) ao efeito combinado de liberação dos íons de Ca^{2+} pela mitocôndria do músculo e à absorção reduzida de íons Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático.

TABELA 3.3 Relação entre tipo de queda no pH e propriedades da carne

pH final	Tipo de declínio	Propriedades da carne
6,0–6,5	lento	escura
5,7–6,0	lento, gradual	ligeiramente escura
5,3–5,7	gradual	ligeiramente escura
5,3–5,6	rápido	normal para levemente escura
5,0	rápido	de escura para clara, porém exsudativa
5,1–5,4 então sobe para 5,3–5,6	rápido	pálida e exsudativa

Adaptado de Cassens (1966).

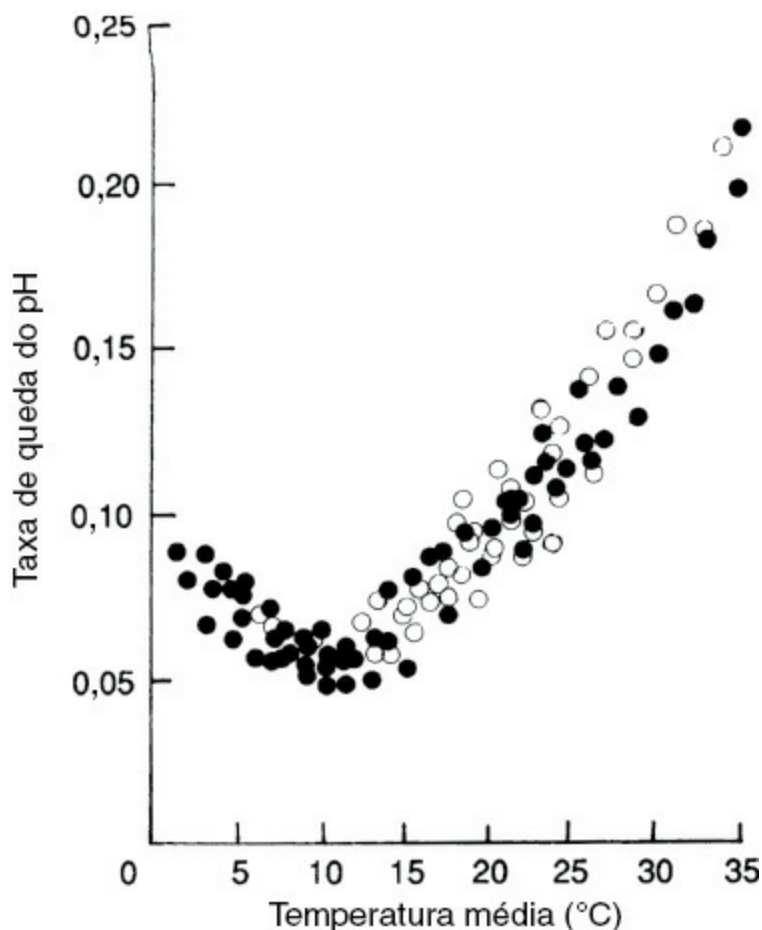


FIGURA 3.20 A taxa de queda no pH em carne de músculo esternomandibular como uma função da temperatura média da junção do termopar adjacente. Os resultados de 16 gradientes diferentes de temperatura estão agrupados (●) músculos embalados a vácuo antes da inserção no aparelho; (○) músculos não embalados a vácuo. Jeacocke (1977).

Herring *et al.* (1965) foram os primeiros a demonstrar haver uma relação entre o encurtamento pelo frio e o comprimento do sarcômero. O potencial do encurtamento pelo frio varia de acordo com os tipos dos músculos, sendo o músculo vermelho mais suscetível ao encurtamento pelo frio (Bendall, 1973). Como resultado, a carne de porco é menos suscetível do que a bovina e a de cordeiros ao encurtamento pelo frio, pois possui, em sua maioria, fibras brancas.

O desenvolvimento do encurtamento pelo frio é bastante indesejável e pode ser evitado deixando-se a carne a uma temperatura mínima de 15°C até que o pH diminua abaixo de 6,0. A carcaça de cordeiros, entretanto, deve ser mantida por pelo menos 16 horas para garantir que as mudanças pré-rigor tenham sido completadas (McCrea *et al.*, 1971). Isto representa um atraso para a indústria de processamento de carne, que utiliza a retirada dos ossos a quente nas carcaças de gado, que são então cortadas e rapidamente refrigeradas com temperaturas abaixo de 15°C, antes do pH cair abaixo de 6,0. Uma técnica capaz de reduzir o pH de carcaças para abaixo de 6,0 envolve o uso de estímulos elétricos para acelerar a glicólise *post mortem*, como será discutido na próxima seção.

H. Efeito de estímulos elétricos na glicólise *post mortem* e a maciez

Sabe-se há muito tempo que o estímulo elétrico do músculo acelera a glicólise no *post mortem* e também o aparecimento do rigor (Harsham e Detherage, 1951; De Fremery e Pool, 1960; Hallund e Bendall, 1965; Forrest e Briskey, 1967). Carse (1973) evitou o encurtamento pelo frio ao expor carcaças de cordeiros logo após o abate a pulsos de 250 V e obteve pH 6,0 em 3 horas, comparado com 15,4 horas necessárias para carcaças não estimuladas. A técnica facilitou a aceleração do condicionamento dos cordeiros e é utilizada comercialmente na Nova Zelândia. Resultados similares foram obtidos para cordeiros por Bendall (1976) e Chrystall e Hagyard (1976). Estes pesquisadores monitoraram o progresso da glicólise em músculos *longissimus dorsi* de cordeiro, estimulados e não estimulados, e acompanharam as alterações do pH, como pode ser visto na Figura 3.21. O estímulo elétrico acelerou substancialmente a glicólise *post mortem* e as carcaças estimuladas atingiram pH final 5,5 em 8 horas, comparado com 24 horas para o controle. Chrystall e Devine (1978) notaram que durante o estímulo elétrico a glicólise foi estimulada em até 150 vezes, o que resultou em uma queda marcante do pH. Mesmo após cessar o estímulo, a taxa de glicólise pode aumentar até três vezes. O efeito inicial foi atribuído por Newbold e Small (1985) à ativação da glicogênio fosforilase, que atingiu o pico 30 segundos após o estímulo elétrico. A glicólise aumentada e a queda do ATP depois da cessação do estímulo elétrico, no entanto, permanecem inexplicadas.

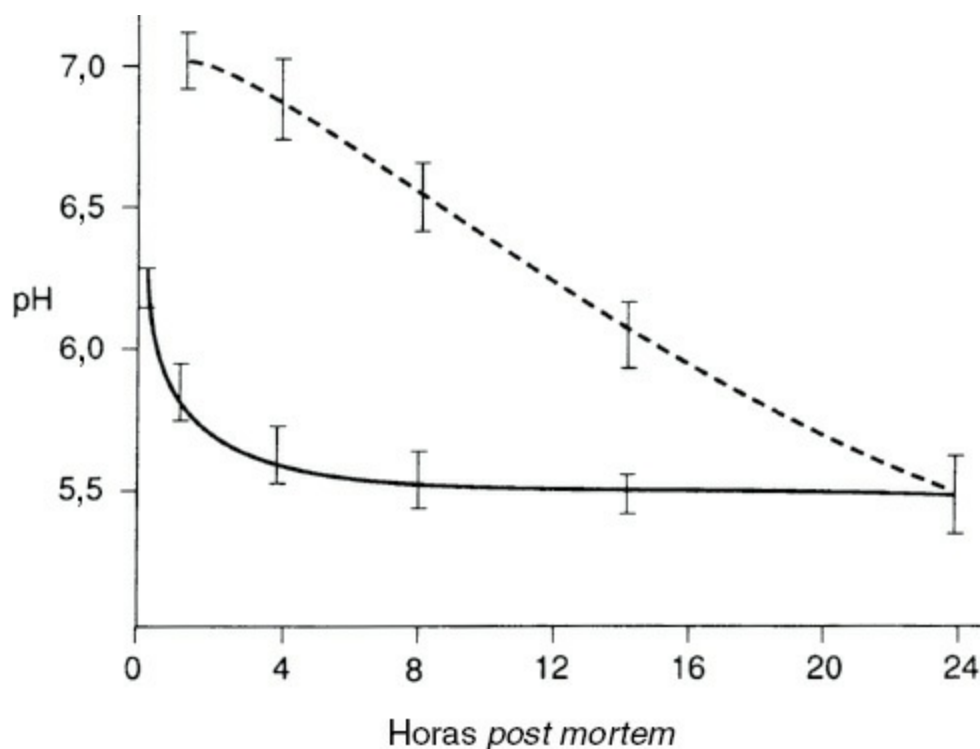


FIGURA 3.21 Progressão da queda do pH em músculos *longissimus dorsi* de animais estimulados (—) e não estimulados (---). Desvio-padrão é mostrado na barra vertical. Chrystall e Haygard (1976).

Horgan e Kuypers (1985) examinaram a glicólise *post mortem* nos músculos *longissimus dorsi* de coelhos após estímulos de alta e de baixa voltagem. Como esperado, o declínio do pH acentuou-se, assim como da atividade de fosforilase após o estímulo elétrico. Tal fato foi atribuído ao aumento da atividade da fosforilase quinase e perda substancial da atividade da fosforilase e da fosfatase. O rendimento do retículo sarcoplasmático foi reduzido, sugerindo aumento da liberação de íons de Ca^{2+} do músculo estimulado. Não ficou determinado, no entanto, se os resultados foram consequência do rompimento físico ou da glicólise rápida, pois trabalhos posteriores de Hopkins e Thompson (2001) indicaram que a concentração de cálcio livre ocorre em função do declínio do pH. Os efeitos bioquímicos e físicos dos estímulos elétricos na carne bovina e de cordeiro foram revisados por Hwang *et al.* (2003).

Foi relatado que estímulos elétricos aumentam a maciez da carne (Savell *et al.*, 1977; McKeith *et al.*, 1980). Seu

efeito foi atribuído a vários fatores, incluindo a redução da capacidade de encurtamento pelo frio, a fragmentação da miofibrila e a atividade aumentada das proteases ácidas, causadas pela diminuição do pH (Davey *et al.*, 1976; Chrystall e Hagyard, 1976; Savell *et al.*, 1977; 1978). Sonaiya *et al.* (1982) estimularam eletricamente um lado de uma carcaça bovina (*semimembranosus*, *longissimus dorsi* e *triceps brachii*) e monitoraram o pH, a temperatura e o índice de fragmentação da miofibrila, durante uma semana após o tratamento. Uma diminuição significativa do pH ocorreu em músculos tratados, quando comparada aos músculos correspondentes não tratados. Um índice maior de fragmentação da miofibrila (MFI) foi observado em músculos eletricamente estimulados, fato que é normalmente associado com a degradação da troponina T e do disco Z pelo fator ativado por cálcio. No entanto, o aparecimento de proteínas de 30 kDa, normalmente associado à ação do CAF, não atingiu o nível máximo até 72 horas após o estímulo, quando o MFI já tinha diminuído. Evidenciou-se, assim, que o estímulo elétrico não aumentou a atividade do CAF, como esperado. Uma vez que a degradação da troponina T ocorreu principalmente em função da ação das catepsinas, o efeito do estímulo elétrico foi atribuído ao aumento da atividade das enzimas proteolíticas em pH baixo.

Preocupações com o custo das instalações e a segurança dos operadores, associadas ao estímulo elétrico de alta voltagem na carne, levaram ao uso mais frequente da estimulação em baixa voltagem (LV-ES, voltagem < 100 V) em muitos países. Tem sido descrito que tal tratamento aumenta a maciez da carne (Taylor e Marshall, 1980; Aalhus *et al.*, 1994). Chrystall *et al.* (1980), trabalhando com cordeiros, recomendaram que, para uma boa eficiência, o tratamento LV-ES deve ser aplicado logo após a morte. Resultados diferentes têm sido descritos quando se trata da maciez em carne bovina com tratamento LV-ES variando de nenhuma melhora, pouca melhora e até alterações ruins, incluindo qualidade mais baixa do produto (Unruh *et al.*, 1986; Redbottom *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2003). Foi descrito que músculos diferentes respondem de forma diferente ao estímulo na mesma carcaça (Devine *et al.*, 1984). Uma pesquisa efetuada por Rhee e Kim (2001) examinou o efeito do LV-ES e da temperatura no condicionamento a 2°C, 16°C e 30°C durante 3 horas na glicólise e na atividade da calpaína em lombo (*m. longissimus*) obtidos de gado nativo da Coreia (Hanwoo). O LV-ES pareceu ser mais eficaz na aceleração da velocidade da glicólise em *longissimus* comparado ao condicionamento a 30°C, embora ambos tenham acelerado o declínio do pH e o esgotamento do ATP e do glicogênio. A atividade da calpaína diminuiu após 24 horas. O melhor tratamento para acelerar a glicólise e aumentar a atividade da calpaína parece ser uma combinação de LV-ES e condicionamento a 30°C. Hollung *et al.* (2007) demonstraram posteriormente que o LV-ES, além de afetar de maneira diferente os músculos no interior da carcaça, apresenta efeito variado na força de cisalhamento do Warner-Bratzler (WB) e na diminuição de pH nos mesmos músculos de animais diferentes. Alguns animais não mostraram nenhum efeito após LV-ES quanto à diminuição do pH enquanto valores da força de cisalhamento de WB foram melhorados. O LV-ES, portanto, pode ser responsável por outros mecanismos além de acelerar o declínio do pH e evitar o encurtamento pelo frio, que devem ter um papel importante na maciez da carne.

Uma nova abordagem para aumentar a qualidade da carne da Austrália é baseada no estímulo elétrico de média voltagem (Pearce *et al.*, 2009). A alteração das frequências aumentou o estímulo do músculo, tornando-o mais macio do que o de controle após 30 dias. Nenhum efeito negativo foi observado quanto à perda de água ou quanto à cor.

I. Pressurização no pré-rigor

Pressurização pré-rigor é outro procedimento desenvolvido para acelerar o processamento da carne (Macfarlane, 1973; Kennick *et al.*, 1980; Elkhalfa *et al.*, 1984a; 1984b). Macfarlane (1973) foi o primeiro pesquisador a amaciar a carne no pré-rigor utilizando tratamento de alta pressão (103 MPa, 30-35°C por 1-4 minutos) e observou queda rápida do pH além de aumento do grau de maciez. Uma vez que o pré-rigor raramente é utilizado, eles

examinaram o efeito da alta pressão na carne bovina no pós-rigor, que será discutido na seção P.

J. Enzimas glicolíticas

Foram feitas investigações para determinar qual a primeira enzima glicolítica que é inibida quando o pH diminui, já que a glicólise cessa em valores de pH acima de 5,3. Newbold e Lee (1965) descobriram que a fosforilase é a enzima limitante em músculo esternomandibular picado diluído em volume igual de solução 0,16 M de cloreto de potássio, fato consistente com estudos anteriores de Briskey e Lawrie (1961). Kastenschmidt *et al.* (1968) examinaram o metabolismo do músculo *longissimus dorsi* de porco e confirmaram que a fosforilase era o principal sítio de controle da glicólise *post mortem*. A fosforilase é uma das enzimas-chave presentes nos músculos (Scopes, 1970). Além dela, Kastenschmidt *et al.* (1968) afirmaram que a fosfofrutoquinase e a piruvato quinase estão envolvidas no controle da via glicolítica. Com base nestes e em outros estudos relacionados, os músculos dos porcos foram classificados como músculos glicolizantes “rápidos” ou “lentos” (Briskey *et al.*, 1966; Kastenschmidt *et al.*, 1968).

K. Condições da carne pálida, macia e exsudativa (PSE) e escura, firme e seca (DFD)

Defeitos na qualidade da carne, como PSE e DFD, resultam em carne pouco atraente e rejeitada pelos consumidores (Viljoena *et al.*, 2002). A percentagem estimada de PSE e de DFD encontrada em carne nos Estados Unidos foi de 16% e 10%, respectivamente (Cassens *et al.*, 1992). Outros países, como o Canadá, Portugal e o Reino Unido, relataram incidências mais altas (Fortin, 1989; Santos *et al.*, 1994). Avaliações indicam que o problema está aumentando em vez de diminuir (Wariss, 2000). Associado a estes fenômenos está a perda financeira considerável e contínua que a indústria da carne sofre em vários países (Adzitey e Nurul, 2011).

1. PSE

A condição PSE, associada principalmente com músculos de porco, se deve à rápida queda do pH para 5,3-5,8 em até uma hora após a morte, enquanto a temperatura do músculo ainda está acima de 36°C. Apesar de muitas pesquisas terem sido realizadas, a PSE continua a ser um problema significativo de qualidade para a indústria da carne de porco (Barbut *et al.*, 2008). A cor pálida, a textura mole e a baixa capacidade de retenção de água (WHC) da carne PSE têm causado sérias perdas para a indústria (Wang *et al.*, 2005). Pesquisas iniciais demonstraram que a combinação de alta temperatura e pH baixo causa desnaturação parcial das proteínas dos músculos (Bendall e Lawrie, 1964; Charpentier, 1969; Goutefongea, 1971). O efeito de temperaturas altas e pH baixo sobre as propriedades da fosforilase foram examinados por Fischer *et al.* (1979); estas condições causam a desnaturação da fosforilase, com a resultante perda de atividade, assim como uma solubilidade diminuída nos músculos PSE.

Já foi demonstrado que o desenvolvimento de carnes PSE é relacionado com o estresse. Este fato é predominante em porcos, que são geneticamente sensíveis ao estresse e que sofrem níveis muito altos de tensão antes do abate, fato que também pode ocorrer com porcos normais (Topel *et al.*, 1969; Oliver *et al.*, 1988; Honkavaara, 1989; Kuchenmeister *et al.*, 2000). O fenômeno, identificado como síndrome de estresse dos porcos, está ligado a um único gene recessivo autossomal. Esta ocorrência causa um metabolismo de cálcio anômalo no músculo, *post mortem*, em função de mutação no aminoácido 615 (Arg615Cys), do canal de liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático. Como resultado, é liberado o dobro da quantidade de cálcio do retículo sarcoplasmático quando comparado aos músculos normais (Mickelson e Louis, 1996). Porcos com suscetibilidade ao estresse também foram identificados por Kuchenmeister *et al.* (1999) como tendo absorção diminuída de Ca²⁺ no músculo

após a morte. O aumento da liberação do Ca^{2+} sarcoplasmático foi responsável por intensificar o metabolismo do músculo ao acelerar a produção e o acúmulo de lactato, após a morte. Gispert *et al.* (2000) realizaram um levantamento completo das condições do pré-abate, incluindo o transporte das fazendas até os matadouros e a frequência de genótipos de halotano no desenvolvimento de PSE, em cinco matadouros na Espanha. Isto levou a uma pesquisa feita por Guardia *et al.* (2004), que identificaram fatores de risco genéticos e ambientais na carne tipo PSE nas condições comerciais espanholas. Utilizando um modelo de regressão logístico policotomoso, eles descobriram que a diminuição do risco de a carne tornar-se do tipo PSE com o tempo de duração do transporte também depende da densidade do estoque. Por exemplo, o risco de obter carne do tipo PSE aumentou com uma densidade de estoque para transportes com duração de mais de três horas, enquanto o contrário foi comprovado em viagens mais curtas.

Uma condição similar foi observada no transporte de carne bovina, descrita como pálida e exsudativa. Fischer e Hamm (1980) estudaram as alterações *post mortem* em músculos de gado com glicólise rápida. Correlações significativas foram obtidas nas quais músculos com pH baixo foram associados com baixa retenção de água (WHC), baixo conteúdo de glicogênio e alto teor de lactato. Foi evidenciado que a ativação da fosforilase ocorreu em músculos de atividade glicolítica rápida, embora o efeito geral na qualidade da carne tenha sido muito menos severo do que nos porcos PSE.

Estudos recentes também identificaram a ocorrência do desenvolvimento de condições exsudativas e pálidas em carne de frango em todo o mundo, caracterizada por altos valores de L^* e baixos teores de WHC (Petracci *et al.*, 2009). Maior número de evidências tem sugerido que a exposição das aves a estresse térmico antes do abate é um dos fatores responsáveis pela carne PSE (Barbut, 1998; Mitchell e Kettlewell, 1998). A principal causa biológica da carne PSE é considerada a liberação excessiva de Ca^{2+} em consequência de uma mutação genética nos receptores de rianodina, uma classe de canais de cálcio intracelulares localizados no retículo sarcoplasmático. Wilhelm *et al.* (2010) verificaram que 24 horas após a morte o músculo *pectoralis major* classificado como PSE tinha baixo pH, baixa capacidade de retenção de água (WHC) e valores de forças de cisalhamento, comparado a amostras de controle. Também foram observadas maiores atividades de protease nas amostras PSE, especialmente quanto à atividade da calpaína, o que contribuía para eventual colapso da estrutura do sarcômero. Outros trabalhos sobre músculos *peitoralis major* em perus, feitos por Zhu *et al.* (2011), demonstraram os efeitos danosos de temperaturas elevadas no *post mortem* (40°C) e da glicólise que causava a desnaturação da fosforilase, tornando a carne do peru PSE.

2. DFD

A manipulação incorreta do gado antes do abate, causando estresse fisiológico e exaustão, é a principal causa do DFD (Grandin, 1980; Tarrant, 1981). Exercício físico excessivo dos animais esgota o glicogênio do músculo, embora outros fatores, como jejum, trauma e estresse psicológico também foram apontados como seus causadores (Howard e Lawrie, 1956; Bergstrom e Hultman, 1966; Conlee *et al.*, 1976; Sugden *et al.*, 1976). Tarrant e Sherrington (1980) monitoraram o pH final no *post mortem* de carcaças de bezerras e novilhos em um matadouro na Irlanda durante três anos. Um efeito sazonal foi notado no desenvolvimento de DFD com uma incidência média de 3,2% nas carcaças examinadas. A medição do pH final da carne foi o melhor método para caracterizar o fenômeno. Os limites de pH relatados no desenvolvimento de DFD variaram entre 5,8-5,9 como limite inferior para a carne normal para 6,2-6,3 como o limite superior para o DFD extremo (Fjelkner-Modig e Ruderus, 1983; Tarrant, 1981). As condições de pH alto resultam em desnaturação de proteínas negligenciável, de modo que a água permanece fortemente ligada com pouca ou mesmo nenhuma exsudação (Warriss, 2000). A incidência de DFD na Suécia foi estudada por Fabiansson *et al.* (1984), que classificaram as carcaças de carne com pH menores que 6,2, depois de 24 horas, como DFD. A incidência geral de DFD em carcaças estimuladas ou não estimuladas

eletricamente é de 3,4% e 13,2%, respectivamente. Pesquisas posteriores continuaram a relatar o desenvolvimento de DFD em carne bovina (Viljoena *et al.*, 2002; Kannan *et al.*, 2002; Apple *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

L. Alterações *post mortem* nas proteínas de carnes e peixes

O declínio do pH do músculo para um estado ácido, além de várias reações exotérmicas, como a glicólise, exerce grande efeito nas proteínas dos músculos da carne e do peixe. A retenção de umidade na carne fresca é reconhecida como uma das principais características quanto à sua qualidade. A maior parte da água é mantida no interior das miofibrilas, entre as miofibrilas e a membrana da célula (sarcolema) e entre as células ou feixes dos músculos (Offer e Trinick, 1983; Offer e Cousins, 1992). Em consequência, qualquer degradação das proteínas dos músculos, especialmente por proteases, pode afetar a capacidade de retenção de água (WHC) do músculo. Esta seção vai abordar o fenômeno da labilidade da proteína no interior do músculo e seu efeito na qualidade da carne e do peixe.

Logo após a morte, a temperatura do corpo do gado pode aumentar de 37,6°C para 39,5°C (Meyer, 1964). Mesmo durante a refrigeração, a carne esfria lentamente em função de várias reações exotérmicas que ocorrem, por exemplo, a glicólise. Este fenômeno é conhecido como “calor animal” e foi observado desde tempos antigos. Em consequência, as mudanças *post mortem* nas proteínas dos músculos são afetadas, muitas vezes, por uma combinação de altas temperaturas e pH baixo. Tais alterações incluem perda da cor e diminuição na WHC (Cassens, 1966). Na carne, são as proteínas sarcoplasmáticas que são desnaturadas e se aderem firmemente à superfície dos miofilamentos, fazendo com que a carne fique mais clara (Bendall e Wismer-Pederson, 1962). Nos peixes, as proteínas sarcoplasmáticas são, em geral, mais estáveis do que as proteínas miofibrilares e não são afetadas pela desidratação ou estocagem prolongada a frio.

1. Capacidade de retenção de água

A maior mudança no *post mortem* dos músculos das carnes e de peixes é a perda de água ou exsudação. Em carnes magras, que possuem, em geral, 75% de água, a maior parte fica fracamente ligada pelas proteínas da carne. No estado de pré-rigor, a carne tem alta capacidade de retenção de água (WHC), que declina nas primeiras horas após a morte atingindo um nível mínimo que coincide com o estabelecimento do *rigor mortis*. Este nível mínimo corresponde ao pH *post mortem* final de 5,3 a 5,5, que é o ponto isoelétrico das principais proteínas dos músculos. Uma queda rápida do pH causa várias mudanças, inclusive desnaturação de algumas proteínas dos músculos (Scopes, 1964; Chaudhrey *et al.*, 1969) e perda de WHC (Disney *et al.*, 1967). Tarrant e Mothersill (1977) determinaram a taxa da via glicolítica em vários lugares das carcaças bovinas, uma vez que ela afeta as propriedades dos músculos. O pH diminuiu com a distância da superfície da carcaça, indicando taxa mais rápida de glicólise acompanhada por maior grau de desnaturação das proteínas e de perda de água. A perda de água foi medida mediante baixa centrifugação de amostras de vários músculos diferentes, intactos, como pode ser visto na Tabela 3.4.

Os músculos que ficam a uma profundidade de 8 cm ficaram mais pálidos, macios e úmidos do que aqueles a 5 cm ou 1,5 cm, dois dias após o *post mortem*, o que parece ser característico da condição PSE observada em porcos, embora menos pronunciada. O aumento da perda de água foi atribuído à diminuição da WHC das proteínas dos músculos desnaturados e ao rompimento do sarcolema. A menor perda de água a 1,5 cm de profundidade deu-se em função de baixas temperaturas (< 15°C) antes de o pH atingir 6,0, explicando por que uma rapidez no esfriamento das carcaças de gado depois do abate minimiza a quantidade da perda de água.

Evidências sugerem que uma degradação reduzida de proteínas importantes do citoesqueleto, como a proteína desmina do filamento intermediário que liga a miofibrila à membrana da célula, pode permitir o encolhimento da

miofibrila e, portanto, o encolhimento do músculo. Este encolhimento, no entanto, abre canais de gotejamento e aumenta a perda de água (Morrison *et al.*, 1998; Kristensen e Purlow, 2001; Rowe *et al.*, 2001). Conseqüentemente, prevenir o encolhimento aumentando a degradação da desmina permitiria a retenção de mais umidade no tecido. Melody *et al.* (2004) associaram diferenças na perda de líquido de músculos *longissimus dorsi* de porcos com a diminuição da proteólise da desmina (Tabela 3.5). Já que a desmina é degradada pela μ -calpaína (Huff-Lonergan *et al.*, 1996), a autólise e a ativação desta enzima pode explicar a variação da degradação da desmina e sua influência na perda de líquido. O exame dos músculos *longissimus dorsi*, *semimembranosus* e *psaos major* de porcos, por Melody *et al.* (2004), demonstrou que as diferenças na atividade da μ -calpaína, na autólise da μ -calpaína e a degradação da proteína podem explicar as diferenças na maciez e na WHC desses músculos. Esses resultados não excluem a possibilidade de haver outras funções das proteínas de filamentos intermediários, como o taliona e a vinculina. Para mais detalhes sobre o papel que as alterações bioquímicas e estruturais exercem sobre o WHC, recomendamos o texto de Huff-Lonergan e Lonergan (2005).

TABELA 3.4 Perdas de água em músculos bovinos

Músculo	Profundidade (cm)	Porcentagem de gotejamento \pm DP (n)
M. bíceps femoral	1,5	8,1 \pm 0,7 (6)
	5	14,9 \pm 0,8 (6)
	8	18,2 \pm 0,7 (6)
M. semitendinoso	1,5	7,5 \pm 1,0 (6)
	8	16,7 \pm 1,2 (6)

DP: desvio-padrão, n: quantidade de músculos avaliados
Adaptado de Tarrant e Mothersill (1977).

TABELA 3.5 Porcentagem de perda de água e produto de degradação da desmina em músculos suínos *longissimus dorsi* (LD), *semimembranosus* (SM) e *psaos major* (PM)

Item	LD	SM	PM
Perda de água (%)			
24 horas de armazenamento	1,57 ^x \pm 0,384	1,46 ^{xy} \pm 0,373	1,06 ^y \pm 0,250
96 horas de armazenamento	2,95 ^b \pm 0,623	2,78 ^b \pm 0,551	1,10 ^c \pm 0,214
Produto da degradação de desmina ^a			
45 minutos <i>post mortem</i>	0,126 ^c \pm 0,027	0,177 ^c \pm 0,036	0,286 ^b \pm 0,039
6 horas <i>post mortem</i>	0,165 ^c \pm 0,106	0,188 ^c \pm 0,056	0,415 ^b \pm 0,097
24 horas <i>post mortem</i>	0,306 ^{xy} \pm 0,081	0,233 ^y \pm 0,071	0,391 ^x \pm 0,057

a As taxas foram calculadas como a intensidade da faixa do produto de degradação da desmina em cada amostra sobre a intensidade do produto intacto de degradação da desmina na densitometria-padrão interna designada.

b,c Dentro de cada fileira, médias sem uma letra minúscula sobrescrita diferem ($p < 0,01$);^{x,y} dentro de uma fileira, médias sem uma letra sobrescrita diferem ($p < 0,05$).
De Melody *et al.* (2004).

No caso de músculos de peixe, o pH final tende a ser mais alto do que o da carne, dificilmente abaixo de 6,0 mesmo em rigor pleno. No entanto, consideráveis perdas de água foram relatadas em músculos de peixes exercitados, similares àquelas em músculos esqueléticos de mamíferos (Partmann, 1965). Um aumento rápido no fluido exprimível foi observado em bacalhau armazenado em gelo por um período de 168 horas (Banks, 1955). Uma série de artigos, publicados por Tomlinson *et al.* (1965; 1966a; 1966b), relataram que uma diminuição do pH em linguados do Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*) causa insolubilidade nas proteínas, o que leva a uma condição de carne pálida, macia e exsudativa semelhante ao PSE em porcos (Briskey, 1964). Esta condição, conhecida como gredosidade ou textura similar a cálcureo em linguados, é um problema para a indústria do peixe no noroeste do Pacífico, pois gera rejeição pelos consumidores. Um relatório técnico feito entre 1997 e 1999 por Kammer (2000) para a International Pacific Halibut Commission (Comissão Internacional de Linguados do Pacífico) também

identificou a temperatura da água, a estação do ano, a manipulação pós-captura e a maturidade sexual como fatores que afetam a gredosidade do linguado do Pacífico. Na tentativa de melhorar as condições, os peixes permanecem na água depois da captura para remover o excesso de ácido lático e obter um pH normal após a morte.

Estudo realizado por Hagen (2008) confirmou a importância do pH na gredosidade de salmão do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus* L.) criado em cativeiro. Ele também atribuiu a atividade das catepsinas B e D no desenvolvimento da gredosidade. Outro estudo sobre os linguados do Atlântico, de cativeiro, feito por Hagen *et al.* (2008), também verificou que catepsinas têm grande impacto no conteúdo de proteínas e na perda de líquido. Entre as catepsinas examinadas, a catepsina H foi considerada a de maior importância na perda de líquido, sendo responsável por 48,8% da variação total. Para obter um linguado do Atlântico de melhor qualidade, os pesquisadores recomendam, com muita ênfase, que a pesca seja feita no outono ou no início do inverno, quando a perda de líquido e a atividade da catepsina são baixas.

2. Proteômica e a capacidade de retenção de água

Utilizando a proteômica, Hwang *et al.* (2004) encontraram forte relação entre o aumento da perda de líquido no músculo *longissimus* de porco e a alta taxa de proteólise *post mortem*. Três proteínas – a troponina T, a adenilato quinase (substrato da proteinase SP-22, dependente da ATPase) e a proteína D5-1 – estão envolvidas nas alterações de perda de líquido. Usando eletroforese bidimensional, Van de Wiel e Zhang (2007) isolaram algumas proteínas marcadoras que poderiam ser importantes para a perda de água, incluindo a creatina fosfoquinase tipo M (CKP), a desmina e um ativador de transcrição (SWI/SNF). Um estudo proteômico recente realizado por Yu *et al.* (2009) examinou a relação entre a qualidade da carne e as proteínas formadas após choques de calor (HSP) em músculos *longissimus dorsi* de porcos. Utilizando a técnica de ensaio enzima ligada a imunoabsorvente (ELISA), Yu *et al.* (2009) observaram uma tendência de diminuição das quatro HSPs ($\alpha\beta$ -crystalina, HSP27, HSP70 e HSP90) assim que a perda de líquido aumentava nos músculos *longissimum dorsi*, sugerindo uma relação muito próxima delas com WHC em porcos.

M. Maciez no pós-rigor

O processo mais utilizado para aumentar a maciez na carne envolve a maturação da carcaça *post mortem*. Um período de maturação considerado ótimo, de 8 a 11 dias para carcaças bovinas selecionadas, foi proposto por Smith *et al.* (1978), apesar de períodos mais longos serem utilizados pela indústria da carne. O processo de maturação (condicionamento) é acelerado com a elevação da temperatura. Por exemplo, no processo Tenderay (American Meat Institute Foundation, 1960), a carne é mantida a 15°C por um período de 3 dias e submetida a uma luz ultravioleta para controlar a deterioração microbiana superficial. Este método contrasta com o utilizado para porcos frescos, que não são maturados devido ao surgimento rápido da rancidez da gordura mesmo em baixas temperaturas. Além da temperatura, estímulos elétricos e pressurização aceleram a maturação *post mortem*, como já mencionado (Savell *et al.*, 1981; Koohmaraie *et al.*, 1984).

N. Mecanismo de amaciamento pós-rigor

Desde a última edição deste livro, grandes progressos foram feitos no entendimento da bioquímica do amaciamento da carne (Herrera-Mendez *et al.*, 2006; Luciano *et al.*, 2007; Kemp *et al.*, 2010; Huff-Lonergan *et al.*, 2010). Três sistemas de enzimas proteolíticas nos músculos parecem ter uma função no amaciamento da carne após a morte. Citadas segundo a ordem em que foram descobertas, elas são as catepsinas lisossomais, as

calpastatinas e os proteossomos ou complexos multicatalíticos (MCP) (Koohmarie e Geesink, 2006). As catepsinas foram as primeiras enzimas descobertas por De Duve *et al.* (1955), que parecem estar envolvidas na maciez da carne. As calpastatinas foram identificadas mais tarde, em cérebros de ratos, por Guroff (1964) e receberam grande atenção em função de sua capacidade de alterar a intensidade da linha Z. Estudos mais recentes sugeriram, porém, uma possível função dos proteossomos no amaciamento. Alguns pesquisadores concluíram que o proteossomo 20S é um contribuidor potencial para amaciamento da carne armazenada (Matsuiishi e Okitani, 1997; Dutaud, 1998; Lamare *et al.*, 2002; Sentandreu *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004).

1. Fator ativado por cálcio: a família calpaína

Uma protease endógena dependente de cálcio capaz de degradar o disco Z foi identificada pela primeira vez no músculo esquelético, por Busch *et al.* (1972), e subsequentemente denominada como o fator ativado por cálcio (CAF). Este fator era ativo em pH neutro na presença de íons de cálcio (Dayton *et al.*, 1975; 1976a; 1976b). Ele degrada tropomiosina, troponina T, troponina I, filamina e proteína C, sem que efeitos tenham sido detectados na miosina, actina, α -actinina ou troponina C (Dayton *et al.*, 1975; Dayton e Schollmeyer, 1980). Olson *et al.* (1977) descobriram que o CAF causa grandes mudanças nas proteínas miofibrilares. Utilizando microscópio e eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), os autores observaram degradação da linha Z, fragmentação da miofibrila e desaparecimento da troponina T, processos acompanhados pela liberação de um componente de 30 kDa da miofibrila de músculo *longissimus dorsi* bovino maturado. A presença de um componente 3 kDa já tinha sido relatada durante a maturação de músculos de frangos e de bovinos (Hay *et al.*, 1973; Penny, 1974; Samejima e Wolfe, 1976). Com a adição de íons de cálcio nas amostras de músculos moídos, Cheng and Parrish (1977) aumentaram a taxa de degradação da troponina T, liberando o componente 30 kDa. Estes resultados forneceram evidências convincentes da importância do CAF na proteólise e no amaciamento do músculo no *post mortem*.

O papel do CAF no amaciamento da carne foi demonstrado indiretamente por Olson *et al.* (1976), que descobriram que a degradação do disco Z e a fragmentação das miofibrilas nos músculos bovinos *longissimus* são correlacionadas com os índices de maciez assim como com os valores de cisalhamento de Warner-Bratzler (Tabela 3.6). Um método objetivo foi desenvolvido posteriormente para a medição da fragmentação da miofibrila, que ficou conhecido como Índice de Fragmentação de Miofibrilas (MFI), que se correlaciona com o grau de maciez de bifes de carne bovina (Olson e Parrish, 1977). Confirmação dessa relação surgiu mais tarde com outras pesquisas sobre a maciez da carne e MFI, entre as quais de Culler *et al.* (1978), MacBride e Parrish (1977), e Parrish *et al.* (1979). MacBride e Parrish (1977) introduziram o termo “fragmentação da miofibrila e maciez” para descrever a maciez em carcaças de bovinos maturados na forma convencional.

TABELA 3.6 Efeito do armazenamento post mortem (2°C) sobre o Índice de Fragmentação de Miofibrila (MFI) e a Força de Cisalhamento de Warner-Bratzler em músculos *longissimus* (L), *semitendinosus* (ST) e *psaos major* (PM)

	Dias de armazenamento <i>post mortem</i>		
	1	3	6
MFI ^a			
L	49,6 ± 1,3	69,8 ± 1,1	76,3 ± 0,9
ST	48,8 ± 0,8	68,2 ± 1,1	77,6 ± 1,0
PM	47,1 ± 0,9	49,3 ± 1,1	54,7 ± 1,0

W-B ^b			
L	2,60 ± 0,20	2,23 ± 0,17	2,13 ± 0,12
ST	3,27 ± 0,11	2,72 ± 0,09	2,64 ± 0,11
PM	2,16 ± 0,12	1,94 ± 0,11	1,86 ± 0,17

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão de cinco carcaças. Médias não sublinhadas pela mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

a Absorção por 0,5 mg de proteína miofibrila × 200.

b quilogramas de força de cisalhamento por cm².

De Olson *et al.* (1976). Copyright © Institut of Food Technologists.

As proteases dependentes do cálcio foram denominadas de calpaínas, por Murachi (1985). As calpaínas são uma grande família de cisteína proteases intracelulares, da qual 14 membros foram identificados até hoje (Goll *et al.*, 2003). As três isoformas principais de calpaínas encontradas no músculo esquelético são: μ -calpaína, m-calpaína e calpaína específica esquelética, p94 ou calpaína 3, além da calpastatina, um inibidor das μ - e m-calpaínas (Koochmaraie e Geesink, 2006). A calpaína 3/p94 parece se ligar a titina na linha N₂ (Sorimachi *et al.*, 1995; Kinbara *et al.*, 1998), local onde a proteólise tem sido associada com o amaciamento (Taylor *et al.*, 1995). Quando não está ligada à titina, a calpaína 3 autoliza-se rapidamente, mesmo na ausência de Ca²⁺ (Kinbara *et al.*, 1998; Spencer *et al.*, 2002). Em decorrência da dificuldade de purificar a calpaína 3 ativa, seu envolvimento no amaciamento foi determinado correlacionando-se sua expressão ou autólise com a proteólise e o amaciamento. Parr *et al.* (1999a) não conseguiram encontrar nenhuma associação entre a quantidade ou autólise da calpaína 3 e as alterações na maciez da carne. Ao contrário, correlações significativas foram encontradas por Illian *et al.* (2004a; 2004b) entre a velocidade de autólise da calpaína 3 com a proteólise da carne e seu amaciamento. No entanto, em estudos posteriores realizados por Geesink *et al.* (2011), em ratos transgênicos com superexpressão de calpastatina, foi verificado que a ativação da calpaína 3 por autólise produziu apenas alterações negligenciáveis na proteólise no *post mortem*. A calpaína 3, portanto, parece ter uma pequena função, se é que possui alguma, na proteólise do músculo no *post mortem*. As duas outras isoformas, no entanto, diferem quanto à quantidade de Ca²⁺ de que precisam para sua ativação. Por exemplo, a μ -calpaína requer entre 5 μ M e 60 μ M de Ca²⁺ para atingir a metade de sua atividade máxima, comparada com 300 μ M a 1000 μ M de Ca²⁺ para a m-calpaína (Goll *et al.*, 1992). Entre as duas isoformas, a μ -calpaína parece ser aquela que possui maior função na degradação *post mortem* das proteínas miofibrilares associadas com o amaciamento (Geesink *et al.*, 2000a; Hopkins e Thompson, 2002; Koochmaraie *et al.*, 2002). A μ -calpaína, por sua especificidade limitada, não é capaz de degradar proteínas para seus aminoácidos constituintes, ou degradar a miosina ou a actina, as principais proteínas miofibrilares. Um modelo proposto por Goll *et al.* (2003) e Neti *et al.* (2009) sugere que as calpaínas liberam miofilamentos a partir das microfibrilas que, em seguida, são completamente degradadas em aminoácidos por proteossomos e lisossomos.

2. Calpastatina

A calpastatina – um inibidor endógeno das enzimas calpaínas – é encontrada em todos os tecidos que contêm calpaínas. Trata-se de uma proteína altamente polimórfica que requer níveis de cálcio similares àqueles necessários à ativação das calpaínas (Goll *et al.*, 2003). A calpastatina é suscetível à proteólise, apesar dos fragmentos de proteínas resultantes reterem sua capacidade inibitória. Pela capacidade das calpastatinas inibir calpaínas, sua presença em altos níveis deve, naturalmente, prevenir ou reduzir a proteólise da carne e o amaciamento. Este fato pode ser observado na Figura 3.22, uma vez que a seleção aleatória de porcos comerciais com altos níveis de calpastatina conduziu a uma incidência mais alta de dureza na carne algumas horas depois de terem sido abatidos (Sensky *et al.*, 1998; Parr *et al.*, 1999b).

O componente genético da qualidade da carne é extremamente complexo, pois aspectos importantes como a cor, o sabor, suculência, o conteúdo de gordura e a maciez são controlados por vários genes do genoma, conhecidos como “locais quantitativos característicos” (QTL). O QTL, que tem grande efeito na maciez da carne de porcos, foi localizado na mesma posição do cromossomo 2 dos porcos (SSC2q) (Stearns *et al.*, 2005). Entre os genes localizados em tal região está a calpastatina (CAST). Mutações no CAST, que resultam em cadeias desreguladas da atividade da calpaína e no aumento da maciez, foram examinadas em numerosas pesquisas (Parr *et al.*, 1999b; Ciobanu *et al.*, 2004). Uma análise comparativa do SSC2q, realizada por Meyers *et al.* (2007), demonstrou que é ortólogo a um segmento do cromossomo humano 5 (HSA5) e contém um gene forte candidato posicional (CAST). A associação de alguns dos polimorfos do CAST às características de qualidade da carne deve proporcionar melhor entendimento da base molecular da maciez da carne de porcos.

Em trabalho posterior, Nonneman *et al.* (2011) ressequenciaram e transcreveram as regiões regulatórias da calpastatina nos porcos, com valores diferentes e divergentes forças de cisalhamento. Essas informações possibilitaram a identificação de mutações que podem afetar a maciez, com um total de 194 polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) identificados. Deles, quatro SNPs foram consistentemente associados à maciez da carne dos 2.826 porcos examinados em quatro populações diferentes. Nonneman *et al.* (2011) concluíram que esses marcadores de calpastatina podem ser utilizados para prever a maciez em populações de porcos. Também há marcadores disponíveis nos genes da calpastatina e da μ -calpaína para selecionar gado de corte com propensão genética para produzir carne tenra (Casas *et al.*, 2006).

3. Roteases lisossomais

Há algum tempo, as proteases lisossomais – as catepsinas – eram consideradas os principais agentes de amaciamento da carne no *post mortem* (Bate-Smith, 1948). Contudo, sua função exata no amaciamento no *post mortem* continua inconclusiva, uma vez que a ação na degradação dos substratos principais das catepsinas, actina e da miosina é limitada no condicionamento *post mortem* (Koohmaraie *et al.*, 1991). Além disso, estas enzimas devem ser liberadas pelos lisossomos para acessar as proteínas das miofibrilas (Hopkins and Taylor, 2002). O rompimento da membrana lisossomal, no entanto, pode ocorrer em condições de pH baixo e altas temperaturas das carcaças *post mortem* (O'Halloran *et al.*, 1997). Acima de tudo, parece haver poucas associações entre as atividades das catepsinas e a maciez da carne (Whipple *et al.*, 1990). Catepsinas incluem exopeptidases e endopeptidases e são classificadas em cisteínas peptidases (catepsinas B, H, I e X), aspártico peptidases (catepsinas D e E) e serina peptidases (catepsinas G) (Sentandreu *et al.*, 2002). Exibem pH ótimo ao redor de 5,5 e são ativas a 37°C. Schwartz e Bird (1977) demonstraram que as catepsinas B e D de músculos de ratos são capazes de hidrolisar miosina. Uma catepsina de músculo de coelho também foi capaz de hidrolisar miosina, α -actinina e actina (Okitani *et al.*, 1980). A catepsina B também foi capaz de degradar a troponina T (Noda *et al.*, 1981) e a actina (Hirao *et al.*, 1984). Pesquisas posteriores são necessárias para identificar as atividades das catepsinas B e D nos músculos *post mortem* (Parrish e Lusby, 1983). Os efeitos combinados do CAF e da catepsina D nas miofibrilas dos músculos *longissimus dorsi* de ovinos foram examinados por Elgasim *et al.* (1985). Em ambos os casos houve uma perda da linha Z, mas na ação do CAF, ela foi totalmente destruída. As proteínas da linha Z, a α -actinina, a desmina e a actina foram degradadas ou liberadas por qualquer uma das enzimas. O CAF degradou a desmina e liberou α -actinina sem, contudo, afetar a actina. A catepsina D afetou principalmente a α -actinina, com pouco ou mesmo nenhum efeito sobre a actina ou a desmina. Apesar de inconclusiva, parece que estas duas enzimas agem de modo cooperativo na degradação de proteínas miofibrilares.

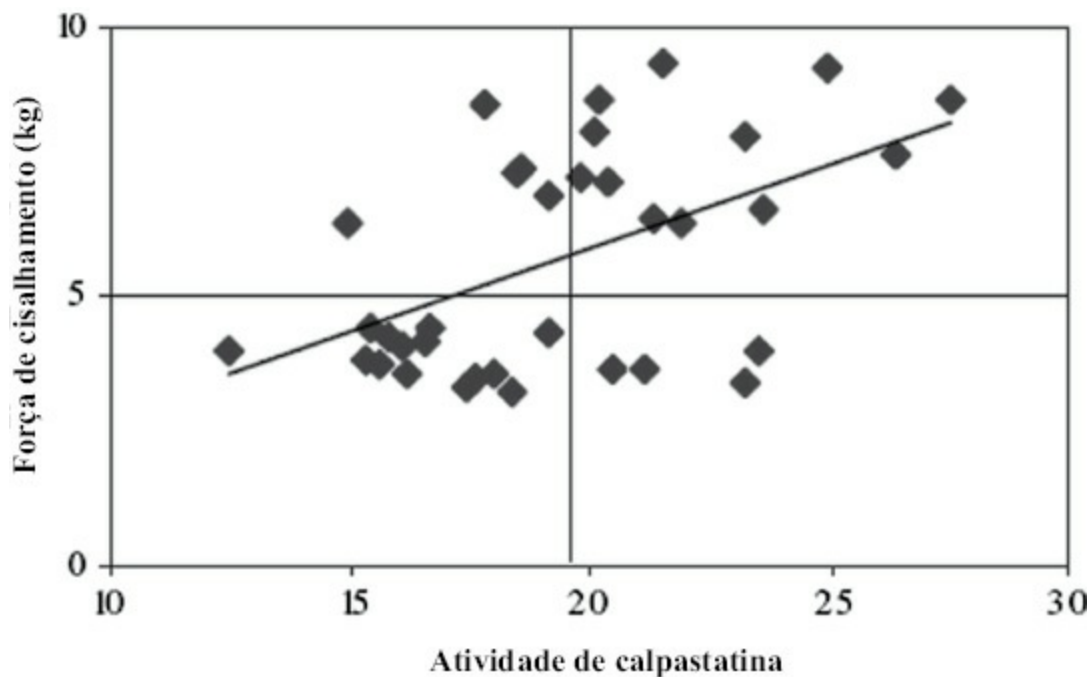


FIGURA 3.22 Correlação entre atividade de calpastatina no abate (2 horas) ($\times 10^7$ unidades de fluorescência/kg) e força de cisalhamento em 8 dias em *longissimus dorsi* (LD) suíno. Kemp *et al.* (2010).

Mikami *et al.* (1987) demonstraram que a catepsina L purificada, preparada a partir de músculos de ratos, pode degradar titina, nebulina, proteína c, α -actinina, cadeias leves de miosina e tropomiosina em miofibrilas obtidas de ratos, frangos e carne bovina. Danos decorrentes da catepsina ocorreram com maior rapidez em miofibrilas de frangos e com menor rapidez em miofibrilas de carne bovina, fato consistente com o condicionamento mais rápido de frangos. Thomas *et al.* (2004) examinaram o papel dos proteassomos e das catepsinas no amaciamento de carne de avestruz. Enquanto a catepsina D permaneceu muito ativa durante os 12 dias de maturação *post mortem* a 4°C, as atividades das catepsinas B, L e H foram mínimas durante as primeiras horas *post mortem*, mas aumentaram substancialmente após 12 dias. Os resultados sugerem que a catepsina D tem uma função de amaciamento na carne de avestruz, uma vez que a B, L e H não se mostraram ativas até o dia 1. Pesquisas prévias com carne de avestruz realizadas por Van Jaarsveld *et al.* (1997) revelaram que as atividades das catepsinas B, B + L e D permaneceram estáveis depois de 12 dias de armazenamento a 4°C. Ao contrário, somente a atividade da catepsina H diminuiu sensivelmente, cerca de 40%, durante este período. Estes resultados parecem esclarecer a controvérsia em torno do papel da catepsina na proteólise *post mortem* discutida por Sentandreu *et al.* (2002).

A presença da catepsina nos músculos dos peixes foi relatada pela primeira vez por Makinodan e Ikeda (1976). Esta enzima foi posteriormente purificada por Toyohara *et al.* (1982) em músculo de carpa, porém não parece estar diretamente envolvida na proteólise *post mortem* no músculo dos peixes. Pesquisas posteriores realizadas por Aoki e Ueno (1997) atribuíram a degradação *post mortem* de músculos brancos maturados de cavalas a 0°C à ação da catepsina L. Embora alguns estudos tenham sido feitos sobre catepsinas nos músculos de algumas espécies de peixes (Wojtowicz e Odense, 1972; Matsumiya e Mochizuki, 1993; Porter *et al.*, 1996), uma pesquisa mais ampla da sua distribuição em 24 espécies de peixes foi realizada por Aoki *et al.* (2000). Com exceção da catepsina D, peixes marinhos de carne vermelha tinham conteúdo mais alto de catepsinas B, similar a B, L e latente L, quando comparados a peixes marinhos de carne branca e peixes de águas doces. Desde que Yamashita e Konagay (1990b; 1991) revelaram que a catepsina L é a principal causadora da degradação e do amaciamento dos tecidos em salmões, a grande quantidade da enzima em carne vermelha de peixes marinhos pode explicar por que eles se degradam e amolecem tão rapidamente durante a estocagem.

4. Proteassomos

Proteassomo – um complexo de proteases multicatalítico – é a principal enzima responsável pela degradação de proteínas no citosol e no núcleo. Os proteassomos estão envolvidos em muitos processos biológicos e são especialmente abundantes nos músculos esqueléticos (Robert *et al.*, 1999). A forma mais comum de proteassomos é o 26S, que contém uma subunidade 19S regulatória e um centro catalítico 20S. O proteassomo 20S, também conhecido como complexo de proteases multicatalítico (MCP), é o centro catalítico dos complexos de proteases (Dahlmann *et al.*, 2001). Ele existe como entidade livre ou como parte de um núcleo de partículas grandes com muitas propriedades proteolíticas. Apesar de, no início, o proteassomo 20S ter sido considerado incapaz de degradar proteínas ou polipeptídeos, estudos posteriores verificaram que há atividades de endopeptidase e de exopeptidase (Forster e Hill, 2003; Liu *et al.*, 2003; Orłowski e Wilk, 2003). Vários estudiosos também defendem que o proteassomo 20S pode degradar proteínas de miofibrilas e miofibrilares *in vivo* (Taylor *et al.*, 1995; Matsuishi e Okitani, 1997). Dutaud *et al.* (2006) confirmaram a capacidade do proteassomo 20S de degradar a banda Z em vitela com pH igual a ou maior que 5,8. O papel potencial de ambos, proteassomos e catepsinas, no amaciamento da carne de avestruz foi relatado por Thomas *et al.* (2004). Koohmaraie e Gesink (2006) verificaram que o padrão de degradação de proteínas miofibrilares incubadas com proteassomos 20S difere do que foi visto nos músculos no *post mortem*. Isto não exclui, no entanto, que o proteassomo possa contribuir na proteólise *post mortem* (Houbak *et al.*, 2008).

5. Proteômica e a maciez da carne

Utilizando proteômicas, Morzel *et al.* (2008) demonstraram a importância da contribuição das proteínas sarcoplasmáticas em músculos *longissimus thoracis* bovinos para a maciez e a qualidade da carne para consumo. A succinato desidrogenase (SDH) foi considerada o melhor fator para prever a maciez inicial e a geral, sendo responsável por 67,6% e 57,8% da variação dos aspectos do sabor. Além disso, uma análise de regressão demonstrou que a proteína HSP27, depois de choques de calor em carne bovina maturada, é responsável por 91% da variação nos índices sensoriais. Com base em dados coletados em biópsias e amostras de músculos bovinos *longissimus thoracis* logo após a morte, Jia *et al.* (2009) identificaram uma enzima antioxidante, a peroxiredoxina-6, como provável marcador em potencial para a maciez da carne.

O. Citoesqueleto e a maciez da carne

1. Filamentos G

Davey e Graffhuis (1976) cozinham músculos de pescoço bovino por longo período e verificaram que os filamentos G permanecem intactos quando a carne não estava maturada. A maciez das proteínas miofibrilares envolve o enfraquecimento dos filamentos G. King (1984) observou que a degradação rápida da titina, uma das principais proteínas que compõem os filamentos G, ocorre em temperaturas elevadas assim como a 0°C e 15°C. Seus resultados diferem daqueles descritos por Locker e Wild (1984), que observaram que a titina é muito resistente às enzimas durante a maturação por até 20 dias a 15°C. A nebulina, no entanto, desapareceu em um prazo de dois dias, acompanhada por uma melhora na maciez. Nenhuma mudança significativa na titina foi constatada, apesar de uma nova banda H ter sido detectada por eletroforese em poliacrilamida (Locker e Wild, 1984). Em estudo posterior, Lusby *et al.* (1983) examinaram a maturação de músculo *longissimus dorsi* de carne bovina em três temperaturas de estocagem diferentes (2°C, 25°C e 37°C) por um período de 7 dias. A nebulina também se degradou rapidamente e houve o aparecimento de uma nova banda que corresponde à banda B observada por Locker e Wild (1984). Lusby *et al.* (1983) afirmaram que a titina-1 converte-se em titina-2 à medida que o tempo e a temperatura aumentam. Locker (1984), porém, apontou que os resultados das fotografias dos géis

não eram conclusivos devido à baixa resolução de separação das bandas de proteínas. Paterson e Parrish (1987) notaram algumas pequenas diferenças no conteúdo de titina entre músculos macios e duros 7 dias após a morte. A titina nativa T1 (3.000 kDa) foi degradada mais tarde, logo depois do *post mortem*, em um produto principal de degradação, T2 (2.000 kDa) (Wang *et al.*, 1979; Kurzban e Wang, 1988) e um subfragmento (1.200 kDa) (Matsuura *et al.*, 1988) por clivagem na região da banda I (Furst *et al.*, 1988). Utilizando um método de anticorpos monoclonais para a titina (9 D 10), desenvolvido por Wang e Greaser (1985), Ringkob *et al.* (1988) demonstraram a ocorrência de uma alteração na forma da titina do músculo bovino em até dois dias após a morte. Análises das seções de músculos e miofibrilas por microscopia imunofluorescente permitiram monitorar as alterações na banda I ao mostrar a transição dos padrões de coloração de duas para quatro bandas pelo anticorpo antititina, por sarcômero, no músculo após 24 a 48 horas de estocagem. Observação similar foi feita por Fritz e Greaser (1991) em músculos bovinos no *post mortem*. Esta conclusão aponta para a ocorrência de proteólise da titina ou de outra proteína à qual a titina pode estar ligada.

Vários pesquisadores usaram microscópio eletrônico para demonstrar a ocorrência da clivagem de miofibrilas próximo da linha Z durante a estocagem *post mortem* (Davey e Graafhuis, 1976; Taylor *et al.*, 1995). Boyer-Berri e Greaser (1998) determinaram se alterações nos padrões de imunofluorescência da titina próximos à linha Z ocorrem no *post mortem* e se essas alterações são afetadas pelo tipo do músculo. Utilizando um anticorpo contra um fragmento de titina de 56 kDa (FE-RE) localizada na linha Z, eles examinaram miofibrilas de carne maturada e não maturada obtidas de quatro músculos (*cutaneus trunct*, *rectus abdominis*, *psoas major* e *masseter*) de 4 novilhos. Seus resultados sugeriram que durante a maturação *post mortem* as interações entre a titina e a actina com a linha Z e a linha N1 podem ficar enfraquecidas pois alguns fragmentos de titina (FE RE) foram capazes de se afastar da região da linha Z da titina. Estas foram as primeiras evidências do rearranjo da titina da região da linha Z durante a maturação *post mortem* que pode ser relacionado com a fragmentação da linha Z e com o aumento da fragilidade da miofibrila. Tais mudanças na titina também podem estar envolvidas no desenvolvimento da maciez *post mortem*.

2. Filamentos intermediários

A degradação da desmina, que tem função na ligação ou na união das miofibrilas adjacentes, pode causar alterações físicas no músculo *post mortem*. Robson *et al.* (1984) monitoraram as mudanças em três das principais frações de desmina isoladas do músculo esquelético bovino durante a maturação *post mortem* por até 7 dias a 15°C por SDS-PAGE. Foi observada apenas uma pequena diminuição na quantidade de desmina após 1 dia, apesar de depois de 7 dias de estocagem uma perda substancial de desmina intacta tornou-se evidente. Esta mudança ocorreu paralelamente a um declínio da troponina T (banda 37 kDa) que desapareceu depois de 7 dias de armazenamento e foi substituída por uma banda de cerca de 30 kDa, como já tinha sido observado por Olson *et al.* (1977). A degradação da desmina pode ocorrer através do CAF, uma vez que O'Shea *et al.* (1979) demonstraram-na utilizando desmina purificada. A degradação da desmina, portanto, e dos filamentos intermediários conectados, pode ter papel importante na maciez da carne durante a maturação (Yamaguchi *et al.*, 1982; 1983a; 1983b).

P. Efeito da pressurização na maciez

1. Tratamento a alta pressão

Tem sido descrito que pressurizações no pré-rigor aumentam a maciez da carne (Macfarlane, 1973; Elgasim, 1977; Kennick *et al.*, 1980). Como discutido na seção I, essa abordagem foi descontinuada e substituída pelo tratamento de alta pressão na carne pós-rigor. Contudo, nenhuma melhora na maciez da carne, foi inicialmente observada por

Bouton *et al.* (1977) em carnes no pós-rigor submetidas a tratamento de alta pressão a baixas temperaturas (< 30°C). Ao combinar alta pressão com calor, verificaram que uma temperatura ótima de 55-60°C aumentou a maciez da carne pós-rigor. Ma e Ledward (2004) trataram músculo bovino *longissimus dorsi* no pós-rigor, a altas pressões de até 800 MPa em temperaturas entre 20-70°C por 20 minutos. Embora nenhum efeito de amaciamento tenha sido observado a temperaturas abaixo de 60°C, uma importante diminuição na dureza da carne foi obtida a 200 MPa e entre 60-70°C. Uma melhora significativa na maciez da carne bovina pós-rigor do músculo *sternomandibularis* tratada com alta pressão e alta temperatura quando comparada a carne crua ou tratada com calor (200 MPa a 60°C) foi relatada recentemente por Sikes *et al.* (2010).

Uma vez que as enzimas dos músculos que são importantes no amaciamento da carne são suscetíveis à alta pressão, muitas pesquisas investigaram os efeitos de tal tratamento. Elgasim (1977) propôs que melhorias na maciez induzida por pressurização pré-rigor podem estar relacionadas com atividades lisossomais. Exames de músculos bovinos *longissimus* expostos a diferentes níveis de pressão, realizados por Elgasim *et al.* (1983), sugerem a ocorrência em função da liberação antecipada de enzimas lisossomais quando as condições de pH e de temperatura ainda permitem rápida atividade enzimática; as conclusões foram baseadas na degradação da linha Z observada no músculo pressurizado 24 horas após o *post mortem*. O pH do músculo estava abaixo de 6,0 após a pressurização, fato que já havia demonstrado facilitar a atividade da catepsina D, uma enzima lisossomal (Eino e Stanley, 1973; Robbins e Cohen, 1976). Desde que as catepsinas estão encapsuladas no interior de corpos lisossomais, sua participação na maturação e no amaciamento da carne requer que sejam liberadas no citosol (Goll, 1983). Assim, a melhora da maciez associada à pressurização pré-rigor pode ser explicada, em parte, pela liberação rápida das enzimas lisossomais, o que ficou evidenciado em um estudo de Homma *et al.* (1994), que monitoraram fosfatase ácida como índice do rompimento da membrana lisossomal. Um aumento na atividade da fosfatase ácida foi acompanhado por uma elevação das atividades das catepsinas B, D e L com pressões de até 400 MPa. Um aumento maior na pressão de até 500 MPa, no entanto, fez decrescer a atividade das catepsinas. Usando microscópio eletrônico para examinar a integridade da membrana dos lisossomos, Jung *et al.* (2000) estabeleceram uma correlação entre as atividades das enzimas lisossomais e a integridade dos lisossomos do músculo da carne bovina submetidos a alta pressão. As atividades da fosfatase ácida foram sempre maiores na carne tratada a pressão do que no controle, e aumentavam com a pressão e com o tempo. No caso da catepsina D, somente pressões mais altas causaram um aumento significativo das atividades. Os valores mais altos foram observados para catepsina D, quando o músculo da carne foi submetido à pressão de 500-600 MPa por períodos curtos, menores que 200 segundos. Utilizando microscopia imunoeletrônica, Kubo *et al.* (2002) observaram que a liberação da catepsina D de músculos *longissimus thoracis* de coelhos, pressurizados a 100 MPa por 5 minutos, foi seguida pela absorção da catepsina nas microfibrilas. Uma breve exposição à alta pressão pareceu ter um efeito mais drástico no músculo do que o condicionamento normal a 2-4°C por 7 e 14 dias.

Homma *et al.* (1995) observaram que a atividade da calpaína diminuiu em carne submetida a pressões acima de 100 MPa e foi inativada acima de 300 MPa. Carne pressurizada a 200 MPa ainda possuía atividade de calpaína, ao passo que a calpastatina foi completamente inativada. A presença da atividade de calpaína em carne pressurizada abaixo de 300 MPa, no entanto, sugere que ela ainda pode ter alguma função no amaciamento. A purificação de proteassomos de músculos de coelhos, realizada por Otsuka *et al.* (1998), revelou aumento da atividade a 150 MPa, que diminuiu com pressões mais altas. Usando microscópio eletrônico, eles descreveram falhas entre as estruturas dos filamentos, a perda completa da linha M e a perda parcial da linha Z em decorrência da ação dos proteassomos.

2. Ondas de choque de alta pressão

Muitas patentes descrevem ondas de choque a alta pressão como método alternativo para o amaciamento da carne (Godfrey, 1970; Long, 2000). Conhecida como tecnologia de ondas de pressão hidrodinâmica (HDP), inclui a

detonação, debaixo da água, de explosivos que geram pressão mediante ondas de choque em carnes submersas em uma câmara de testes (Solomon *et al.*, 1997). A onda de choque a alta pressão gerada por explosivos resultou em grande melhora na maciez da carne bovina, de porco, cabrito e frango (Solomon *et al.*, 1997; 1998; Meek *et al.*, 2000; Claus *et al.*, 2001a). O efeito das ondas de choque foi instantâneo, com a melhora na maciez alcançando de 37% a 57%, equivalente à obtida por maturação (Solomon, 1998). Como alternativa para os explosivos, descargas elétricas compactas de alta eficiência foram testadas para gerar ondas de choque para amaciamento da carne (Schaefer 2004a-d, 2005). Descargas elétricas têm efeitos similares aos explosivos, mas diferem por serem fontes acústicas elétricas de ondas de choque de alta pressão. Alguma melhora da maciez utilizando descargas elétricas havia sido observada previamente em carne de aves, bovina e suína (Claus *et al.*, 2001b; Claus, 2002; Sagili e Claus, 2003). Um estudo recente de Bowker *et al.* (2011) mostrou mudanças favoráveis na maciez de lombos de carne bovina utilizando descargas elétricas de alto poder e eficiência consistente com estudos prévios que utilizaram ondas de choque.

Q. Enzimas lisossomais e degradação do colágeno

Os efeitos possíveis das enzimas lisossomais no tecido conectivo de músculos bovinos foram estudados por Wu *et al.* (1981). Eles demonstraram que condicionamento a altas temperaturas (37°C) leva à liberação de enzimas lisossomais e à intensificação da solubilização do colágeno. O aumento da hidrólise das fibras de colágeno na presença de glicosidases lisossomais foi atribuído à degradação dos componentes proteoglicanas, que, normalmente, interferem com a degradação do colágeno pela colagenase (Eyre e Muir, 1974; Osebold e Pedrini, 1976).

V. PIGMENTOS DA CARNE

A aceitação pelo consumidor de carne fresca empacotada é influenciada, em primeiro lugar, pela cor (Pirko e Ayres, 1957). O vermelho vivo da carne fresca, causado pelo pigmento oximioglobina, é preferido pela maior parte dos consumidores, comparado à carne com coloração mais escura ou amarronzada. A metamioglobina é o pigmento responsável pela cor marrom, desenvolvido durante a estocagem da carne e é em geral reconhecido pelos consumidores como indicador de falta de frescor. Conseqüentemente, sua predominância em produtos de carne empacotada resulta em rejeição. Esta descoloração de carnes embaladas, conhecida na indústria como “perda do frescor”, é associada pelo consumidor ao crescimento de bactérias, apesar de não ser uma constante. O consumo anual de carne, principalmente de carne bovina, é bem maior do que 100 lb *per capita* nos Estados Unidos, e adquirido, em sua maior parte, como carne crua. Quaisquer alterações deletérias na natureza dos pigmentos caracterizam grande preocupação para a indústria da carne, pois afeta o mercado consumidor. Aproximadamente 15% da carne bovina vendida no varejo têm preços mais baixos em consequência da descoloração da superfície (Smith *et al.*, 2000), de modo que é importante, em termos econômicos, manter o vermelho vivo associado à carne fresca.

O principal pigmento da carne é a mioglobina, que tem cor vermelho-púrpura. Considerava-se que a hemoglobina – o pigmento vermelho do sangue – desempenhava um papel menor, uma vez que o sangue normalmente é drenado da carcaça depois da morte. No entanto, Solberg (1968) afirmou que a cor desejável para a carne é influenciada pela mioglobina e pela hemoglobina. Enquanto a quantidade de hemoglobina observada na carne varia muito segundo a literatura, a quantidade relativamente pequena pode ser importante em termos de cor e de estabilidade.

A mioglobina é responsável por 10% do total de ferro no animal antes da morte, mas no caso de carcaças bem

drenadas pode ser responsável por 95% do total do ferro (Clydesdale e Francis, 1971). Uma vez que a maioria dos estudos sobre a cor da carne tem sido relacionada com a mioglobina, esta seção vai limitar seu foco às alterações atribuídas a esse pigmento.

A. Mioglobina

A mioglobina é uma proteína solúvel em água composta por uma única cadeia de polipeptídeo, a globina, que contém oito α -hélices. Ela é conectada a um grupo prostético heme, um complexo de íons (II) protoporfirina-IX (Pegg e Shahidi, 1997). Este último consiste em quatro grupos pirrólicos contendo um átomo de ferro localizado no centro (Figura 3.23). As massas moleculares das mioglobinas de mamíferos são geralmente maiores do que as de peixes e variam de 14 a 18 kDa (Satterlee e Zecharia, 1972; Fosmire e Brown, 1976; Yamaguchi *et al.*, 1979; Ueki e Uchiai, 2004; Chaijan *et al.*, 2007). Os principais fatores responsáveis pela cor da carne são o estado de valência do átomo de ferro e o ligante unido ao sítio de ligação livre do heme (Seideman *et al.*, 1984).

1. A estrutura primária das mioglobinas

A estabilidade da mioglobina varia entre as espécies por causa das diferenças entre as sequências de aminoácidos de suas respectivas globinas assim como pelas estruturas secundárias. Nos últimos anos, as estruturas primárias da mioglobina de cabra, peru, bisão, atum e sardinha foram determinadas (Chaijan *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2010; 2011; Suman *et al.*, 2009). A estrutura primária completa da mioglobina isolada de cabra foi determinada por meio da degradação de Edman e tríptica e peptídeos de brometo de cianogênio, por Suman *et al.* (2009). Eles compararam a sequência de aminoácidos da mioglobina da cabra com a homologia da sequência da mioglobina de ruminantes conhecidos (cabrito, gado, búfalo e veado). A mioglobina da cabra é similar àquela de outros animais domésticos e possui 153 resíduos. No entanto, a sequência de aminoácidos na mioglobina das cabras difere daquela das ovelhas e de outros ruminantes. Como um pequeno animal ruminante que fornece carne, a mioglobina da cabra assemelha-se mais à de ovelhas do que de ruminantes maiores. As mioglobinas de cabras e ovelhas diferem entre si pela substituição de dois aminoácidos, sendo os de baixa massa molecular, a treonina e a glicina, encontrados nas posições 8 e 52 na mioglobina da cabra, comparados com os aminoácidos maiores, glutamina e ácido glutâmico, nas posições 8 e 52 na mioglobina de ovelhas (THRcabra8GLN ovelha e GLYcabra52GLU ovelha) (Figura 3.24). As histidinas distal (HIS64) e proximal (HIS94), importantes para a estabilização do grupo heme e na coordenação da ligação do oxigênio em outros produtos de carne de animais domésticos, também foram conservadas na mioglobina da cabra. Utilizando as mesmas técnicas, Joseph *et al.* (2011) determinaram a sequência completa de aminoácidos da mioglobina do peru. A porcentagem das similaridades da sequência entre a mioglobina do peru e outras mioglobinas está resumida na Tabela 3.7. A sequência de aminoácidos da mioglobina do peru é idêntica à da mioglobina do frango, e compartilha 92,5% de homologia do avestruz, 76,5% do porco e menos de 73% com mioglobinas de ruminantes.

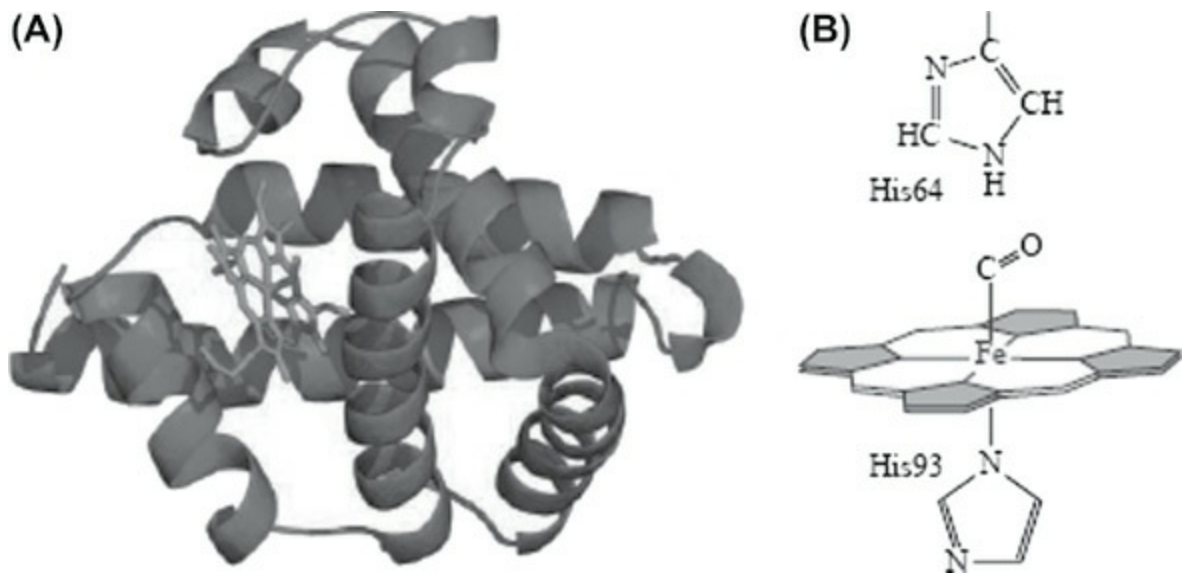
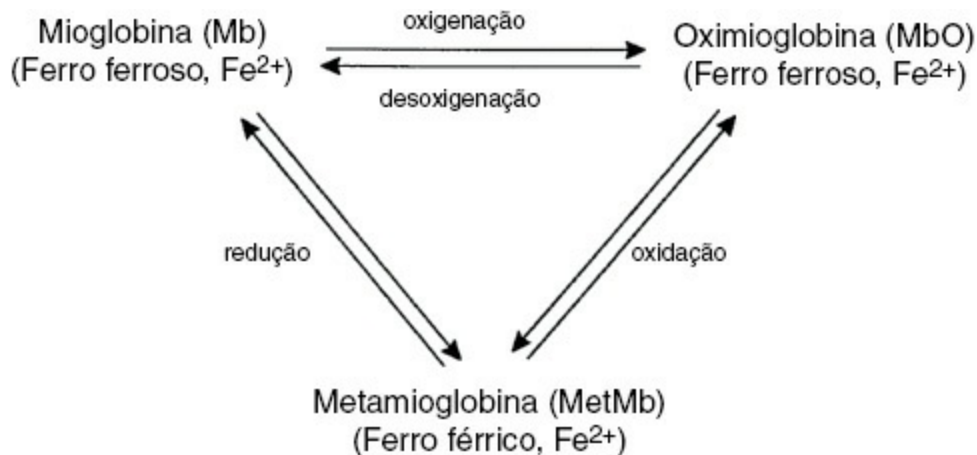


FIGURA 3.23 A mioglobina consiste de uma cadeia e grupo prostético heme. (A) A cadeia de mioglobina consiste de oito α -hélices enrolados em torno de uma bolsa central contendo um grupo heme. (B) O grupo protoheme é agrupado ou estabilizado por resíduos de histidina acima (His64) e abaixo (His93). Ordway e Garry (2004).

2. Alterações da mioglobina na carne crua

Estudos feitos com a descoloração da carne crua enfocam, sobretudo, a formação da metamioglobina na carne pós-rigor. A cor da carne crua é determinada pelas proporções relativas das três principais formas da mioglobina (Watts *et al.*, 1966). Elas incluem os três estados oxidativos da mioglobina: a oximioglobina, a deoximioglobina e a metamioglobina. A forma predominante da mioglobina em carne vermelho vivo é a oximioglobina, na qual a mioglobina liga-se ao oxigênio. A deoximioglobina – a forma reduzida da mioglobina – é um pigmento púrpura ligado à água (ou com oxigênio removido) e é facilmente convertido em oximioglobina. Ao contrário, a cor marrom, indesejada, associada às carnes com descoloração é a metamioglobina, na qual a valência do ferro é convertida para a forma férrica.

Quando o animal é abatido, o oxigênio não está mais disponível para o tecido muscular, o que resulta na conversão da oximioglobina em deoximioglobina. Outras alterações durante este período incluem o pH, temperatura, pressão osmótica e potencial de oxidação e redução (Tabela 3.8). Em tais condições, as alterações dos pigmentos que ocorrem na carne são fonte de grande preocupação para os tecnólogos de alimentos. A metamioglobina, o indesejável pigmento marrom, está em equilíbrio com as outras formas dos pigmentos, como demonstrado no Esquema 3.5. Outras reações de degradação são mediadas pela ação de bactérias, que causam danos irreversíveis ao anel de porfirina, conduzindo à formação de pigmentos da bile, cooglobina, sulfamioglobina e a oxisulfamioglobina, assim como outros compostos de nitrogênio que são característicos de deterioração da carne.



ESQUEMA 3.5 Alterações da mioglobina em carne fresca.

Sequence No.	10	20	30	40	50
Cabra	GLSDGEW T LV	LNAWGKVEAD	VAGHGQEVLI	RLFTGHPETL	EKEDKFKHLK
Ovelha	GLSDGEW Q LV	LNAWGKVEAD	VAGHGQEVLI	RLFTGHPETL	EKFDKFKHLK
Gado	GLSDGEWQ L V	LNAWGKVEAD	VAGHGQEVLI	RLFTGHPETL	EKFDKFKHLK
Búfalo	GLSDGEWQ L V	LNAWGKVETD	VAGHGQEVLI	RLFTGHPETL	EKFDKFKHLK
Cervo	GLSDGEWQ L V	LNAWGKVEAD	VAGHGQEVLI	RLFTGHPETL	EKFDKFKHLK
Sequence No.	60	70	80	90	100
Cabra	T GAEMKASED	LKKHGNTVLT	ALGGILKKKG	HHEAEVKHLA	ESHANKHKIP
Ovelha	T EAEMKASED	LKKHGNTVLT	ALGGILKKKG	HHEAEVKHLA	ESHANKHKIP
Gado	TEAEMKASED	LKKHGNTVLT	ALGGILKKKG	HHEAEVKHLA	ESHANKHKIP
Búfalo	TEAEMKASED	LKKHGNTVLT	ALGGILKKKG	HHEAEVKHLA	ESHANKHKIP
Cervo	TEAEMKASED	LKKHGNTVLT	ALGGILKKKG	HHEAEVKHLA	ESHANKHKIP
Sequence No.	110	120	130	140	150
Cabra	VKYLEFISDA	IIHVLHAKHP	SDFGADAQGA	MSKALELFRN	DMAAQYKVLG FQG
Ovelha	VKYLEFISDA	IIHVLHAKHP	SDFGADAQGA	MSKALELFRN	DMAAQYKVLG FQG
Gado	VKYLEFISDA	IIHVLHAKHP	SDFGADAQAA	MSKALELFRN	DMAAQYKVLG FHG
Búfalo	VKYLEFISDA	IIHVLHDKHP	SDFGADAQAA	MSKALELFRN	EMAAQYKVLG FHG
Cervo	VKYLEFISDA	IIHVLHAKHP	SNFGADAQGA	MSKALELFRN	DMAAQYKVLG FQG

FIGURA 3.24 Comparação de seqüências de aminoácidos de mioglobina de cabra e de outro ruminante. Diferenças entre mioglobina de ovelhas e cabras nas posições 8 e 52 são em caixas. Cabra = *Capra hircus*; ovelha = *Ovis aries*; gado = *Bos taurus*; búfalo = *Bubalus bubalis*; cervo = *Cervus elaphus*. Suman *et al.* (2009).

TABELA 3.7 Porcentagem das similaridades da seqüência entre a mioglobina do peru e outras mioglobinas

Espécies	Peru	Frango	Avestruz	Porco	Boi	Búfalo	Ovelha	Cabra
Peru	100							
Frango	100	100						

Avestruz	92,8	92,8	100					
Porco	76,5	76,5	74,5	100				
Boi	72,5	72,5	70,6	88,2	100			
Búfalo	71,2	71,2	69,9	86,9	98,0	100		
Ovelha	72,5	72,5	70,6	89,5	98,7	96,7	100	
Cabra	71,9	71,9	69,9	88,2	97,4	95,4	98,7	100

Peru: *Meleagris gallopavo*; frango: *Gallus gallus*; ostrich: *Struthio comelus*; porco: *Sus scrofa*; boi: *Bos taurus*; ovelha: *Ovis aries*; cabra: *Capra hircus*. Joseph et al. (2011).

TABELA 3.8 Comparação entre tecido de músculo vivo e carne

Condição	Músculo vivo	Carne <i>post rigor</i>
Mioglobina	oximioglobina	mioglobina
pH	7,35–7,43	5,3–5,5
Temperatura (°C)	37,7–39,1	2–5
Pressão osmótica (% NaCl equiv.)	0,936	
Potencial de oxidação e redução (mV)	+250	–50

De Solberg (1970).

3. Alterações da mioglobina e tensão de oxigênio

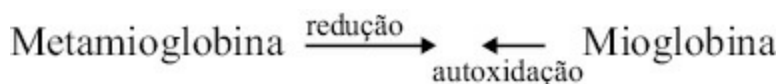
A formação da oximioglobina envolve a complexação do oxigênio com o grupo heme da mioglobina. Este processo, conhecido como oxigenação, ocorre quando há altas tensões de oxigênio e favorece a formação do pigmento responsável pela cor vermelho-cereja vivo na carne. Sob baixa tensão de oxigênio, no entanto, o que se forma é a metamioglobina (Taylor, 1972). Na carne fresca, tanto a forma reduzida da mioglobina como a oxigenada estão presentes, e a predominante determina a cor final do produto. A formação da oximioglobina envolve a ligação covalente do oxigênio molecular à mioglobina (Clydesdale e Francis, 1971). Quando a tensão de oxigênio está baixa, o oxigênio se dissocia do heme formando mioglobina. Esta, uma vez que é instável, é posteriormente oxidada transformando-se em metamioglobina (Pirko e Ayres, 1957). A formação da metamioglobina é acompanhada pela perda de um elétron da molécula de ferro, resultando em uma alteração do estado ferroso (Fe^{2+}) para o férrico (Fe^{3+}) (Giddings e Markarkis, 1973; Giddings, 1977a; 1977b).

4. Efeito do pH, temperatura e sal na formação da metamioglobina

A formação da metamioglobina ocorre em condições de alta temperatura, pH baixo, luz ultravioleta, presença de sal e bactéria aeróbica (Seideman *et al.*, 1984). Temperaturas altas e pH baixo causam a desnaturação da globina, o que deixa o heme sem proteção, e conduz à oxidação rápida para metamioglobina (Walters, 1975; Wallace *et al.*, 1982). O sal provoca dois efeitos: diminui a capacidade de tamponante da carne e causa baixas tensões de oxigênio na carne. Qualquer um desses dois efeitos conduz à oxidação da mioglobina para metamioglobina (Brooks, 1937; Seideman *et al.*, 1984).

5. Enzimas endógenas da carne e a formação de metamioglobina

A metamioglobina na carne fresca é formada por duas reações opostas: a autoxidação e a redução.



A mioglobina, a partir de agora, será referida como deoximioglobina, a forma reduzida da mioglobina (Fe^{2+}). Estas reações, conhecidas como atividade redutora de metamioglobina (MRA), são responsáveis pela alteração da valência do ferro da mioglobina da carne, de ferroso para férrico. As diferenças da MRA entre os músculos contribuem para a capacidade de alguns músculos reterem o pigmento de coloração vermelho vivo por períodos mais longos. Stewart *et al.* (1965) separaram as duas reações e demonstraram que a redução da metamioglobina é realizada por enzimas. Foram observadas variações consideráveis na atividade redutora (MRA) nas amostras de carne bovina, o que aumentou o pH e a temperatura. O nome da metamioglobina redutase é usado atualmente para descrever vários sistemas redutores, inclusive aqueles envolvidos com outras heme proteínas (Bekhit e Faustman, 2005).

Watts *et al.* (1966) concluíram que a redução da metamioglobina e do oxigênio na carne ocorre por meio da redução do nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). A succinato desidrogenase parece ser uma das enzimas envolvidas, pois sua adição à carne aumentou a utilização do oxigênio. Outros intermediários do ciclo de ácido cítrico e o aminoácido de L-glutamato também estimularam a redução da metamioglobina (Saleh e Watts, 1968). As enzimas envolvidas continuaram potencialmente ativas na carne *post mortem* e foram capazes de retomar sua atividade na presença de oxigênio. Isto pode ocorrer se a carne for moída ou quando as superfícies são cortadas e expostas ao ar, portanto, sempre que houver disponibilidade de doadores de hidrogênio (por exemplo, NADH^+).

A redução da metamioglobina na carne no *post mortem* deve-se, principalmente, a enzimas nas quais a mitocôndria age como fonte de equivalentes redutores na redução de nucleotídeos piridina (MacDougall, 1982). Uma delas, a metamioglobina redutase, foi identificada em músculo de coração bovino (Hagler *et al.*, 1979). Esta enzima requer cianeto de ferro e NADH e pode reduzir a metamioglobina para mioglobina. Arihara *et al.* (1989) verificaram a presença de citocromo b_5 NADH redutase em músculos esqueléticos bovinos, que têm um espectro de absorção idêntico àquele do citocromo b_5 redutase das células vermelhas do sangue bovino (Yubisui e Takeshita, 1980; Tamura *et al.*, 1983). Utilizando técnicas eletroforéticas de imunofixação, Arihara *et al.* (1995) estimaram que a quantidade de citocromo b_5 NADH redutase em músculos esqueléticos bovinos foi $13,8 \pm 2,6$ g/g por tecido, variando de 9,0 a 12,0 g/g por tecido em músculos *biceps femoris*. Arihara *et al.* (1990) localizaram previamente o citocromo b da membrana externa na superfície da mitocôndria do tecido muscular e o citocromo b_5 nas frações microssomais. Arihara *et al.* (1995) propuseram os dois mecanismos que podem ser consultados na Figura 3.25 como envolvidos na redução de MetMb. A enzima tem afinidade muito maior com o citocromo b_5 e pode reduzir tanto MetMb quanto MetHb. Uma excelente revisão sobre a redução da metamioglobina pode ser encontrada no trabalho de Bekhit e Faustman (2005).

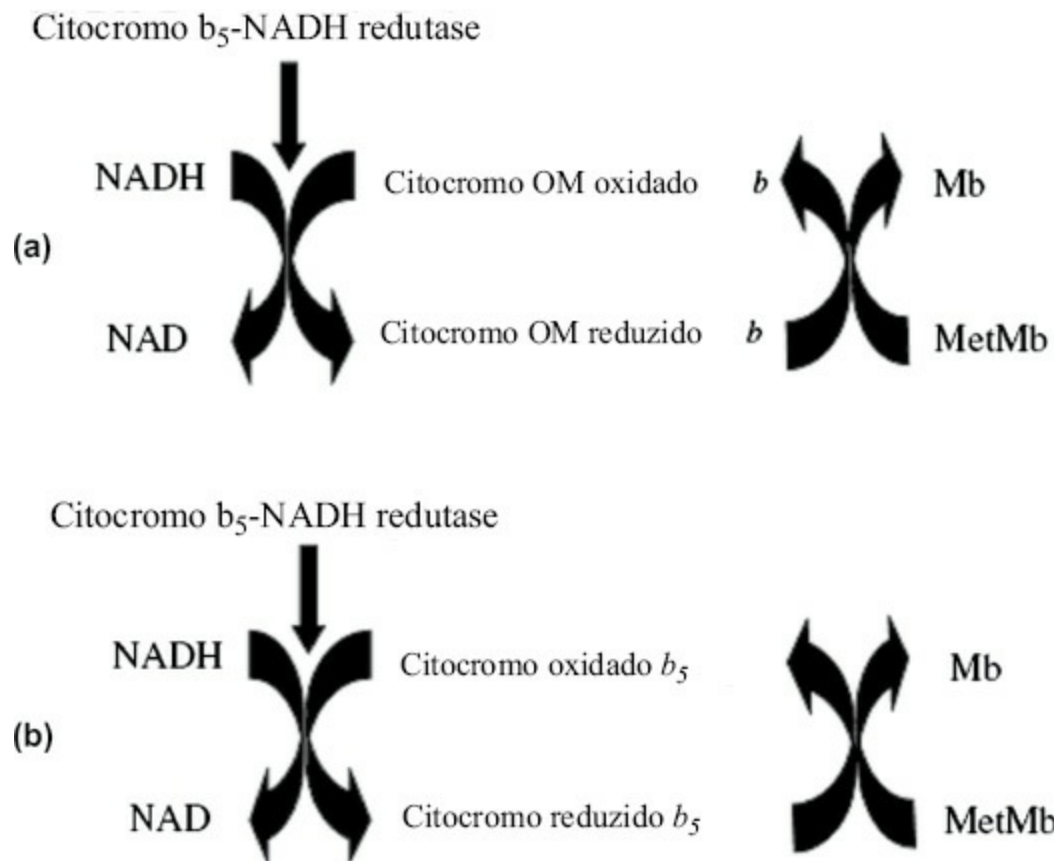


FIGURA 3.25 Caminhos de redução da mioglobina por citocromo b_5 NADH redutase: (a) situação na mitocôndria e (b) situação no retículo sarcoplasmático. Arihara *et al.* (1995).

B. Pigmentos em peixes

A massa molecular da mioglobina de peixes tende a ser muito mais baixa do que a da mioglobina de mamíferos (Fosmire e Brown, 1976; Yamaguchi *et al.*, 1979; Chaijan *et al.*, 2007). O vermelho da carne do atum, uma fonte rica de mioglobina, influencia fortemente sua aceitação pelo consumidor. Qualquer descoloração durante a estocagem é associada à conversão em metamioglobina (Bito, 1965; 1976). O músculo escuro do atum *yellowfin* (*Thunnus albacores*), que também é rico em mioglobina, oxida-se muito mais rapidamente do que mioglobinas de mamíferos (Brown e Mebine, 1969). Levy *et al.* (1985) isolaram e caracterizaram a metamioglobina redutase do músculo escuro do atum, que tinha um pH ótimo semelhante à enzima bovina. A massa molecular da enzima do atum é similar à da redutase do golfinho (30-40 kDa), mas é metade da redutase bovina (65 kDa). Enquanto os valores dos pontos isoelétricos das redutases de músculo de atum e bovino são diferentes, ambas as enzimas foram específicas para NADH. Recentemente, Thiansilakul *et al.* (2011) isolaram mioglobina do músculo escuro do atum pequeno do leste (*Euthynnus affinis*) e observaram que ele é muito propenso à oxidação e à desnaturação em pH 3, quando exposto a temperaturas acima de 60°C. Eles recomendaram que o processamento seja feito em condições brandas para evitar mudanças na mioglobina.

Ochiai *et al.* (2009) demonstraram que a estabilidade estrutural de diferentes mioglobinas de atuns (*bigeye* e *bluefin*) é afetada por pequenas substituições de aminoácidos. Enquanto resíduos de aminoácidos muito bem conservados foram responsáveis pela estabilidade da mioglobina, alguns resíduos não conservados nos segmentos não helicoidais e na região do grupo heme afetaram intensamente a estabilidade térmica da mioglobina.

Pesquisas anteriores de Miki e Nishimoto (1984) examinaram a relação entre perda de frescor e descoloração em diversas espécies de peixes, incluindo o bonito-listrado, a cavala e o sorgo do mar. Em peixes de músculos vermelhos, a porcentagem de metamioglobina torna-se um índice muito útil para a descoloração. Miki e Nishimoto (1984) traçaram curvas do log da (100 – % metamioglobina), que representa a razão de oximioglobina

residual em relação ao total de mioglobina contra os tempos de estocagem em diferentes temperaturas. Os resultados para o bonito-listrado, que estão na Figura 3.26, indicam claramente uma reação de primeira ordem que corresponde às alterações no frescor. Estes resultados são consistentes com trabalhos anteriores de Matsuura *et al.* (1962), que demonstraram que a taxa de auto-oxidação de mioglobina isolada de músculos de peixe também segue uma cinética de primeira ordem.

C. Preservação dos pigmentos da carne

A conversão acelerada de mioglobina em metamioglobina em condições de baixa pressão parcial de oxigênio é extremamente importante para o empacotamento de carne fresca, já que a coloração é o principal fator determinante para a decisão de compra da carne (Mancini e Hunt, 2005). Por exemplo, carne que contém 20% de metamioglobina é, em geral, discriminada pelos consumidores (MacDougall, 1982) e quando excede 40% é desclassificada ou rejeitada (Greene *et al.*, 1971). George e Stratmann (1952) relataram que a taxa máxima de formação de metamioglobina ocorre com pressões parciais de oxigênio em torno de 1-1,4 mm, decrescendo até atingir uma taxa constante mínima de 30 mm. Por consequência, a permeabilidade do oxigênio do filme de embalagem possui importância considerável na manipulação de produtos de carne fresca. Landrock e Wallace (1955) sugeriram que o empacotamento deveria permitir a penetração de 5 litros de O₂/m²/dia/atmosfera de oxigênio para evitar a formação de metamioglobina e a consequente coloração marrom.

Fellers *et al.* (1963), ao contrário de pesquisadores anteriores, reportaram que teores de oxigênio mais altos do que os normalmente encontrados na atmosfera preservam a oximioglobina. Este fato foi confirmado posteriormente por Bausch (1966). Pressões parciais de oxigênio altas, portanto, possuem potencial considerável para realçar a cor desejável para a carne. Ocorre pouca desoxigenação, pois o excesso de oxigênio se recombina com a mioglobina para formar oximioglobina. Daun *et al.* (1971) examinaram o efeito de atmosferas ricas em oxigênio em pacotes de carne fresca, utilizando uma bandeja semirrígida de cloreto de polivinil com um espaço controlado, para estocar carne fresca. Oxigênio injetado neste espaço criou uma atmosfera rica em oxigênio e a formação de metamioglobina na superfície das fatias dos músculos *semimembranosus* e *adductor* ficou mais baixa do que em carne estocada em atmosfera normal, sem alteração no ar. Os resultados, mostrados na Figura 3.27, indicaram que as amostras estocadas em atmosfera normal ficaram inaceitáveis 6 dias depois, em função da cor, enquanto a carne estocada em atmosferas enriquecidas de oxigênio levou 10 dias para alcançar as mesmas condições. Um dos maiores problemas que limitou a comercialização deste método foi o desenvolvimento de gordura rançosa.

Entre os vários fatores que afetam a descoloração de carne empacotada, as diferenças entre os músculos foram demonstradas por Hood (1980) como sendo o mais importante. A Figura 3.28 mostra a diminuição da estabilidade da coloração em todos os quatro músculos, à medida que a temperatura aumentou de 0°C para 10°C. A taxa de acúmulo de metamioglobina foi 8 vezes mais rápida em *psaos major* do que em *longissimus dorsi*. Pesquisas posteriores, realizadas por O’Keeffe e Hood (1982), examinaram os fatores bioquímicos que afetam a taxa de descoloração em músculos bovinos em função da metamioglobina. O músculo *psaos major* apresentou maior atividade de succinato desidrogenase, o que, em conjunto com seu baixo conteúdo de mioglobina, gerou uma taxa de alto consumo de oxigênio (OCR), resultando em baixa penetração de oxigênio e rápida formação de metamioglobina, quando comparado ao *longissimus dorsi*. Baseada nesta pesquisa, as enzimas responsáveis pela redução da metamioglobina foram os principais fatores determinantes da formação da metamioglobina em músculos bovinos, sendo que os músculos *psaos major* possuem baixa atividade redutora enquanto *longissimus dorsi* apresentam alta atividade. O empacotamento em atmosfera modificada com altos teores de oxigênio (MAP) satura o pigmento da carne com oxigênio enquanto dióxido de carbono a um teor acima de 20% inibe o crescimento de bactérias (Enfors *et al.*, 1979; Nissen *et al.*, 1996; Sorheim e Dainty, 1996; Luno *et al.*, 2000).

Portanto, a forte relação entre a estabilidade da coloração em músculos diferentes é oriunda da OCR e das atividades redutoras da mioglobina e metamioglobina (Kropf, 1993; Sammel *et al.*, 2002; Seyfert *et al.*, 2006).

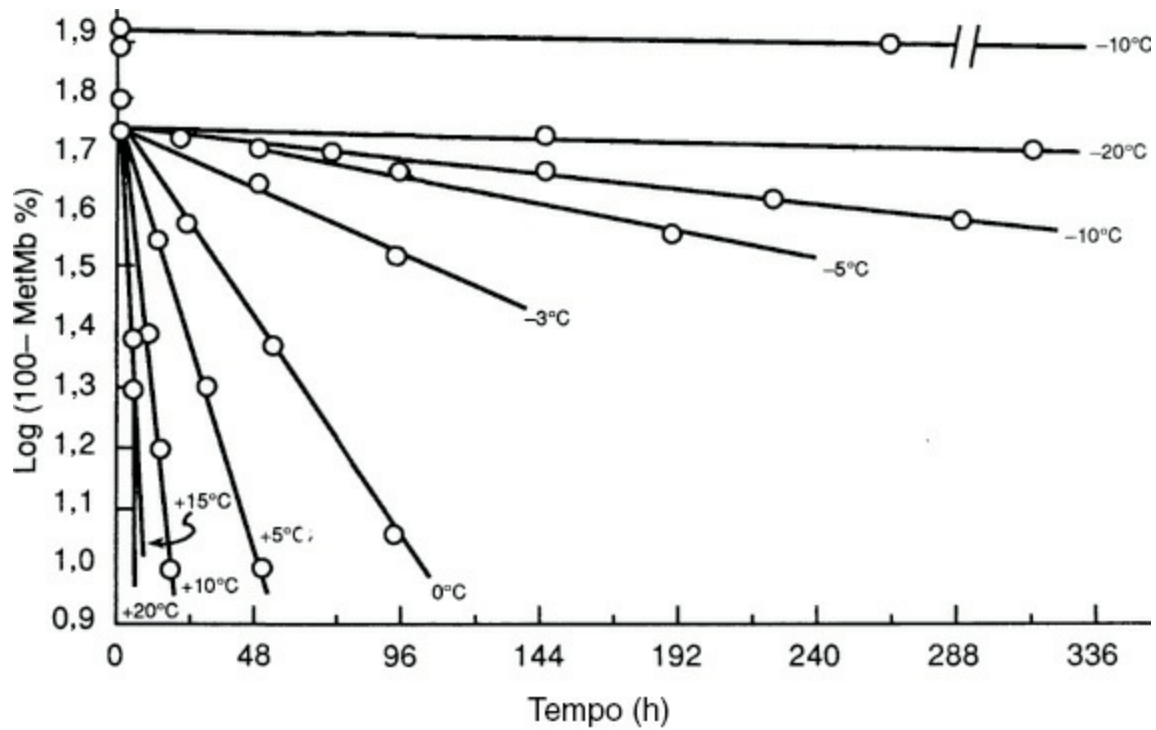


FIGURA 3.26 Alterações na porcentagem de MetMb de bonito-listrado durante armazenamento a diferentes temperaturas. Miki e Nishimoto (1984).

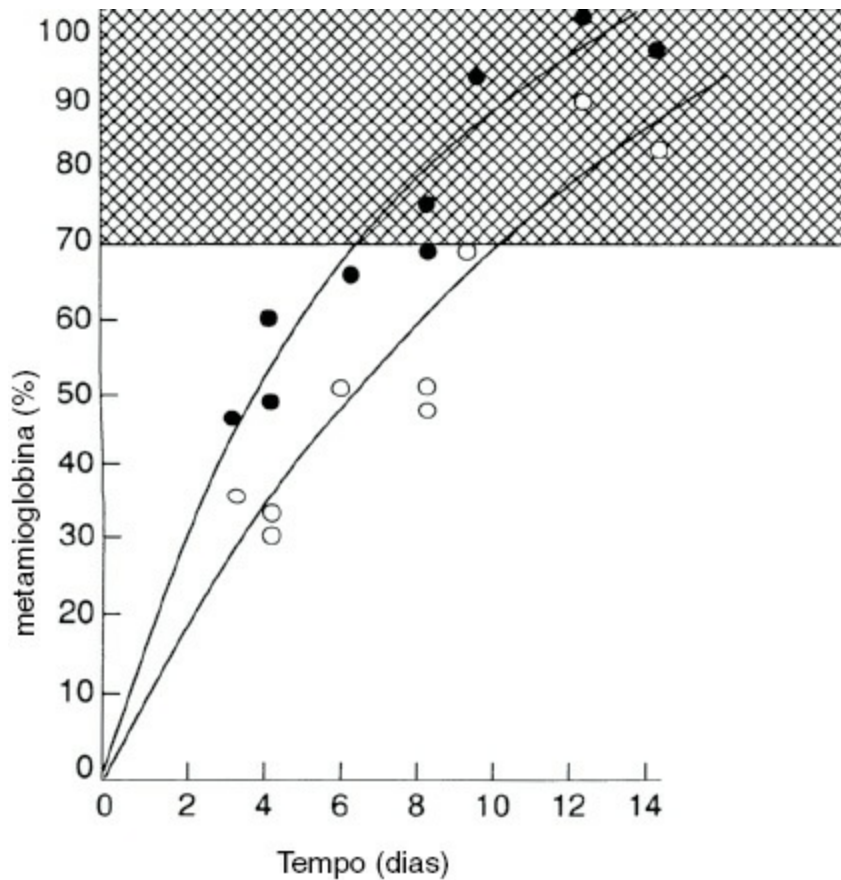


FIGURA 3.27 Porcentagem de metamioglobina na superfície de fatias de músculo bovino semimembranoso e adutor a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em embalagem de polivinil semirrígida hermeticamente fechada contendo ar ou atmosfera enriquecida em oxigênio. ●: Air; ○: enriquecido de oxigênio; área hachurada denota cor inaceitável. Daun *et al.* (1971). Copyright © Institute of Food Technologists.

A inter-relação entre a oxidação de lipídeos e pigmentos é estudada desde que pigmentos férricos, por

exemplo, a metamioglobina, aumentam a oxidação lipídica (Younathan e Watts, 1960; Brown *et al.*, 1963). Hutchins *et al.* (1967) observaram que há boas correlações entre a oxidação de lipídeos e a formação de metamioglobina em carne crua. Greene (1969) testou métodos para retardar a rancidez em carne bovina moída refrigerada adicionando vários antioxidantes, como o propil galato (PG) e o hidroxí-anisol butilado (BHA). A cor desejável da carne moída durou mais tempo em amostras tratadas com antioxidantes. Greene *et al.* (1971) estudaram amostras de carne bovina moída tratada com uma combinação de PG ou BHA e ácido ascórbico (AA). Baseado em tabelas de cores em um painel treinado (um painel de consumidores e determinações de metamioglobina), a carne tratada com antioxidantes apresentou tempo de prateleira mais longo. Entre as principais limitações do alto teor de oxigênio MAP estão a aceleração da oxidação lipídica e odores estranhos (Jakobsen e Berrelsen, 2000; Jayasingh *et al.*, 2002) e formação de coloração marrom prematura durante cozimento (Torngren, 2003; John *et al.*, 2004; 2005).

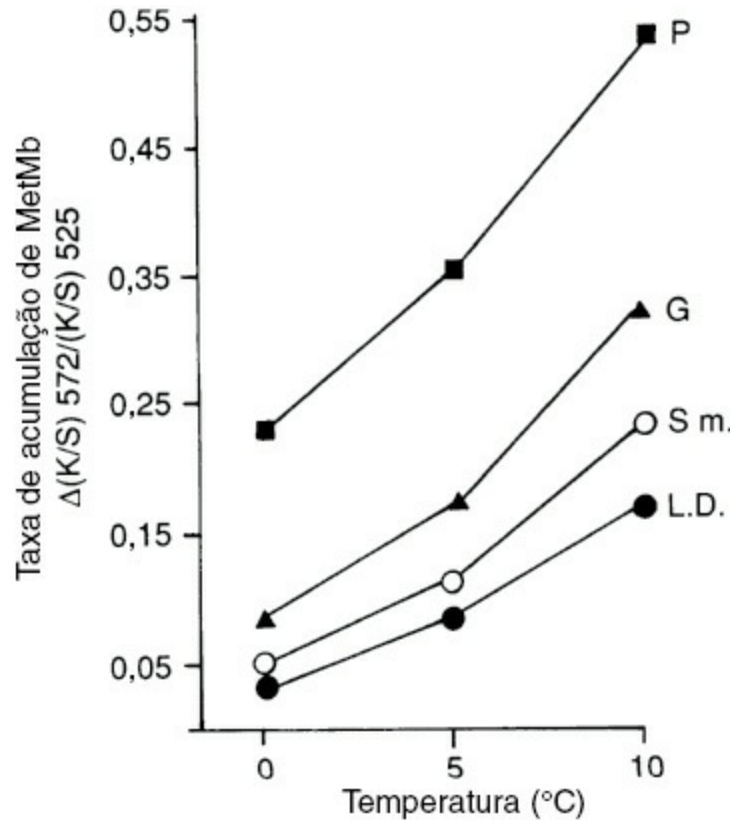


FIGURA 3.28 Efeito da temperatura sobre a acumulação de metamioglobina em quatro músculos bovinos de 10 animais de experimento. P: *m. psoas major*; G: *m. gluteus medius*; S m.: *m. semimembranosus*; L.D.: *m. longissimus dorsi*. Hood (1980).

No Capítulo 11, que aborda a oxidação lipídica, será discutida a miríade de aldeídos responsáveis por sabores e odores estranhos em produtos alimentares, incluindo a carne (Pearson *et al.*, 1977). Pesquisas demonstraram que aldeídos monoinsaturados incubados com oximioglobina aceleram significativamente a formação da metamioglobina (Yin e Faustman, 1993; Chan *et al.*, 1997; Faustman *et al.*, 1999). Entre as várias classes de aldeídos estão os α,β -aldeídos insaturados, que são extremamente reativos com biomoléculas (Witz, 1989). O aldeído α,β -insaturado, mais proeminente e estudado, o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), é formado, na carne, pela oxidação do ácido linoleico (Sakai *et al.*, 1998; Suhr e Kwon, 2005; Gasc *et al.*, 2007). Pesquisas anteriores demonstraram um grande número de fatores, incluindo produtos da oxidação lipídica, como o HNE, que reduzem a estabilidade de redox da oximioglobina com a formação de metamioglobina (Faustman *et al.*, 1999; Alderton *et al.*, 2003). Suman *et al.* (2007) monitoraram a formação de metamioglobina quando o HNE foi incubado com oximioglobina de porcos em pH de 7,4 e 5,6, que representam músculos em condições fisiológicas normais e *post mortem*. Os resultados, ilustrados na Figura 3.29, mostram que a formação de metamioglobina ocorre com maior rapidez em pH 5,6 e aumenta na presença de HNE. Isto contrasta com os resultados obtidos sob condições alcalinas (pH de

7,4), quando a formação da metamioglobina foi muito mais baixa e não aumentou na presença de HNE. Enquanto o HNE pode se ligar com os resíduos de cisteína, histidina, lisina e arginina nas proteínas, adutos de mioglobina-HNE são formados principalmente em resíduos de histidina. Pesquisas independentes com mioglobinas de cavalo, gado, porco, atum, bisão, frango e peru constataram que o HNE promove a oxidação da oximioglobina (Alderton *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003a; 2003b; Joseph *et al.*, 2010; Maheswarappa *et al.*, 2010). Uma pesquisa recente de Yin *et al.* (2011) examinou o efeito do HNE na oxidação de oximioglobina de frango, peru, porco, gado, carneiro, cavalo e veado. Enquanto o HNE aumentou a oxidação da oximioglobina em todas as espécies examinadas, seu efeito foi muito maior nas mioglobinas de bovino, cavalo, carneiro e veado do que nas mioglobinas de frango, porco e peru. Este fato foi atribuído à presença de 13 ou mais resíduos de histidina em mioglobinas de boi, cavalo, ovelha e veado comparados a somente nove resíduos de histidina nas mioglobinas de frango, porco e peru. Utilizando fenil isocianato marcado com isótopos, Suman *et al.* (2007) atribuíram a menor suscetibilidade da mioglobina dos porcos à instabilidade redox na formação de número menor de adutos de HNE (três), comparados a sete na mioglobina bovina. Os resíduos de histidina, que formaram adutos com HNE na mioglobina de porcos, foram HIS 24, 26 e 119, comparados com HIS 24, 36, 81, 88, 93 119 e 152 na mioglobina bovina.

Uma combinação de dióxido de carbono e oxigênio, portanto, é uma solução alternativa para aumentar o tempo de prateleira da carne. Enquanto o dióxido de carbono inibe as bactérias deteriorativas, o oxigênio mantém o pigmento na forma de oximioglobina. Taylor e MacDougall (1973) relataram a manutenção da coloração de carne bovina fresca, por pelo menos uma semana a 1°C em atmosfera com 60% de oxigênio e 40% de dióxido de carbono. O empacotamento de cortes de carne fresca com gás, em nitrogênio livre de oxigênio ou dióxido de carbono, aumentou a estocagem ao minimizar as alterações oxidativas e o crescimento de bactérias (Partmann e Frank, 1973; Huffman, 1974). O’Keeffe e Hood (1980-1981) examinaram o efeito de gás anóxico no empacotamento de carne fresca em pacotes flexíveis ou utilizando dessecadores com catalisador de paládio que elimina oxigênio. Nenhuma descoloração foi observada na carne estocada com dióxido de carbono ou nitrogênio por um período de até três semanas a 0°C. Algumas diferenças observadas entre as amostras de carne foram atribuídas a diferenças entre os animais.

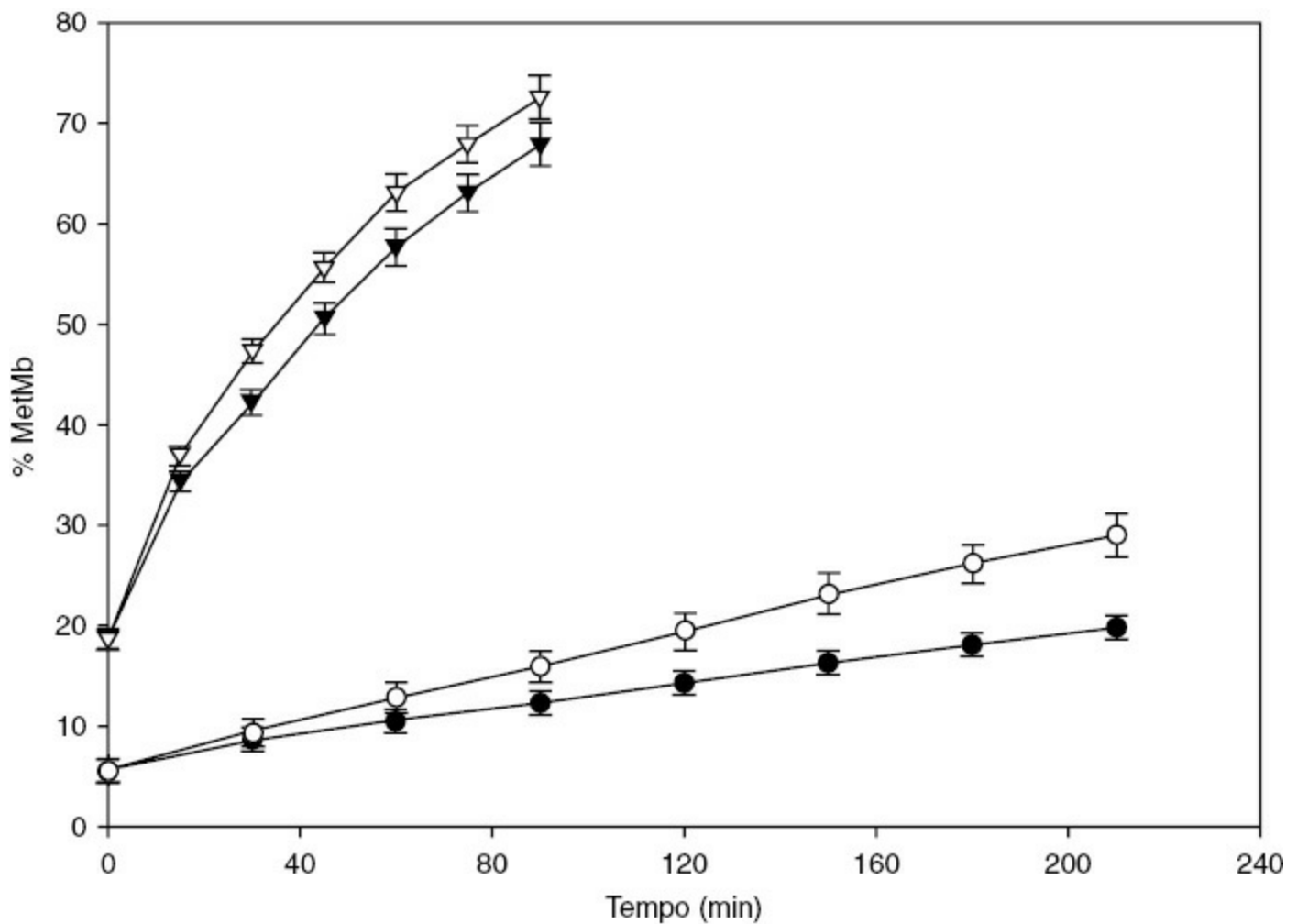


FIGURA 3.29 Formação de MetMb durante a reação de OxyMb (0,075 mM) com HNE (0,05 mM) com pH 7,4 ou 5,6, a 37 °C em porcos. As barras de desvio-padrão estão indicadas. T: pH 5,6, controle; ∇: pH 5,6, HNE; ●: pH 7,4, controle; ○: pH 7,4, HNE. Suman *et al.* (2007).

A maioria da carne bovina vendida no varejo norte-americano é apresentada empacotada em bandejas de isopor (Styrofoam™) cobertas por papel-filme permeável para o oxigênio para permitir rápida oxigenação das mioglobinas da superfície do produto e, portanto, uma aparência viçosa e com o desejado tom vermelho. Infelizmente, este aspecto permanece somente de 1 a 7 dias, dependendo do músculo ou do método de corte, antes de tornar-se amarronzada e ocorrer a formação da metamioglobina (Maudhavi e Carpenter, 1993). É possível estender o período por outros 3 a 4 dias, utilizando uma atmosfera modificada com oxigênio, dióxido de carbono e nitrogênio (Manu-Tawiah *et al.*, 1991).

No entanto, é necessário um mínimo de 21 dias de estabilidade da coloração, sendo 7 dias para o empacotamento e distribuição do produto, 7 dias em exposição para venda e 7 dias na residência ou local onde será consumido, extensão possibilitada pela adição de 0,5% de monóxido de carbono ao MAP em substituição ao oxigênio (Sorheim *et al.*, 1999). Na presença de monóxido de carbono, a mioglobina forma carboximioglobina, um pigmento vermelho muito estável que possui um espectro de absorção quase idêntico ao da oximioglobina (El-Badawi *et al.*, 1964; Cornworth, 1994). A adição de baixos teores de monóxido de carbono a sistemas de MAP não apresenta nenhum risco para o consumidor; esta prática é muito usada na Noruega para o empacotamento de carne (Sorheim *et al.*, 1997). Em 2001, um Comitê Científico para Alimentos da Comissão Europeia examinou o uso de monóxido de carbono como integrante dos gases de empacotamento em MAP de carne fresca (SCF/CS/ADD/MSAd/204 Final). O Comitê concluiu que não há preocupações com a saúde na utilização de 0,3-0,5% de monóxido de carbono em mistura de gases com dióxido de carbono e nitrogênio na carne fresca, desde que a temperatura de estocagem não exceda 4°C. Devem ser observados cuidados, no entanto, para evitar condições de estocagem não apropriadas, pois o monóxido de carbono pode mascarar a deterioração microbiana.

Cornforth e Hunt (2008) debateram as vantagens e desvantagens do empacotamento de carne fresca com baixo teor de oxigênio, utilizando monóxido de carbono, e os fatores que devem ser levados em consideração no desenvolvimento de uma tecnologia de empacotamento que proteja tanto os consumidores como a indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- Aalhus, J.L., Jones, S.D.M., Lutz, S., Best, D.R., Robertson, W.M., 1994. The efficacy of high and low voltage electrical stimulation under different chilling regimes. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 433-442.
- Acton, J.C., Ziemer, G.R., Burge Jr., D.L., 1983. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 99-121.
- Adzitey, F., Nurul, H., 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark, firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences – a mini review. *Int. Food Sci. J.* 18, 11-20.
- Alderton, A.L., Faustman, C., Liebler, D.C., Hill, D.W., 2003. Induction of redox instability of bovine myoglobin by adduction with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 42, 4398-4405.
- Aliani, M., Farmer, L.J., 2002. Postcolumn derivatization method for determination of reducing and phosphorylated sugars in chicken by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2760-2766.
- Aliani, M., Farmer, L.J., 2005a. Precursors of chicken flavor. I. Determination of some flavor precursors in chicken muscle. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6067-6072.
- Aliani, M., Farmer, L.J., 2005b. Precursors of chicken flavor. II. Identification of key flavor precursors using sensory methods. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6455-6462.
- Aliani, M., Kennedy, J.T., McRoberts, C.W., Farmer, L.J., 2008. Formation of flavor precursors by the AMP pathway in chicken meat. In: Interlaken, Switzerland, I., Wust, Blank, M., Yeretian, C. (Eds.), *Proceedings of the 12th Weurman Symposium, Institut fur Chemie und Bioloische*, p. 288-292.
- American Meat Institute Foundation, 1960. *The Science of Meat and Meat Products*. Freeman, San Francisco, CA.
- Amos, L.A., Huxley, H.E., Holmes, K.C., Goody, R.S., Taylor, K.A., 1982. Structural evidence that myosin heads may interact with two sites on F-actin. *Nature (London)* 299, 467-469.
- Andou, S., Takama, K., Zama, K., 1979. Interaction between lipid and protein during frozen storage. I. Effect of oil dipping on rainbow trout muscle during frozen storage. *Hokkaido Daigaku Kenkyu Iho* 30, 282-287.
- Andou, S., Takama, K., Zama, K., 1980. Interaction between lipid and protein during frozen storage. II. Effect off non-polar and polar lipids on rainbow trout myofibrils during frozen storage. *Hokkaido Daigaku Kenkyu Iho* 31, 201-209.
- Ang, J.F., Haard, N.F., 1985. Chemical composition and postmortem changes in soft textured muscle from intensely feeding Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Food Biochem.* 9, 49-64.
- Aoka, T., Ueno, R., 1997. Involvement of cathepsins B and L in post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res. Int.* 30, 585-591.
- Aoka, T., Yamashita, T., Ueno, R., 2000. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fish. Sci.* 66, 776-782.
- Apple, J.K., Kegley, E.B., Galloway, D.L., Wistuba, T.J., Rakes, L.K., 2005. Duration of restraint and isolation stress as a model to study dark-cutting condition in cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 1202-1214.
- Arihari, K., Itoh, M., Kondo, Y., 1989. Identification of bovine skeletal muscle metmyoglobin reductase as an NADH-cytochrome b₅ reductase. *J. Zootech. Sci.* 6, 46-56.
- Arihari, K., Itoh, M., Kondo, Y., 1990. Presence of cytochrome b₅-like hemoprotein (OM cytochrome b) in rat muscles as a metmyoglobin reducing enzyme system component. *Jpn. Soc. Scient. Fish* 45, 1335-1339.
- Arihari, K., Cassens, R.G., Greaser, M.L., Luchansky, J.B., Modziak, R.E., 1995. Localization of metmyoglobin-reducing enzyme (NADH-cytochrome b₅ reductase) system components in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.* 39, 205-213.
- Arya, S.S., Parhar, D.B., 1979. Changes in free nucleotides, nucleosides and bases during thermal processing of goat and sheep meats. Part I. Effect of temperature. *Nahrung* 23, 1-7.
- Asghar, A., Henrickson, R.L., 1982. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Adv. Food Res.* 28, 231-372.
- Asghar, A., Samejima, K., Yasui, T., 1984. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22, 27-106.
- Ashton, T.J., Michie, I., Johnston, I.A., 2010. A novel tensile test method to assess texture and gaping in salmon fillets. *J. Food Sci.* 74, S182-S190.
- Bailey, A.J., 1972. The basis of meat texture. *J. Sci. Food Agric.* 23, 995-1007.
- Bailey, A.J., 1990. The chemistry of collagen cross-links and their role in meat texture. In: *Reciprocal Meat Conference Proceedings* 23, 995-1007.
- Bailey, A.J., Light, N.D., 1989. *Connective Tissue in Meat and Meat Products*. Elsevier Applied Science, London, p. 1-355.
- Bailey, A.J., Peach, C.M., 1968. Isolation and structural identification of labile intermolecular crosslink in collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 812-819.
- Bailey, A.J., Shimokomaki, M., 1971. Age related changes in the reducible cross-links of collagen. *FEBS Lett.* 16, 86-88.
- Bailey, A.J., Sims, T.J., 1977. Meat tenderness, distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *J. Sci. Food Agric.* 28, 565-570.
- Bailey, A.J., Restall, D., Sims, T.J., Duance, V.C., 1979. Meat tenderness. Immunofluorescent localization of the isomorphous forms of collagen in bovine muscles of varying texture. *J. Sci. Food Agric.* 30, 203-210.
- Bang, M.I., Gregorio, C., Labeit, S., 2002. Molecular dissection of the interaction of desmin with the C-terminal region of nebulin. *J. Struct. Biol.* 137, 119-127.
- Bang, M.I., Li, X., Littlefield, R., Bremner, S., Thor, A., Knowlton, K.U., Lieber, R.I., Chen, J., 2006. Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 173, 905-916.
- Bang, M.I., Caremani, M., Brunello, F., Littlefield, R., Lieber, R.I., Chen, J., Lombardi, V., Linari, M., 2009. Nebulin plays a direct role in promoting strong actin-myosin interactions. *FASEB J* 23, 4117-4125.
- Banks, A., 1955. The expressible fluid of fish fillets. IV. The expressible fluid of iced cod. *J. Sci. Food Agric.* 6, 584-587.
- Barbut, S., 1998. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. *J. Muscle Foods* 9, 35-49.
- Barbut, S., Sosnicki, A.A., Lonergan, S.M., Knapp, T., Ciobanu, D.C., Gatcliffe, L.J., Huff-Lonergan, E., Wilson, E.W., 2008. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci.* 79, 46-63.
- Bate-Smith, E.C., 1948. The physiology and chemistry of rigor mortis, with special reference to the aging of beef. *Adv. Food Res.* 1, 1-38.
- Bate-Smith, E.C., Bendall, J.R., 1949. Factors determining the time course of rigor mortis. *J. Physiol. (London)* 110, 47-65.

- Bate-Smith, E.C., Bendall, J.R., 1956. Changes in muscle after death. *Br. Med. Bull.* 12, 230-235.
- Battle, N., Aristoy, M.-C., Toldra, E., 2000. Early postmortem detection of exudative pork meat based on nucleotide content. *J. Food Sci.* 65, 413-416.
- Batzer, O.F., Santora, A.T., Tan, M.C., Landmann, W.A., Schweigert, B.S., 1960. Precursors of beef flavor. *J. Agric. Food Chem.* 8, 498-501.
- Bausch, E.R., 1966. Color retention of red meat. Canadian Patent 742, 165.
- Beecher, G.R., Briskey, E.J., Hockstra, W.G., 1965. Comparison of glycolysis and associated changes in light and dark portions of the porcine semitendinosus. *J. Food Sci.* 30, 477-486.
- Bekhit, A.G.D., Faustman, C., 2005. Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci.* 71, 407-439.
- Bendall, J.R., 1951. The shortening of rabbit muscles during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. *J. Physiol. (London)* 114, 71-88.
- Bendall, J.R., 1969. *Muscles, Molecules and Movement*. Heinemanns, London.
- Bendall, J.R., 1973. Postmortem changes in muscle. In: Bourne, G.H. (Ed.), second ed. *The Structure and Function of Muscle*, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Bendall, J.R., 1976. Electrical stimulation of rabbit and lamb carcasses. *J. Sci. Food Agric.* 27, 819-826.
- Bendall, J.R., Davey, C.L., 1957. Ammonia liberation during rigor mortis and its relation to changes in the adenine and inosine nucleotides of rabbit muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 26, 93-103.
- Bendall, J.R., Lawrie, R.A., 1964. Watery pork. *Anim. Breed. Abstr.* 32, 1-8.
- Bendall, J.R., Wismer-Pederson, J., 1962. Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *J. Food Sci.* 27, 144-159.
- Bergstrom, J., Hultman, E., 1966. The effect of exercise on muscle glycogen and electrolytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18, 16-20.
- Bito, M., 1965. Studies on the retention of meat color of frozen tuna. II. Effect of storage temperature on preventing discoloration of tuna meat during frozen storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 31, 534-539.
- Bito, M., 1976. Studies on the retention of meat color of frozen tuna. *Bull. Tokai Region. Fish. Res. Lab.* 84, 51-113.
- Bito, M., Yamada, K., Mikumo, Y., Amano, K., 1983. Studies on rigor mortis of fish. 1. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. *Bull. Tokai Reg. Fish Res. Lab.* 109, 89-96.
- Bosselmann, A., Moller, C., Steinhart, H., Kirchgessner, M., Schwartz, F.J., 1995. Pyridinoline cross-links in bovine muscle collagen. *J. Food Sci.* 60, 953-958.
- Bouton, P.E., Ford, A.L., Harns, P.V., Macfarlane, J.J., Oshea, J.M., 1977. Pressure-heat treatment of postrigor muscle. Effect on meat tenderness. *J. Food Sci.* 42, 132-135.
- Bowker, B.C., Schaefer, R.B., Grapperhaus, M.J., Solomon, M.B., 2011. Tenderization of beef loins using a high efficiency sparker. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 135-141.
- Boyer-Berri, C., Greaser, M.L., 1998. Effect of postmortem storage on the Z-line region of titin in bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 76, 1034-1044.
- Bremner, H.A., 1999. Gaping in fish flesh. In: Satp, K., Sakaguchi, M., Bremner, H.A. (Eds.), *Extracellular Matrix of Fish and Shellfish*, Research Signpost, Trivandrum, India, p. 81-94.
- Briskey, E.J., 1964. Etiological status and associated studies of pale, exudative porcine musculature. *Adv. Food Res.* 13, 89-178.
- Briskey, E.J., Lawrie, R.A., 1961. Comparative in vitro activities of phosphorylase b and cytochrome oxidase in preparations from two ox muscles. *Nature (London)* 192, 263-264.
- Briskey, E.J., Kastenschmidt, L.L., Forrest, J.C., Beecher, G.R., Judge, M.D., Cassens, R.G., Hoekstra, W.G., 1966. Biochemical aspects of post-mortem changes in porcine muscle. *J. Agric. Food Chem.* 14, 201-206.
- Brooks, J., 1937. Color of meat. *Food Ind.* 9, 707.
- Brown, W.D., Mebine, L.B., 1969. Autoxidations of oxmyoglobins. *J. Biol. Chem.* 244, 6696-6701.
- Brown, W.D., Harris, L.D., Olcott, H.S., 1963. Catalysis of unsaturated lipid oxidation by iron protoporphyrin derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 14-20.
- Buege, D.R., Marsh, B.B., 1975. Mitochondrial calcium and postmortem muscle shortening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 478-482.
- Burns, G.B., Kee, P.J., Irvine, B.B., 1985. Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using a HPLC system. *Can. J. Fish Aquat.* 22, 1373-1376.
- Burt, J.R., 1966. Glycogenolytic enzymes of cod (*Gadus callarias*) muscle. *J. Fish. Res. Board Can.* 23, 527-538.
- Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E., Suzuki, A., 1972. Ca^{2+} -specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 52, 367-381.
- Buttkus, H., 1963. Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis. *J. Fish. Res. Board Can.* 20, 45-58.
- Cambero, M.I., Pereira-Lima, C.I., Ordonez, J.A., Garcia de Fernando, G.D., 2000. Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1519-1528.
- Cappelin, G., Jessen, F., 2002. ATP, IMP and glycogen in cod muscles at onset and during development of rigor mortis depend on sample location. *J. Food Sci.* 67, 991-995.
- Carse, W.A., 1973. Meat quality and the acceleration of postmortem glycolysis by electrical stimulation. *J. Food Technol.* 8, 163-166.
- Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase Jr., C.C., Johnson, D.D., Smith, T.P., 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84, 520-525.
- Cassens, R.G., 1966. General aspects of postmortem changes. In: Briskey, E.J., Cassens, R.G., Trautman, J.C. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. University of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 181-196.
- Cassens, R.G., Newbold, R.P., 1966. Effects of temperature on postmortem metabolism in beef muscle. *J. Sci. Food Agric.* 17, 254-256.
- Cassens, R.G., Kauffman, R.G., Scherer, A., Mecker, D.I., 1992. Variations in pork quality: a 1991 USA survey. In: *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France, p. 237-240.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C., 2007. Characterisation of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle. *Food Chem.* 100, 156-164.
- Chan, W.K.M., Decker, E.A., Yin, M., Faustman, C., 1997. Lipid oxidation induced by oxmyoglobin and metmyoglobin with involvement of H_2O_2 and superoxide anion. *Meat Sci.* 46, 181-190.
- Chandra, M., Mamidi, R., Ford, S., Hidalgo, C., Witt, C., Ottenheim, C., Labeit, S., Granzier, H., 2009. Nebulin alters cross-bridge cycling kinetics and increases the filament activation: a novel mechanism for increasing tension and reducing tension cost. *J. Biol. Chem.* 284, 30889-30896.
- Chang, K.C., da Costa, N., Blackley, R., Southwood, O., Evans, G., Plastow, G., Wood, J.D., Richardson, R.I., 2003. Relationship of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. *Meat Sci.* 64, 93-103.
- Charpentier, J., 1969. Postmortem biochemical characteristics of the sarcoplasmic reticulum of pig muscle. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 9, 101-110.
- Chaudhry, H.M., Parrish Jr., F.C., Goll, D.E., 1969. Molecular properties of postmortem muscle. VI. *J. Food Sci.* 34, 183-191.
- Cheng, C.-S., Parrish Jr., F.C., 1977. Effect of Ca^{2+} on changes in myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.* 42, 1621-1626.
- Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M., Verrez-Bagnis, V.V., 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101, 1474-1479.
- Chock, S.P., Chock, P.B., Eisenberg, E., 1976. Presteady-state kinetic evidence for a cyclic interaction of myosin subfragment one with actin during the hydrolysis of adenosine-5'-triphosphate. *Biochemistry* 15, 3244-3253.

- Chrystall, B.B., Devine, C.E., 1978. Electrical stimulation, muscle tension, and glycolysis in bovine sternomandibularis. *Meat Sci.* 2, 49-58.
- Chrystall, B.B., Hagyard, C.J., 1976. Electrical stimulation and lamb tenderness. *N.Z.J. Agric. Res.* 19, 7-11.
- Chrystall, B.B., Devine, C.E., Davey, C.L., 1980. Studies in electrical stimulation: postmortem decline in nervous response in lambs. *Meat Sci.* 4, 69-76.
- Ciobanu, D.C., Bastiaansen, J.W., Lonergan, S.M., Thomsen, H., Dekkers, J.C., Plastow, G.S., Rothchild, M.E., 2004. New alleles in calpastin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 2829-2839.
- Claus, R.R., 2002. Shock treatment: shock waves are an effective tool for tenderizing meat. *Meat Poultry* 48 (12), 61-63.
- Claus, J.R., Schilling, M.B., Paroczay, E.W., Eastridge, J.S., Pursel, V.G., Mitchell, A.D., 2001a. Hydrodynamic shock wave tenderization effects using a cylinder processor on early deboned broiler breasts. *Meat Sci.* 58, 287-292.
- Claus, J.R., Schilling, J.K., Marriott, N.G., Duncan, S.E., Solomon, M.B., Wang, H., 2001b. Tenderization of chicken and turkey meats with electrically produced hydrodynamic shockwaves. *Meat Sci.* 58, 283-286.
- Clydesdale, F.M., Francis, F.J., 1971. The chemistry of meat color. *Food Prod. Dev.* 5 (3), 81-87.
- Cornforth, D.P., Hunt, M.C., 2008. Low-oxygen packaging of fresh meat with carbon monoxide: meat quality, microbiology, and safety. *American Meat Science Association White Paper Series*, 1-10.
- Cornforth, D.P., Pearson, A.M., Merkel, R.A., 1980. Relationship of mitochondria and sarcoplasmic reticulum to cold shortening. *Meat Sci.* 4, 103-121.
- Conlee, R.K., Renna, M.J., Winder, N.W., 1976. Skeletal muscle glycogen content, diurnal variation and effects of fasting. *Am. J. Physiol.* 231, 614-618.
- Conover, G.M., Henderson, S.N., Gregorio, C.C., 2009. A myopathy-linked desmin mutation perturbs striated muscle actin filaments architecture. *Mol. Biol. Cell.* 20, 834-845.
- Cornforth, D.P., 1994. Color – its basis and importance. In: Pearson, A.M., Dutson, T.R. (Eds.), *Quality Attributes and their Measurements in Meat, Poultry and Fish Products*. Blackie, London, p. 34-78.
- Coro, F.A.G., Youssef, E.Y., Shimokomaki, M., 2002. Age related changes in poultry breast meat collagen pyridinoline and texture. *J. Food Biochem.* 26, 533-541.
- Crouse, J.D., Koohmaraie, M., Seideman, S.D., 1991. The relationship of muscle fibre size to tenderness of beef. *Meat Sci.* 30, 295-302.
- Crupkin, M., Barassi, C.A., Martone, C.B., Trucco, R.E., 1979. Effect of storing hake (*Merluccius merluccius hubbsi*) on ice on the viscosity of the extract of soluble muscle protein. *J. Sci. Food Agric.* 30, 911-913.
- Culler, R.D., Parrish Jr., F.C., Smith, G.C., Cross, H.R., 1978. MFI relationship of myofibril fragmentation index to palatability and carcass attributes. *J. Food Sci.* 43, 1177-1180.
- Cutting, C.L., 1939. Immediate post mortem changes in trawled fish. *G.B. Dep. Sci. Ind. Res. Rep. Food Invest. Board*, 39-40.
- Dahiya, R., Butters, C.A., Tobacman, L.S., 1994. Equilibrium linkage analysis of cardiac thin filament assembly. Implications for the regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 269, 29457-29461.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., 2001. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie.* 83, 295-299.
- Daun, H., Solberg, M., Franke, W., Gilbert, S., 1971. Effect of oxygen-enriched atmospheres on storage quality of packaged fresh meat. *J. Food Sci.* 36, 1011-1014.
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., 1974. The mechanism of cold induced shortening in beef muscle. *J. Food Technol.* 9, 51-58.
- Davey, C.L., Graafhuis, A.E., 1976. Structural changes in beef muscle during ageing. *J. Sci. Food Agric.* 27, 301-306.
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., Carse, W.A., 1976. Carcass electrical stimulation to prevent cold shortening toughness in beef. *N.Z.J. Agric. Res.* 19, 13-18.
- Dayton, W.R., Schollmeyer, J.R., 1980. Isolation from papaine cardiac muscle of a calcium⁽²⁺⁾-activated protease that partially degrades myofibrils. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 533-551.
- Dayton, W.R., Goll, D.E., Stromer, M.H., Reville, W.J., Zeece, M.G., Robson, R.M., 1975. Some properties of a Ca²⁺-activated protease that may be involved in myofibrillar protein activated protease that may be involved in myofibrillar protein turnover. In: Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E. (Eds.), *Proteases and Biological Control*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 551-577.
- Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M., Reville, W.J., 1976a. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15, 2150-2158.
- Dayton, W.R., Reveille, W.J., Goll, D.E., Stromer, M.H., 1976. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15, 2159-2167.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelman, F., 1955. Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-617.
- De Fremery, D., 1966. Some aspects of post-mortem changes in poultry muscle. In: Briskey, E.J., Cassens, R.G., Trautman, J.C. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. University of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 205-212.
- De Fremery, D., Pool, M.F., 1960. Biochemistry of chicken muscle as related to rigor mortis and tenderization. *Food Res.* 25, 73-87.
- Delbarre-Ladrat, C., Cheret, R., Taylor, R., Verrez-Bagnis, V., 2006. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 409-421.
- Devine, C.E., Ellery, S., Wade, L., Chrystall, B.B., 1984. Differential effects of electrical stunning on the early post mortem glycolysis in sheep. *Meat Sci.* 11, 301-309.
- Disney, J.G., Follett, M.J., Ratcliff, P.W., 1967. Biochemical changes in beef muscle postmortem. *J. Sci. Food Agric.* 18, 314-321.
- Dransfield, E., 1977. Intramuscular composition and texture of beef muscles. *J. Sci. Food Agric.* 28, 833-842.
- Dugal, L.C., 1967. Hypoxanthine in iced freshwater fish. *J. Fish. Res. Board Can.* 24, 2229-2239.
- Dunajski, E., 1979. Texture of fish muscle. *J. Texture Stud.* 10, 301-318.
- Dutand, D., 1998. Quantification and characterization of 20S proteasome in relation to meat tenderization. PhD thesis. Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Dutand, D., Aubry, L., Guignot, F., Monin, G., Oali, A., 2006. Bovine muscle 20S proteasome to meat tenderization as revealed by an ultrasonic approach. *Meat Sci.* 74, 337-344.
- Dyer, W.J., 1951. Protein denaturation in frozen and stored fish. *J. Fish. Res. Biol.* 24, 2229.
- Ebashi, S., 1974. Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the troponin-tropomyosin system. *Essays Biochem.* 10, 1-36.
- Eccleston, J.F., Geeves, M.A., Trentham, D.R., Bagshaw, C.R., Mowa, V., 1976. The binding and cleavage of ATP in the myosin and actomyosin ATPase mechanisms. *Colloq. Ges. Biol. Chem.* 26, 42.
- Eino, M.F., Stanley, D.W., 1973. Catheptic activity, textural properties and surface ultrastructure of postmortem beef muscle. *J. Food Sci.* 38, 45-50.
- El-Badawi, A.A., Cain, R.F., Samuels, C.E., Anglemeir, A.F., 1964. Color and pigment stability of packaged refrigerated beef. *Food Technol.* 18, 154-163.
- Elgasim, E.A., 1977. The effect of ultrahydrostatic pressure of prerigor muscle on characteristics of economic importance. MS thesis. Oregon State University, Corvallis.
- Elgasim, E.A., Kennick, W.H., Anglemeir, A.F., Koohmaraie, M., Elkhalfifa, E.A., 1983. Effect of pressurization on bovine lysosomal enzyme activity. *Food Microstruct.* 2, 91-98.
- Elgasim, E.A., Koohmaraie, M., Anglemeir, A.F., Kennick, W.H., Elkhalfifa, E.A., 1985. The combined effects of the calcium activated factor and cathepsin D on

- skeletal muscle. *Food Microstruct.* 4, 55-62.
- Elkhalifa, E.A., Anglemeyr, A.F., Kennick, W.H., Elgasim, E.A., 1984. Effect of prerigor pressurization on post-mortem bovine muscle lactate dehydrogenase activity and glycogen degradation. *J. Food Sci.* 49, 593-594.
- Elkhalifa, E.A., Anglemeyr, A.F., Kennick, W.H., Elgasim, E.A., 1984. Influence of prerigor pressurization on beef muscle creatine phosphokinase activity and degradation of creatine phosphate and adenosine triphosphate. *J. Food Sci.* 49, 595-597.
- Enfors, S.O., Molin, G., Ternstrom, A., 1979. Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen, or air on the microflora of pork stored at 4°C. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 197-208.
- Erikson, U., Misimi, E., 2008. Atlantic salmon skin and fillet color changes effects by postmortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. *J. Food Sci.* 73, C50-C59.
- Erikson, U., Beyer, A.R., Sigholt, T., 1997. Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice-storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.* 62, 43-47.
- Essen-Gustavson, B., Karlstrom, K., Poso, R., 1991. Adenine nucleotide breakdown products in muscle at slaughter and their relation to meat quality in pigs with different halothane genotypes. *Proceedings of the 37th International Congress on Meat Science Technology* vol. 1 Kulmbach, Germany.
- Etherington, D.J., Sims, T.J., 1981. Detection and estimation of collagen. *J. Sci. Food Agric.* 32, 539-546.
- Eyre, D.R., Muir, G.C., 1974. Collagen polymorphism. Two molecular species in pig vertebral disc. *FEBS Lett.* 42, 192-196.
- Eyre, D.R., Oguchi, H., 1980. The hydroxyypyridinium crosslinks of skeletal collagens: their measurement, properties and a proposed pathway of formation. *Biophys. Res. Commun.* 92, 403-410.
- Eyre, D.R., Paz, M.A., Gallop, P.M., 1984. Crosslinking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 717-748.
- Fabiansson, S., Erichsen, I., Reutersward, M.L., 1984. The incidence of dark cutting beef in Sweden. *Meat Sci.* 10, 21-33.
- Farmer, L.J., 1999. *Poultry Meat Flavour*. CABI, Bristol.
- Farmer, L.J., Hagan, T.D.J., Paraskevas, O., 1996. A comparison of three sugars and inosine monophosphate as precursors of meat aroma. In: Taylor, A.J., Mottram, D.S. (Eds.), *Flavour Science: Recent Developments*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 225-230.
- Farmer, L.J., Hagan, T.D., Paraskevas, O., 1999. Role of selected precursors in meat flavour formation. In: Xiong, Y.L., Ho, C.T., Shahidi, F. (Eds.), *Quality Attributes of Muscle Foods*, Kluwer Academic, New York, p. 159-172.
- Faustman, C., Sun, Q., McClure, T.D., Liebler, D.C., 1999. Alpha, beta-unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3140-3144.
- Fellers, D.A., Wahba, I.J., Caldano, J.C., Ball, C.O., 1963. Factors affecting the color of packaged retail beef cuts. Origin of cuts, package type, and storage conditions. *Food Technol.* 17, 95.
- Fischer, C., Hamm, R., 1980. Biochemical studies on fast glycolysing bovine muscles. *Meat Sci.* 4, 41-49.
- Fischer, C., Hamm, R., Honikel, K.O., 1979. Changes in solubility and enzymic activity of muscle glycogen phosphorylase in PSE-muscles. *Meat Sci.* 3, 11-19.
- Fjølner-Modig, S., Ruderus, H., 1983. The influence of exhaustion and electrical stimulation on the meat quality of young bulls. Part 2. Physical and sensory properties. *Meat Sci.* 8, 203-220.
- Follett, M.J., Norman, G.A., Ratcliff, P.W., 1974. The ante-rigor excision and air cooling of beef semimembranosus muscles at temperatures between -5°C and +15°C. *J. Food Technol.* 9, 509-523.
- Forrest, J.C., Briskey, E.J., 1967. Response of striated muscle to electrical stimulation. *J. Food Sci.* 32, 483-488.
- Forster, A., Hill, C.P., 2003. Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends Cell. Biol.* 13, 550-553.
- Fortin, A., 1989. Preslaughter management of pigs and its influence on the quality (PSE/DFD) of pork. *Proceedings of the 35th International Congress of Meat Science and Technology*. Roskilde. Danish Meat Science Research Institute, 981-986.
- Fosmire, G.J., Brown, W.D., 1976. Yellowfin tuna (*Thunnus albares*) myoglobin: characterization and comparative stability. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 55, 293-299.
- Fraser, D.I., Punjamapirom, S., Dyer, W.J., 1961. Temperature and the biochemical processes occurring during rigor mortis in cod muscle. *J. Fish Res. Board Can.* 18, 641-644.
- Fritz, J.D., Greaser, M.L., 1991. Changes in titin and nebulin in postmortem bovine revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 56, 607-610.
- Fujita, T., Hori, Y., Otani, T., Kunita, Y., Sawa, S., Sakai, S., Tanaka, Y., Takagahara, I., Nakatani, Y., 1988. Applicability of the K_0 value as an index of freshness for porcine and chicken muscles. *Agric. Biol. Chem.* 52, 107-112.
- Fujimoto, D., 1977. Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine Achilles tendon collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 1124-1129.
- Furst, D.O., Osborn, M., Nave, P., Weber, K., 1988. The organization of titin filaments in the half sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitomes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell. Biol.* 106, 1563-1572.
- Gasc, N., Tache, S., Rathahao, E., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Guerand, F., 2007. 4-Hydroxynonenal in foodstuffs: haem concentration, fatty acid composition and freeze-drying are determining factors. *Redox. Rep.* 12, 40-44.
- Geesink, C., Ilian, M., Moton, J.D., Bickerstaffe, R., 2000. Involvement of calpains in post-mortem tenderization: a review of recent research. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 60, 99-102.
- Geesink, C., Morton, J., Kent, M., Bickerstaffe, R., 2000. Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. *J. Food Sci.* 65, 1318-1324.
- Geesink, G.H., Taylor, R.G., Koohmaraie, M., 2005. Calpain 3/p94 is not involved in post-mortem proteolysis. *J. Anim. Sci.* 83, 1646-1652.
- George, P., Stratmann, C.J., 1952. The oxidation of myoglobin to metmyoglobin by oxygen. 2. The relation between the first order rate constant and the partial pressure of oxygen. *Biochem. J.* 51, 418-425.
- Ghanekar, D.S., Bal, D.V., Kamala, S., 1956. Enzymes of some elasmobranchs from Bombay. III. Amylases of *Scoliodon sorrakowah* and *Sphyrna blochii*. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B.* 43, 134-148.
- Giddings, G.G., 1977a. The basis of color in muscle foods. *J. Food Sci.* 42, 288-294.
- Giddings, G.G., 1977b. The basis of color in muscle foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 9, 81-144.
- Giddings, G.G., Markarkis, P., 1973. On the interaction of myoglobin and hemoglobin with molecular oxygen and its lower oxidation states with cytochrome c. *J. Food Sci.* 38, 705-709.
- Gispert, A., Faucitano, L., Oliver, M.A., Guardia, M.D., Coll, C., Siggins, K., Harvey, K., Diestre, A., 2000. A survey of slaughter conditions halothane gene frequency in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Sci.* 55, 97-106.
- Godfrey, J. 1970. Tenderizing meat. US Patent 3.492.688.
- Gokhin, D.S., Bang, M.I., Zhang, J., Chen, J., Lieber, R.I., 2009. Reduced thin filament length in nebulin-knockout skeletal muscle alters isometric contractile properties. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 296, C1123-C1132.
- Goll, D.E., Otsuka, Y., Nagainis, P.A., Shannon, J.D., Sathe, S.K., Muguruma, M., 1983. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *J. Food Biochem.* 7, 137-177.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G., Christiansen, J.A., 1992. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie.* 74, 225-237.

- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731-801.
- Goodno, C.C., Wall, C.M., Perry, S.V.P., 1978. Kinetics and regulation of the myofibrillar adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 175, 813-821.
- Goutefongea, R., 1971. Influence du pH et de la température sur le solubilité des protéines musculaires du porc. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 11, 233-244.
- Grandin, T., 1980. The effect of stress on livestock and meat quality prior to and during slaughter. *Int. J. Stud. Anim. Prob.* 1, 313-337.
- Granger, B.L., Lazarides, E., 1978. The existence of an insoluble Z-disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell (Cambridge Mass.)* 15, 1253-1268.
- Greaser, M.L., Gergely, J., 1973. Purification and properties of the components from troponin. *J. Biol. Chem.* 248, 2125-2133.
- Greene, B.E., 1969. Lipid oxidation and pigment changes in raw beef. *J. Food Sci.* 34, 110-113.
- Greene, B.E., Hsin, I., Zipser, M.W., 1971. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *J. Food Sci.* 36, 940-942.
- Guardia, M.D., Estany, J., Balasch, S., Oliver, M.A., Gispert, M., Dietstre, A., 2004. Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYRI gene in pigs. *Meat Sci.* 67, 471-478.
- Guroff, G., 1964. A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239, 149-155.
- Hagen, O., 2008. Protease activity impacts flesh colour during post-mortem storage of farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): a condition referred to as chalky halibut. *Food Chem.* 125, 1294-1298.
- Hagen, O., Solberg, C., Johnston, I.A., 2008. Activity of aspartate (cathepsin D), cysteine proteases (cathepsins B, B + L, and H) and their influence on protein and water-holding capacity of muscle in commercially farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 5953-5959.
- Hagler, L., Coppes, R.I., Herman, R.H., 1979. Metmyoglobin reductase. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin. *J. Biol. Chem.* 254, 6505-6514.
- Hallund, O., Bendall, J.R., 1965. Long-term effect of electrical stimulation on the post-mortem fall of pH in the muscles of Landrace pigs. *J. Food Sci.* 30, 296-299.
- Hamm, R., 1977. Postmortem breakdown of ATP and glycogen in ground muscle: a review. *Meat Sci.* 1, 15-39.
- Hamm, R., Dalrymple, R.H., Honikel, K.O., 1973. Proceedings of the 19th Meeting of European Meat Research Workers vol. 1, 73.
- Hamoir, G., Konosu, S., 1965. Carp myogens of white and red muscles. General composition and isolation of low molecular weight components of abnormal amino acid composition. *Biochem. J.* 96, 85-97.
- Hanson, J., Huxley, H.E., 1955. The structural basis of contraction in striated muscle. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 9, 228-264.
- Harsham, A. and Detherage, F. E. 1951. Tenderization of meat. US Patent 2.544.681.
- Haselgrove, J.C., 1972. X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 341-352.
- Hashimoto, Y., 1965. Taste-producing substances in marine products. In: Kreuzer, R. (Ed.), *The Technology of Fish Utilization*. Fishing News (Books), London, p. 57.
- Hay, J.D., Currie, R.W., Wolfe, F.H., Sanders, E.J., 1973. Effects of post-mortem aging on chicken muscle fibrils. *J. Food Sci.* 38, 981-986.
- Herrera-Mendez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A., Ouali, A., 2006. Meat aging: reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 394-405.
- Herring, H.K., Cassens, R.G., Briskey, E.J., 1965. Sarcomere length of free and restrained bovine muscles at low temperature as related to tenderness. *J. Sci. Food Agric.* 16, 379-384.
- Hirao, T., Hara, T., Takahashi, K., 1984. Purification and characterization of cathepsin B from monkey skeletal muscle. *J. Biochem.* 95, 871-879.
- Hollung, K., Veiseth, E., Frystein, T., Aass, L., Langsrud, O., Hildrum, K.I., 2007. Variation in the response to manipulation of post-mortem glycolysis in beef muscles by low-voltage electrical stimulation and conditioning temperature. *Meat Sci.* 77, 372-383.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., Suzuki, A., 1994. Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in beef. *Meat Sci.* 38, 219-228.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., Suzuki, A., 1995. Levels of calpain and calpastatin in meat subjected to high pressure. *Meat Sci.* 41, 251-260.
- Honikel, K.O., Fischer, C., 1977. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscle. *J. Food Sci.* 42, 1633-1636.
- Honikel, K.O., Roncales, P., Hamm, R., 1983. The influence of temperature on shortening and rigor onset in beef muscle. *Meat Sci.* 8, 221-241.
- Honkavaara, M., 1989. Influence of selection phase, fasting and transport on porcine stress and on the development of PSE pork. *J. Agric. Sci. Finl.* 61, 415-423.
- Hood, D.E., 1980. Factors affecting the rate of metmyoglobin accumulation in prepackaged beef. *Meat Sci.* 4, 247-265.
- Hopkins, D.L., Taylor, R.G., 2002. Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderization. In: te Pas, M., Everts, M., Haagsman, H. (Eds.), *Muscle Development of Livestock Animals*. CAB International, Cambridge, MA, p. 363-389.
- Hopkins, D.L., Thompson, J.M., 2001. Inhibition of protease activity. 2. Degradation of myofibrillar proteins, myofibril examination and determination of free calcium levels. *Meat Sci.* 59, 199-209.
- Hopkins, D.L., Thompson, J.M., 2002. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderization in beef and sheep meat. *Aust. J. Agric. Res.* 53, 149-166.
- Horgan, D.J., Kuypers, R., 1985. Post-mortem glycolysis in rabbit longissimus dorsi muscles following electrical stimulation. *Meat Sci.* 12, 225-241.
- Horowitz, R., 2006. Nebulin regulation of actin filament lengths: new angles. *Trends Cell. Biol.* 16, 121-124.
- Houbak, M.B., Ertbjerg, P., Therkildsen, M., 2008. In vitro studies to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and microcalpain. *Meat Sci.* 79, 77-85.
- Howard, A., Lawrie, R.A., 1956. Beef quality. II. Physiological and biological effects of various prelaughter treatments. *Div. Food Preserv. Tech. Pap. (Aust. C.S.I.R.O.)* 2, 18.
- Hoyle, G., 1967. Diversity of striated muscle. *Am. Zool.* 7, 435-449.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S., 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71, 194-204.
- Huff-Lonergan, E., Mitsusashi, T., Beekman, D.D., Parrish Jr., F.C., Olson, D.G., Robson, R.M., 1996. Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 74, 993-1008.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W., Lonergan, S.M., 2010. Biochemistry of postmortem muscle – lessons on mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* 86, 184-195.
- Huffman, D.L., 1974. Effect of gas atmospheres on microbial quality of pork. *J. Food Sci.* 39, 723-725.
- Hughes, R.B., Jones, N.R., 1966. Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on flavour relations. *J. Sci. Food Agric.* 17, 434-436.
- Hutchins, B.K., Liu, T.H.P., Watts, B.M., 1967. Effect of additives and refrigeration on the reducing activity, metmyoglobin and malonaldehyde of raw ground beef. *J. Food Sci.* 32, 214-217.
- Huxley, H.E., 1964. Structural arrangements and the contraction mechanism in striated muscle. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 160, 442-448.
- Huxley, H.E., 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.
- Huxley, H.A., 1972. Structural changes in the actin and myosin-containing filaments [of muscle] during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 361-376.
- Hwang, I.H., Devine, C.E., Hopkins, D.L., 2003. Review: The biochemical and physical aspects of electrical stimulation on beef and sheep tenderness. *Meat Sci.* 65, 677-691.

- Hwang, I.H., Park, B.Y., Kim, S.H., Cho, J.M.L., 2004. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Sci.* 69, 79-91.
- Ilian, M.A., Bekhit, A.E.D., Bickerstaffe, R., 2004a. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. *Meat Sci.* 66, 317-327.
- Ilian, M.A., Bekhit, A.E.D., Bickerstaffe, R., 2004b. Does the newly discovered calpain 10 play a role in meat tenderization during post-mortem storage?. *Meat Sci.* 66, 387-397.
- Ishikawa, H., Bischoff, R., Holtzer, H., 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 38, 538-555.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S., Hashimoto, K., 1987. Effect of storage temperature on rigor mortis and ATP depletion in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. *J. Food Sci.* 52, 1514-1517.
- Jakobsen, M., Bertelsen, G., 2000. Color stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time and modified stress atmosphere composition. *Meat Sci.* 54, 49-57.
- Jayasingh, P., Cornworth, D.P., Brennand, C.P., Carpenter, C.E., Whittier, D.R., 2002. Sensory evaluation of ground beef stored in high oxygen modified atmosphere. *J. Food Sci.* 67, 3493-3496.
- Jeacocke, R.E., 1977. The temperature dependence of anaerobic glycolysis in beef muscle held in a linear temperature gradient. *J. Sci. Food Agric.* 28, 551-556.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K.I., Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6 – a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J. Anim. Sci.* 87, 2391-2399.
- Jiang, S.-T., Hwang, B.-S., Tsao, C.-T., 1987. Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 35, 22-27.
- John, L., Cornforth, D.P., Carpenter, C.E., Sorheim, O., Pettee, B.C., Whittier, D.R., 2004. Comparison of odor and thiobarbituric acid values of cooked hamburger patties after storage of beef chubs in modified atmospheres. *J. Food Sci.* 69, 608-614.
- John, L., Cornforth, D.P., Carpenter, C.E., Sorheim, O., Pettee, B.C., Whittier, D.R., 2005. Color and thiobarbituric acid values of cooked top sirloin steaks packaged in modified atmospheres of 80% oxygen, or 0.4% carbon monoxide, or vacuum. *Meat Sci.* 69, 441-449.
- Jones, N.R., 1965. Interconversions of flavorful catabolites in chilled frozen fish. *Prog. Refrig. Sci. Technol. Proc. 11th Int. Congr. Refrig.* 1963, 917.
- Jones, N.R., Murray, J., 1961. Nucleotide concentration in codling (*Gadus callarias*) muscle passing through rigor mortis at 0°C. *Z. Vergl. Physiol.* 44, 174-177.
- Jones, N.R., Murray, J., Livingstone, E.I., 1964. Rapid estimations of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish. *J. Sci. Food Agric.* 15, 763-774.
- Jones, N.R., Burt, J.R., Murray, J., Stroud, G.D., 1965. Nucleotides and the analytical approach to the rigor mortis problem. In: Kreuzer, R. (Ed.), *The Technology of Fish Utilization*, Fishing News (Books), London, p. 14-20.
- Joseph, P., Suman, S.P., Li, S., Beach, C.M., Steinke, L., Fontaine, M., 2010. Characterization of bison (*Bison bison*) myoglobin. *Meat Sci.* 84, 71-78.
- Joseph, P., Suman, S.P., Li, S., Claus, J.R., Fontaine, M., 2011. Primary structure of turkey myoglobin. *Food Chem.* 129, 175-178.
- Joseph, R.L., 1968. Biochemistry and quality in beef. Part I. *Process Biochem.* 3 (7), 20.
- Joseph, R.L., 1968. Biochemistry and quality in beef. Part II. *Process Biochem.* 3 (9), 32.
- Jung, S., de Lamballerie-Anton, M., Taylor, R.G., Ghoul, M., 2000. High-pressure effects on lysosome integrity and lysosomal enzyme activity in bovine muscle. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2467-2471.
- Kammer, S.M., 2000. Chalky halibut investigations 1997-1999. Technical Report No. 4. International Pacific Halibut Commission, Washington, p. 1-24.
- Kannan, G., Chawan, C.B., Kouakou, B., Gelaye, B., 2002. Influence of packaging method and storage time on shear value and mechanical strength of intramuscular connective tissue of chevon. *J. Anim. Sci.* 80, 2383-2389.
- Karijama, H., 1988. Shape of the myosin head in the rigor complex. Three-dimensional image reconstruction of the actin-tropomyosin heavy meromyosin complex. *J. Mol. Biol.* 204, 639-652.
- Karube, I., Sato, I., Araki, Y., Suzuki, S., Hideaki, Y., 1980. Monoamine oxidase electrode in freshness testing of meat. *Enzyme Microb. Technol.* 2, 117-120.
- Karube, I., Maatsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., Toyama, K., 1984. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agric. Food Chem.* 32, 314-319.
- Kassemsarn, B.O., Sang, P., Murray, J., Jones, N.R., 1963. Nucleotide degradation in the muscle of ice haddock, lemon sole and plaice. *J. Food Sci.* 28, 28-37.
- Kastenschmidt, L.L., Hoekstra, W.G., Briskey, E.J., 1968. Glycolytic intermediates and co-factors in "fast" and "slow-glycolyzing" muscles of the pig. *J. Food Sci.* 33, 151-158.
- Kelly, T.R., 1969. Quality in frozen cod and limiting factors on its shelf life. *J. Food Technol.* 4, 95-103.
- Kelly, T.R., Little, W.T., 1966. Brown discoloration in prerigor cut fish fillets. *J. Food Technol.* 1, 121-129.
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.I., Parr, T., 2010. Tenderness – an enzymatic view. *Meat Sci.* 84, 248-256.
- Kennick, W.H., Elgasim, E.A., Holmes, Z.A., Meyer, P.F., 1980. The effects of ultra-hydrostatic pressurization of prerigor muscle on prerigor meat characteristics. *Meat Sci.* 4, 33-40.
- Kiely, P.J., Nowlin, A.C., Moriarty, J.H., 1960. Bread aromatics from browning systems. *Cereal Sci. Today* 5, 273-274.
- Kiessling, A., Espe, M., Roohonen, R., Morkore, T., 2004. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter isoeugenol or CO₂ anesthesia. *Aquaculture* 236, 645-657.
- Kinbara, K., Ishiura, S., Tomioka, S., Sorimachi, H., Jeong, S.Y., Amano, S., Kawasaki, H., Kilmerer, B., Kimuras, S., Labeit, S., Suzuki, K., 1998. Purification of p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.* 335, 589-596.
- King, N.L., 1984. Breakdown of connectin during cooking of meat. *Meat Sci.* 11, 27.
- Kinbara, K., Ishiura, S., Tomioka, S., Sarimachi, H., Jeong, S.Y., Amano, S., Kawasaki, H., Kilmerer, B., Kimuras, S., Labeit, S., Suzuki, K., 1998. Purification of native p94, a muscle calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.* 335, 589-596.
- Koehler, H.H., Jacobson, M., 1967. Characteristics of chicken flavor-containing fraction extracted from raw muscle. *J. Agric. Food Chem.* 15, 707-712.
- Konagaya, S., Konagaya, T., 1979. Acid denaturation of myofibrillar protein as the main cause of formation of "yake niku", a spontaneously done meat, in red meat fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45 (2), 245.
- Koohmaraie, M., Geesink, G.H., 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality and particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* 74, 34-43.
- Koohmaraie, M., Kennick, W.H., Elgasim, E.A., Anglemeir, A.F., 1984. Effect of prerigor pressurization on the activity of calcium-activated factor. *J. Food Sci.* 49, 680-684.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, D.H., Mermann, H.J., 1991. Postmortem proteolysis of longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69, 617-624.
- Koohmaraie, M., Kent, M.P., Shackelford, S.D., Veiseth, E., Wheeler, T.L., 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. *Meat Sci.* 62, 345-352.
- Koutsidis, G., Elmore, J.S., Oruna-Concha, M.J., Campo, M.M., Wood, J.D., Mottram, D.S., 2008. Water-soluble precursors of beef flavour. II: Effect of post-mortem conditioning. *Meat Sci.* 79, 270-277.
- Kristensen, L., Purlow, P.P., 2001. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeleton proteins. *Meat Sci.* 58, 17-23.

- Kropf, D.H., 1993. Color stability. *Meat Focus Int.* 2, 269-275.
- Kruger, M., Wright, J., Wang, K., 1991. Nebulin as a tough regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, Nebulin size, and epitome profile. *J. Cell Biol.* 115, 97-107.
- Kubo, T., Gerelt, B., Han, G.N., Sugiyama, T., Nishiumi, T., Suzuki, A., 2002. Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced conditioning or high-pressure treatment. *Meat Sci.* 61, 415-418.
- Kuchenmeister, U., Kuhn, G., Wagner, J., Nurnberg, G., Ender, K., 1999. Postmortem changes in Ca²⁺ transporting proteins of sarcoplasmic reticulum in dependence on malignant hypothermia status in pigs. *Mol. Cell. Biochem.* 195, 37-46.
- Kuchenmeister, U., Kuhn, G., Ender, K., 2000. Seasonal effects on Ca²⁺ transport of sarcoplasmic reticulum and on meat quality of pigs with different malignant hypothermia status. *Meat Sci.* 55, 239-245.
- Kuhner, S., Fischer, S., 2011. Structural mechanism of the ATP-induced dissociation of rigor myosin from actin. *PNAS.* 108, 7793-7798.
- Kuninaka, A., 1967. Flavour potentiators. In: Schultz, H.W., Day, E.A., Libbey, L.M. (Eds.), *Chemistry and Physiology of Flavours*. Avi, Westport, CT, p. 515-535.
- Kurtzman, C.H., Sjostrom, L.B., 1964. The flavor-modifying properties of disodium inosinate. *Food Technol.* 18, 221-225.
- Kurzban, G.P., Wang, K., 1988. Grant polypeptides of skeletal muscle titin: sedimentation equilibrium in guanidine hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 1155-1161.
- Labeit, S., Gibson, T., Lakey, A., Leonard, K., Zeviani, M., Knight, P., Wardale, J., Trinick, J., 1991. Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett.* 282, 313-316.
- Labeit, S., Ottenheijm, C.A.C., Granzier, H., 2011. Nebulin, a major player in muscle health and disease. *FASEB J.* 25, 822-829.
- Lamare, M., Taylor, R.G., Farout, L., Briand, Y., Briand, M., 2002. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Sci.* 61, 199-204.
- Landrock, A.H., Wallace, G.A., 1955. Discoloration of fresh red meat and its relationship to film oxygen permeability. *Food Technol.* 9, 194-196.
- Lawrie, R.A., 1966. The effect of species in a given muscle (longissimus dorsi) and at a given temperature (37°C) on the progress of glycolysis measured by a fall in pH. *Meat Science, First English edition*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Lawrie, R.A., 1998. *Meat Science*, sixth ed. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge UK. p. 106.
- Lawrie, R.A., Gatherum, D.P., Hale, H.P., 1958. Abnormally low ultimate pH in pig muscle. *Nature (London)* 182, 807-808.
- Lazarides, E., Hubbard, B.D., 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4344-4348.
- Lee, C.A., Newbold, R.P., 1963. The pathway of degradation of inosinic acid in bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 72, 349-352.
- Lee, E.H., Oshima, T., Koizumi, C., 1982. High performance liquid chromatographic determination of K value as an index of freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 255.
- Lee, S., Faustman, C., Liebler, D.C., Phillips, A.L., 2003. Porcine oxymyoglobin and lipid oxidation in vitro. *Meat Sci.* 63, 241-247.
- Lee, S., Joo, S.T., Alderton, A.L., Hill, D.W., Faustman, C., 2003. Porcine oxymyoglobin and lipid oxidation in yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) loins. *J. Food Sci.* 68, 1664-1668.
- Lehman, W., Galinska-Rakoczy, A., Hatch, V., Tobacman, L.S., Crig, R., 2009. Structural basis for the activation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J. Mol. Biol.* 388, 673-681.
- Lepetit, J., 2007. A theoretical approach of the relationships between collagen content, cross-links and meat tenderness. *Meat Sci.* 76, 147-159.
- Lepetit, J., 2008. Collagen contribution to meat toughness: theoretical aspects. *Meat Sci.* 80, 960-967.
- Levy, M.J., Livingston, D.J., Criddle, R.S., Brown, W.D., 1985. Isolation and characterization of metmyoglobin reductase from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81, 809-814.
- Lewis, G.J., Purslow, P.P., 1990. Connective tissue differences in strength of cooked meat across the muscle fiber direction due to test specimen size. *Meat Sci.* 28, 183-194.
- Light, N., Champion, A.E., Voyle, C., Bailey, A.J., 1985. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. *Meat Sci.* 13, 137-149.
- Lister, D., 1970. The physiology of animals and the use of their muscle for food. In: Briskey, E.J., Locker, R.G., Marsh, B.B. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. University of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 705.
- Liu, M.J., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., Thomas, P.J., 2003. Endoproteolytic activity of proteasome. *Science* 229, 408-411.
- Locker, R.H., 1984. The role of gap filaments in muscle and meat. *Food Microstruct.* 3, 17-32.
- Locker, R.H., Daines, G.J., 1975. Rigor mortis in beef sternomandibularis muscle at 37°C. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1721-1733.
- Locker, R.H., Leet, N.G., 1976. Histology of highly stretched beef muscle. II. Further evidence on location and nature of gap filaments. *J. Ultrastruct. Res.* 55, 157-172.
- Locker, R.H., Leet, N.G., 1976. Histology of highly stretched beef muscle. IV. Evidence for movement of gap filaments through the Z-line, using the N-line and M-line as markers. *J. Ultrastruct. Res.* 56, 31-38.
- Locker, R.H., Wild, D.J.C., 1984. The fate of the large proteins of the myofibril during tenderizing treatments. *Meat Sci.* 11, 89-108.
- Long, J. B. 2000. Treatment of meat by capacitor discharge. US Patent 6.120.828.
- Love, R.M., 1975. Variability in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of the flesh. *J. Fish. Res. Board Can.* 32, 2333-2342.
- Love, R.M., 1988. Gaping. In: Love, R.M. (Ed.), *The Food Fishes: Their Intrinsic Variation and Practical Implication*. Farrand Press, London, p. 161-180.
- Love, R.M., Roberson, I., Smith, G.L., Whittle, K.J., 1972. The texture of cod muscle. *J. Texture Stud.* 5, 201-212.
- Love, R.M., Lavety, J., Vellas, F., 1982. Unusual properties of the connective tissues of cod (*Gadus morhua* L.). In: Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E., Ward, D.R. (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Avi, Westport, CT, p. 67-73.
- Luciano, F.B., Anton, A.A., Rosa, C.F., 2007. Biochemical aspects of meat tenderness: a brief review. *Arch. Zootecnia.* 56, 1-8.
- Lundstrom, K., Nilsson, H., Malmfors, B., 1977. Interrelationships between meat quality characteristics in pigs. *Proceedings of Muscle Function and Porcine Meat Quality, NJF Symposium. Acta Agric. Scand. (Suppl. 1)*, 71.
- Luno, M., Roncales, P., Djenane, D., Beltran, J.A., 2000. Beef shelf life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. *Meat Sci.* 55, 413-419.
- Lusby, M.L., Ridpath, J.F., Parrish Jr., F.C., Robson, R.M., 1983. Effect of post mortem storage on the degradation of the myofibrillar protein titin in bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.* 48, 1787-1790.
- Ma, H.-J., Ledward, D.A., 2004. High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Sci.* 68, 347-355.
- MacBride, M.A., Parrish Jr., F.C., 1977. The 30,000 dalton component of tender bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.* 42, 1627-1629.
- MacCallum, W.A., Jaffray, J.I., Churchill, D.N., Idler, D.R., Odense, P.H., 1967. Postmortem physicochemical changes in unfrozen Newfoundland trap-caught cod. *J. Fish Res. Board Can.* 24, 651-676.
- McCormick, R.J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Sci.* 78, 785-791.

- McCrea, S.E., Secombe, C.G., Marsh, B.B., Carse, W.A., 1971. Studies in meat tenderness. 9. The tenderness of various lamb muscles in relation to their skeletal restraint and delay before freezing. *J. Food Sci.* 36, 566-570.
- MacDougall, D.B., 1982. Changes in colour and opacity of meat. *Food Chem.* 9, 75-88.
- Macfarlane, J.J., 1973. Prerigor pressurization of muscle, effect of pH, shear value and taste panel assessment. *J. Food Sci.* 38, 294-298.
- McKeith, F.K., Smith, G.C., Dutson, T.R., Savell, J.W., Hostetler, R.L., Carpenter, Z.L., 1980. Electrical stimulation of intact or split steer and cow carcasses. *J. Food Prot.* 43, 795-798.
- MacLeod, G., 1994. The flavour of beef. In: Shahidi, F. (Ed.), *The Flavour of Meat and Meat Products*. Blackie, Glasgow, p. 4-37.
- MacLeod, R.A., Jonas, R.E.E., Roberts, E., 1963. Glycolytic enzymes in the tissues of a salmonoid fish (*Salmo gairdnerii gairdnerii*). *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 1971-1981.
- Macy, R.L., Neumann, H.D., Bailey, M.E., 1964. Water-soluble flavour and odour precursors of meat. I. Qualitative study of certain amino acids, carbohydrates, non amino-acid nitrogen compounds and phosphoric acid esters of beef, pork and lamb. *J. Food Sci.* 29, 136-141.
- Macy, R.L., Naumann, H.D., Bailey, M.E., 1970. Water-soluble flavor and odor precursors of meat. 5. Influence of heating on acid extractable non-nucleotide chemical constituents of beef, lamb and pork. *J. Food Sci.* 35, 83-87.
- Madruga, M.S., Elmore, J.S., Oruna-Concha, M.J., Balagiannis, D., Mottram, D.S., 2010. Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. *Food Chem.* 123, 513-520.
- Maga, J.A., 1994. Umami flavor in meat. In: Shahidi, F. (Ed.), *Flavor of Meat and Meat Products*. Chapman and Hall, Glasgow, p. 98-115.
- Maheswarappa, N.B., Faustman, C., Tatiyaborworntam, N., Yin, S., Ramanathan, R., Mancini, R.A., 2010. Detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts of turkey and chicken myoglobins using mass spectrometry. *Food Chem.* 122, 836-840.
- Makinodan, Y., Ikeda, S., 1976. Studies on fish muscle protease. VI. Separating carp muscle cathepsins A and D and some properties of carp muscle cathepsin A. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42, 239-247.
- Marsh, B.B., 1954. Rigor mortis in beef. *J. Sci. Food Agric.* 5, 70-75.
- Marsh, B.B., Leet, N.G., 1966. Studies on meat tenderness. III. The effects of cold-shortening on tenderness. *J. Food Sci.* 31, 450-459.
- Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., Eguchi, G., 1976a. Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 82, 347-350.
- Maruyama, K., Natori, R., Nonomura, Y., 1976b. New elastic protein from muscle. *Nature (London)* 262, 58-59.
- Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Harada, S., Eguchi, G., 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 82, 317-337.
- Maruyama, K., Kimura, M., Kimura, S., Ohashi, K., Suzuki, K., Katunuma, N., 1981. Connectin, an elastic protein muscle. Effects of proteolytic enzymes in situ. *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 701.
- Maltin, C., Balcerak, D., Tilley, R., Delday, M., 2003. Determinants of meat quality. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 337-347.
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research on meat color. *Meat Sci.* 71, 100-121.
- Manu-Tawiah, W., Ammann, L.L., Sebraneh, J.G., Molins, A., 1991. Extending the color stability and shelf life of fresh meat. *Food Technol.* 45 (94), 96-98. 100-102.
- Matsuishi, M., Okitani, A., 1997. Proteasome from rabbit skeletal muscle: some properties and effect on muscle proteins. *Meat Sci.* 45, 451-462.
- Matsumiya, Y., Mochizuki, A., 1993. Existence of a new type of cysteine protease in ordinary and dark muscle of common mackerel. *Bull. Coll. Agr. Vet. Med. Nihon Univ.* 48, 112-118.
- Matsuura, F., Hashimoto, K., Kikawada, S., Yamaguchi, K., 1962. Studies on the autoxidation velocity of fish myoglobin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 28, 210-215.
- Maudhavi, D.L., Carpenter, C.G., 1993. Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen consumption of beef muscles. *J. Food Sci.* 58, 939-942.
- Meek, K.I., Claus, J.R., Duncan, S.E., Marriot, N.G., Solomon, M.B., Kathman, S.J., 2000. Quality and sensory characteristics of selected pre-rigor, early-deboned broiler breast meat tenderized using hydrodynamic shock waves. *Poultry Sci.* 79, 126-136.
- Melody, J.L., Lonergan, S.M., Rowe, L.J., Huiatt, T.W., Mayes, M.S., Huff-Lonergan, E., 2004. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.* 82, 1195-1205.
- Mendelson, R., 1982. X-ray scattering by myosin S-1, implications for the steric blocking model of muscle control. *Nature (London)* 298, 665.
- Meinert, L., Schäfer, A., Bjerregaard, C., Aaslyng, M.D., Bredie, W.L.P., 2009. Comparison of glucose, glucose 6-phosphate, ribose, and mannose as flavour precursors in pork; the effect of monosaccharide addition on flavour generation. *Meat Sci.* 81, 419-425.
- de Meis, L., Vianna, A.L., 1979. Energy interconversions by the Ca dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 275-289.
- Meyer, L.H., 1964. *Food Chemistry*, third ed. Reinhold, New York.
- Meyers, S.N., Rodriguez-Zas, S.L., Beever, J.E., 2007. Fine-mapping of QTL influencing pork tenderness on porcine chromosome 2. *BMC Genomics.* 8, 69.
- Michie, I., 2001. Causes of downgrading in salmon farming industry. In: Kestin, S.C., Warriss, P.D. (Eds.), *Farmed Fishing Quality*, Blackwell Science, Oxford, p. 129-136.
- Mickelson, J.R., Louis, C.F., 1996. Malignant hypothermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel and cell Ca²⁺ regulation defects. *Physiol. Rev.* 76, 537-592.
- Mikami, M., Whiting, A.H., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., Etherington, D.J., 1987. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin 1 and lysosomal lysates. *Meat Sci.* 21, 81-97.
- Miki, H., Nishimoto, J., 1984. Kinetic parameters of freshness-lowering and discoloration based on temperature dependence in fish muscles. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 281-285.
- Milligan, R.A., Flicker, P.F., 1987. Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 105, 29-39.
- Mitchell, M.A., Kettlewell, P.J., 1998. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems!. *Poultry Sci.* 77, 1803-1814.
- Moore, P.B., Huxley, H.E., De Roosier, D.J., 1970. Three-dimensional reconstruction of F-actin. Thin filaments and decorated filaments. *J. Mol. Biol.* 50, 279-295.
- Mori, T., Hashida, W., Hirai, A., Kawaski, Y., 1974. Assessment of freshness of marine products based on composition in nucleic acid related substances in canned sea food. IV. Nucleic acid decomposing enzyme of oysters. *Toyo Shokutin Kogyo Tanki Daigaku Toyo Shokutin Kenkyusho* 11, 154-159.
- Morkore, T., Mazo, T.P.L., Tahirovic, V., Einen, O., 2008. Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Aquaculture* 277, 231-238.
- Morrison, E.H., Mielche, M.M., Porslow, P.P., 1998. Immunolocalisation of intermediate filament proteins in porcine meat. Fibre-type and muscle specific variations during conditioning. *Meat Sci.* 50, 91-104.
- Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B., 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of longissimus thoracis of Blonde d'Aquitaine young bulls. A central role of hsp7 isoforms. *Meat Sci.* 78, 297-304.
- Mottram, D.S., Madruga, M.S., 1994. The role of inosine monophosphate as a flavour precursor in meat aroma. In: Maarse, H., van der Heij, D.G. (Eds.), *Trends in Flavour Research*. Elsevier, Amsterdam, p. 339-344.
- Mottram, D.S., Nobrega, I.C.C., 1998. Formation of volatile sulphur compounds in reaction mixtures containing cysteine and three different ribose compounds.

- In: Contis, E.T., Spanier, A.M., Shahidi, F. (Eds.), *Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences*. Proceedings of the 9th International Flavor Conference; Elsevier, Amsterdam, p. 483-492.
- Murachi, T., 1985. Calcium-dependent proteases and their specific inhibitors: calpain and calpastatin. *Biochem. Soc. Symp.* 49, 149-167.
- Murakami, K., Stewart, M., Nozawa, K., Tomil, K., Kudou, N., Igarashi, N., Shirakihara, Y., Wakatsuki, S., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., 2008. Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin. *T. PNAS.* 105, 7200-7205.
- Murray, J.M., Weber, A., 1974. The cooperative action of muscle protein. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 50, 59-65.
- Nagayama, F., 1966. Mechanisms of breakdown and synthesis of glycogen in tissues of marine animals. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 32, 188.
- Nakano, T., Thompson, J.R., Aherne, F.X., 1991. Concentration of the crosslink pyridinoline in porcine skeletal muscle epimysium. *Can. J. Inst. Food Sci. Technol.* 18, 100-102.
- Nakatani, Y., Fujita, T., Sawa, S., Otani, T., Hori, Y., Takagahara, I., 1986. Changes in ATP-related compounds of beef and rabbit muscles and a new index of freshness of muscle. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1751-1756.
- Nazir, D.J., Magar, N.G., 1963. Biochemical changes in fish muscle during rigor mortis. *J. Food Sci.* 28, 1-7.
- Neti, G., Novak, S.M., Thompson, V.F., Goll, D.E., 2009. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover?. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1383-C1390.
- Newbold, R.P., 1966. Changes associated with rigor mortis. In: Briskey, E.J., Cassens, R.G., Trautman, J.C. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as Food*, University of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 213-224.
- Newbold, R.P., Lee, C.A., 1965. Post-mortem glycolysis in skeletal muscle. The extent of glycolysis in diluted preparation of mammalian muscle. *Biochem. J.* 97, 1-6.
- Newbold, R.P., Scopes, R.K., 1967. Post-mortem glycolysis in ox skeletal muscle. Effects of temperature on the concentrations of glycolytic intermediates and cofactors. *Biochem. J.* 105, 127-136.
- Newbold, R.P., Small, L.M., 1985. Electrical stimulation of post-mortem glycolysis in the semitendinosus muscle of sheep. *Meat Sci.* 12, 1-16.
- Nissen, H., Sorheim, O., Dainty, R., 1996. Effects of vacuum, modified atmospheres and storage temperature on the microbial flora of packaged beef. *Food Microbiol.* 13, 183-191.
- Noda, T., Isogai, L., Hayashi, H., Katunuma, N., 1981. Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B and morphological alteration of isolated myofibrils by this enzyme. *J. Food Biochem.* 90, 371-379.
- Nonneman, D., Lindholm-Perry, A.K., Shackelford, S.D., King, D.A., Wheeler, T.L., Rohrer, G.A., Bierman, C.D., Schneider, J.F., Miller, R.K., Zerby, H., Moeller, S.J., 2011. Predictive markers for tenderness in commercial pig populations. *J. Anim. Sci.* 89, 2663-2672.
- Obatake, A., Heya, H., 1985. A rapid method to measure dark content in fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 1001-1004.
- Obatake, A., Tsumiyama, S., Yamamoto, Y., 1985. Extractive nitrogenous constituents from the dark muscle of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 5, 1461-1468.
- Ochiai, Y., Ueki, N., Watabe, S., 2009. Effects of point mutations on the structural stability of tuna myoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 153, 223-228.
- Oe, M., Ohnishi-Kameyama, M., Nakajima, I., Muroya, S., Chikuni, K., 2007. Muscle type expression of tropomyosin isoforms in bovine skeletal muscles. *Meat Sci.* 75, 558-561.
- Offer, G., Cousins, T., 1992. The mechanism of drip production: formation of two compartment of extracellular space in muscle postmortem. *J. Sci. Food Agric.* 58, 107-116.
- Offer, G., Trinick, J., 1983. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.* 8, 245-281.
- Ofstad, R., Olsen, R.L., Taylor, R., Hannesson, K.O., 2006. Breakdown of intramuscular tissue of cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) related to gaping. *LWT Food Sci. Technol.* 39, 1143-1154.
- O'Halloran, G.R., Troy, D.J., Buckley, D.J., Reville, W.J., 1997. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Sci.* 47, 187-210.
- O'Keefe, M., Hood, D.E., 1980-1981. Anoxic storage of fresh beef. 1. Nitrogen and carbon dioxide storage atmospheres. *Meat Sci.* 5, 27-39.
- O'Keefe, M., Hood, D.E., 1982. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. *Meat Sci.* 7, 209-228.
- Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H., Fujimaki, M., 1980. Purification and some properties of a myofibrillar protein-degrading protease, cathepsin rabbit skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)* 87, 1133-1143.
- Oliver, M.A., Gispert, M., Diestre, A., 1988. Estudio del pH, de los musculos Longissimus dorsi y Semimembranosus en canales porcinos comerciales. *Med. Vet.* 1, 45-49.
- Olson, D.G., Parrish Jr, F.C., 1977. Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. *J. Food Sci.* 42, 506-511.
- Olson, D.G., Parrish Jr, F.C., Stromer, M.H., 1976. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. *J. Food Sci.* 41, 1036-1041.
- Olson, D.G., Parrish Jr, F.C., Dayton, W.R., Goll, D.E., 1977. Effect of postmortem storage and calcium activated factor on the myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.* 42, 117-124.
- Ordway, G.A., Garry, D.J., 2004. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Expt. Biol.* 207, 3441-3446.
- Orlowski, M., Wilk, S., 2003. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 1-5.
- Osebold, W.R., Pedrini, V., 1976. Pepsin-solubilized collagen of human nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Biochim. Biophys. Acta.* 434, 390-405.
- O'Shea, J.M., Robson, R.M., Huiatt, T.W., Hartzer, M.K., Stromer, M.H., 1979. Purified desmin b from adult mammalian skeletal muscle: a peptide mapping comparison with desmin from adult mammalian and avian smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 972-980.
- O'Shea, J.M., Robson, R.M., Hartzer, M.K., Huiatt, T.W., Rathbun, W.E., Stromer, M.H., 1981. Purification of desmin from adult mammalian skeletal muscle. *Biochem. J.* 195, 345-356.
- Ota, F., Nakamura, T., 1952. Change of ammonia content in fish meat by heating under pressure. Relation between increase of ammonia and the freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 18, 15.
- Otsuka, Y., Homma, N., Shiga, K., Ushiki, J., Ikeuchi, Y., Suzuki, A., 1988. Purification and properties of rabbit muscle proteasome and its effect on myofibrillar structure. *Meat Sci.* 49, 365-378.
- Ottenheijm, C.A., Fong, C., Vangheluwe, P., Wutack, F., Babu, G.J., Periasamy, M., Witt, C.C., Labeit, S., Granzier, H., 2008. Sarcoplasmic reticulum calcium uptake and speed of relaxation are depressed in nebulin-free skeletal muscle. *FASEB J.* 22, 2912-2917.
- Ouali, A., 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74, 251-265.
- Ozawa, S., Mitsunashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Itoh, N., Itagaki, K., Kohno, Y., Dohgo, T., 2000. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese black steers. *Meat Sci.* 54, 65-70.
- Pappas, C.T., Krieg, P.A., Gregorio, C.C., 2010. Nebulin regulates actin filament lengths by a stabilization mechanism. *J. Cell Biol.* 189, 859-870.
- Parr, T., Sensky, P.L., Scothern, G.P., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Wood, J.D., Warkup, C., 1999a. Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 77, 661-668.
- Parr, T., Sensky, P.L., Scothern, G.P., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Wood, J.D., Warkup, C., 1999b. Immunochemical study of the calpain system in porcine longissimus dorsi muscle with high and low shear force values. *J. Anim. Sci.* 77 (Suppl. 1), 164.

- Parrish Jr., F.C., Lusby, M.L., 1983. An overview of a symposium on the fundamental properties of muscle proteins important in meat science. *J. Food Biochem.* 7, 125-135.
- Parrish Jr., F.C., Vandell, C.J., Culler, R.D., 1979. Effect of maturity and marbling on the myofibril fragmentation index of bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.* 44, 1668-1671.
- Parry, D.A.D., Squire, J., 1973. Structural role of tropomyosin in muscle regulation, analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J. Mol. Biol.* 75, 33-55.
- Partmann, W., 1965. Changes in proteins, nucleotides and carbohydrates during rigor mortis. In: Kreuzer, R. (Ed.), *The Technology of Fish Utilization*, Fishing News (Books), London, p. 4.
- Partmann, W., Frank, H.K., 1973. Storage of meat in controlled gaseous atmospheres. *Prog. Refrig. Sci. Technol., Proc. 13th Int. Conf. Refrig.* 1971 (Vol. 3), 17.
- Patashnik, M., Groninger, H.S., 1964. Observations on the milky condition in some Pacific coast fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 21, 335-346.
- Paterson, B.C., Parrish Jr., F.C., 1987. SDS-PAGE conditions for detection of titin and nebulin in tender and tough bovine muscle. *J. Food Sci.* 52, 509-510.
- Pearce, K.L., Hopkins, D.L., Williams, Jacob, R.H., Pethwick, D.W., Phillips, J.K., 2009. Alternating frequency to increase the response to stimulation from medium voltage electrical stimulation and the effect on objective meat quality. *Meat Sci.* 81, 188-195.
- Pearson, A.M., Love, J.D., Shorland, F.B., 1977. Warmed over flavor in meat poultry and fish. *Adv. Food Res.* 23, 2-74.
- Pegg, R.B., Shahidi, F., 1997. Unravelling the chemical identity of meat pigments. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 561-589.
- Penny, I.F., 1974. The action of a muscle proteinase on the myofibrillar proteins of bovine muscle. *J. Sci. Food Agric.* 25, 1273-1284.
- Perry, S.V., 1979. The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 7, 593-617.
- Perry, S.V., 2001. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 5-49.
- Petracci, M., Bianchi, M., Cavani, C., 2009. The European perspective on pale, soft, exudative conditions in poultry. *Poultry Sci.* 88, 1518-1523.
- Pirko, P.C., Ayres, J.C., 1957. Pigment changes in packaged beef during storage. *Food Technol.* 11, 461-468.
- Piskarev, A., Dibirasulaev, M., Korzhenko, V.P., 1972. Changes in the content of free amino acids and nucleotides in warm and matured meat during sterilization. *Myasnaya Industriya USSR* 43, 34-37.
- Porter, R., Koury, B., Stone, F., 1996. Comparison of cathepsin B, D, H, and L activity in four species of Pacific fish. *J. Food Biochem.* 19, 429-442.
- Poso, A., Puolanne, E., 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Sci.* 70, 423-434.
- Potter, J.D., Gergely, J., 1975. The calcium and magnesium binding sites of troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250 4628-4623.
- Purslow, P.P., 1985. The physical basis of meat texture: observations on the fracture behaviour of cooked bovine *M. semitendinosus*. *Meat Sci.* 12, 39-60.
- Redbottom, R., Lea, P., Hildrum, K.I., 2001. Relative influence of low-voltage electrical stimulation, chilling rate and ageing time on tenderness of *M. longissimus dorsi* of Norwegian cattle. *Acta Agric. Scand. A. Anim. Sci.* 51, 184-191.
- Reineccius, G., 1994. *Source Book of Flavors*. Chapman and Hall, New York.
- Reiser, K., McCormick, R.J., Rucker, R.B., 1992. Enzymatic and nonenzymatic crosslinking of collagen and elastin. *FASEB J.* 6, 2439-2449.
- Rhee, M.S., Kim, B.C., 2001. Effect of low voltage electrical stimulation and temperature conditioning on postmortem changes in glycolysis and calpains activities of Korean native cattle (Hanwoo). *Meat Sci.* 58, 231-237.
- Richardson, F.L., Stromer, M.H., Huiatt, T.W., Robson, R.M., 1981. Immunoelectron and fluorescence microscope localisation of desmin in mature avian muscles. *Eur. J. Cell Biol.* 26, 91-101.
- Ridpath, J.F., Robson, R.M., Huiatt, T.W., Trenkle, A.H., Lusby, M.L., 1982. Localization and rate of accumulation of nebulin in skeletal and cardiac muscle cell cultures. *J. Cell Biol.* 95, 361a.
- Ringkob, T.P., Marsh, B.B., Greaser, M.L., 1988. Change in titin position in postmortem bovine muscle. *J. Food Sci.* 53, 276-277.
- Ritchie, A.D., 1926. Lactic acid and rigor mortis. *J. Physiol. (London)* 6 (1), iv-v.
- Robbins, F.M., Cohen, S.H., 1976. Effects of cathepsin enzymes from spleen on the microstructure of bovine semimembranous muscle. *J. Texture Stud.* 7, 137-142.
- Robert, N., Briand, M., Taylor, R.G., Briand, Y., 1999. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.* 51, 149-153.
- Robins, S.P., Shimokomaki, M., Bailey, A.J., 1973. The chemistry of the collagen cross-links. Age-related changes in the reducible components of intact collagen fibres. *Biochem. J.* 131, 771-780.
- Robins, S.P., 1983. Cross-linking of collagen. Isolation, structural characterization and glycosylation of pyridinoline. *Biochem. J.* 215, 167-173.
- Robson, R.M., O'Shea, J.M., Hartzler, M.K., Rathbun, W.E., LaSalle, F., Schreiner, P.J., Kasang, L.E., Stromer, M.H., Lusby, M.L., Ridpath, J.F., Pang, Y.-Y., Evans, R.R., Zeece, M.G., Parrish, F.C., Huiatt, T.W., 1984. Role of new cytoskeletal elements in maintenance of muscle integrity. *J. Food Biochem.* 8, 1-24.
- Root, D.D., Wang, K., 1994. Calmodulin sensitive interaction of human nebulin fragments with actin and myosin. *Biochemistry* 33, 12581-12591.
- Root, D.D., Wang, K., 2001. High-affinity actin-binding nebulin fragments influence the actoS1 complex. *Biochemistry* 40, 1171-1186.
- Rowe, L.J., Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M., 2001. Desmin degradation influences water-holding capacity and tenderness in fresh pork [abstract]. *J. Anim. Sci.* 20 (Suppl. 1).
- Rowe, R.W.D., 1974. Collagen fiber arrangement in intramuscular connective tissue. Changes associated with muscle shortening and their possible relevance to raw meat toughness measurements. *J. Food Technol.* 9, 501-509.
- Ryder, J.M., 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33, 678-680.
- Ryu, Y.C., Kim, B.C., 2005. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Sci.* 71 351-257.
- Sagili, J.V.V., Claus, J.R., 2003. Tenderization effects of electrically produced hydrodynamic shock waves on top round and strip loin muscles of beef. *Proceedings of the 56th Reciprocal Meat Conference.*, 15-19 June American Meat Science Association, Columbia, MO 15-19 June.
- Saito, T., Arai, K., 1958. Further studies of inosinic acid formation in carp muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 23, 579-580.
- Saito, T., Arai, A., Matsuyoshi, M., 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 24, 749-750.
- Sakai, T., Yamauchi, K., Kuwazuru, S., Gotoh, N., 1998. Relationships between 4-hydroxy-2-nonenal, 2-thiobarbituric acid reactive substances and n-6 polyunsaturated fatty acids in refrigerated and frozen pork. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2028-2029.
- Saleh, B., Watts, B.M., 1968. Substrates and intermediates in the enzymatic reduction of metmyoglobin in ground beef. *J. Food Sci.* 33, 353-357.
- Samejima, K., Wolfe, F.H., 1976. Degradation of myofibrillar protein components during postmortem aging of chicken muscle. *J. Food Sci.* 41, 250-254.
- Sammel, L.M., Hunt, M.C., Kropf, D.H., Hachmeister, K.A., Johnston, D.E., 2002. Comparison of assays for metmyoglobin reducing ability in beef inside and outside semimembranosus muscle. *J. Food Sci.* 67, 978-984.
- Sandwick, R., Johanson, M., Breuer, E., 2005. Maillard reaction of ribose-5-phosphate and amino acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 85-96.
- Santos, C., Roseiro, L., Gonclaves, H., Melo, R.S., 1994. Incidence of different pork quality categories in a Portugal slaughterhouse: a survey. *Meat Sci.* 38, 279-287.
- Saterlee, L.D., Zecharia, N.Y., 1872. Porcine and ovine myoglobin: isolation, purification, characterization and stability. *J. Food Sci.* 37, 909-912.
- Savell, J.W., Smith, G.C., Dutson, T.R., Carpenter, Z.L., Suter, D.A., 1977. Effect of electrical stimulation on palatability of beef, lamb and goat meat. *J. Food*

- Savell, J.W., Dutson, T.R., Smith, G.C., Carpenter, Z.L., 1978. Structural changes in electrically stimulated beef muscles. *J. Food Sci.* 43, 1606-1607.
- Savell, J.W., McKeith, F.K., Smith, G.C., 1981. Reducing postmortem aging time of beef with electrical stimulation. *J. Food Sci.* 46, 1777-1781.
- Schaefer, R.B., 2004. Innovative water treatment technology for water treatment. BSF SBIR Phase 1 Final Report, Contract No. DMI-0318911, June 2004.
- Schaefer, R.B., 2004. Nontoxic sparker control of zebra mussels. EPA SBIR Phase II, Final Report, Contract No. 68-D-02-059, June 2004.
- Schaefer, R.B., 2004. High efficiency long lifetime sparker sources. US Patent No. 6,687,189, 3 February 2004.
- Schaefer, R.B., 2004. High efficiency and projection reflectors for light and sound. US Patent No. 6,672,729, 6 January 2004.
- Schaefer, R.B., 2005. High source level sparker for navy applications. Phase II SBIR, Naval Air Warfare Center, Contract No. N00421-03-C-0570, September 2003-August 2005.
- Schiaffino, S., Reggiani, C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76, 371-423.
- Schwartz, W.N., Bird, J.N.C., 1977. Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochem. J.* 167, 811-820.
- Scopes, R.K., 1964. The influence of post-mortem conditions on the solubilities of muscle proteins. *Biochem. J.* 91, 201-207.
- Scopes, R.K., 1970. In: Briskey, E.J., Cassens, R.G., Marsh, B.B. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, Characterization and study of sarcoplasmic proteins*, Vol. 2. University of Wisconsin Press, Madison, WI, p. 471-492.
- Seideman, S.C., Cross, H.R., Smith, G.C., Durland, P.R., 1984. Factors associated with fresh meat colour: a review. *J. Food Qual.* 6, 211-237.
- Sensky, P.L., Parr, T., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Warkup, C.C., 1998. Differences in calpain enzyme system in tough and tender samples of porcine longissimus dorsi. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.* 16.
- Sentandreu, M.A., Coulis, G., Ouali, A., 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 398-419.
- Seyfert, M., Mancini, R.A., Hunt, M.C., Tang, J., Faustman, C., Garcia, M., 2006. Colour stability, reducing activity and cytochrome c oxidase activity of five bovine muscles. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8919-8925.
- Seymour, J., O'Brien, E.J., 1980. The position of tropomyosin in muscle thin filaments. *Nature (London)* 283, 680-682.
- Shahidi, F., Chong, X., Dunajski, E., 1994. Freshness quality in harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. *J. Agric. Food Chem.* 42, 868-872.
- Shinokomaki, M., Elsdon, D.F., Bailey, A.J., 1972. Meat tenderness: age related changes in bovine intramuscular collagen. *J. Food Sci.* 37, 892-896.
- Shinokomaki, M., Wright, D.W., Irwin, M.H., Van der Rest, M., Mayne, R., 1990. The structure and macromolecular organization of type IX collagen in cartilage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 580, 1-7.
- Sikes, A., Tomberg, E., Tume, R., 2010. A proposed method of tenderising post-rigor beef using high pressure heat treatment. *Meat Sci.* 84, 390-394.
- Sjöstrand, F.S., 1962. The connections between A and I band filaments in striated frog muscle. *J. Ultrastruct. Res.* 7, 225-246.
- Smith, G.C., Culp, G.R., Carpenter, Z.L., 1978. Postmortem aging of beef carcasses. *J. Food Sci.* 43, 823-826.
- Smith, G.C., Belk, K.E., Sofos, J.N., Tatum, T.D., Williams, S.N., 2000. Economic implications of improved color stability in beef. In: Decker, E.A., Faustman, C., Lopez-Pote, C.S. (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. Wiley Interscience, New York, p. 397-426.
- Solberg, M., 1968. Factors affecting fresh meat color. *Proc. Meat Ind. Res. Conf.*, 32-40.
- Solberg, M., 1970. The chemistry of color stability in meat: a review. *Can. Inst. Food Technol. J.* 3, 55-59.
- Solomon, M.B., 1998. The hydrodyne process for tenderizing meat. Proceedings of the 51st Reciprocal Meat Conference. 28 June-1 July 1998 American Meat Science Association, Storrs, CT, 171-176.
- Solomon, M.B., Long, J.B., Eastridge, J.S., 1997. The Hydrodyne – a new process to improve meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 75, 1534-1537.
- Solomon, M.B., Long, J.B., Carpenter, C.E., Snowden, G.D., Cockett, N.E., 1998. Tenderizing callipyge lamb with the Hydrodyne process and electrical stimulation. *J. Muscle Foods* 9, 305-311.
- Sonaiya, E.B., Stouffer, J.R., Beerman, D.H., 1982. Electrical stimulation of mature cow carcasses and its effects on tenderness, myofibril protein degradation and fragmentation. *J. Food Sci.* 47, 889-891.
- Sorheim, N.H., Dainty, R.H., 1966. Effect of vacuum modified atmospheres and storage temperature on the microbial flora of packaged beef. *Food Microbiol.* 13, 183-191.
- Sorheim, O., Aune, T., Nesbakken, T., 1997. Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 307-312.
- Sorheim, O., Nissen, H., Nesbakken, T., 1999. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere of low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Sci.* 52, 157-164.
- Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T.C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., Arahata, K., Ishiura, S., Suzuki, K., 1993. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J. Biol. Chem.* 268, 10593-10605.
- Spencer, M.J., Guyon, J.R., Sorimachi, H., Potts, A., Richards, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L.M., Beckman, J.S., 2002. Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8874-8879.
- Spinelli, J., Eklund, M., Miyauchi, D., 1964. Measurement of hypoxanthine in fish as a method of assessing freshness. *J. Food Sci.* 29, 710-714.
- Stanley, D.W., 1983. A review of the muscle cell cytoskeleton and its possible relation to meat texture and sarcolemma emptying. *Food Microstruct.* 2, 99-109.
- Stearns, T.M., Beaver, J.E., Southey, B.R., Ellis, M., McKeith, F.K., Rodriguez-Zas, S.L., 2005. Evaluation of approaches to detect quantitative trait loci for growth, carcass, meat quality on swine chromosomes 2, 6, 13 and 18. II. Multivariate and principal component analyses. *J. Anim. Sci.* 83, 2472-2481.
- Stewart, M.P., Hutchins, B.K., Zipser, M.W., Watts, B.M., 1965. Enzymatic reduction of metmyoglobin by ground beef. *J. Food Sci.* 30, 487-491.
- Sugden, M.C., Sharples, S.C., Randle, J., 1976. Carcass glycogen as a potential source of glucose during short-term starvation. *Biochem. J.* 160, 817-819.
- Suman, S.P., Faustman, C., Stamer, S.L., Liebler, D.C., 2007. Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* 7, 628-640.
- Suman, S.P., Joseph, P., Li, L., Steinke, L., Fontaine, M., 2009. Primary structure of goat myoglobin. *Meat Sci.* 82, 456-460.
- Surette, M.E., Gill, T.A., LeBlanc, P.J., 1988. Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *J. Agric. Food Chem.* 36, 19-22.
- Surh, J., Kwon, H., 2005. Estimation of daily exposure to 4-hydroxy-2-nonenals in Korean foods containing n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Food Addit. Contam.* 22, 701-708.
- Suryanarayana-Rao, S.V., Rangaswamy, J.R., Lahiry, N.L., 1969. Nucleotides and related compounds in canned shrimp. *J. Fish. Res. Board Can.* 26, 704-706.
- Suzuki, T., 1953. Determination of volatile acids for judging the freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 19, 102-105.
- Suzuki, T., 1981. *Fish and Krill Protein Processing Technology*. Applied Science Publishers, London, p. 31-34.
- Tamura, M., Yubisui, T., Takeshita, M., 1983. Microsomal NADH cytochrome b5 reductase of bovine brain purification and properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 94, 1547-1552.
- Tarr, H.L.A., 1954. The Maillard reaction in flesh foods. *Food Technol.* 8, 15-19.
- Tarr, H.L.A., 1965. Pathways of glycogen breakdown. In: Kreuzer, R. (Ed.), *The Technology of Fish Utilization*, Fishing News (Books), London, p. 34.
- Tarr, H.L.A., 1966. Post-mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates and sugars in fish muscles. A review. *J. Food Sci.* 31, 846.
- Tarr, H.L.A., 1968. Post-mortem degradation of glycogen and starch in fish muscle. *J. Fish. Res. Board Can.* 25, 1539-1559.

- Tarrant, P.J.V., 1981. In: Hood, D.E., Tarrant, P.J.V. (Eds.), *The Problem of Dark-Cutting in Beef*. Martinus Nijhoff, The Hague, p. 462.
- Tarrant, P.V., Mothersill, C., 1977. Glycolysis and associated changes in beef carcasses. *J. Sci. Food Agric.* 28, 739-749.
- Tarrant, P.V., Sherrington, J., 1980. An investigation of ultimate pH in the muscles of commercial beef carcasses. *Meat Sci.* 4, 287-297.
- Tarrant, P.J.V., McLoughlin, J.V., Harrington, M.G., 1972. Anaerobic glycolysis in biopsy and post-mortem porcine longissimus dorsi muscle. *Proc. R. Ir. Acad. Sect. B.* 72B, 55-73.
- Tarrant, P.J.V., Hegarty, P.V.J., McLoughlin, J.V., 1972. High-energy phosphates and anaerobic glycolysis in the red and white fibers of porcine semitendinosus muscle. *Proc. R. Ir. Acad. Sect. B.* 72B, 229-251.
- Taylor, A.A., 1972. Gases in fresh meat packaging. *Meat World* 5, 3-6.
- Taylor, A.A., Amos, L.A., 1981. A new model for the geometry of the binding of myosin crosslinkages to muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* 147, 297.
- Taylor, A.A., MacDougall, D.B., 1973. Fresh beef packed in mixtures of oxygen and carbon dioxide. *J. Food Technol.* 8, 453-461.
- Taylor, D.G., Marshall, A.R., 1980. Low voltage electrical stimulation of beef carcasses. *J. Food Sci.* 45, 144-145.
- Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koochmaria, M., Goll, D.E., 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?. *J. Anim. Sci.* 73, 1351-1367.
- Taylor, R.G., Fjaera, S.O., Skjervold, P.O., 2002. Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *J. Food Sci.* 67, 1-5.
- Terova, G., Preziosa, E., Marelli, S., Gornati, R., Bernadini, G., Saroglia, M., 2011. Applying transcriptomics to better understand the molecular mechanisms underlying fish file quality. *Food Chem.* 124, 1268-1278.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Richards, M.P., 2011. Effect of myoglobin from Eastern little tuna muscle on lipid oxidation of washed Asian seabass mince at different pH conditions. *J. Food Sci.* 76, C242-C249.
- Thomas, A.R., Gondoza, H., Hoffman, L.C., Oosthuizen, V., Naude, R.J., 2004. The roles of proteasome, and cathepsins B, L, H and D in ostrich meat tenderization. *Meat Sci.* 67, 113-120.
- Tobacman, L.S., 1996. Thin filament regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 447-481.
- Tomioka, K., Endo, K., 1984. Purification of 5'-nucleotidase from carp muscle. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 1077-1081.
- Tomioka, K., Endo, K., 1985. Zn content and subunit structure of carp muscle 5'-nucleotidase. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 857.
- Tomlinson, N., Geiger, S.E., 1962. Glycogen concentration and post-mortem loss of adenosine triphosphate in fish and mammalian muscle: a review. *J. Fish. Res. Board Can.* 19, 997-1003.
- Tomlinson, N., Geiger, S.E., Dollinger, E., 1965. Chalkiness in halibut in relation to muscle pH and protein denaturation. *J. Fish. Res. Board Can.* 22, 653-663.
- Tomlinson, N., Geiger, S.E., Dollinger, E., 1966. Free drip, fresh pH and chalkiness in halibut. *J. Fish. Res. Board Can.* 23, 673-678.
- Tomlinson, N., Geiger, S.E., Dollinger, E., 1966. Influence of fishing methods on chalkiness in halibut. *J. Fish. Res. Board Can.* 23, 925-928.
- Tonino, P., Pappas, C.T., Hudson, B.D., Labeit, S., Gregorio, C.C., Granzier, H., 2010. Reduced myofibrillar connectivity and increased Z-disk width in bebulin-deficient skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 123, 384-391.
- Topel, D.G., Bicknell, E.J., Preston, K.S., Christian, L.L., Matsushima, L.Y., 1969. Porcine stress syndrome. *Mod. Vet. Pract.* 49, 40-60.
- Torngren, M.A., 2003. Effect of packaging method on colour and eating quality of beef loin steaks. *Brazil Proceedings of the 49th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 495-496.
- Toyohara, H., Makinodan, Y., Ikeda, S., 1982. Purification and properties of carp muscle cathepsin. *A. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 1145.
- Trucco, R.E., Lupin, H.M., Giannini, D.H., Crupkin, M., Boeri, R.L., Barassi, C.A., 1982. Study on the evolution of rigor mortis in batches of fish. *Lebensm. Wiss. Technol.* 15, 77-79.
- Tsai, R., Cassens, R.G., Briskey, E.J., Greaser, M.L., 1972. Studies on nucleotide metabolism in porcine longissimus muscle postmortem. *J. Food Sci.* 37, 612-617.
- Uchiyama, H., Kakuda, K., 1984. A simple and rapid method for measuring K value, a fish freshness index. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 263-267.
- Ueki, N., Ochiai, Y., 2004. Primary structure and thermostability of bigeye tuna myoglobin in relation to those of other scombridae fish. *Fish. Sci.* 70, 875-884.
- Unruh, J.A., Kastner, C.L., Kropf, D.H., Dikeman, M.E., Hunt, M.C., 1986. Effects of low-voltage electrical-stimulation on meat quality and display color stability. *Meat Sci.* 18, 281-293.
- Van de Wiel, D.F.M., Zhang, W.L., 2007. Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Sci.* 77, 46-54.
- Van Jaarsveld, F.P., Naude, R.J., Oelofsen, W., 1997. The effects of Ca ions, EGTA and storage time on myofibrillar protein degradation, levels of Ca²⁺-dependent proteases and cathepsins B, H, L and D of ostrich skeletal muscle. *Meat Sci.* 45, 517-529.
- Viljoena, H.F., de Kocka, H.L., Webb, E.C., 2002. Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal beef steaks. *Meat Sci.* 61, 181-185.
- Wagner, J.R., Titus, D.S., Schade, J.E., 1963. New opportunities for flavor modification. *Food Technol.* 46, 730-736.
- Wallace, W.J., Houtchens, R.A., Maxwell, J.C., Caughey, W.S., 1982. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions. *J. Biol. Chem.* 257, 4966-4977.
- Walters, C.L., 1975. In: Cole, D.J.A., Lawrie, R.A. (Eds.), *Meat, Avi*, Westport, CT, p. 385-401.
- Wang, D., Tang, J., Correia, L.R., Gill, T.A., 1998. Postmortem changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt intake. *J. Food Sci.* 63, 634-637.
- Wang, H., Pato, M.D., Shand, P.J., 2005. Biochemical properties of natural actomyosin extracted from normal and pale, soft, exudative pork loin after frozen storage. *J. Food Sci.* 70, 313-330.
- Wang, K., 1983. Cytoskeletal matrix in striated muscle. The role of titin, nebulin and intermediate filaments. *Cross-Bridge Mechanisms in Muscular and Cellular Control*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 439-452.
- Wang, K., McClure, J., Tu, A., 1979. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3698-3702.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., 1979. Titin: Possible candidate as putative longitudinal filaments in striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3698-3702.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., 1983. A network of transverse and longitudinal intermediate filaments is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 83, 389a.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., 1983. Ultrastructural morphology and epitope distribution of titin, a giant sarcomere-associated cytoskeletal protein. *J. Cell Biol.* 97, 257a.
- Wang, K., Ramirez-Mitchell, R., 1984. Architecture of titin-containing cytoskeletal matrix in striated muscle. Mapping of distinct epitopes of titin specified by monoclonal antibodies. *Biophys. J.* 45, 392a.
- Wang, K., Williamson, C.L., 1980. Identification of an N-line protein of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3254-3258.
- Wang, K., Wright, J., 1988. Sarcomere matrix of skeletal muscle: the role of thick filaments in the segmental extensibility of elastic titin filaments. *Biophys. J.* 53, 25a.
- Wang, K., McClure, J., Tu, A., 1979. Titin: major myofibrillar component of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3698-3702.
- Wang, S.-M., Greaser, M.L., 1985. Immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to bovine cardiac titin on intact and extracted myofibrils. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6, 293-312.
- Warriss, P.D., 2000. *Meat Science: An Introductory Text*. CAB-International, Wallingford.
- Watanabe, E., Toyama, K., Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., 1984. Determination of inosine-5-monophosphate in fish tissue with an enzyme sensor. *J. Food Sci.* 49, 114-116.

- Watts, B.M., Kendrick, J., Zipser, M.W., Hutchins, B., Saleh, B., 1966. Enzymatic reducing pathways in meat. *J. Food Sci.* 31, 855-862.
- Wells, R.M.G., 1987. Stress responses imposed by fish capture and handling: a physiological perspective. *Food Technol. Aust.* 39, 479-481.
- Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M.E., Crouse, J.D., Hunt, M.C., Klemm, R.D., 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus dorsi tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 68, 2716-2728.
- Whiting, R.C., 1980. Calcium uptake by bovine muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *J. Food Sci.* 45, 288-292.
- Wilhelm, A.E., Maganhini, M.B., Hernandez-Blazquez, F.J., Ida, E.I., Shimokomaki, M., 2010. Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (pale, soft, exudative) meat. *Food Chem.* 119, 1201-1204.
- Witt, C.C., Burkart, C., Albeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H., Labeit, S., 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractability, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J.* 25, 3843-3855.
- Witz, G., 1989. Biological interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 333-349.
- Wojtowicz, M.B., Odense, P.H., 1972. Comparative study of the muscle castheptic activity of some marine species. *J. Fish. Res. Board Can.* 29, 85-90.
- Wright, J., Huang, Q.Q., Wang, K., 1993. Nebulin in full-length template of actin filaments in the skeletal muscle sarcomere: an immunoelectron microscopic study of its orientation and span with site-specific monoclonal antibodies. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14, 476-483.
- Wu, J.J., Dutson, T.P., Carpenter, Z.L., 1981. Effect of postmortem time and temperature on the release of lysosomal enzymes and their possible effect on bovine connective tissue components of muscle. *J. Food Sci.* 46, 1132-1135.
- Yamaguchi, K., Takeda, N., Ogawa, K., Hashimoto, K., 1979. Properties of mackerel and sardine myoglobins. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 1335-1339.
- Yamaguchi, M., Robson, R.M., Stromer, M.H., Dahl, D.S., Oda, T., 1982. Nemaline rod bodies: structure and composition. *J. Neurol. Sci.* 56, 35-56.
- Yamaguchi, M., Robson, R.M., Stromer, M.H., 1983. Evidence for actin involvement in cardiac Z-line analogs. *J. Cell Biol.* 96, 435-442.
- Yamaguchi, M., Robson, R.M., Stromer, M.H., Cholvin, N.R., Izumimoto, M., 1983. Properties of soleus muscle Z-lines and induced Z-line analogs revealed by dissection with Ca-activated neutral protease. *Anat. Rec.* 206, 345-362.
- Yamashita, M., Konagaya, S., 1990. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 96, 247-252.
- Yamashita, M., Konagaya, S., 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaisha* 57, 1917-1922.
- Yin, S., Faustman, C., 1993. Influence of temperature, pH and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: a liposome model. *J. Agric. Food Chem.* 41, 853-857.
- Yin, S., Fustman, C., Tatiyaboworntham, N., Ramathan, R., 2011. Species-specific myoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12198-12203.
- Younathan, M.T., Watts, B.M., 1960. Oxidation of tissue lipids in cooked pork. *Food Res.* 25, 538-543.
- Young, O.A., Graafhuis, A.E., Davey, C.L., 1980-1981. Post-mortem changes in cytoskeletal proteins of muscle. *Meat Sci.* 5, 41-55.
- Yu, J., Tang, S., Bao, E., Zhang, B., Hao, Q., Yue, Z., 2009. The effect of transportation on the expression of heat shock proteins and meat quality of *M. longissimus dorsi* in pigs. *Meat Sci.* 83, 474-478.
- Yubisui, T., Takeshita, M., 1980. Fractionation and characterization of the purified NADH cytochrome b5 reductase of human erythrocytes as a FAD-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* 255, 2454-2456.
- Zabel, R.W., Harvey, E.J., Katz, S.L.G.T.P., Levin, P.S., 2003. Ecologically sustainable yield. *Am. Sci.* 91, 110-117.
- Zhang, S.X., Farouk, K., Young, O.A., Wieliezko, K.J., Podmore, C., 2005. Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat Sci.* 69, 346-765.
- Zhu, X., Ruusunen, M., Gusella, M., Zhou, G., Puolanne, E., 2011. High post-mortem temperature combined with rapid glycolysis induces phosphorylase denaturation and produces pale and exudative characteristics in broiler pectoralis major muscles. *Meat Sci.* 89, 181-188.

Leite

N. A. Michael Eskin,[§] H. Douglas Goff[†]

I. INTRODUÇÃO

Tanto o leite quanto seus derivados são fontes importantes de proteína animal, vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais para crianças e jovens adultos (Walstra *et al.*, 2006). A maior fonte de leite é obtida dos rebanhos ocidentais de gado (*Bos taurus*), apesar de também poder ser obtido, em alguns países, de outras espécies de animais mamíferos. Segundo a Portaria do Leite Pasteurizado do United States Public Health Service (2011), o leite é definido como uma secreção láctea natural, praticamente sem colostro, obtida ao ordenhar uma ou mais vacas saudáveis, contendo no mínimo 8,25% de sólidos de leite sem gordura (SNF) e, no mínimo, 3,25% de gordura de leite. A exclusão do colostro, líquido secretado logo após o parto, dá-se, principalmente, por razões sensoriais. Mais de 70 bilhões de galões de leite são produzidos por ano nos Estados Unidos, dos quais mais de 30 bilhões de galões são consumidos como leite líquido (Goff e Griffiths, 2006).

Desde a publicação da segunda edição deste livro, houve progressos importantes no conhecimento do mecanismo da secreção do leite, incluindo a organização intercelular de suas gotículas, além da natureza e da formação da membrana de gordura do leite (MFGM), assim como a regulação da síntese mamária da gordura do leite (Bauman *et al.*, 2006). Vários textos abrangentes e atuais sobre a química do leite também foram publicados (Fox e McSweeney, 2003; 2006; 2009; Walstra *et al.*, 2006). Este capítulo vai abordar os sistemas bioquímicos dinâmicos envolvidos na biossíntese dos componentes do leite.

II. COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os principais componentes do leite são água (86-88%), gordura do leite (3-6%), proteínas (3-4%), lactose (5%) e minerais (cinzas) (0,7%), perfazendo um total de sólidos de 11-14%. A composição do leite é afetada por vários

fatores, entre os quais a raça, o estágio de lactação, o estado de saúde e o nutricional da vaca, a estação do ano (referente à temperatura e aos efeitos do estágio da lactação, mesmo se bezerros não são procriados durante o ano todo), além de fatores genéticos (Fox e McSweeney, 1998). A Tabela 4.1 ilustra a influência das quatro raças principais dos Estados Unidos, em função da produção e da composição de leite. Ela mostra também as mudanças na produção e na composição, que ocorreram durante as últimas duas décadas, decorrentes da melhora genética e nutricional.

A raça Holstein é, incomparavelmente, a maior produtora de leite, embora seu teor de gordura e de proteínas seja mais baixo com base em seu peso. A produtividade, porém, é muito maior de modo que, no total, as quantidades de gordura e de proteína são elevadas. Mudanças sazonais na gordura, proteínas, lactose e outros sólidos podem ser vistas na Tabela 4.2 com base no total de leite produzido na Província de Ontário, em 2006. Uma vez que o nascimento de bezerros é distribuído de modo uniforme, as mudanças são causadas pela temperatura e pelo regime de alimentação. Em países nos quais o nascimento de bezerros fica mais concentrado em determinados períodos, por exemplo, na primavera, a composição do leite nas diversas estações também pode ser afetada pelo estágio de lactação.

TABELA 4.1 Alterações no rendimento e na composição do leite coletado no período de 1991 a 2009, no Canadá, em função da raça

Ano	Todas as raças			Holstein			Jersey			Guernsey			Pardo suíço		
	Rendimento (kg) ^a	Gordura (%)	Proteína (%)	Rendimento (kg) ^a	Gordura (%)	Proteína (%)	Rendimento (kg) ^a	Gordura (%)	Proteína (%)	Rendimento (kg) ^a	Gordura (%)	Proteína (%)	Rendimento (kg) ^a	Gordura (%)	Proteína (%)
2009 ^b	9592	3,77	3,22	9793	3,76	3,19	6371	4,87	3,81	6812	4,56	3,43	8128	4,05	3,48
2008	9642	3,78	3,23	9836	3,74	3,20	6435	4,84	3,81	6820	4,51	3,45	8366	4,04	3,48
2007	9538	3,77	3,22	9733	3,72	3,19	6412	4,82	3,78	6673	4,51	3,46	8159	4,06	3,48
2006	9481	3,75	3,21	9677	3,71	3,18	6331	4,83	3,77	6540	4,55	3,43	8064	4,06	3,46
2005	9422	3,76	3,21	9624	3,71	3,19	6279	4,85	3,77	6398	4,50	3,43	7792	4,12	3,48
2004	9458	3,72	3,22	9658	3,67	3,19	6291	4,85	3,77	6435	4,54	3,45	8048	4,07	3,47
2003	9519	3,73	3,23	9721	3,68	3,21	6344	4,87	3,81	6570	4,49	3,49	8038	4,04	3,49
2002	9511	3,72	3,25	9717	3,67	3,22	6407	4,86	3,84	6347	4,44	3,51	8215	4,03	3,50
2001	9242	3,72	3,24	9440	3,68	3,22	6186	4,87	3,83	6015	4,45	3,51	8020	4,02	3,50
2000	9152	3,70	3,23	9350	3,67	3,21	6203	4,90	3,83	5949	4,45	3,48	7920	3,96	3,48
1999	8960	3,69	3,24	9162	3,66	3,22	6072	4,89	3,85	5939	4,43	3,54	7585	4,03	3,54
1998	8738	3,70	3,24	8946	3,65	3,22	6002	4,88	3,84	5991	4,48	3,55	7105	4,04	3,50
1997	8427	3,72	3,24	8697	3,68	3,22	5753	4,90	3,86	5919	4,53	3,55	6818	4,05	3,52
1996	8424	3,76	3,25	8633	3,72	3,23	5720	4,93	3,86	5984	4,56	3,54	6910	4,08	3,53
1995	8251	3,74	3,24	8461	3,70	3,21	5620	4,89	3,86	5936	4,57	3,54	6709	4,05	3,49
1994	8103	3,74	3,26	8309	3,69	3,21	5501	4,94	3,94	5867	4,76	3,56	6718	4,06	3,51
1993	7988	3,75	3,25	8193	3,71	3,21	5408	4,94	3,88	5826	4,58	3,57	6639	4,07	3,52
1992	7807	3,73	3,24	8028	3,67	3,21	5244	4,92	3,91	5755	4,55	3,58	6483	4,03	3,48
1991	7523	3,70	3,21	7717	3,66	3,22	4992	4,90	3,92	5554	4,52	3,60	6176	4,01	3,54

Fonte: Canadian Dairy Information Centre, www.dairyinfo.gc.ca (2010).

^a Baseado em um período de lactação de 305 dias.

^b Em 2009, o gado Holstein contava 92,8% da população, Jersey 3,2%, Guernsey < 1%, e Pardo suíço < 1%.

Extensas pesquisas sobre a composição do leite nos Estados Unidos foram feitas em função do interesse considerável na porcentagem de SNF ou de proteína na determinação dos preços do produto. Tal medição foi facilitada por métodos automatizados e rápidos, utilizando análise de espectrometria no infravermelho. Wilcox *et al.* (1971) desenvolveram uma grande pesquisa sobre a composição do leite em cinco raças e concluíram que o efeito da idade na gordura, do SNF, da proteína e dos sólidos totais (ST) são tão importantes quanto seus efeitos na produção do leite. Em seguida, Norman *et al.* (1978) examinaram a influência da idade e do mês de nascimento dos bezerros na gordura do leite e do SNF assim como na produção de proteínas, durante um período de 9 anos, caracterizando a maior pesquisa já feita e que incluiu 106.411 vacas de 2.215 rebanhos em 41 estados. Segundo os

autores, os teores dos componentes do leite foram mais baixos do que os encontrados por Wilcox *et al.* (1971), porém refletiam de modo mais próximo a média da produção americana de leite e gordura. As porcentagens médias de gordura e de SNF, descritas por Norman *et al.* (1978), foram 3,8% e 8,6%, respectivamente. O efeito da raça na composição do leite foi considerado consistente com o de estudos anteriores. Uma pesquisa posterior, realizada por Sommerfeldt e Baer (1986), monitorou a variação dos componentes do leite em 1.705 rebanhos do leste de Dakota do Sul, Minnesota e do norte de Iowa. Leite foi coletado a cada duas semanas, durante um período de um ano, para avaliar as vantagens e desvantagens do pagamento de leite com base em seu SNF. A maior variação foi observada quanto à gordura (8,4% de coeficiente de variação), seguida pela proteína, ST e SNF, com coeficientes variando de 6,3%, 4,1%, e 3,4%, respectivamente. Sommerfeldt e Baer (1986) não encontraram relação consistente entre SNF e proteína ou gordura do leite examinado e recomendaram que testes sobre o valor do SNF também deveriam incluir o conteúdo de gordura e o grau de produtividade. A introdução de um plano de preços com base nos componentes do leite foi considerada benéfica tanto para o produtor como para o processador, uma vez que o leite com alto teor de proteína seria particularmente interessante para produtores de queijo, pois aumentaria sua produção.

TABELA 4.2 Composição média mensal do leite (kg/hl) produzido na província de Ontário, Canadá

Mês	Gordura	Proteína	Lactose e outros sólidos
Janeiro	3,99	3,34	5,71
Fevereiro	4,00	3,32	5,72
Março	4,01	3,34	5,73
Abril	3,97	3,30	5,74
Mai	3,91	3,27	5,75
Junho	3,85	3,24	5,73
Julho	3,77	3,20	5,72
Agosto	3,78	3,25	5,70
Setembro	3,92	3,33	5,70
Outubro	4,04	3,37	5,70
Novembro	4,03	3,39	5,70
Dezembro	4,01	3,33	5,70

Fonte: University of Guelph Laboratory Services (2006), <http://www.guelphlabservices.com>

Na última década, Stoop *et al.* (2006; 2008) demonstraram o potencial de selecionar raças para alterar a composição do leite, bem como os efeitos genéticos apontaram alto percentual de hereditariedade no conteúdo de lipídeos (0,52), proteínas (0,60) e lactose (0,64), e hereditariedade moderada quanto ao leite produzido (0,44), lipídeos (0,37) e proteínas (0,34). Com a utilização de gado de leite de elite (raças Swedish Red e Swedish Holstein), classificado segundo seus méritos genéticos, Glantz *et al.* (2009) observaram maiores rendimentos para componentes de proteínas, lipídeos, perfis de carboidratos e minerais. No entanto, o conteúdo dos componentes do leite, como os lipídeos e o soro de leite, em média, diminuíram. O leite exibiu boas características de coagulação, mas foi mais suscetível à oxidação em decorrência de sua menor capacidade antioxidante. Esta pesquisa demonstrou que as características do processamento e da composição podem ser usadas para ajustar práticas de seleção das raças para otimizar a qualidade e a estabilidade do leite.

Em um estudo realizado na Holanda, por Heck *et al.* (2009), foi avaliado o efeito da variação sazonal na composição do leite, de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006. A proteína do leite variou de 3,21 g/100 g em junho até o máximo de 3,38 g/100 g em dezembro, enquanto que a gordura do leite aumentou de 4,10 g/100 g em junho até o ponto mais alto, 4,57 g/100 g em janeiro. As maiores alterações sazonais foram observadas na composição dos ácidos graxos, nos quais os ácidos graxos *trans*, incluindo o ácido linoleico conjugado, aumentaram em até 2 vezes. Ao contrário, porém, a lactose do leite permaneceu sem variações durante todas as estações.

Enquanto fatores ambientais e fisiológicos demonstraram ter afetado a gordura do leite, a nutrição pareceu ser o fator predominante (Bauman *et al.*, 2006). O efeito mais importante da nutrição é a síndrome do baixo teor de gordura, muitas vezes denominado de depressão da gordura do leite (MFD). A redução da gordura no leite foi associada a dietas contendo peixes e suplementos de óleos vegetais, assim como altos teores de concentrados e baixos teores de fibras.

III. COMPONENTES DO LEITE

A composição geral do leite fornece informação útil ao fazendeiro e processador na determinação de sua qualidade e de seu valor de mercado. Esta seção enfoca a química e a bioquímica dos principais componentes do leite.

A. Lipídeos

A fração lipídica do leite de vaca (3-5%) é secretada pelo animal em lactação, na forma de pequenos glóbulos de gordura de $< 1 \mu\text{m}$ a $15 \mu\text{m}$ de diâmetro. Cada glóbulo de gordura é envolvido por uma camada interfacial especial, ou membrana de gordura do leite (MFGM), que é composta por uma camada dupla de lipídeo e uma proteína (Spitsberg, 2005; Singh, 2006). Esta camada assegura que cada gotícula de lipídeo seja dispersada no soro de leite aquoso e que seja incapaz de agregar com outras. Kanno (1990) relatou que as proteínas e os lipídeos do MFGM possuem uma razão de massa de 1:1. Trabalhos anteriores de Wooding e Kemp (1975) sugerem que os lipídeos do MFGM contêm grande quantidade de triacilgliceróis de alto ponto de fusão, como pode ser observado no modelo de membrana de MFGM proposto por McPherson e Kitchen (1983). No entanto, Walstra (1974; 1985) relatou tratar-se de um artefato causado pela contaminação de fragmentos de MFGM com cristais de triacilgliceróis durante o procedimento de isolamento. Os lipídeos MFGM agora são reconhecidos como predominantemente polares, com uma pequena quantidade de lipídeos neutros incluindo triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis além do colesterol e de seus ésteres. A composição total do MFGM está ilustrada na Tabela 4.3. Uma revisão da literatura mostra que os valores variam consideravelmente em decorrência de diferenças no isolamento, na purificação e procedimentos analíticos utilizados (Dewettinck *et al.*, 2008). A camada de MFGM também contém cerca de 50 polipeptídeos, que variam de tamanho de 10 kDa a 300 kDa (Spitsberg e Gorwitt, 1998; Mather, 2000), assim como concentrações de outros elementos.

A estrutura do MFGM, do centro lipídico até a superfície, foi esquematizada por Dewettinck *et al.* (2008) e está reproduzida na Figura 4.1. O centro interno consiste de uma monocamada de lipídeos polares e proteínas, que envolve a gotícula de gordura intracelular com uma camada densa de elétrons de proteínas na face interna da membrana com uma verdadeira bicamada de lipídeos polares e proteínas. A camada dupla de fosfolipídeos parece ter a função de estrutura da membrana e existe no estado fluido. Fosfolipídeos contendo colina junto com glicolipídeos, cerebrosídeos e gangliosídeos costumam ser encontrados na membrana externa, enquanto fosfatidil etanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e esfingomielina (SM) concentram-se na superfície interna da membrana. Parcialmente incorporadas ou ligadas fracamente à dupla camada encontram-se proteínas de membranas periféricas. Entre elas, a adipofilina (ADPH) fica localizada na camada polar interna, enquanto a xantina desidrogenase/oxidase (XDH/XO) é encontrada entre as duas camadas. Outras proteínas importantes da MFGM, como mucina 1 (MUCI), butirofilina (BTN), diferenciação de agrupamento 36 (CD36) e ácido periódico/Schiff III (PAS III), podem ser encontradas na camada externa, com ácido periódico /Schiff 6/7 (PAS 6/7) e proteose peptona 3 (PP3) ligadas fracamente à parte externa da membrana. Para informações mais detalhadas sobre a estrutura da MFGM, os textos seguintes são recomendados: Dewettinck *et al.* (2008), Evers *et al.* (2008), Reinhardt e Lippolis (2008), Sanchez-Juanes *et al.* (2009) e Vanderghem *et al.* (2008).

TABELA 4.3 Composição média estimada de membrana de glóbulos de gordura do leite

Componente	mg/100 g glóbulos de gordura	g/100 g MFGM matéria seca
Proteínas	1800	70
Fosfolipídeos	650	25
Cerebrosídeos	80	1
Colesterol	40	2
Monoglicerídeos	+ ^a	?
Água	+	-
Carotenoides + vitamina A	0,04	0,0
Ferro	0,3	0,0
Cobre	0,01	0,0
Total	> 2570	100

MFGM: membrana de glóbulo de gordura

^a Presente, porém em quantidade desconhecida.

De Dewettinck *et al.* (2008).

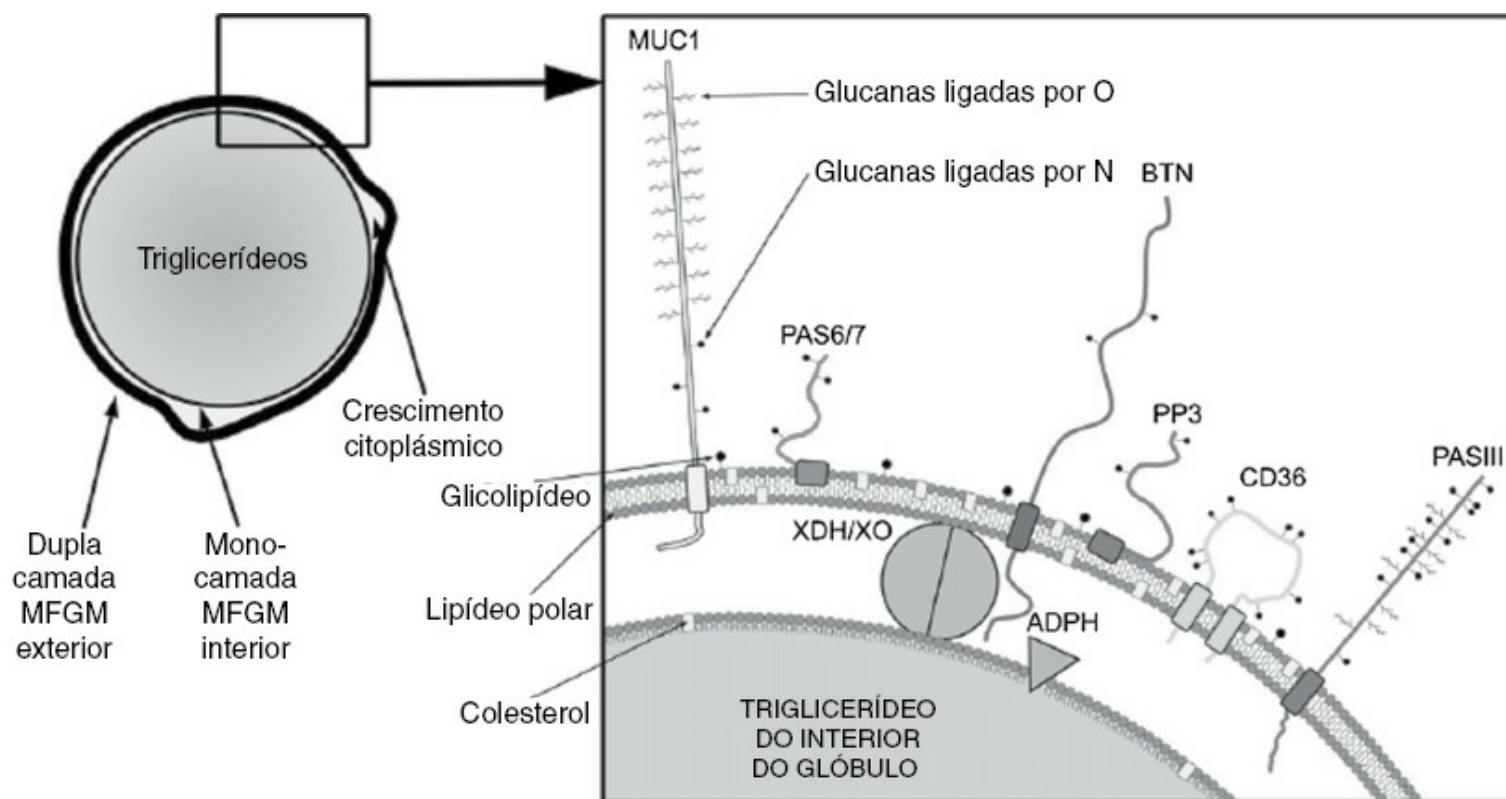
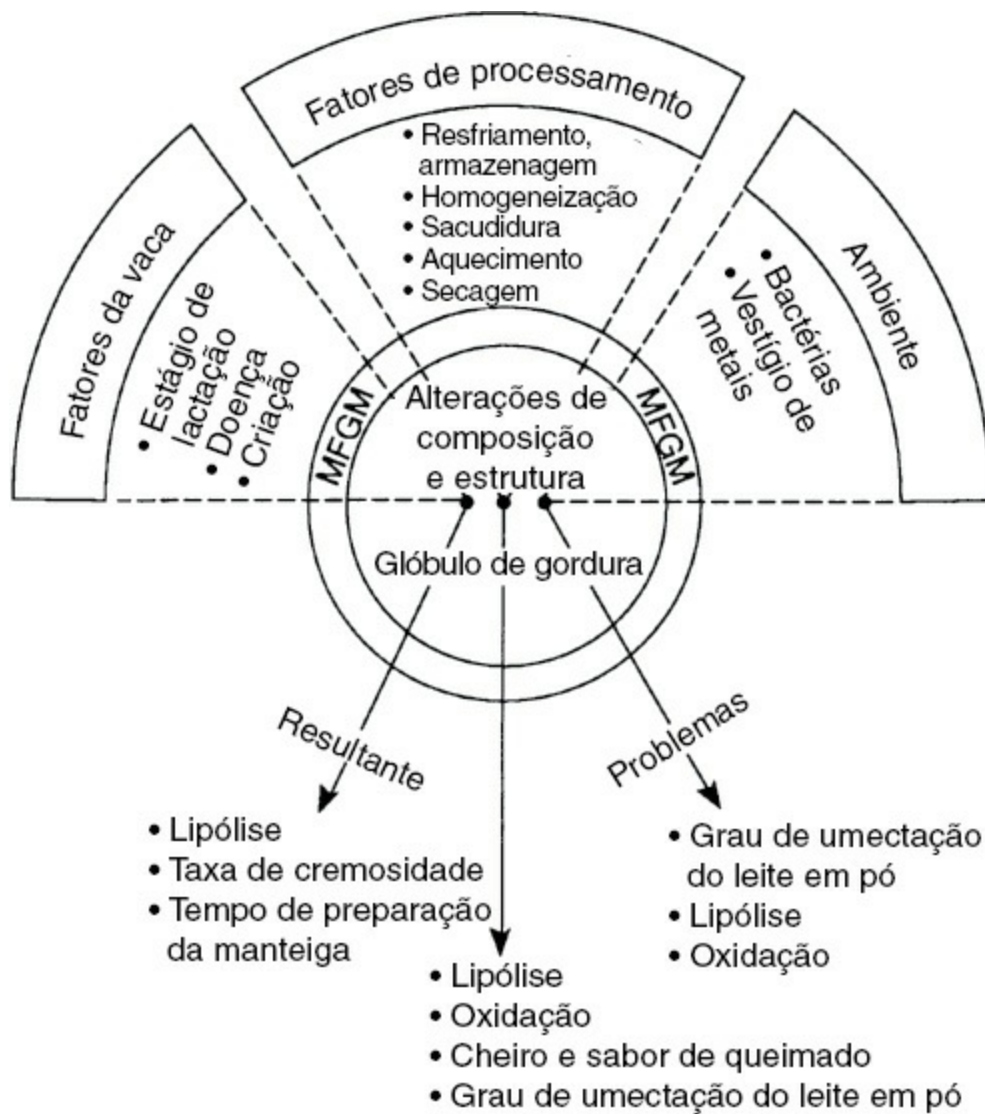


FIGURA 4.1 Estrutura do glóbulo de gordura com a organização detalhada das principais proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM). O desenho é bastante esquematizado e as dimensões não são proporcionais. Uma dupla camada de lipídeos polares está situada na monocamada interna de lipídeos polares. Proteínas específicas estão distribuídas ao longo da membrana. Adipofilina (ADPH) localiza-se na camada interna de lipídeo polar. Xantina desidrogenase/oxidase (XDH/XO) está situada entre as duas camadas. Mucina 1 (MUC1), butirofilina (BTN), agrupamento de diferenciação 36 (CD36), e ácido periódico/Schiff III (PAS III) estão colocados na camada externa. Ácido periódico/Schiff 6/7 (PAS 6/7) e proteose peptona 3 (PP3) estão apenas ligados fracamente à parte externa da membrana. Os fosfolipídeos contendo colina, PC e SM, e os glicolipídeos, cerebrosídeos e gangliosídeos, são encontrados predominantemente no exterior da membrana, enquanto fosfatidil etanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI) são concentrados principalmente na superfície interna da membrana. Deeth (1997); Mather e Keenan (1998); Danthine *et al.* (2000); Mather (2000); Harrison (2002); Rasmussen *et al.* (2002); Evers (2004) e Dewettinck *et al.* (2008).



ESQUEMA 4.1 Fatores que afetam a membrana do glóbulo de gordura do leite. McPherson e Kitchen (1983).

A natureza anfífilica dos lipídeos polares (fosfolipídeos e esfingolipídeos) da camada de MFGM tem grande influência na estabilidade da fase de gordura do leite e nas alterações que ocorrem durante o processamento do leite e do creme. McPherson e Kitchen (1983) resumiram os fatores que afetam a composição da camada de MFGM, como pode ser visto no Esquema 4.1. O efeito de algumas das alterações na composição das propriedades da camada de MFGM ainda não foi esclarecido. As superfícies externas da MFGM são bastante lábeis e podem ser removidas por meio de procedimentos simples de lavagem e manipulação da temperatura. Tais perdas na superfície externa têm um impacto no processamento e na estocagem do leite.

Os triacilgliceróis representam 97-98% do total de gordura do leite. A composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis é influenciada pela raça, práticas de manejo e estação do ano, sendo que as gorduras saturadas ficam mais baixas no verão do que no inverno (Tabela 4.4). A gordura do leite não é afetada especialmente por mudanças na dieta de lipídeos, uma vez que alguns são metabolizados pela atividade microbiana no rúmen da vaca (Garton, 1964). No entanto, modificações na gordura do leite podem ser obtidas ao alimentar a vaca com uma emulsão de triacilglicerol protegida por uma membrana de proteína com ligações cruzadas, para proteger a gordura do metabolismo microbiano no rúmen. Esta técnica permite que a composição da gordura do leite seja manipulada e que seu grau de insaturação possa ser modificado. A composição dos ácidos graxos dos lipídeos do leite bovino é mais variada do que a de qualquer outro produto natural, e possui 437 componentes que foram relacionados por Patton e Jensen (1975). Entre eles, os ácidos graxos saturados compõem 70% do total, dos quais 25% são monoinsaturados, 2,3% são *cis*-poli-insaturados e 2,7% são ácidos graxos *trans*. Ácidos graxos de cadeias longas (C14-C23) e de cadeias curtas (C4-C6) compõem 85% e 15% do total de ácidos graxos nos triacilgliceróis da gordura

do leite, respectivamente (Tabela 4.4).

TABELA 4.4 Composição dos ácidos graxos (% w/w) do total de ácidos graxos em leite de laticínio sueco em 2001, dado como média ponderada com desvio-padrão; os valores mais baixo e mais alto observados e os valores-*p* para variações geográficas e sazonais também são dados (Mansson, 2008)

Ácido graxo	Média (% m/m)	SD	Valor mais baixo observado	Valor mais alto observado	Variação sazonal
4:0	4,4	0,1	4,0	5,1	n.s.
6:0	2,4	0,1	2,1	2,9	n.s.
8:0	1,4	0,1	1,2	1,9	n.s.
10:0	2,7	0,2	2,4	3,5	*
12:0	3,3	0,2	3,0	4,1	**
14:0	10,9	0,5	10,0	12,1	***
15:0	0,9	0,0	0,8	1,1	n.s.
16:0	30,6	0,9	28,7	34,1	**
17:0	0,4	0,0	0,4	0,5	**
18:0	12,2	0,4	10,3	13,3	n.s.
20:0	0,2	0,0	0,2	0,2	n.s.
Ácidos graxos saturados, total	69,4	1,7	67,1	74,4	***
10:1	0,3	0,0	0,2	0,4	n.s.
14:1	0,8	0,4	0,4	1,3	**
16:1	1,0	0,0	0,9	1,8	n.s.
17:1	0,1	0,0	< 0,1	0,3	n.s.
18:1	22,8	1,0	19,7	24,7	***
Ácidos graxos monoinsaturados, <i>cis</i> , total	25,0	1,0	22,2	26,7	**
18:2	1,6	0,1	1,4	1,8	n.s.
18:3	0,7	0,0	0,6	0,9	**
Ácidos graxos poli-insaturados, <i>cis</i> , total	2,3	0,1	2,0	2,5	n.s.
16:1t	0,4	0,1	0,3	0,4	***
18:1t	2,1	0,7	2,0	3,3	***
18:2t	0,2	0,0	0,1	0,5	n.s.
Ácidos graxos <i>trans</i> , total	2,7	0,7	0,6	3,9	***
CLA	0,4	0,1	0,3	0,5	***

n.s.: Não significativo; **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

1. A biossíntese da gordura do leite

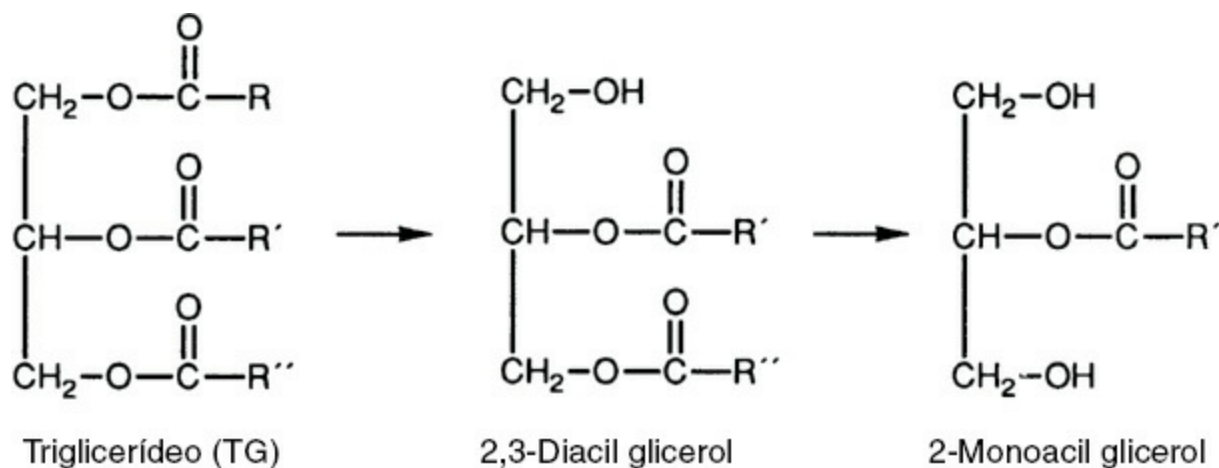
A síntese dos triagliceróis do leite envolve lipídeos do sangue e a síntese *de novo* das células epiteliais mamárias. A maioria dos ácidos graxos C16-C18 dos triglicerídeos do leite bovino é derivada da gordura absorvida pelo sangue, da dieta dos animais, enquanto os ácidos graxos C4-C14 são sintetizados *de novo* na glândula mamária. Os ácidos graxos são transportados do intestino para as glândulas mamárias e outros tecidos por quilomicrons (Zinder *et al.*, 1974). Os quilomicrons são formados nas células epiteliais intestinais a partir de lipídeos absorvidos no intestino e são, em seguida, transportados pela linfa para os vasos linfáticos intestinais ao duto torácico por meio da corrente sanguínea, e, em seguida, são absorvidos por vários tecidos.

Os quilomicrons são partículas esféricas que contêm um núcleo de triaglicerol e traços de ésteres de colesterol. Eles ficam encapsulados por um filme de camada única de 25-30 Å de largura e são compostos, basicamente, de fosfolipídeos e diglicerídeos contendo pequenas quantidades de colesterol, proteínas, monoglicerídeos e ácidos graxos (Scow *et al.*, 1976). A hipótese de que os triacilgliceróis são absorvidos pela glândula mamária a partir dos quilomicrons, quando presentes, na forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL; *d* < 1,05 g/ml) tem sido comprovada pelas pesquisas (Moore e Christie, 1979). Mazur e Rayssiguier (1988) relataram que vacas leiteiras têm

como característica baixos níveis de triacilgliceróis e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL; $d < 1,01$ g/ml). A maioria dos lipídeos que circulam é relacionada com proteínas de alta densidade (HDL; $d = 1,06-1,21$ g/ml), que transportam apenas pequenas quantidades dos triacilgliceróis. Em outras palavras, os triacilgliceróis que circulam no sangue na forma de lipoproteínas ($d > 1,05$) não doam seus ácidos graxos para as glândulas mamárias para que ocorra a síntese da gordura do leite. Dados apresentados por Brumby e Welch (1970) e por Stead e Welch (1975) demonstraram claramente que as lipoproteínas do soro de vacas leiteiras contêm quantidades negligenciáveis de triacilgliceróis. Apesar de todos estes estudos, Bickerstaffe (1971) afirmou que os triacilgliceróis são encontrados em todas as frações de lipoproteínas no sangue de vacas leiteiras e que foram absorvidas pelas glândulas mamárias.

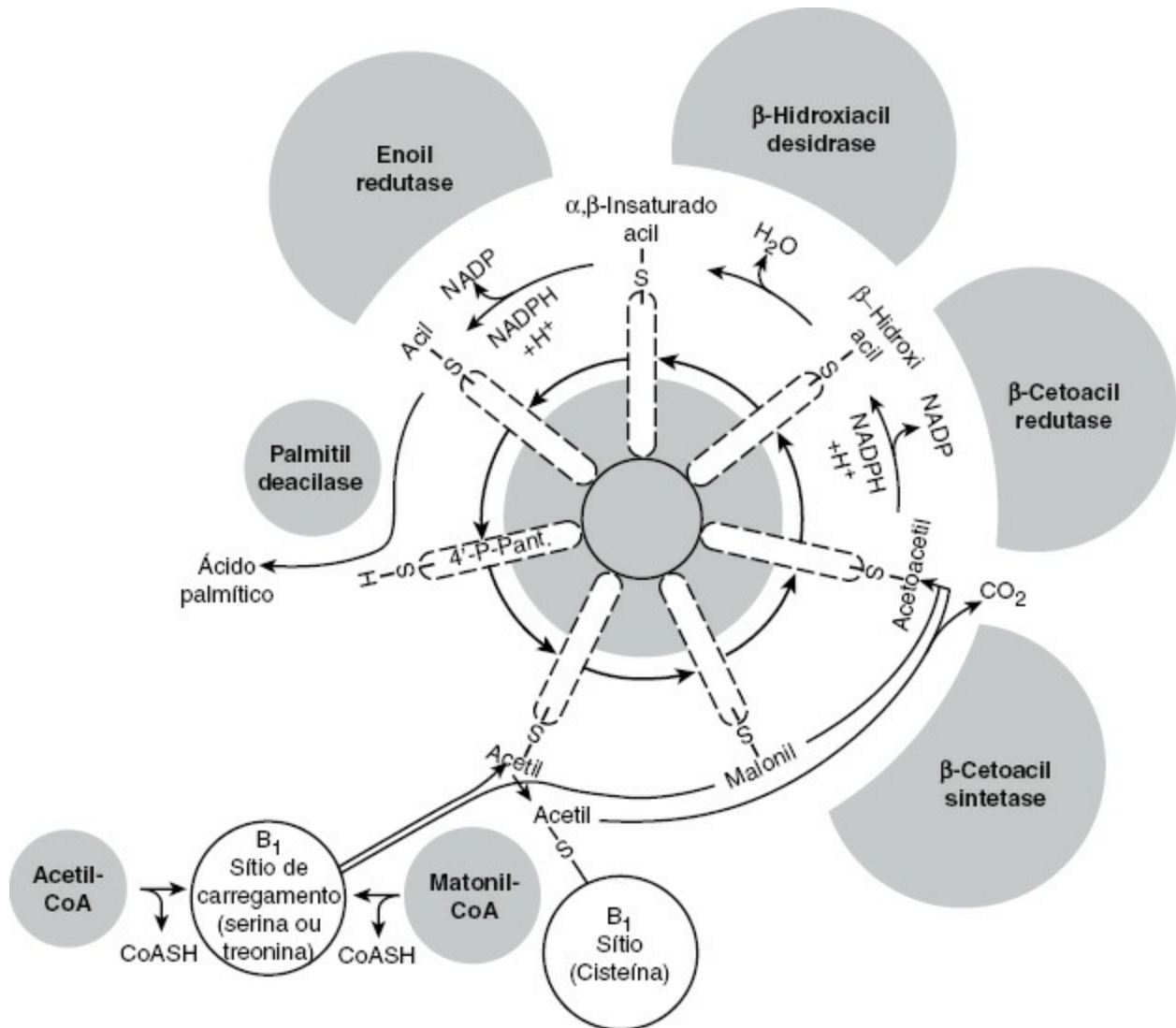
Em condições normais, quando um regime de dieta-padrão é fornecido ao animal, os principais ácidos graxos encontrados nos triacilgliceróis do sangue são os seguintes: C16:0, C18:0 e C18:1, que são absorvidos pela glândula mamária. Uma modificação da dieta, por exemplo, a adição de sementes de canola protegidas por formaldeído para evitar a bio-hidrogenação no rúmen, teve como resultado um aumento no conteúdo de C18:1, C18:2 e C18:3 no plasma de vacas Holstein (Delbecchi *et al.*, 2001), que correspondeu a um acréscimo na assimilação de C18:1, C18:2 e C18:3 pela glândula mamária. É claro, no entanto, que a composição de ácidos graxos no plasma não é o único fator determinante dos ácidos graxos nos triacilgliceróis do plasma. Annison *et al.* (1967) e West *et al.* (1972) observaram que o triacilglicerol total no plasma arterial é muito maior em C18:0 e mais baixo em C18:1. Tal assimilação seletiva foi confirmada por Moore *et al.* (1969), que concluíram que as glândulas mamárias assimilam seletivamente o triacilglicerol do plasma quando há baixos níveis de C18:2 e altos níveis de C18:2, na síntese da gordura do leite.

A distribuição de ácidos graxos de triacilgliceróis entre as diferentes frações de lipoproteínas foi examinada, uma vez que os triacilgliceróis dos quilomicrons e VLDL hidrolisam durante a absorção, pelos tecidos, através da lipoproteína lipase. Goldberg *et al.* (2009) revisaram a regulação da absorção do ácido graxo pela lipoproteína lipase. A lipoproteína lipase purificada de leite de vaca foi reportada por vários pesquisadores (Morley e Kuksis, 1972; Morley *et al.*, 1975; Paltauf *et al.*, 1974; Paltauf e Wagner, 1976) como tendo alta especificidade para ligação ester acil na posição 1 do triacilglicerol, hidrolisando-a ao monoacil-2 glicerol de acordo com a seguinte sequência:



Estudos sobre a absorção do triacilglicerol do sangue pela glândula mamária e a função da lipoproteína lipase foram efetuados primeiro em animais não ruminantes. No entanto, os resultados gerais indicam que quilomicrons e triacilgliceróis do VLDL dos tecidos mamários são os substratos e apoproteína e fosfolipídeos, os cofatores, para ótima atividade da lipoproteína lipase. A hidrólise enzimática do triacilglicerol só ocorre no quilomicron que é ligado ao endotélio, talvez pela hidrólise da ligação ester acil na posição 1. Hidrólise posterior de alguns diglicerídeos remanescentes pode ocorrer na superfície luminal, os quais são, em seguida, absorvidos nas microvesículas e transportadas pelas células endoteliais. A segunda ligação ester acil do diglicerídeo é hidrolisada à medida que a microvesícula atravessa o endotélio, local onde alguns monoglicerídeos também são hidrolisados

dos ácidos graxos foi observado em ambas as fatias de tecidos mamários e nos homogeneizados, com início 18 dias antes do parto e término 20 dias após o parto. Com base em tais pesquisas, fica claro que algum controle hormonal está envolvido na síntese do perfil específico de ácidos graxos pelas glândulas mamárias.



ESQUEMA 4.2 Um mecanismo de síntese de ácido pelo sistema protótipo mamífero 1, de J. Porter. Observe o fluxo de acetil-CoA e malonil-CoA para o local de carregamento e o movimento subsequente das unidades C2 e C3 ligadas à proteína carreadora de acila, que serve como o componente substrato para os sistemas de enzima orientados periféricamente. Adaptado de Collomb *et al.* (2006).

O mecanismo envolvido no término do comprimento da cadeia, especialmente na síntese de ácidos graxos de cadeias curtas e médias, ainda não foi esclarecido. Smith (1980) examinou o mecanismo de terminação do comprimento da cadeia na síntese da gordura do leite ao hidrolisar seletivamente o componente tioesterase do complexo ácido graxo sintetase, o que foi feito com base em estudos prévios que demonstravam que a proteólise limitada do complexo ácido graxo sintetase em fígado de ratos e glândulas mamárias com quimotripsina e tripsina produz terminações de cadeias defeituosas (Agradí *et al.*, 1976). Comprovou-se, depois, que a tripsina seletivamente hidrolisa o componente tioesterase do complexo de ácido graxo sintetase (Smith *et al.*, 1976; Dileepan *et al.*, 1978). O complexo de ácido graxo sintetase parece ser composto de duas subunidades idênticas, cada uma delas suscetível ao ataque de tripsina em três locais. A tioesterase I ocupa uma localização terminal em uma ponta das duas cadeias de polipeptídeos. Possui massa molecular de 25.000 com um sítio suscetível à tripsina perto do centro. O centro do complexo de ácido graxo sintetase que permanece depois da adição da tripsina reteve a porção da 4'-fosfopantoteína, assim como as atividades enzimáticas associadas a ele, com exceção da tioesterase. O complexo continuou sendo capaz de sintetizar longas cadeias de ácidos graxos, porém não apresentou condições de concluir o processo. Estudos utilizando um inibidor da atividade de tioesterase I também demonstrou a

habilidade do complexo multienzimático modificado para sintetizar parte do grupo acil. Ao contrário do dímero, o monômero do ácido graxo sintetase catalisou todas as reações já descritas, com exceção da condensação, que é realizada apenas pela tioesterase (Kumar *et al.*, 1970). A separação dos componentes do ácido graxo sintetase envolvidos no crescimento e na terminação da cadeia forneceu uma oportunidade única para determinar a regulação do comprimento da cadeia. Uma vez que o ácido graxo sintetase em tecidos de animais sintetiza preferencialmente C16:0, um mecanismo comum deve ser responsável pelo término da cadeia de acil. A remoção, ou inibição, portanto, da tioesterase I resultou em um complexo multienzimático modificado alongando a cadeia de ácidos graxos para C22; contudo, a taxa de alongamento de C16:0 para C18:0 foi muito mais lenta do que a de formação de C16:0, sendo que o alongamento posterior foi ainda mais lento. Se a tioesterase I estava envolvida na determinação do comprimento da cadeia, a atividade em tioésteres de cadeias médias e curtas deveria ser pequena, com uma grande distinção entre tioésteres de C14 e C16. As enzimas do fígado e as multienzimas mamárias são idênticas, com preferência para grupos acil de cadeias longas de C16 e C18.

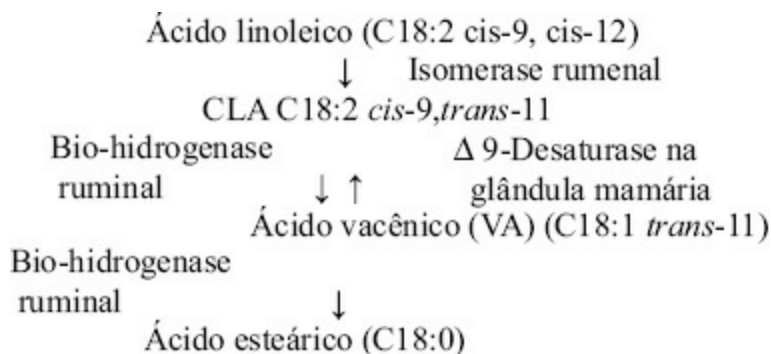
Estudos sobre a especificidade da enzima de condensação – aquela enzima que alonga a cadeia – e a enzima que termina a cadeia (a tioesterase I) demonstraram onde o alongamento da cadeia foi controlado. A incapacidade da enzima de condensação alongar rapidamente após C16 e a da tioesterase I de hidrolisar acil tioésteres mais curtos do que C16:0 garantem que C16:0 seja o principal produto sintetizado. Um exame da grande diversidade da distribuição de ácidos graxos entre as espécies demonstra que ratos, coelhos, roedores e camundongos possuem grandes quantidades de ácidos graxos de cadeias médias, enquanto porquinhos-da-índia só têm ácidos graxos de cadeias longas na gordura do leite. Smith (1980) demonstrou a presença de tioesterase II, específica de glândulas mamárias de coelhos, ratos e camundongos, que é responsável pela modificação da especificidade do ácido graxo sintetase. A enzima foi isolada e purificada a partir de glândulas mamárias de coelhos e ratos, e quando adicionada ao ácido graxo sintetase purificada, alterou a produção de C16 para ácidos graxos com cadeia média. A enzima estava intimamente envolvida com o complexo de ácido graxo sintetase em glândulas mamárias de ruminantes.

3. Síntese de ácidos graxos insaturados

É fato conhecido que as células mamárias de bovinos dessaturam ativamente C18:0 para C18:1. O fracionamento subcelular de tecidos mamários de vacas, leiteiras ou não, indica que a atividade de dessaturação ocorre somente nos microsomas. Os ácidos graxos monoinsaturados, por exemplo, o ácido oleico (C18:1), são responsáveis por 25% dos ácidos graxos presentes na gordura do leite enquanto os ácidos graxos poli-insaturados representam cerca de 2,4% do peso total dos ácidos graxos. Entre eles, o ácido linoleico (C18:2) e o ácido α -linolênico (C18:3) contribuem com 1,7% e 0,7% do peso total dos ácidos graxos, respectivamente (Mansson, 2008). Além disso, ácidos graxos *trans* com uma ou mais ligações duplas foram mencionados como representando 2,7% dos ácidos graxos do leite (Precht e Molkentin, 1995). Os ácidos graxos *trans*, uma mistura posicional e geométrica de isômeros de ácido octadecadinoico com ligações duplas conjugadas, são conhecidos como ácidos linoleicos conjugados (CLAs). O principal isômero CLA na gordura do leite, no entanto, é o *cis-9, trans-11*, que representa de 80-90% do CLA total (Parodi, 1977; Chin *et al.*, 1992; Sehat *et al.*, 1998). A biossíntese do CLA na gordura do leite envolve isomerização e bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados pelas bactérias do rúmen assim como Δ^9 -desaturase na glândula mamária (Collomb *et al.*, 2006). O isômero principal, o *cis-9,trans-11* CLA, é formado por ácido linoleico e α -linolênico (Bauman *et al.*, 2003). A sequência envolvida na biossíntese do isômero *cis-9,trans-11* CLA está ilustrada no Esquema 4.3.

O Esquema 4.3 mostra que o ácido linoleico é isomerizado rapidamente para CLA *cis-9,trans-11* pela isomerase *cis-12,trans-11* e é em seguida hidrogenado pelas bactérias do rúmen, *Butyrivibrio fibrisolvens*, transformando-se em ácido vacênico (VA, *trans-11*) (Kepler e Tove, 1967). Looor *et al.* (2002) encontraram forte correlação entre a quantidade de C18:2 na dieta e o teor de ácido vacênico na gordura do leite. Já que o VA é

hidrogenado em uma velocidade muito mais lenta por outros micro-organismos, ele é acumulado no rúmen (Griinari *et al.*, 1997; Harfoot e Hazelwood, 1997). VA é, em seguida, reconvertido para CLA *cis-9,trans-11* pela Δ^9 -desaturase na glândula mamária (Griinari *et al.*, 2000; Piperova *et al.*, 2002; Mosley *et al.*, 2006). Kraft *et al.* (2003) propuseram que o CLA (*cis-9,trans-11*) é formado indiretamente a partir do ácido α -linoleico (C18:3) depois de ter sido isomerizado para um trieno conjugado (*cis-9,trans-11,cis-15*, C18:3) por isomerase no rúmen e, depois, reduzido por bio-hidrogenação para *trans-11,cis-5* C18:2, *trans-11* 18:1 (VA).



ESQUEMA 4.3 Biossíntese do isômero CLA *cis-9*, isômero *trans-11* no leite a partir de C18:2. Adaptado de Collomb *et al.* (2006).

B. Proteínas do leite

As proteínas do leite caracterizam uma mistura heterogênea e incluem dois grupos principais: caseínas e soro de leite ou proteínas do soro. Elas são compostas por seis proteínas principais: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Outras frações de proteínas também estão presentes, mas em níveis muito baixos, incluindo a albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, lactoferritinas (LF), PP3 e ceruloplasminas (Fox e Mulvihill, 1982). As caseínas representam o maior grupo de proteínas e foram definidas por Jenness *et al.* (1956) como fosfoproteínas precipitadas a partir do leite cru pela acidificação para pH 4,6 a 20°C. As proteínas residuais do soro depois da remoção das caseínas são conhecidas como proteínas do soro do leite. A nomenclatura das proteínas do leite de vaca foi revista inúmeras vezes, em consequência do aprimoramento da separação das proteínas por meio da eletroforese em gel. A quinta revisão da *Nomenclatura das proteínas do leite de vaca*, realizada por Eigel *et al.* (1984), recomenda que a eletroforese não seja mais utilizada como base para a classificação. Em seu lugar, eles sugerem que as caseínas sejam identificadas de acordo com a homologia de suas seqüências primárias de aminoácidos em quatro famílias genéticas: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas. A eletroforese em gel ainda era considerada útil, no entanto, para a identificação de diferentes membros de tais famílias. Farrell *et al.* (2004), na sexta revisão da *Nomenclatura das proteínas do leite de vaca*, sugeriram que um sistema flexível de nomenclatura, que possa incorporar novas descobertas, deveria ser adotado.

1. Caseínas

As caseínas respondem por aproximadamente 80% do total de proteínas do leite de vaca. Elas estão organizadas em agregados macromoleculares, ou micelas de caseína, e variam de tamanho de 30 nm a 300 nm. Estas micelas espalham luz e são responsáveis pela natureza opaca e esbranquiçada do leite desnatado. As principais frações de caseína são as α_{s1} -, α_{s2} -, κ -, β - e γ -caseínas, que representam 38%, 10%, 36%, 13% e 3% de seu total, respectivamente (Davies e Law, 1980). As frações individuais de caseína diferem entre si em seu comportamento com relação aos íons de cálcio. Waugh e von Hippel (1956) separaram caseínas micelares em frações sensíveis e não sensíveis ao cálcio. Este processo baseou-se nos diferentes graus de solubilidade na presença de quantidades específicas de íons

de cálcio, resultando na identificação de duas frações conhecidas como α_s -caseína e κ -caseína. Aschaffenburg (1961), utilizando eletroforese em papel com ureia alcalina, demonstrou as variantes genéticas das caseínas do leite de vaca, confirmando, assim, o polimorfismo genético, fato consistente com estudos anteriores feitos por Aschaffenburg e Drewry (1955), que relataram a presença de variantes genéticas nas proteínas do soro do leite. As três variantes genéticas da α_{s1} -caseína foram denominadas como A, B e C com base em sua mobilidade decrescente durante a eletroforese contendo géis de amido com ureia por Thompson *et al.* (1962). Uma quarta variante genética, α_{s1} -D, foi identificada por Grosclaude *et al.* (1966). O poliformismo genético ocorre como resultado da substituição de um ou dois aminoácidos na mesma proteína, apesar de, no caso da α_{s1} -D, oito resíduos de aminoácidos terem sido retirados. Este fenômeno é diretamente relacionado com a raça e o gênero (Aschaffenburg, 1968; Bell *et al.*, 1981; Swaisgood, 1982). Com a exceção das α_{s1} -D e κ -caseínas, as diferenças entre as variantes genéticas, no entanto, não têm importância tecnológica. Variantes da β -caseína já tinham sido observadas por Aschaffenburg (1961) e designadas como A, B e C. Uma quarta variante genética, β -caseína D, foi identificada em *Bos indicus* por Aschaffenburg *et al.* (1968).

A fração de κ -caseína, originalmente identificada por von Hippel e Waugh (1955) e Waugh e von Hippel (1956), foi considerada idêntica à Z-caseína protetora coloidal, descrita por Lindstrom-Lang e Kodoma (1925). Pesquisas posteriores indicaram que a κ -caseína era associada à α_s -caseína, estabilizando-a e evitando, portanto, que fosse precipitada por íons de cálcio. Esta fração parece estabilizar as micelas de caseína assim como limitar seu tamanho. κ -caseína também é composta de muitas variantes genéticas, incluindo A e B (Neeling, 1964; Schmidt, 1964; Woychik, 1964).

2. Características moleculares e estruturais das caseínas

A sequência completa dos aminoácidos, ou estrutura primária das principais caseínas de bovinos, foi determinada (Mercier *et al.*, 1971; Jollès *et al.*, 1972; Ribadeau-Dumas *et al.*, 1972; Grosclaude *et al.*, 1973), o que permitiu que a hidrofobicidade média fosse calculada.

a. α_{s1} -Caseína

A α -Caseína é a maior fração e inclui aquelas fosfoproteínas precipitadas em baixas concentrações de cálcio. A família da α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN) compõe até 40% da fração e contém 199 resíduos de aminoácidos, dos quais 8,4% são de prolil distribuídos de maneira uniforme pela cadeia de polipeptídeos. Uma região altamente carregada é evidenciada entre os resíduos 41 e 80, que contém oito resíduos de fosfoferil altamente ácidos. O restante da molécula possui carga líquida igual a zero, apesar de haver três regiões fortemente hidrofóbicas nos resíduos de aminoácidos em 1-40, 90-110 e 130-199. A α_{s1} -caseína é uma fração típica de caseína, por ser uma molécula anfifílica, que possui um peptídeo ácido em uma extremidade, enquanto na outra é capaz de formar ligações hidrofóbicas. As cinco variantes genéticas de α_{s1} -caseína são conhecidas como A, D, B, C e E, em ordem decrescente de mobilidade eletroforética relativa em géis alcalinos contendo ureia. Três novas variantes genéticas de α_{s1} -CN F foram encontradas desde a última edição deste livro. Elas incluem α_{s1} -CN F em gado preto e branco da Alemanha (Erhardt, 1993), α_{s1} -CN G em gado marrom da Itália (Mariani *et al.*, 1995) e α_{s1} -CN H em animais da África (Mahe *et al.*, 1999). A principal variante genética em *B. taurus* é a variante B. Se tais diferenças entre as variantes genéticas se devem à fosforilação, atualmente elas são designadas por um número arábico e uma letra latina que indicam a variante genética em questão (Eigel *et al.*, 1984). Por exemplo, a principal variante genética B para α_{s1} -caseína em *B. taurus* com oito resíduos de fosfoferil é designada agora como α_{s1} -CN B-8P (Figura 4.2).

1	10	20
H-Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-		
21	30	40
Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-		
41	50	60
<u>Ser</u> -Lys-Asp-Ile-Gly- SeP -Glu- SeP -Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-		
61	70	80
Glu-Ala-Glu- SeP -Ile- SeP - SeP - SeP -Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- SeP -Val-Glu-Gln-Lys-His-		
81	90	100
Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-		
101	110	120
Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- SeP -Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-		
121	130	140
His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-		
141	150	160
Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-		
161	170	180
Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-		
181	190	199
Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH		

FIGURA 4.2 Estrutura primária de gado α_{s1} -CN B-8P. Mercier *et al.* (1971); Grosclaude *et al.* (1973); Stewart *et al.* (1984); Nagao *et al.* (1984); Koczan *et al.* (1991) e Farrell *et al.* (2004).

b. α_{s2} -Caseína

A α_{s2} -Caseína (α_{s2} -CN) corresponde a 10% da fração e é composta de 207 resíduos de aminoácidos. Ela é a fração mais hidrofílica entre as caseínas, com 10 a 13 resíduos de fosfoseril localizados em três regiões carregadas, 8-16, 56-61 e 129-133. Ela possui uma região C-terminal hidrofóbica muito forte (160-207) e um segmento hidrofóbico fraco entre 90 e 120 (Fox e Mulvihill, 1982). α_{s1} -Caseína também contém resíduo(s) de cisteína que podem estar envolvidos em interações tiol-dissulfeto induzidos termicamente. Quatro variantes genéticas foram descritas, denominadas como A, B, C e D. Os componentes do leite, classificados previamente como α_{s3} -, α_{s4} -, α_{s5} - e α_{s6} -caseína (Annan e Manson, 1969; Rose *et al.*, 1970; Whitney *et al.*, 1976), eram todos compostos da família α_{s2} -CN com uma sequência de aminoácidos similar, diferindo apenas quanto ao grau de fosforilação. Eigel *et al.* (1984) recomendaram que a nomenclatura para a variante A fosse alterada, conforme indicado na Tabela 4.5. A α_{s5} -caseína, no entanto, é um dímero das α_{s3} - e α_{s4} -caseínas, agora denominadas α_{s2} -CN A-12P e α_{s2} -CN A-11P, e são unidas por ligação dissulfeto (Hoagland *et al.*, 1971). Como resultado do sequenciamento do cDNA (Stewart *et al.*, 1987) e do sequenciamento do DNA genômico (Groenen *et al.*, 1993), a estrutura primária de α_{s2} -CN A-11P, relatada pela primeira vez por Brignon *et al.* (1977), foi modificada. Isto está ilustrado na Figura 4.3, na qual Gln substitui Glu na posição 87.

c. β -Caseínas

As β -Caseínas (β -CN) englobam até 45% do total de caseínas e também são fosfoproteínas. Elas diferem das α -caseínas pela sua forte associação com a temperatura assim como pela dependência da temperatura em sua solubilidade na presença de íons de cálcio. A β -caseína tem 209 resíduos de aminoácidos, dos quais 16,7% são prolinas distribuídas igualmente ao longo do polipeptídeo, o que limita a formação de uma α -hélice. Sete variantes

genéticas já são reconhecidas, separadas de modo diferente quando submetidas à eletroforese, dependendo da utilização de condições alcalinas ou ácidas. Enquanto A pode ser diferenciada de B, C e D por eletroforese em condições alcalinas, as variantes A só podem ser separadas em condições ácidas. Detalhes sobre a natureza e a nomenclatura das variantes foram revisados por Eigel *et al.* (1984). Desde então, três novas variantes foram identificadas por sequenciamento, como β -CN F, antes conhecida como β -CN X (Visser *et al.*, 1995), β -CN G (Dong e Ng-Kwai-Hang, 1998) e β -CN H (Han *et al.*, 2000).

TABELA 4.5 Alterações recomendadas para a nomenclatura da família α_{s2} -N

Nomenclatura anterior	Nomenclatura recomendada	
α_{s2} -CN A	α_{s2} -CN A-13	
α_{s3} -CN	α_{s2} -CN A-12	
α_{s4} -CN	α_{s2} -CN A-11	
α_{s6} -CN	α_{s2} -CN A-10	
1	10	20
H-Lys-Asn- <u>Thr</u> -Met-Glu-His-Val- SeP-<i>SeP-<i>SeP</i></i> -Glu-Glu-Ser-Ile-Ile- SeP -Gln-Glu-Thr-Tyr-		
21	30	40
Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro- SeP -Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-		
41	50	60
Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly- SeP-<i>SeP-<i>SeP</i></i> -Glu-Glu-		
61	70	80
SeP -Ala-Glu-Val-Ala- <i>Thr</i> -Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-		
81	90	100
Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-		
101	110	120
Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-		
121	130	140
Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu- SeP-<i>Thr</i> - SeP -Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-		
141	150	160
Met-Glu- SeP -Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu- <u>Thr</u> -Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-		
161	170	180
Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-		
181	190	200
Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-		
201	207	
Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH		

FIGURA 4.3 Estrutura primária de gado α_{s2} -CN A-11P (Brignon *et al.*, 1977; Mahe e Grosclaude, 1982; Stewart *et al.*, 1987; Groenen *et al.*, 1993). Resíduos de serila (SeP) identificados como fosforilados estão indicados em negrito itálico. Farrell *et al.* (2004).

A sequência primária da variante A2, a mais comum, β -CN A2-5P, está ilustrada na Figura 4.4. As β -caseínas são as frações de caseína mais hidrofóbicas em função do número de resíduos hidrofóbicos presentes, apesar de terem o N-terminal fortemente carregado. Técnicas que incluem o dicróismo circular e a dispersão rotatória ótica excluíram a presença de estruturas secundárias e terciárias, apesar de Andrews *et al.* (1979) terem calculado a presença de 10% de α -hélice, 13% de folhas e 77% de estrutura desordenada em β -caseína.

1	10	20
H-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu- SeP -Leu- SeP - SeP - SeP -Glu-		
21	30	40
Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln- SeP -Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-		
41	50	60
Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-		
61	70	80
Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-		
81	90	100
Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-		
101	110	120
Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-		
121	130	140
Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-		
141	150	160
Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-		
161	170	180
Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-		
181	190	200
Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-		
201	209	
Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-OH		

FIGURA 4.4 Estrutura primária de gado β -CN A²-5P. Ribadeau-Dumas *et al.* (1972); Grosclaude *et al.* (1973) e Farrell *et al.* (2004).

*1	10	20
H-Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-		
21	30	40
Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-		
41	50	60
Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-		
61	70	80
Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-		
81	90	100
Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-		
101	110	120
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-		
121	130	140
Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala- <u>Ser</u> -Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro- <u>Thr</u> -Thr-Glu-Ala-Val-Glu-		
141	150	160
Ser-Thr-Val-Ala- <u>Thr</u> -Leu-Glu-Asp- SeP -Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-		
161	169	
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-OH		

FIGURA 4.5 Estrutura primária de gado κ -CN B-1P (Mercier *et al.*, 1973). A flecha indica o ponto de ataque pela quimosina (renina). O asterisco (*) indica piroglutamato como N-terminal ciclicizado. O sítio da fosforilação pós-translacional (SeP) está indicado em negrito itálico; resíduos que possam ser fosforilados estão sublinhados. Farrell *et al.* (2004).

d. γ -Caseína

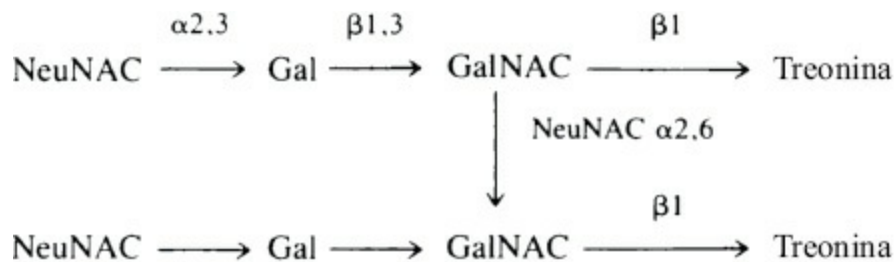
A γ -caseína já foi considerada uma fração distinta, correspondendo a 3% da caseína total. A eletroforese

demonstrou que ela é idêntica à porção C-terminal da β -caseína (Gordon *et al.*, 1972; Groves *et al.*, 1973). Trieu-Cuot e Gripon (1981), utilizando eletrofocalização e eletroforese bidimensional de caseínas bovinas, obtiveram dois padrões bidimensionais por hidrólise enzimática da β -caseína com plasma bovino similar à γ -caseína. Pesquisas realizadas por vários outros pesquisadores sugerem que a β -caseína tenha sido hidrolisada pela proteinase do leite (plasmina) em três locais adjacentes aos resíduos de lisil, 28, 104 e 106, produzindo 6 polipeptídeos, incluindo γ_1 , γ_2 e γ_3 -caseínas, assim como peptonas de protease (fosfoproteínas solúveis em ácido e estáveis ao calor) encontradas no leite (Groves *et al.*, 1973; Eigel, 1977; Andrews, 1979). A γ -caseína, portanto, pode surgir por meio da proteólise, similar à ação da tripsina, da β -caseína antes ou depois da ordenha. A quinta revisão da *Nomenclatura das proteínas do leite de vaca* não incluiu a classificação das γ -caseínas, mas foram consideradas produtos da degradação da β -caseína (Eigel *et al.*, 1984). Na sexta edição, feita por Farrell *et al.* (2004), os produtos da clivagem da plasmina da β -CN foram identificados como variantes γ_1 , γ_2 e γ_3 CN e proteose peptonas.

A estrutura aberta e a hidrofobicidade das caseínas fazem com que elas se tornem muito susceptíveis à proteólise, com alta propensão para a formação de peptídeos amargos (Guigoz e Solms, 1976). As caseínas são acessíveis ao ataque das proteinases psicotróficas endógenas do leite, que não afetam as proteínas do soro (Fox, 1981).

e. κ -Caseína

A κ -Caseína (κ -CN) contém 169 resíduos de aminoácidos, dos quais 11,8% são prolinas (Figura 4.5). O principal componente da κ -CN não contém carboidrato, enquanto os componentes menores da κ -CN, uma glicoproteína, são considerados formas glicosiladas da κ -CN principal. A porção de carboidrato contém ácido N-neuramínico (NANA), galactose (Gal) e N-acetilgalactosamina (NeuNAC) e está presente como trissacarídeo ou tetrassacarídeo (Jollès e Fiat, 1979). Os pontos de ligação entre κ -CN do colostro e o complexo de oligossacarídeos foram apontados como sendo os resíduos de treonina (Thr) 131, 133 e 135. Saito e Itoh (1992) confirmaram as estruturas de tais moléculas de carboidratos e identificaram outras três. A falta de informação quanto à estrutura dos componentes menores do κ -CN fez com que sua nomenclatura permanecesse não definida na quinta revisão (Eigel *et al.*, 1984). Na sexta revisão, Farrell *et al.* (2004) continuaram a evitar uma nomenclatura precisa para as frações minoritárias de κ -caseínas, em virtude de seu alto grau de heterogeneidade e às quantidades limitadas de κ -CN.



A κ -caseína, uma molécula anfifílica que possui um único resíduo de fosfoseril, exibe moléculas de trissacarídeos ou tetrassacarídeos localizados no segmento C-terminal. O resto da molécula, porém, tem caráter altamente hidrofóbico. É a única solúvel em soluções de cálcio que, normalmente, precipitaria as outras frações de caseína. A κ -caseína exerce um efeito estabilizador nas frações de caseína ao formar micelas coloidais. É esta fração de proteína que é hidrolisada pela renina, que libera um macropeptídeo da região do C-terminal que contém carboidratos. A ligação específica hidrolisada na κ -caseína é 105-106, a ligação Phe-Met. O produto remanescente com o N-terminal e 2/3 da cadeia de peptídeo original é conhecido como para- κ -caseína. Esta reação, discutida no Capítulo 8, desestabiliza a micela da caseína, causando a formação do coalho.

3. Proteínas do soro do leite

O soro – principal coproduto das indústrias de caseína e queijo – foi considerado, há algum tempo, um produto desperdiçado pelos fabricantes de queijo e caseína (Smithers, 2008). Hoje, no entanto, ele é tido como alimento funcional em função das propriedades bioativas que as proteínas do soro e frações individuais exibem (Kruger *et al.*, 2005; Michaelidou e Steijns, 2006). Ele contém um grupo de proteínas que continuam solúveis no soro do leite após a precipitação e a remoção das caseínas com o pH a 4,6 e a 20°C. As principais proteínas do soro – β -lactoglobulina (β -LG) e α -lactalbumina (α -LA) – são globulares e constituintes de 70-80% do total (Chatterton *et al.*, 2006). As outras frações menores incluem a lactoferrina e a lactoperoxidase.

a. β -Lactoglobulinas

As β -LGs fornecem, em geral, proteção imunológica e, por esta e outras propriedades, são, atualmente, muito valorizadas como nutracêuticas. Elas estão presentes como variantes genéticas, com as variantes A e B encontradas com muita frequência na maioria das raças de vacas. A variante A é expressa em nível mais alto do que a B (Aschaffenburg e Drewry, 1955) ou a C (Hill *et al.*, 1996; Ng-Kwai-Hang e Grosclaude, 2003). Variantes adicionais também foram observadas, incluindo H, I, J e W. A sequência básica de β -LG B pode ser consultada na Figura 4.6 e contém 162 aminoácidos (Farrell *et al.*, 2004).

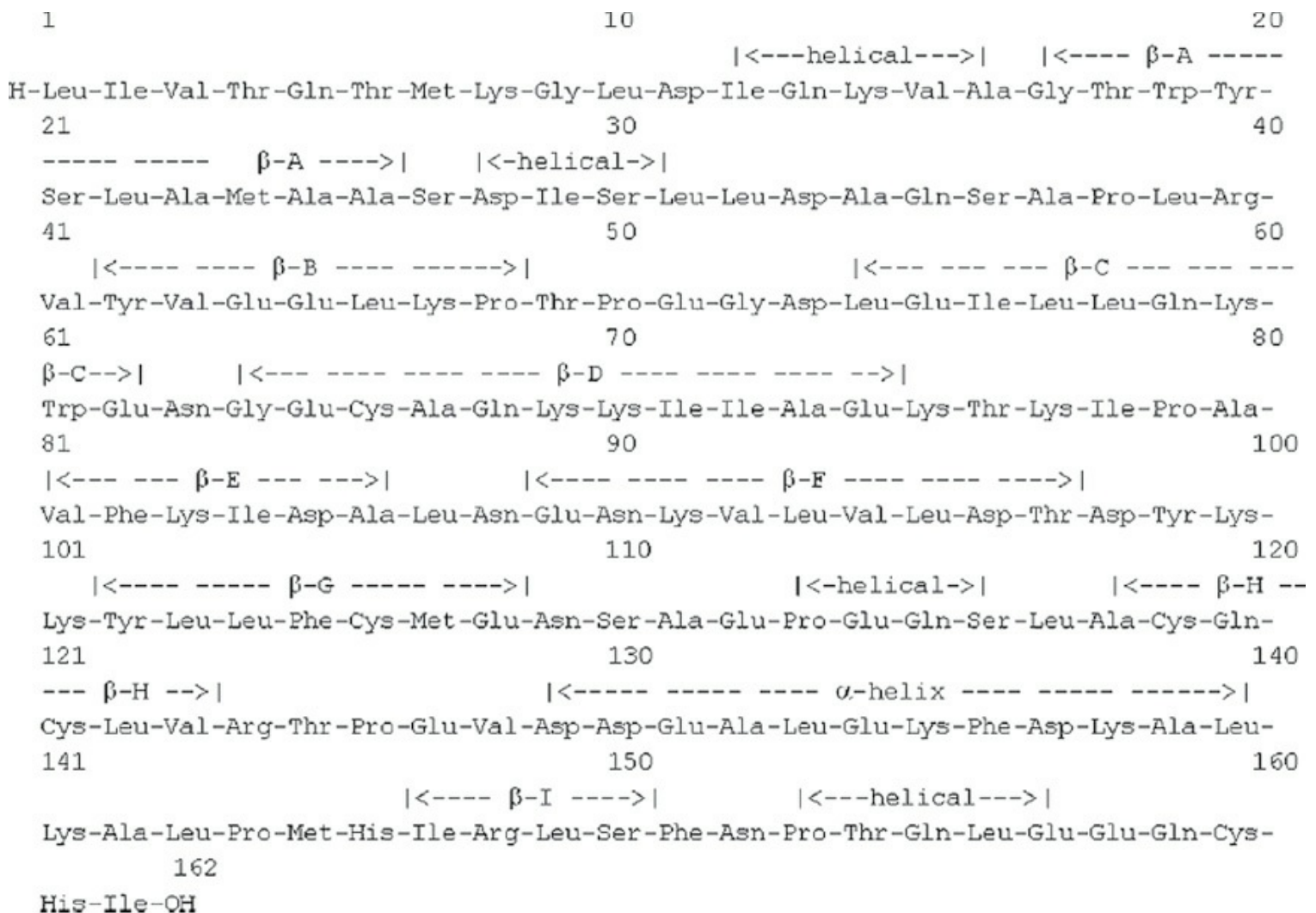


FIGURA 4.6 Estrutura primária de gado β -LG B (Eigel *et al.*, 1984). Os grupos sulfidríla livre estão em Cys121 na forma natural da proteína (Bewley *et al.*, 1997; Brittan *et al.*, 1997; Brownlow *et al.*, 1997; Quin *et al.*, 1998a; 1998b; 1999). As sequência de posições dos principais aspectos estruturais secundários, α -hélice, regiões helicoidais e filamentos- β (β -A para β -I) estão apresentados acima da sequência principal. Farrell *et al.* (2004).

1	10	20
H-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Arg-Glu-Leu-Lys-Asp-Leu-Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-		
21	30	40
Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr-Phe-His-Thr-Ser-Gly-Tyr-Asp-Thr-Gln-Ala-		
41	50	60
Ile-Val-Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Glu-Tyr-Gly-Leu-Phe-Gln-Ile-Asn-Asn-Lys-Ile-Trp-		
61	70	80
Cys-Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn-Ile-Cys-Asn-Ile-Ser-Cys-Asp-Lys-Phe-		
81	90	100
Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Thr-Asp-Asp-Ile-Met-Cys-Val-Lys-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Val-Gly-		
101	110	120
Ile-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln-Trp-Leu-Cys-		
123		
Glu-Lys-Leu-OH		

FIGURA 4.7 Estrutura primária de gado α -LA B (Brew *et al.*, 1970; Vanaman *et al.*, 1970). As pontes de dissulfeto na molécula estão entre as posições 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77, e 73 e 91. Farrell *et al.* (2004).

b. α -Lactalbumina

A α -LA costuma ser a responsável por 3-4% do total de proteínas do leite ou por 20% das proteínas do soro (Swaigood, 1995). É uma proteína globular, que contém 123 aminoácidos (Brew *et al.*, 1970) com alto grau de homologia entre a α -LA de outros animais, incluindo o leite humano. Junto com a $\beta_{1,4}$ -galactosiltransferase, ela forma o complexo sintase da lactose. Como ainda será discutido, ele facilita a formação da lactose a partir da glicose e da galactose UDP. Duas variantes genéticas predominam na proteína madura α -LA, A e B (Jenness, 1974), com uma terceira variante C descrita, mas ainda não confirmada por meio de sequenciamento de DNA ou de proteínas (Bell *et al.*, 1981). Ela aparece em maior quantidade no leite humano do que no bovino, sugerindo que alimentos para crianças poderiam ser enriquecidos com proteínas α -LA do soro (Chatterton *et al.*, 2006). A estrutura básica de α -LA está ilustrada na Figura 4.7.

c. Lactoferritina

LF, o principal membro de uma família de proteínas com propriedades de ligação com ferro, é encontrado no leite da maioria das espécies (Schanbacher *et al.*, 1993). Ele ocorre com uma única cadeia de polipeptídeos que contém 689 aminoácidos com graus diversos de glicosilação. A LF fornece a primeira linha de defesa contra infecções e inflamações (Ward *et al.*, 2002) e também possui atividade antiviral (Van de Strate *et al.*, 2001).

d. Albumina do soro bovino

A BSA responde por cerca de 8% do total das proteínas do soro do leite e é física e imunologicamente idêntica à albumina do soro do sangue (Coulson e Stevens, 1950; Polis *et al.*, 1950). Contém 583 aminoácidos e 17 ligações de dissulfeto (Hirayama *et al.*, 1990). Possui uma função importante no transporte, metabolismo e na distribuição de ligantes (Carter e Ho, 1994), assim como na proteção de radicais livres.

C. Micela da caseína

As caseínas do leite são encontradas em uma partícula coloidal, conhecida como micela da caseína. Estas partículas coloidais, assim como os glóbulos de gordura, compõem a fase dispersa do leite, envolvidas pelo soro, que

consiste de lactose, das proteínas do soro e vitaminas e minerais dissolvidos. As micelas estão polidispersas e podem ser dispostas em uma distribuição de tamanho logarítmica, que varia de 50 nm a 400 nm com seu pico centralizado a 200 nm, determinados por fracionamento por campo, fluxo e sedimentação e dispersão dinâmica da luz (de Kruif, 1998). As determinações das massas moleculares sugerem que micelas individuais podem conter até 20.000 moléculas de proteínas individuais (de Kruif e Holt, 2003). Além da proteína (94%), as micelas contêm íons de cálcio, fosfato, magnésio e citrato, conhecidos como fosfatos de cálcio coloidais (CaP). Essas micelas possuem estrutura aberta e porosa quando vista por microscópio eletrônico (Figura 4.8). São altamente hidratadas e possuem volume de 2-4 mL/g. Sua estabilidade é especialmente importante, por exercer grande influência nas propriedades de processamento do leite, aspecto que resultou em inúmeros estudos sobre a natureza das interações proteína-proteína e proteína-íon no interior da estrutura da micela. A micela é extremamente estável em determinadas condições de processamento, como a concentração, ultrafiltração, peletização e secagem, e extremamente instável em outras, como a acidificação e adição de coalho (Horne, 1998). A complexidade da estrutura da micela pode estar relacionada com sua função biológica no leite: a de transportar grandes quantidades de CaP insolúveis a jovens mamíferos na forma líquida e formar um coágulo no estômago para que a nutrição se torne mais eficiente (de Kruif e Holt, 2003).

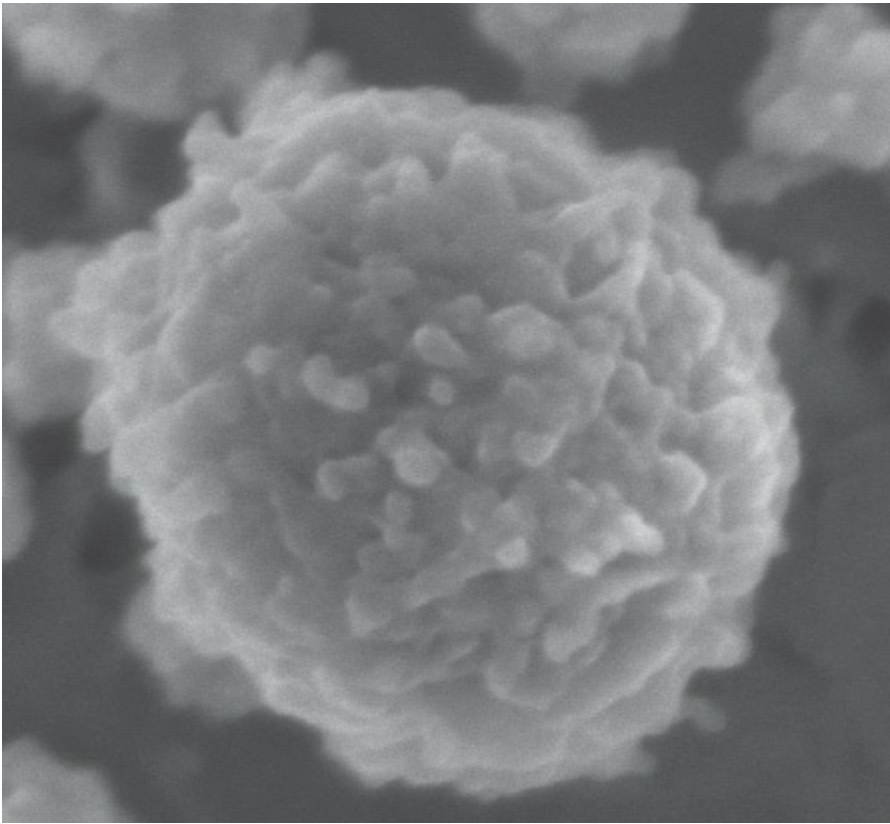


FIGURA 4.8 Imagem de uma micela de caseína por microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo. Ver Dalglish *et al.* (2004) para metodologia. Barra = 150 nm. Cortesia do Professor D. Goff, University of Guelph.

Vários modelos da estrutura das superfícies externa e interna das micelas de caseína têm sido propostos nos últimos 50 anos ou mais, incluindo a camada do núcleo, o polímero da cadeia e os modelos de submicelas (Waugh e Noble, 1965; Payens, 1966; 1979; Garnier e Ribadeau-Dumas, 1970; Waugh *et al.*, 1970; Schmidt e Payens, 1976; Slattery, 1976; Schmidt, 1980; McMahon e Brown, 1984; Walstra, 1990; 1999). Os modelos atuais incluem o de nanoagrupamento de CaP (Holt *et al.*, 1998; 2003; de Kruif e Holt, 2003), o de vínculo duplo (Horne, 1998; 2002; 2006) e o modelo de grade entrelaçada (McMahon and Oommen, 2008). Com todas as informações e técnicas disponíveis, aplicadas aos estudos das micelas de caseínas, a opinião atual é de que todos os modelos diferem apenas em pequenos detalhes e que os elementos essenciais da estrutura da caseína foram aprovados pelos estudiosos. O leitor pode consultar inúmeras referências recentes para obter uma discussão completa sobre as estruturas das micelas da caseína (de Kruif e Holt, 2003; Dalglish *et al.*, 2004; Horne, 2006; McMahon e Oommen,

1. Estrutura da micela de caseína

Cerca de 75-80% das proteínas do leite são classificadas como caseína, aquelas que precipitam em pH de 4,6. A maioria, mas não todas, localiza-se na micela da caseína, que também contém outros componentes além da caseína, como cálcio, fosfato, citrato, diversos íons em pequena quantidade, lipase e enzimas de plasmina, além de soro de leite aprisionado. Essa partícula é um complexo de caseína de fosfato de cálcio e não uma verdadeira micela no sentido coloidal. A razão molar das proteínas no interior das micelas no momento da secreção é de aproximadamente $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : \beta : \kappa = 4:1:3.5:1.5$, ou de cerca de 38% α_{s1} -, 10% α_{s2} -, 36% β -, e 13% κ -caseína. As α_s - e β -caseínas são fosforiladas extensivamente em resíduos de serina e se precipitam na presença de íons de cálcio ou CaP, enquanto a κ -caseína não é sensível à precipitação de cálcio. Em decorrência da alta concentração de resíduos de prolina, as α_s - e β -caseínas são conhecidas como reomórficas, não possuindo uma estrutura secundária específica. Elas também possuem alta hidrofobicidade (Walstra *et al.*, 2006).

O conteúdo da κ -caseína requer consideração especial. Possui uma função única na coagulação do leite, pois é hidrolisada pela quimosina na ligação 105-106 Phe-Met transformando-se em frações de para- κ -caseína (resíduos 1-105) e caseína-macropeptídeo hidrofílico (resíduos 106-169). Uma relação inversa entre o conteúdo da κ -caseína e o tamanho da micela foi relatado em várias pesquisas (Schmidt, 1979; McGann *et al.*, 1980; Donnelly *et al.*, 1984). As micelas de diâmetro de cerca de 154 nm podem conter baixo teor de κ -caseína, podendo chegar a apenas 4%, enquanto aquelas com 62 nm de diâmetro contêm até 12% de κ -caseína (Donnelly *et al.*, 1984). Diminuições em α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína foram observadas à medida que a κ -caseína aumentava. Micelas artificiais podem ser preparadas quando α_{s1} - ou β -caseína estão ausentes, mas não na ausência da κ -caseína (Schmidt, 1980). Assim sendo, ela possui importante função na estabilização da micela da caseína. A porção de macropeptídeo, após ter sido clivada pela quimosina, torna-se prontamente solúvel e migra para longe da micela. A paracaseína da micela, sem a caseína-macropeptídeo carregada negativamente, coagula de imediato com outras paracaseínas das micelas formando o coágulo. A κ -caseína, portanto, precisa estar presente na superfície da micela, orientada de forma que a caseína-macropeptídeo seja de fácil acesso para ser clivada pela quimosina. Acredita-se que este macropeptídeo existe na forma de filamentos cobrindo a superfície externa da micela (Walstra, 1979; Walstra *et al.*, 1981; Holt e Dalgleish, 1986; Holt e Horne, 1996) e a estabiliza por intermédio de uma combinação de mecanismos estéricos e eletrostáticos.

Cerca de 7% da matéria seca da micela consiste em material inorgânico, principalmente cálcio e fosfato (Holt *et al.*, 1998). O leite contém cerca de 117 mg de cálcio por 100 g de leite. O soro do leite contém 40 mg por 100 g de soro e apenas 32% do conteúdo de cálcio. O restante é associado à micela da caseína, aproximadamente 31 mg por grama de caseína seca. Do mesmo modo, de 203 mg de fosfato inorgânico por 100 g de leite, apenas 53% estão no soro e o resto, 37 mg por grama de caseína seca, é associado à micela. A micela também contém 5,6 mg de citrato, 3,3 mg de K, 1,5 mg de Mg e 0,9 mg de Na por grama de caseína seca (Walstra *et al.*, 2006).

As micelas podem conter até 7,9 g de água (Farrell *et al.*, 1990) ou soro de leite desprovido de moléculas, como as proteínas globulares (Walstra *et al.*, 2006), por grama de proteína. A micela é mais altamente solúvel do que a maioria das proteínas globulares e apresenta estrutura porosa. O volume das micelas varia de 2 mL a 4 mL por grama de caseína, dependendo de quanto as camadas filamentosas externas da micela possam se estender, representando de 6-12% da fração do volume do leite (Walstra, 1979).

Muitas pesquisas sobre a distribuição das dimensões das micelas foram feitas utilizando microscópios eletrônicos, dispersão de luz e métodos de cromatografia com vidro de porosidade controlada. O diâmetro médio relatado foi de 25-140 nm e o diâmetro médio da superfície do volume foi de 86 nm (Schmidt e Payens, 1976). Os

tamanhos das micelas se encaixam em uma distribuição normal logarítmica, que se estende de 50 nm a 400 nm, com o pico localizado a 200 nm, de acordo com a determinação por fracionamento por campo, fluxo e sedimentação e dispersão dinâmica da luz (de Kruif, 1998), apesar dos resultados variarem de acordo com a técnica utilizada. Tem sido descrito um número pequeno de partículas muito grandes que alcançam até 800 nm de diâmetro, além de um grande número de partículas pequenas (Walstra *et al.*, 2006).

As razões molares das frações de caseína da micela mencionadas anteriormente referem-se à micela no momento da secreção. Foi reconhecido, no entanto, que a β -caseína é capaz de migrar para fora da micela para a fase do soro, de modo reversível, sem causar o colapso da estrutura da micela (Creamer *et al.*, 1977; Ali *et al.*, 1980), sendo tal migração dependente da temperatura. Até 60% da β -caseína foi observada na fase do soro após 48 horas a 4°C. Esta β -caseína do soro fica livre para se alternar com a caseína da micela. As mudanças, entretanto, são reversíveis quando as substâncias são reaquecidas a 37°C. O fenômeno de dissociação pelo frio possui impacto pedagógico em modelos de micelas de caseína, pois chama a atenção para a importância das interações hidrofóbicas nas interações intermoleculares no interior da micela e também exerce um impacto tecnológico, especialmente na indústria do queijo, pois os parâmetros de sua preparação podem ter sido alterados (Ali *et al.*, 1980) e uma proteólise acentuada da β -caseína pela plasmina e proteinases da microflora bacteriana pode ocorrer na fase do soro (Fox e Guiney, 1973; Creamer *et al.*, 1977).

2. Modelos de micelas de caseínas

Todas as considerações feitas anteriormente conduziram a inúmeros modelos propostos para a micela da caseína que evoluíram e foram refinados com novas técnicas experimentais e resultados. Durante muitos anos, o modelo mais aceito foi o de submicela elaborado por Schmidt (1980) e refinado por Walstra (1990; 1999). A comprovação mais convincente da existência de submicelas de 8-20 nm de diâmetro foi deduzida a partir da natureza porosa da micela, elaborada pelas primeiras técnicas de microscopia eletrônica, como possuindo aparência similar à da framboesa (Schmidt e Buchheim, 1970; 1976). Foi sugerido que as submicelas contêm um núcleo hidrofóbico (Farrell *et al.*, 1990) coberto por uma camada externa hidrofílica muito menos densa do que a das proteínas globulares (Farrell *et al.*, 1990), que é, ao menos parcialmente, composta por moléculas polares de κ -caseína (Walstra, 1990). A κ -caseína forma projeções que lembram filamentos emergentes da superfície da micela, sendo que a camada com filamentos possui uma espessura efetiva de, no mínimo, 7 nm (Walstra, 1990).

O modelo da submicela refere-se a dois tipos de micelas: aquelas ricas em κ -caseína na sua superfície e aquelas que não o são. Foi sugerido que as submicelas são agregadas pelo CaP até que toda a superfície esteja coberta com κ -caseínas, passando a conter, portanto, centenas de submicelas mantidas juntas pelo CaP. Esta é, de fato, a grande dificuldade apresentada pelo modelo: não há nenhuma razão inerente para que, durante a síntese das caseínas ou das micelas de caseína na célula secretora, surjam dois tipos de submicelas com composições diferentes; e, também, nenhum dos dois tipos de submicelas jamais foi encontrado (McMahon e McManus, 1998; Holt *et al.*, 2003; Dalgleish *et al.*, 2004).

A associação de proteínas de caseína tem início nas vesículas de Golgi no interior da célula secretora. As caseínas totalmente fosforiladas, mas ainda não agregadas, saem do aparato de Golgi. Cálcio e fosfato passam pela membrana para o interior das vesículas de Golgi, e quando sua concentração excede a solubilidade do CaP, a agregação micelar inicia-se. Quando as vesículas de Golgi se fundem com a membrana do plasma apical, micelas intactas são esvaziadas no lúmen alveolar (Farrell *et al.*, 2006).

É preciso lembrar que uma das funções biológicas da micela da caseína é a de transportar concentrações muito mais altas de cálcio biodisponível ao mamífero infantil do que as que podem ser carregadas em solução. O modelo proposto por Holt *et al.* (1998; 2003) descreve as micelas de caseína como uma rede homogênea de polímeros de

caseína contendo nanoagrupamentos de CaP. Nele, o papel biológico da micela é abordado, já que foi demonstrado que os resíduos de fosfoserina de α_{s1} - e β -caseínas podem evitar que a CaP precipite depois que a associação de cálcio e fosfato durante a biossíntese exceda a solubilidade (Holt *et al.*, 1998). Portanto, a função biológica das caseínas é a de sequestrar o CaP em uma partícula coloidal. O nanoagrupamento de CaP-caseína se assemelha, até certo ponto, a antiga submicela de caseína, conclusão resultante de um melhor conhecimento do processo de biossíntese. O modelo de ligação dupla de Horne (1998; 2002; 2006) enfatiza as habilidades duplas das várias caseínas, exceto a κ -caseína, para associar-se a si mesma ou associar com o CaP. É a autoassociação das caseínas que começa a agregar os nanoagrupamentos. Durante a biossíntese, a formação e a agregação dos nanoagrupamentos continuam, embora a associação da κ -caseína com a β - ou α_s -caseína atue como terminador de cadeias o que, enfim, conduz a uma cobertura da superfície com κ -caseína e a interrupção da agregação. Esta condição expande a função da κ -caseína dos modelos submicelares prévios, uma vez que explica como ela forma a camada com filamentos na superfície, eliminando, assim, a necessidade de haver duas populações diferentes de submicelas, como já mencionado. Marchin *et al.* (2007), utilizando análises de dispersão de raio X em ângulo estreito, concluíram que as micelas de caseína devem consistir de uma complexa rede de cadeias de proteína. As únicas subestruturas particuladas presentes foram os nanoagrupamentos de CaP.

McMahon e Oommen (2008) combinaram as ideias do modelo de nanoagrupamento e do modelo de ligação dupla para elaborar o que eles definem como uma estrutura supramolecular do tipo grade intertravada, que inclui as cadeias de proteínas e os nanoagrupamentos de proteínas CaP. No estudo que realizaram, imobilizaram micelas de caseína em uma grade de cobre coberta com parlodiona e poli L-lisinas, com proteínas e CaP coradas com oxalato de uranila. O protocolo incluiu congelamento instantâneo e secagem sob alto vácuo para obter imagens em microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução (TEM). Tais imagens, junto com as reproduções das imagens das fraturas das seções transversais produzidas pelo TEM por Heertje *et al.* (1985) e Karlsson *et al.* (2007), e as imagens do microscópio eletrônico de varredura de emissão do campo feitas por Dalglish *et al.* (2004) fornecem as melhores representações das estruturas até o momento. Com base nessas imagens, McMahon e Oommen (2008) propuseram a estrutura supramolecular, reproduzida na Figura 4.9, como uma grade intertravada. As proteínas aparecem como esferas de 8 nm de diâmetro que envolvem os nanogrupos CaP e se estendem no formato de cadeias curtas entre os pontos de intertravamento e a partir da periferia. A estrutura global é irregular e não pode acomodar uma grande diversidade de ligações entre as proteínas, por exemplo, os extensores de cadeias (β -caseína ou α_{s1} -caseína), pontos de ramificação das cadeias (α_{s1} -caseína ou α_{s2} -caseína), terminadores de cadeias (κ -caseína) e pontos de intertravamento (CaP nanoagrupamentos). A estrutura supramolecular proposta permite a existência de uma partícula coloidal muito estável, composta por milhares de moléculas de proteína e centenas de nanoagrupamentos CaP. A distância entre os locais de intertravamento é coerente com o intervalo de 19 nm para nanoagrupamentos, proposto por de Kruif e Holt (2003). O modelo supramolecular também permite a predominância das κ -caseínas como moléculas terminais na periferia contendo protuberâncias que se estendem no ambiente circundante. Esta descrição, de fato, reconcilia os modelos dos nanoagrupamentos e os de ligação-dupla, caracterizando um conjunto coerente.

A superfície da micela demanda maior discussão. Já está estabelecido que a κ -caseína possui uma função vital na estabilização da micela e está presente com seu macropeptídeo estendido para o soro. A superfície da micela permite que a quimosina penetre e alcance a ligação Phe-Met da κ -caseína, e a β -lactoglobulina quando há aquecimento a alta temperatura, uma vez que se sabe que ela interage com a κ -caseína na superfície da micela (Diaz *et al.*, 1996), e também por grandes polímeros, como κ -carragenana carregada negativamente (Spagnuolo *et al.*, 2005). Ela também precisa permitir que a β -caseína se dissocie reversivamente durante a estocagem sob refrigeração. Além disso, cálculos sugerem que não há κ -caseína suficiente para cobrir toda a superfície (Dalglish, 1998), significando, assim, que ela não é um tipo de estrutura de superfície que se assemelha a uma “bola de tênis

com pelos ou filamentos” (Holt e Dalgleish, 1986; de Kruif, 1998), mas que sua distribuição não é uniforme, deixando grandes intervalos ou poros na superfície, talvez localizados no final dos microtúbulos, como descrito por Dalgleish *et al.* (2004).

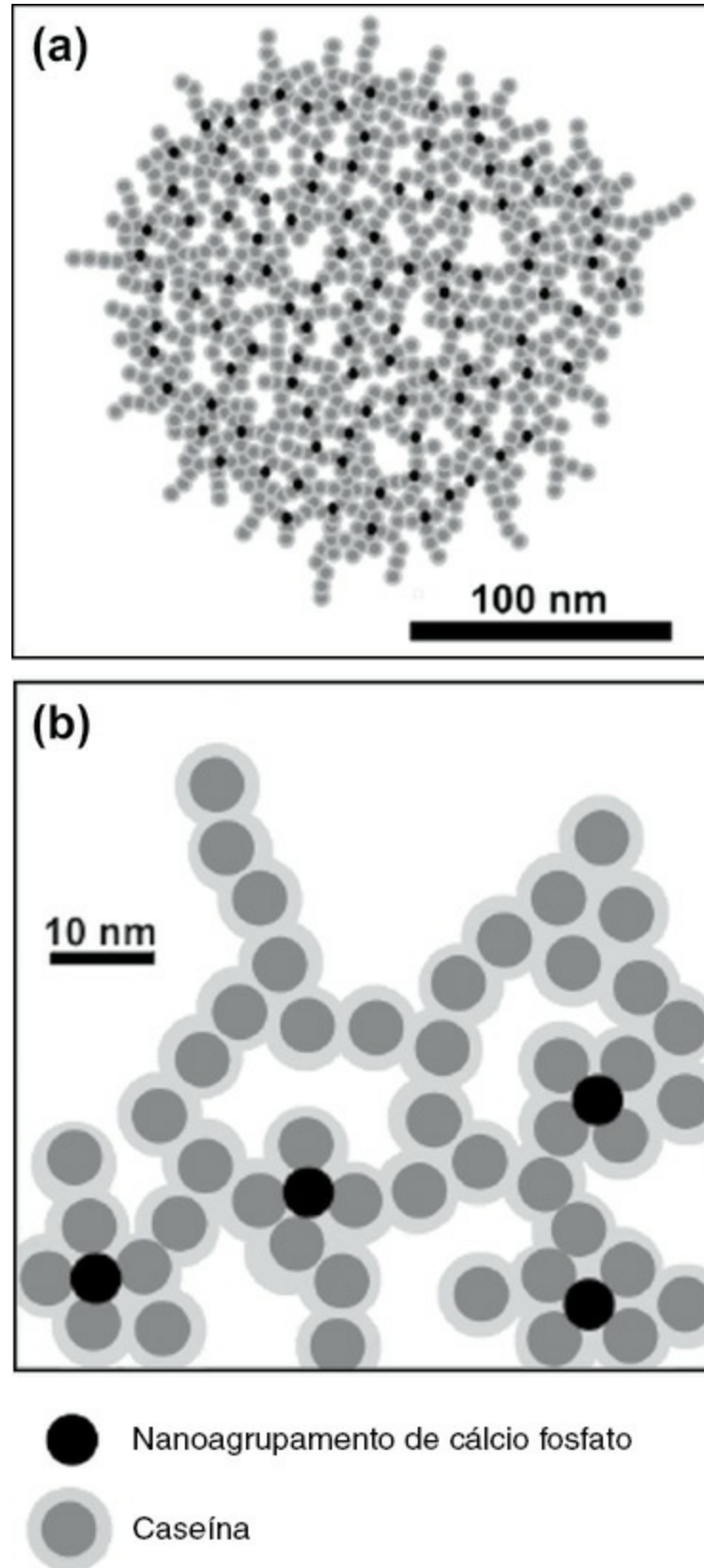
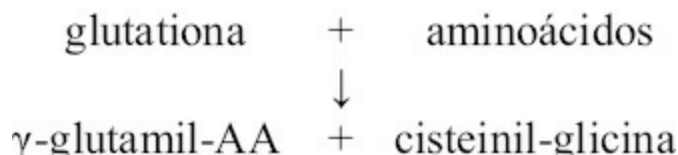


FIGURA 4.9 Diagrama esquemático de um modelo de grade intertravada da micela da caseína com agregados de cálcio fosfato ao longo da supramolécula inteira e extensores de cadeias de proteínas entre eles. Desenhado como vistas em escala de corte transversal (a) da supramolécula completa, e (b) de uma parte da periferia da supramolécula. Nanoagrupamentos de fosfato de cálcio são mostrados com diâmetro de 4,8 nm e cerca de 18 nm à parte; as caseínas se apresentam com um diâmetro hidrodinâmico de 8 nm. McMahon e Oommen (2008).

D. Biossíntese das proteínas do leite

A principal porção de proteínas do leite é sintetizada por células secretoras mamárias especializadas, que agem por controle genético. Elas produzem proteínas muito específicas, que são únicas para a lactação. As substâncias iniciais são aminoácidos livres absorvidos do fluxo sanguíneo por meio da membrana basal, por um processo que envolve transporte ativo (Christensen, 1975). A possível função do ciclo da γ -glutamil peptidase na absorção de grupos amino, nas células mamárias, foi sugerido por Baumrucker e Pocius (1978). A enzima envolvida – a glutamil transpeptidase (EC 2.3.2.2) – catalisa a transferência dos resíduos de γ -glutamil da glutatona e/ou outros componentes de γ -glutamil para aminoácidos ou peptídeos (Meister *et al.*, 1976). Acredita-se que esta enzima regule a glutatona celular e o transporte de aminoácidos por intermédio do ciclo γ -glutamil:



A enzima γ -glutamil transpeptidase é secretada no leite, onde se associa com as membranas do leite, incluindo o MFGM ou outra membrana obtida do leite desnatado. Esta última deriva das membranas do plasma, do aparato de Golgi, do retículo endoplasmático e dos vasos secretores (Kitchen, 1974). Pocius *et al.* (1981) notaram que o teor de glutatona era extremamente baixo no plasma de vacas da raça Holstein em lactação, se comparado com seu teor no sangue, no qual era 200 vezes mais alto. Pesquisas *in vitro* revelaram que quando as diferenças arteriovenosas de aminoácidos livres no plasma são quantificadas ocorre aparente falta de cisteína para a síntese proteica do leite. A absorção de glutatona pelas glândulas mamárias, no entanto, é mais do que suficiente para fornecer qualquer quantidade de cisteína secretada pelo leite. Pocius e Baumrucker (1980) estudaram, *in vitro*, o padrão de absorção de 9 aminoácidos essenciais em fatias de tecido mamário e as compararam ao padrão *in vivo* dos mesmos aminoácidos no úbere da vaca. Uma significativa correlação linear ($r = 0,91$) ficou evidenciada entre tais padrões de absorção, apesar das várias hipóteses existentes (Figura 4.10).

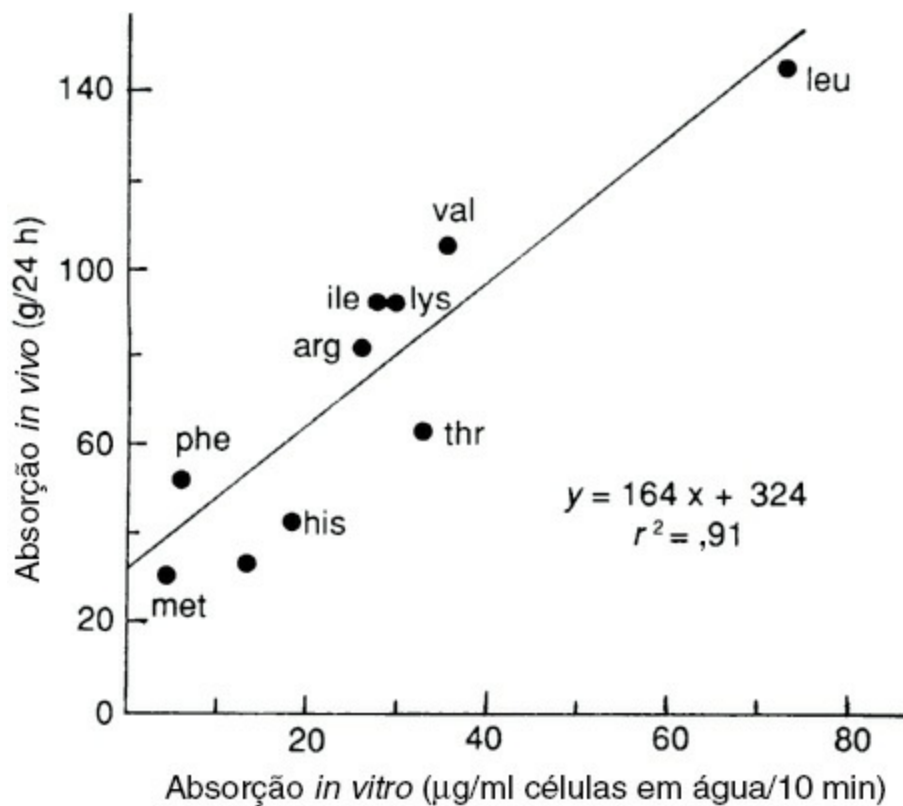


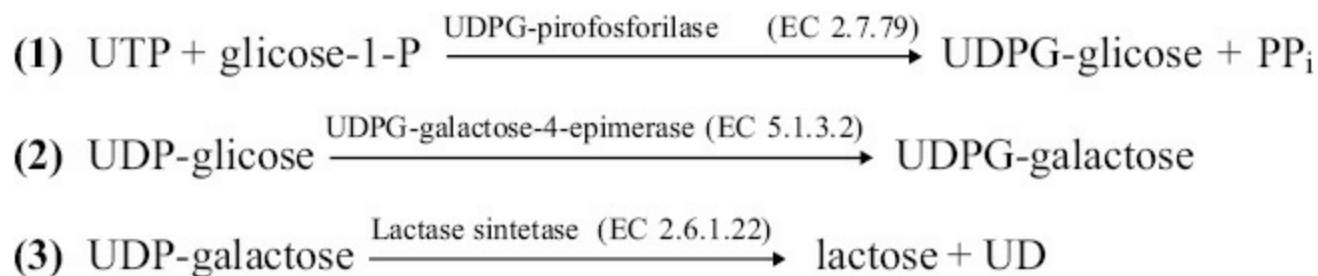
FIGURA 4.10 Relação entre absorção de aminoácidos medida *in vitro* (abscissa) e *in vivo* (ordenada) (Pocius e Baumrucker, 1980). Calculado a partir de dados de Clark *et al.* (1975).

A biossíntese das proteínas do leite é semelhante à de outros sistemas, nos quais a mensagem genética é transmitida pelo DNA ao RNA mensageiro e depois traduzida em nível ribossomal na sequência de aminoácidos dos polipeptídeos. Após a síntese, a proteína do leite exportada deixa os ribossomos na superfície externa do retículo endoplasmático rugoso, que é transportado para o aparato de Golgi, no qual ocorre a alteração de algumas proteínas de exportação e de outros principais componentes do leite.

E. Lactose

O principal carboidrato do leite é a lactose, um dissacarídeo de galactose e de glicose unidas por ligação β -(1 \rightarrow 4) glicosídica. Às vezes, ela é denominada de açúcar do leite e responde por 2% do leite normal de vacas. O nome completo da lactose é β -(1 \rightarrow 4)galactosilglicopiranosose.

A biossíntese da lactose é catalisada pela enzima lactose sintetase, na qual a glicose age como o aceptor do galactosil (Watkins e Hassid, 1962), enzima esta localizada na face luminal da membrana do dicitossoma de Golgi, no qual recebe glicose e UDP-galactose do citosol. As reações estão ilustradas na Figura 4.11, nas quais o ciclo do nucleotídeo da uridina parece se ligar funcionalmente às duas regiões (Kuhn *et al.*, 1980). A transferência de glicose, de UDP-galactose e de UMP por meio da membrana de Golgi é facilitada, provavelmente, por um carregador específico da membrana. A formação de UMP pela enzima nucleotídeo difosfatase permite a remoção do UDP liberado pela reação de sintetase de lactose, fato muito importante, pois a UDP inibe competitivamente a enzima lactose sintetase para formar a UDP galactose (Kuhn e White, 1975; 1976; 1977). Os passos mais importantes envolvidos na biossíntese da lactose são os seguintes:



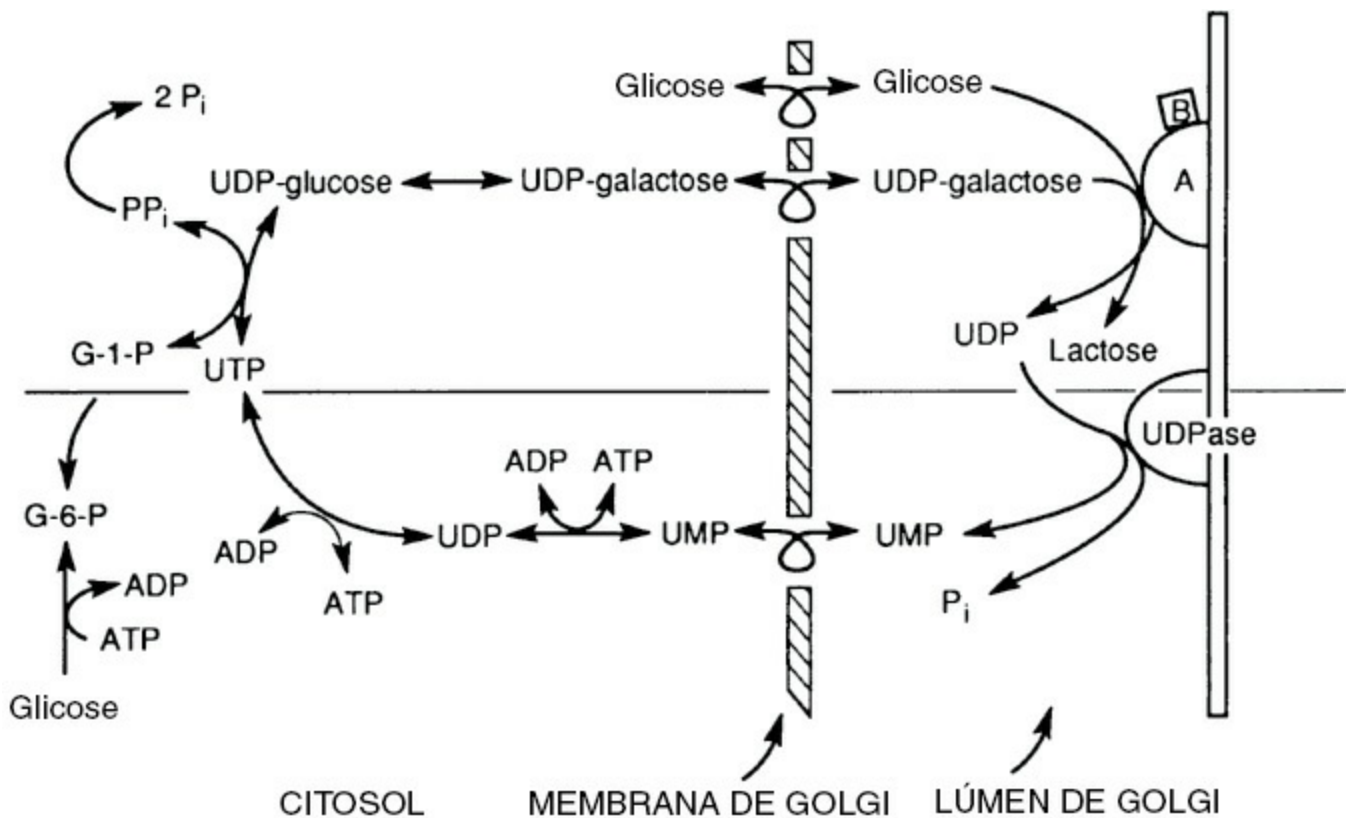


FIGURA 4.11 Ciclo do nucleotídeo de uridina suportando síntese de lactose e funcionalmente ligando o citosol e compartimentos de lúmen de Golgi de células secretoras mamárias. A = Galactosil transferase; B = α -lactalbumina. Kuhn *et al.* (1980).

Kuhn *et al.* (1980), em seus estudos com glândulas mamárias de ratos, resumiram os benefícios resultantes da compartimentalização do sistema da lactose sintetase. A energia liberada poderia ser utilizada para sintetizar a lactose sem criar problemas osmóticos para as outras células. A concentração de UDP-glicose no citosol não pode exceder a da UDP-galactose por um fator maior que três. A UDP-glicose deve ser impedida de entrar no lúmen do Golgi, pois inibiria a lactose sintetase. A separação da nucleosídeo difosfatase evita a hidrólise do difosfato no citosol e a consequente diminuição da energia do fosfato. O papel da α -lactalbumina (α -LA) na biossíntese da lactose foi descoberto por Brodbeck e Ebner (1966), que observaram que a lactose sintetase é composta de dois componentes: uma proteína "A" e uma proteína "R". A proteína "A" foi identificada por Brew *et al.* (1968) como sendo galactosiltransferase, enquanto a proteína "R" foi apontada por Brodbeck *et al.* (1967) como sendo α -LA. A interação entre os dois componentes da lactose sintetase (EC 2.4.1.22), α -LA e a galactosiltransferase é essencial para a catálise da biossíntese da lactose. Por estar envolvida na última etapa da biossíntese da lactose, o α -LA é fundamental para o controle da lactação e da seção do leite (Brew *et al.*, 1968; Lo *et al.*, 1998). O α -LA não possui função catalisadora, e age como uma proteína transportadora específica que facilita a ação da galactosil transferase, também conhecida como $\beta_{1,4}$ -galactosiltransferase (β_4 Gal-T-1, EC 2.4.1.38). Na ausência de α -LA, β Gal-T-1 transfere galactose da UDP-galactose para N-acetilglucosamina. Durante a síntese da lactose, glicose-manganês, UDP-galactose e galactosil transferase combinam-se com o α -LA para formar um dímero que aceita concentrações milimolares de glicose, formando lactose em condições fisiológicas. O α -LA parece ser o mais importante regulador durante a lactogênese ao alterar a especificidade do açúcar de β -Gal-T-1 como também a especificidade do doador do açúcar (Ramakrishnan *et al.*, 2001, 2002). Na presença de α -LA, β -Gal-T-1 transfere, portanto, galactose para glicose, sua atividade de síntese da lactose. Outros possíveis reguladores identificados foram a D-glicose, UDP-galactose, íons de cálcio e geração de proteínas no interior do lúmen de Golgi, assim como as propriedades da membrana de Golgi em limitar a taxa de biossíntese de lactose.

REFERÊNCIAS

- Agradi, E., Libertini, L., Smith, S., 1976. Specific modification of fatty acid synthetase from lactating rat mammary gland by chymotrypsin and trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 894-900.
- Ali, A.E., Andrews, A.T., Cheeseman, G.C., 1980. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheesemaking parameters. *J. Dairy Res.* 47, 371-382.
- Andrews, A.L., 1979. The formation and structure of some proteose-peptone components. *J. Dairy Res.* 46, 215-218.
- Andrews, A.L., Atkinson, D., Evans, M.T.A., Finer, E.G., Green, J.P., Phillips, M.C., Roberston, R.N., 1979. The conformation and aggregation of bovine β -casein A. I. Molecular aspects of thermal aggregation. *Biopolymers* 18, 1105-1121.
- Annan, W.D., Manson, W., 1969. A fractionation of the α -casein complex of bovine milk. *J. Dairy Res.* 36, 259-268.
- Annisson, E.F., Linzell, J.L., Fazakerley, S., Nichols, B.W., 1967. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism, and the role of plasma phospholipids and neutral lipids in milk-fat synthesis. *Biochem. J.* 102, 637-647.
- Aschaffenburg, R., 1961. Inherited casein variants in cow's milk. *Nature (Lond.)* 176, 218.
- Aschaffenburg, R., 1968. Reviews of the progress of dairy science. Section G. Genetics, genetic variants of milk proteins, their breed distribution. *J. Dairy Res.* 35, 447-460.
- Aschaffenburg, R., Drewry, J., 1955. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature (Lond.)* 176, 218-219.
- Aschaffenburg, R., Sen, A., Thompson, M.P., 1968. Genetic variants of casein in Indian and African zebu cattle. *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 177-184.
- Bauman, D.E., Cori, B.A., Peterson, G.P., 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. In: Sebedio, J.-L., Christie, W.W., Adolf, R. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2. AOCS Press, Champaign, IL, p. 267-282.
- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J., Lock, A.L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89, 1235-1243.
- Baumrucker, C.R., Pocius, P.A., 1978. γ -Glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat. *J. Dairy Sci.* 61, 309-314.
- Bell, K., Hopper, K.E., McKenzie, H.A., 1981. Bovine α -lactalbumin C and α -, β - and κ -caseins of Bali (Banteng) cattle. *Bos (Bibos) javanicus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 34, 149-159.
- Bewley, M.C., Quin, B.Y., Jaeson, G.B., Sawyer, L., Baker, E.N., 1997. β -Lactoglobulin and its variants. A three dimensional structural perspective. *Milk Protein Polymorphism*. International Dairy Federation, Special Issue 9702, International Dairy Federation, Brussels, p. 100-109.
- Bickerstaffe, R., 1971. Uptake and metabolism of fat. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Lactation*, Butterworth, London, p. 317-332.
- Brew, K., Vanaman, T.C., Hill, R.L., 1968. The role of α -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of biological reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 491-497.
- Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C., Hill, R.L., 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4570-4582.
- Brignon, G., Ribadeau Dumas, B., Mercier, J.-C., Pelissier, J.-P., Das, B.C., 1977. The complete amino acid sequence of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Lett.* 76, 105-158.
- Brittan, H., Mudford, J.C., Norris, G.E., Kitson, T.M., Hill, J.P., 1997. Labelling the free sulphhydryl group in β -lactoglobulin A, B and C. *International Dairy Federation, Special Issue 9702*, International Dairy Federation, Brussels, p. 200-203.
- Brodbeck, U., Ebner, K.E., 1966. Resolution of a soluble lactose synthetase into two protein components and solubilization of microsomal lactose synthetase. *J. Biol. Chem.* 241, 762-764.
- Brodbeck, U., Denton, W.L., Tanahashi, N., Ebner, K.E., 1967. The isolation and identification of lactose synthetase as α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 242, 1391-1397.
- Brownlow, S., Morais-Cabral, J.H., Cooper, R., Floer, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T., Sawyer, L., 1997. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution – still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5, 481-495.
- Brumby, P.E., Welch, V.A., 1970. Fractionation of bovine serum lipoproteins and their characterization by gradient gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 37, 121-128.
- Carter, D.C., Ho, J.X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153-203.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A., 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and β -lactalbumin – technological implications for processing. *Int. Dairy J.* 16, 1229-1240.
- Chin, S.F., Storkson, J.M., Albright, K.J., Cook, M.E., Pariza, M.W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5, 185-197.
- Christensen, H.N., 1975. *Biological Transport*. Benjamin, London.
- Clark, J.H., Derrig, R.G., Davis, C.L., Spiers, H.R., 1975. Metabolism of arginine and ornithine in the cow and rabbit mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 58, 1808-1813.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhanen, E.-L., 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16, 1347-1361.
- Coulson, E.J., Stevens, H., 1950. The serological relationship of bovine whey albumin to serum albumin. *J. Biol. Chem.* 187, 355-363.
- Creamer, L.K., Berry, G.P., Mills, O.E., 1977. A study of the dissociation of β -casein of the bovine casein micelle at low temperature. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 12, 58-66.
- Dalgleish, D.G., 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J. Dairy Sci.* 81, 3013-3018.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P., Goff, H.D., 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* 14, 1025-1031.
- Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Deoanne, C., 2000. Progress in milk fat globule membrane research: a review. *Lait* 80, 209-222.
- Davies, D.T., Law, A.J.R., 1980. The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *J. Dairy Res.* 47, 83-90.
- Deeth, H.C., 1997. The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Aust. J. Dairy Technol.* 52, 44-46.
- Delbecchi, L., Ahnadi, C.E., Kenedy, J.J., Lacasse, P., 2001. Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. *J. Dairy Sci.* 84, 1375-1381.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Trung Le, T., Messens, K., Van Camp, J., 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18, 436-457.
- Diaz, O., Gouldsworthy, A.M., Leaver, J., 1996. Identification of peptides from casein micelles by limited trypsinolysis. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2517-2522.
- Dileepan, K.N., Lin, C.Y., Smith, S., 1978. Release of two thioesterase domains from fatty acid synthetase by limited digestion with trypsin. *Biochem. J.* 175, 199-206.
- Dong, C., Ng-Kwai-Hang, K.F., 1998. Characterization of a nonelectrophoretic variant of β -casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis. *Int. Dairy J.* 8, 967-972.
- Donnelly, W.J., MacNeill, G.P., Buchheim, W., McGann, T.C.A., 1984. Comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 789, 136-143.
- Eigel, W.N., 1977. Formation of γ 1-A2, γ 2- γ 2 and γ 3-A caseins by *in vitro* proteolysis of β -casein A2 with bovine plasmin. *Int. J. Biochem.* 8, 187-192.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell Jr., H.M., Halwalkar, V.R., Jennes, R., Whitney, R., McL, 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631.
- Erhardt, G., 1993. A new α_{s1} -casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Genet.* 24, 65-66.
- Evers, J.M., 2004. The milk fat globule membrane – compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *J. Food Sci.* 14, 661-674.

- Evers, J.M., Haverkamp, R.G., Holroyd, S.E., Jameson, G.B., Mackenzie, D.D.S., McCarthy, O.J., 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *Int. Dairy J.* 18, 1081-1089.
- Farrell Jr., H.M., Pessen, H., Brown, E.M., Kumosinski, T.F., 1990. Structural insights into the bovine casein micelle: small angle X-ray scattering studies and correlations with spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 73, 3592-3601.
- Farrell Jr., H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E., 2004. Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87, 1641-1674.
- Farrell, H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., Qi, P.X., 2006. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 135-147.
- Fox, P.F., 1981. Proteinases in dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 233-253.
- Fox, P.F., Guiney, J., 1973. Casein micelle structure: susceptibility of various casein systems to proteolysis. *J. Dairy Res.* 40, 229-234.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), New York.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2003. *Advanced Dairy Chemistry – 1. Proteins*, (3rd ed.). Kluwer Academic, New York.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), 2006. *Advanced Dairy Chemistry – 2. Lipids*, (3rd ed.). Kluwer Academic, New York.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), 2009. *Advanced Dairy Chemistry – 3. Lactose, Water and Minor Constituents*, (3rd ed.). Springer, New York.
- Fox, P.F., Mulvihill, D.M., 1982. Milk proteins, molecular, colloidal and functional properties. *J. Dairy Res.* 49, 679-693.
- Garnier, J., Ribadeau-Dumas, B., 1970. Structure of the casein micelle. A proposed model. *J. Dairy Res.* 37, 493-505.
- Garton, G.A., 1964. In: Dawson, R.M.C., Rhodes, D.N. (Eds.), *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, Wiley, New York, p. 335.
- Glantz, M., Lindmark Mansson, H., Stalhammar, H., Barstrom, L.-O., Frojelin, M., Knutsson, A., Teluk, C., Paulsson, M., 2009. Effects of animal selection on milk composition and processability. *J. Dairy Sci.* 92, 4589-4603.
- Goff, H.D., Griffiths, M.W., 2006. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk and frozen desserts. *J. Dairy Sci.* 89, 1163-1173.
- Goldberg, I.J., Eckel, R.H., Abumrad, N.A., 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J. Lipid Res.* 50, S86-S90.
- Gordon, W.G., Groves, M.L., Greenberg, R., Jones, S.B., Kalan, E.B., Peterson, R.F., Townsend, R.E., 1972. Probable identification of γ , TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.* 55, 261-263.
- Griinari, J.M., Chouinard, P.Y., Bauman, D.E., 1997. *Trans* fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY, p. 208-216.
- Griinari, J.M., Cori, B.A., Lucy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., Bauman, D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* 130, 2285-2291.
- Groenen, M.A.M., Dijkhof, R.E.M., Verstege, A.J.M., van der Poel, J.J., 1993. The complete sequence of the gene coding bovine α_{s2} -casein. *Gene* 123, 5106-5114.
- Grosclaude, F., Joudrier, P., Mahé, M.-F., 1966. Polymorphisme de la caséine α -bovine; étroite liaison du locus α -Cn avec les loci délétion dans le variant α -CnD. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 10, 313-327.
- Grosclaude, F., Mahé, M.-F., Ribadeau-Dumas, B., 1973. Structure primaire de la caséine et de la caséine β -bovine correctif. *Eur. J. Biochem.* 40, 323-324.
- Groves, M.L., Gordon, W.G., Kalan, E.B., Jones, S.B., 1973. TS-A2, TS-B, R- and S-caseins: their isolation, composition and relationship to the β - and α -casein polymorphs A2 and B. *J. Dairy Sci.* 56, 558-568.
- Guigoz, Y., Solms, J., 1976. Bitter peptides, occurrence and structure. *Chem. Senses Flavour.* 2, 71-84.
- Han, S.K., Shin, Y.C., Byun, H.D., 2000. Biochemical, molecular and physiological characterization of a new β -casein variant detected in Korean cattle. *Anim. Genet.* 31, 49-51.
- Harfoot, C.G., Hazelwood, G.P., 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.M. (Ed.), *The Rumen Microbial Ecosystem*, (2nd ed.). Elsevier, New York, p. 382-426.
- Harrison, R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 774-797.
- Heck, J.M.L., van Valenberg, H.J.F., Dijkstra, J., van Hooijdonk, A.C.M., 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *J. Dairy Sci.* 92, 4745-4755.
- Heertje, I., Visser, J., Smits, P., 1985. Structure formation in acid milk gels. *J. Ultrastruct. Res.* 25, 193-213.
- Hele, P., 1954. The acetate activating enzyme of beef heart. *J. Biol. Chem.* 206, 671-676.
- von Hippel, P.H., Waugh, D.F., 1955. Casein, monomers and polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4311.
- Hill, J.P., Boland, J., Creamer, L.K., Anema, S.G., Otter, D.E., Paterson, G.R., 1996. Effect of bovine β -lactoglobulin phenotype on the properties of β -lactoglobulin, milk composition, and dairy products. In: Parris, N., Kato, A., Creamer, L.K., Pearce, R.J. (Eds.), *Macromolecular Interactions in Food Technology*, ACS Symposium Series 650, American Chemical Society, Washington, DC, p. 281-294.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K., 1990. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 639-646.
- Hoagland, P.D., Thompson, M.P., Kalan, E.B., 1971. Amino acid composition of α_{s3} -, α_{s4} -, and α_{sr} -caseins. *J. Dairy Sci.* 54, 1103.
- Holt, C., Dagleish, D.G., 1986. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *J. Colloid Interface Sci.* 114, 513-524.
- Holt, C., Horne, D.S., 1996. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* 50, 85-111.
- Holt, C., Timmins, P.A., Errington, N., Leaver, J., 1998. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by β -casein phosphopeptides derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Eur. J. Biochem.* 252, 73-78.
- Holt, C., de Kruif, C.G., Tunier, R., Timmons, P.A., 2003. Substructure of bovine casein micelles by small angle X-ray and neutron scattering. *Colloids Surfaces A* 213, 275-284.
- Horne, D.S., 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure of dairy products. *Int. Dairy J.* 8, 171-177.
- Horne, D.S., 2002. Casein structure, self assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 456-461.
- Horne, D.S., 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 148-153.
- Jenness, R., 1974. The composition of milk. In: Larson, B.I., Smith, V.R. (Eds.), *Lactation*, Vol. III. Academic Press, New York, p. 3-107.
- Jenness, R., Larson, B.L., McMeeekin, T.L., Swanson, C.H., Whitnah, C.H., Whitney, R., 1956. Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 39, 536-541.
- Jollès, J., Fiat, A.-M., 1979. The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *J. Dairy Res.* 46, 187-191.
- Jollès, J., Schoentgen, F., Alais, C., Jollès, P., 1972. Studies on the primary structure of cow κ -casein: the primary structure of cow para- κ -casein. *Chimia* 20, 148.
- Kanno, C., 1990. Secretory membranes of the lactating mammary gland. *Protoplasma* 159, 184-208.
- Karlsson, A.O., Ipsen, R., Ardo, Y., 2007. Observations of casein micelles to skim milk concentrate by transmission electron microscopy. *Food Sci. Technol.* 40, 1102-1107.
- Kepler, C.R., Tove, S.B., 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate $\Delta 12$ -*cis*, $\Delta 11$ -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242, 5686-5692.

- Kinsella, J.E., 1975. Coincident synthesis of fatty acids and secretory triglycerides in bovine mammary tissue. *Int. J. Biochem.* 6, 65-67.
- Kitchen, B.J., 1974. A comparison of the properties of membranes isolated from bovine skim and cream. *Biochim. Biophys. Acta.* 356, 257-269.
- Koczan, D., Hobom, G., Seyfert, H.-M., 1991. Genomic organization of the bovine α_{s1} -casein gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 1590-1594.
- Kraft, J., Collomb, M., Mockel, P., Sieber, R., Jahreis, G., 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 38, 657-664.
- Kruger, M.C., Plimmer, G.G., Schollum, L.M., Haggarty, N., Ram, S., Palmano, K., 2005. The effect of whey acidic protein fractions on bone loss in the ovariectomised rat. *Br. J. Nutr.* 93, 244-252.
- de Kruif, C.G., 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* 81, 3019-3028.
- de Kruif, C.G., Holt, C., 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry 1. Proteins*, Part A, Kluwer Academic/Plenum, New York, p. 233-270.
- Kuhn, N.J., White, A., 1975. Milk glucose as an index of the intracellular glucose concentration of rat mammary gland. *Biochem. J.* 152, 153-155.
- Kuhn, N.J., White, A., 1976. Evidence for specific transport of uridine diphosphate galactose across the Golgi membrane of rat mammary gland. *Biochem. J.* 154, 243.
- Kuhn, N.J., White, A., 1977. The role of nucleoside diphosphatase galactose across the Golgi membrane of rat mammary gland. *Biochem. J.* 168, 423-433.
- Kuhn, N.J., Carrick, D.T., Wilde, C.J., 1980. Lactose synthesis: the possibilities of regulation. *J. Dairy Sci.* 63, 328-336.
- Kumar, S., Dorsey, J.A., Muesing, R.A., Porter, J.W., 1970. Comparative studies of the pigeon liver fatty acid synthetase complex and its subunits. *J. Biol. Chem.* 245, 4732-4744.
- Lindstrom-Lang, K., Kodoma, S., 1925. Studies over kasein. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 16, 1.
- Lo, N.W., Shaper, J.H., Pevsner, J., Shaper, N.L., 1998. The expanding of β -4 galactosyltransferase gene family. *Glycobiology* 8, 517-526.
- Loor, J.J., Herbein, J.H., Polan, C.E., 2002. *Trans*18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J. Dairy Sci.* 85, 1197-1207.
- McGann, T.C.A., Donnelly, W.J., Kearney, R.D., Buchheim, W., 1980. Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 630, 261-270.
- McMahon, D.J., Brown, R.J., 1984. Composition, structure and integrity of casein micelles: a review. *J. Dairy Sci.* 67, 499-512.
- McMahon, D.J., McManus, W.R., 1998. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *J. Dairy Sci.* 81, 2985-2993.
- McMahon, D.J., Oommen, B.S., 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 91, 1709-1721.
- McPherson, A.V., Kitchen, B.J., 1983. Reviews of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane – its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *J. Dairy Res.* 50, 107-133.
- Mahe, M.F., Grosclaude, F., 1982. Polymorphisme de la caseine α_{s2} -des bovines. Characterization du variant C du yak (*Bos grunniens*). *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14, 401-416.
- Mahe, M.F., Miranda, G., Queral, R., Bado, A., Souvenir-Zafidrajaona, P., Grosclaude, F., 1999. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations characterization of variants α_{s1} -CN H and κ -CN. *J. Genet. Sel. Evol.* 31, 239-253.
- Mansson, H.L., 2008. Fatty acids in bovine milk. *Food Nutr. Res.* 52, 1821-1828.
- Marchin, S., Putaux, J.-L., Pignon, F., Leonil, J., 2007. Effects of the environmental factors in the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *J. Chem. Phys.* 126 art no. 045101.
- Mariani, P., Summer, A., Anghinetti, A., Senese, C., Di Gregorio, P., Rando, P., Serventi, P., 1995. Effects of the c-CN G allele on the percentage distribution of caseins c1-, α_{s2} -, β - and κ - in Italian brown cows. *Ind. Latte* 31, 3-13.
- Mather, I.H., 2000. A review of proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203-247.
- Mather, I.H., Keenan, T.W., 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 3, 259-273.
- Mazur, A., Rayssiguier, Y., 1988. Lipoprotein profile of the lactating cow. *Ann. Rech. Vet.* 19, 53-58.
- Meister, A., Tate, S.S., Rose, L.L., 1976. Membrane bound γ -glutamyl transpeptidase. In: Martonsi, A. (Ed.), *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. III. Plenum Press, New York, p. 315.
- Mellenberger, R.W., Bauman, D.E., Nelson, D.R., 1973. Metabolic adaptations during lactogenesis; fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. *Biochem. J.* 136, 741-748.
- Mercier, J.-C., Grosclaude, F., Ribadeau-Dumas, B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} -bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.* 23, 41-51.
- Mercier, J.-C., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., 1973. Structure primaire de la caséine κ B bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.* 35, 222-235.
- Michaelidou, A., Steijns, J., 2006. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. *Int. Dairy J.* 16, 1421-1426.
- Moore, J.H., Christie, W.W., 1979. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. *Prog. Lipid Res.* 17, 347-395.
- Moore, J.H., Steele, W., Noble, R.C., 1969. The relationship between dietary fatty acids, plasma lipid composition and milk fat secretion in the cow. *J. Dairy Res.* 36, 383-392.
- Morley, N.H., Kuksis, A., 1972. Positional specificity of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 247, 6389-6393.
- Morley, N.H., Kuksis, A., Buchna, D., Myher, J., 1975. Hydrolysis of diacylglycerols by lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 250, 3414-3418.
- Mosley, E.E., Shafii Dagger, N., Moate, P.J., McGuire, M.A., 2006. *Cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 136, 570-575.
- Nagao, M., Maki, R., Sasaki, R., Chuba, H., 1984. Isolation and characterization of bovine α_{s1} -casein cDNA clone. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1663-1667.
- Neeling, J.M., 1964. Variants of κ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 47, 506-509.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Grosclaude, F., 2003. Genetic polymorphism of milk proteins. Part B In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), 3rd ed., *Advances in Dairy Chemistry*, Vol. 1. Kluwer Academic/Plenum, New York, p. 739-816.
- Norman, H.D., Kuck, A.L., Cassell, B.G., Dickinson, F.N., 1978. Effect of age and month-of-calving on solids-not-fat and protein yield for five dairy breeds. *J. Dairy Sci.* 61, 239-245.
- Paltauf, F., Wagner, E., 1976. Stereospecificity of lipases. Enzymatic hydrolysis of enantiomeric alkyldiacyl and dialkylacylglycerols by lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 431, 359-362.
- Paltauf, F., Esfandi, F., Holasek, A., 1974. Stereospecificity of lipases. Enzymic hydrolysis of enantiometric alkyl diacylglycerols by lipoprotein lipase, lingual lipase and pancreatic lipase. *FEBS Lett.* 40, 119-123.
- Parodi, P.W., 1977. Conjugated octadecadienoic acids in milk fat. *J. Dairy Sci.* 60, 1550-1553.
- Patton, S., Jensen, R.G., 1975. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 14, 167-277.
- Payens, T.A.J., 1966. Association of caseins and their possible relation to the structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 49, 1317-1324.
- Payens, T.A.J., 1979. Casein micelles, the colloid-chemical approach. *J. Dairy Res.* 46, 291-306.
- Phillips, G.T., Nixon, J.E., Dorsey, J.A., Butterworth, P.H.W., Chesteron, C.J., Porter, J.W., 1970. The mechanism of synthesis of fatty acids by the pigeon liver enzyme system. *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 380-391.
- Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M., Erdman, R.A., 2002. Duodenal and milk *trans* octadecenoic

- acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9 containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 132, 1235-1241.
- Pocius, P.A., Baumrucker, C.R., 1980. Amino acid uptake by bovine mammary slices. *J. Dairy Sci.* 63, 746-749.
- Pocius, P.A., Clark, J.H., Baumrucker, C.R., 1981. Glutathione in bovine blood: possible source of amino acids for milk protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 64, 1551-1554.
- Polis, B.D., Shmukler, H.W., Custer, J.H., 1950. Isolation of a crystalline albumin from milk. *J. Biol. Chem.* 187, 349-354.
- Precht, D., Molkentin, J., 1995. *Trans* fatty acids: implications for health, analytical methods, incidence in edible fats and intake (a review). *Nahrung* 39, 343-374.
- Quin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N., Jameson, G.B., 1998. Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 37, 14014-14023.
- Quin, B.Y., Ceamer, L.K., Baker, E.N., Jameson, G.B., 1998. 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* 438, 272-278.
- Quin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, E.N., Jameson, G.B., 1999. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci.* 8, 74-83.
- Ramakrishnan, B., Sha, P.S., Qasa, P.K., 2001. α -Lactalbumin (LA) stimulates milk β -1,4-galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) to transfer glucose from UDP-glucose to *N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 276, 37665-37671.
- Ramakrishnan, B., Boeggeman, B., Qasba, P.K., 2002. β -1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1113-1118.
- Rasmussen, J.T., Berglund, L., Pallesen, L.T., Petersen, T.E., 2002. Proteins from the milk fat globule membrane. Poster at the 26th IDF World Dairy Congress 24-27 September, Paris, France.
- Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., 2008. Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrums to milk. *J. Dairy Sci.* 91, 2307-2318.
- Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F., Mercier, J.-C., 1972. Structure primaire de la caseine β bovine. *Eur. J. Biochem.* 25, 505-514.
- Rose, D.J., Brunner, J.R., Kalan, E.B., Larson, B.L., Melchnychyn, P., Swaisgood, H.E., Waugh, D.F., 1970. Nomenclature of the proteins of cow's milk, third revision. *J. Dairy Sci.* 53, 1-17.
- Sanchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zencada, L., Hueso, P., 2009. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule. *Int. Dairy J.* 19, 173-278.
- Saito, T., Itoh, T., 1992. Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.* 75, 1768-1775.
- Schmidt, D.G., 1964. Starch gel electrophoresis of κ casein. *Biochim. Biophys. Acta.* 90, 411-414.
- Schmidt, D.G., 1979. Properties of artificial casein micelles. *J. Dairy Res.* 46, 351-355.
- Schmidt, D.G., 1980. Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34, 42-64.
- Schmidt, D.G., Payens, T.A.J., 1976. Micellar aspects of casein. *Surf. Colloid Sci.* 9, 165-229.
- Schmidt, D.G., Buchheim, W., 1970. An electron microscopical investigation of the sub-structure of the casein micelles in cow's milk. *Milchwissenschaft* 35, 596-600.
- Schmidt, D.G., Buchheim, W., 1976. Particle size distribution in casein solutions. *Neth. Milk Dairy J.* 30, 17-28.
- Scow, R.O., Blanchette-Mackie, E.J., Smith, L.C., 1976. Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons: a model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes. *Circ. Res.* 39, 149-162.
- Sehat, N., Rickert, R., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Morehouse, K.M., Ku, Y., 1998. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33, 963-971.
- Schanbacher, F.L., Goodman, R.E., Talhouk, R.S., 1993. Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy Sci.* 76, 3812-3831.
- Singh, H., 2006. The milk fat globule membrane – a biophysical system for food applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 154-163.
- Slattery, C.W., 1976. Review: Casein micelle structure: an examination of models. *J. Dairy Sci.* 59, 1547-1556.
- Smith, S., 1976. Structural and functional relationships of fatty acid synthetases from various tissues and species. In: Salton, M.R.J. (Ed.), *Immunochemistry of Enzymes and their Antibodies*, Chapter 5 Wiley, New York.
- Smith, S., 1980. Mechanism of chain length determination in biosynthesis of milk fatty acids. *J. Dairy Sci.* 63, 337-352.
- Smith, S., Agradi, E., Libertini, L., Dileepan, K.N., 1976. Specific release of the thioesterase component of the fatty acid synthetase complex by limited trypsinization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1184-1188.
- Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins – from 'gutter to gold'. *Int. Dairy J.* 18, 695-704.
- Sommerfeldt, J.L., Baer, R.J., 1986. Variability of milk components in 1705 herds. *J. Food Prot.* 49, 729-733.
- Spagnuolo, P., Dagleish, D.G., Goff, H.D., Morris, E.R., 2005. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids* 19, 371-377.
- Spitsberg, V.L., 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88, 2289-2294.
- Spitsberg, V.L., Gorewitt, R.C., 1998. Solubilization and purification of xanthine oxidase from bovine milk fat globule membrane. *Protein Expr. Purif.* 13, 229-234.
- Stead, D., Welch, V.A., 1975. Lipid composition of bovine serum lipoproteins. *J. Dairy Sci.* 58, 122-127.
- Stewart, A.F., Wills, I.M., Mackinlay, A.G., 1984. Nucleotide sequence of bovine α_{s1} - and κ -casein cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 12, 3895-3907.
- Stewart, A.F., Bonsing, J., Beattie, C.W., Shah, F., Willis, I.M., Mackinlay, A.G., 1987. Complete nucleotide sequences of bovine α_{s2} - and β -casein cDNAs: comparisons with related sequences of other species. *Mol. Biol. Evol.* 4, 231-241.
- Stoop, M., Bovenhuis, H., van Arendonk, J., 2006. Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *J. Dairy Sci.* 90, 1981-1989.
- Stoop, M., van Arendonk, J., Hock, J.M.I., van Valenberg, H.J.F., Bovenhuis, H., 2008. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.* 91, 385-394.
- Swaisgood, H.E., 1982. Chemistry of milk protein. In: Fox, P.F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry. I. Proteins*, Chapter 1 Applied Science Publishers, London, p. 1.
- Swaisgood, H.E., 1995. Nitrogenous components of milk. F. Protein and amino acid composition of bovine milk. In: Jensen, R.G. (Ed.), *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, New York, p. 464-468.
- Thompson, M.P., Kiddy, C.A., Pepper, L., Zittle, C.S., A., 1962. Casein variants in the milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* 45, 650.
- Trieu-Cuot, P., Gripon, J.-C., 1981. Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.* 48, 303-310.
- US Department of Health and Human Services, 2011. Grade A Pasteurized Milk Ordinance. Food and Drug Administration, College Park, MD.
- Van der Strate, B.W.A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M.C., Meijer, S.K.F., 2001. Antiviral activities of lactoferrin (Review). *Antiviral Res.* 52, 225-239.
- Vanaman, T.C., Brew, K., Hill, R.L., 1970. The disulfide bonds of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4583-4590.

- Vanderghem, C., Blecker, C., Danthine, S., Deroanne, C., Haubruge, E., Guillonnet, F., De Pauw, E., Francis, F., 2008. Proteome analysis of the bovine milk fat globule: enhancement of membrane purification. *Int. Dairy J.* 18, 885-893.
- Visser, S., Stangen, C.J., Van Dongen, D.F., Haverkamp, J., 1995. Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J. Chromat. A* 711, 141-150.
- Walstra, P., 1974. High melting triglycerides in fat globule membrane-artifact. *Neth. Milk Dairy J.* 28, 3-9.
- Walstra, P., 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46, 317-323.
- Walstra, P., 1985. Some comments on the isolation of fat globule membrane material. *J. Dairy Res.* 52, 309-312.
- Walstra, P., 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73, 1965-1979.
- Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles: do they exist?. *Int. Dairy J.* 9, 189-192.
- Walstra, P., Bloomfield, V.A., Wei, G.J., Jenness, R., 1981. Effect of chymosin action on the hydrodynamic character of casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 669, 258-259.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Guerts, T.J., 2006. *Dairy Science and Technology*, (2nd ed.). CRC Taylor & Francis, New York.
- Ward, Q.J., Uribe-Luna, S., Conneeley, O.M., 2002. Lactoferrin and host defense. *Biochem. Cell Biol.* 80, 95-102.
- Watkins, W.M., Hassid, W.Z., 1962. The synthesis of lactose by particulate enzyme preparation from guinea pig and bovine mammary glands. *J. Biol. Chem.* 237, 1432-1440.
- Waugh, D.F., von Hippel, P.H., 1956. κ -Casein and the stabilization of casein micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4576-4582.
- Waugh, D.F., Noble Jr., R.W., Casein micelles. Formation and structure. II, 1965. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2246-2257.
- Waugh, D.F., Creamer, L.K., Slattery, C.W., Dresdner, G.W., 1970. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry* 9, 786-795.
- West, C.E., Bickerstaffe, R., Annison, E.F., Linzell, J.L., 1972. Studies on the mode of uptake of blood triglycerides by the mammary gland of the lactating goat. *Biochem. J.* 126, 477-490.
- Whitney, R., McL., Brunner, J.R., Ebner, K.E., Farrell Jr., M., Josephson, R.V., Morr, C.V., Swaisgood, H., 1976. Nomenclature of the proteins of cow's milk, fourth revision. *J. Dairy Sci.* 59, 795-815.
- Wilcox, C.J., Gaunt, S.N., Farthing, B.R., 1971. Genetic interrelationship of milk composition and yield. *South. Coop. Ser. Bull.* 155 University of Florida, Gainesville, FL.
- Wooding, F.B.P., Kemp, P., 1975. High melting triglycerides and the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 42, 419-426.
- Woychik, J.H., 1964. Polymorphism in κ -casein of cow's milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 267.
- Zinder, O., Hamosh, M., Clary Fleck, T.R., Scow, R.O., 1974. Effect of prolactin of lipoprotein lipase in mammary gland and adipose tissue of rats. *Am. J. Physiol.* 226, 744-748.

Componentes dos ovos nos sistemas alimentares

Yoshinori Mine, Hua Zhang¹

I. INTRODUÇÃO

Há muito tempo, os ovos das aves são reconhecidos como importante ingrediente de alimentação e fonte nutricional para humanos. Com o progresso tecnológico do século XX, as propriedades funcionais e a composição química dos ovos de aves foram estudadas intensamente e a maioria das pesquisas tem por foco os ovos produzidos por galinhas domésticas. Uma ampla compreensão da composição química do ovo é vital para a ciência dos alimentos e para a biotecnologia, e muitos artigos foram escritos descrevendo em detalhes sua composição (Li-Chan e Nakai, 1989; Huopalahti *et al.*, 2007; Li-Chan e Kim, 2008). A funcionalidade dos ovos também tem sido objeto de pesquisas inovadoras com base em suas moléculas, as quais foram descritas em inúmeros artigos científicos de revisão (Li-Chan e Nakai, 1989; Mine, 1995; 2002; Campbell *et al.*, 2003; Lomakina e Mikova, 2006). A compreensão das características químicas e funcionais que estão por trás de tais propriedades é importante para a utilização dos ovos de galinha na indústria de alimentos, para o desenvolvimento de novos produtos e para a melhoria da qualidade dos já existentes. A indústria de alimentos também procura prolongar a vida útil dos ovos, proteger o valor nutricional durante estocagem e incorporar derivados de ovos em outros produtos que possam ser comercializados, como sorvetes e bolos, por intermédio de processamento (Burley e Vadehra, 1989c). As mudanças químicas dos componentes dos ovos, porém, assim como suas propriedades funcionais, são consequências do processamento de alimentos. Algumas alterações são desejáveis enquanto outras devem ser evitadas. É recomendável, portanto, aprimorar a qualidade dos produtos derivados de ovos evitando, assim, mudanças químicas oriundas do processamento de alimentos.

O objetivo deste capítulo é o de fornecer informações detalhadas sobre a composição e a funcionalidade dos

ovos para melhorar o conhecimento das mudanças que ocorrem durante o processamento dos alimentos. Detalhes, dentre os quais composição, biossíntese e alterações induzidas pelo processamento na casca do ovo, albúmen (ou clara) e gema também foram resumidas.

II. ESTRUTURA E COMPONENTES QUÍMICOS DOS OVOS

A. Estrutura dos ovos

Os três componentes principais dos ovos são: casca do ovo (9-11%), albúmen, também conhecida como clara do ovo (60-63%), e gema do ovo (28-29%), como indicado na Tabela 5.1 e na Figura 5.1. A gema localiza-se em seu centro, é cercada pelo albúmen e envolta pela casca. Há também uma camada composta por uma membrana da casca do ovo no intervalo entre o albúmen e a casca. As estruturas de cada um dos componentes do ovo estão descritas nesta seção.

1. Estrutura da casca do ovo

A casca do ovo possui uma estrutura policristalina, que inclui uma cutícula (camada porosa), uma camada de calcita e duas membranas da casca. A camada da cutícula contém de 7.000 a 17.000 canais de poros distribuídos de maneira desigual, cuja função é a troca de gases. A estrutura das camadas da casca do ovo está apresentada na Figura 5.2. Há quatro camadas principais: (1) a cutícula, que pode ter de 10 μm a 30 μm , uma camada fina que contém camadas mineralizadas e orgânicas e a maior parte dos pigmentos; (2) a região da paliçada, uma densa camada vertical de cristal de cerca de 200 μm de espessura, que é composta por uma matriz esponjosa calcificada de estrutura cristalina; (3) a camada mamilar, também conhecida como camada calcificada interna, que fica localizada na parte basal das colunas calcificadas e inclui a reserva de cálcio e a região da coroa; e (4) as membranas da casca, incluindo a interna (20 μm) e a externa (50 μm), localizadas entre o albúmen e a camada mamilar, e que são formadas por fibras orgânicas que protegem o ovo da penetração de micro-organismos. A complexa estrutura da casca do ovo dá-se por um processo sofisticado. Os núcleos orgânicos da camada mamilar são formados como um local de semeadura para o crescimento de cristais de carbonato de cálcio, que por fim são utilizados para formar a cutícula. Uma vez que o crescimento de cristalitos de calcita é inibido pelo componente de fibra das membranas da casca, o cristal da camada da paliçada é orientado para a área externa (Nys *et al.*, 2004; Li-Chan e Kim, 2008).

2. Estrutura da clara do ovo

A clara do ovo ou albúmen contém quatro camadas separadas. Cerca de 23,3% do albúmen é formado por uma camada fina colada à membrana interna da casca, enquanto a maioria do albúmen (57,3%) é composta por uma camada interna branca e espessa. Cerca de 16,8% do albúmen é composto por uma camada interna branca e fina, e 2,7% é formado por uma camada calazífera (Burley e Vadehra, 1989a; Li-Chan e Kim, 2008). A viscosidade varia entre as camadas espessas e finas de clara de ovo em consequência dos conteúdos diferenciados da ovomucina. As proporções das camadas da clara do ovo são afetadas pela raça da galinha, condições ambientais, tamanho do ovo e ritmo da produção (Li-Chan *et al.*, 1995). Em ovos frescos, uma albumina espessa cobre a camada fina interna e a calazífera, mantendo a gema no centro do ovo.

TABELA 5.1 Composição de clara de ovo, gema e ovo inteiro – base úmida

Componente do ovo	% Proteína	% Lipídeo	% Carboidrato	% Cinza
Clara de ovo	9,7–10,6	0,03	0,4–0,9	0,5–0,6
Gema	15,7–16,6	32,0–35,0	0,2–1,0	1,1
Ovo inteiro	12,8–13,4	10,5–11,8	0,3–1,0	0,8–1,0

Adaptado de Li-Chan, 1995.



FIGURA 5.1 Estrutura do ovo de galinha. O ovo é composto de uma casca, membranas da casca, uma câmara de ar, as calazas, o albúmen (clara) e a gema. A gema está centrada no albúmen e cercada pela membrana vitelínica, que é incolor. O disco embrionário, no qual ocorre a fertilização, está ligado à gema. De lados opostos da gema, há duas estruturas retorcidas semelhantes a cordas, conhecidas como calazas. Sua função é manter a gema no centro do albúmen. Em volta do albúmen, estão duas membranas da casca e a própria casca. Adaptado de American Egg Board (1981): <http://www.aeb.org>.

3. Estrutura da gema do ovo

A macroestrutura da gema do ovo consiste na membrana de vitelina, gema amarelo-escuro e amarelo-claro, como mostra a Figura 5.3. A membrana de vitelina é composta de uma proteína fibrosa e fina (de cerca de 10 μm) e contém três camadas múltiplas (Mineki e Kobayashi, 1998). A gema é composta de uma camada amarelo-claro (0,25-0,45 mm de espessura) e uma camada amarelo-escuro (2 mm de espessura) do plasma formado, principalmente, por partículas de lipídeos e proteínas. Estas partículas foram classificadas como esferas (4-150 μm de diâmetro), contorno (12-48 μm), ou grânulos (0,3-2 μm) dependendo de seu tamanho. A gema do ovo pode ser separada em duas frações distintas através de centrifugação e diluição, o que produz um plasma de cor laranja-escuro (parte flutuante) e um precipitado pálido (grânulo) (Figura 5.4) (Anton, 2007). A gema de coloração clara responde por apenas 2% da massa total da gema do ovo e contém muitas estruturas, incluindo a latebra, o pescoço da latebra, o núcleo do pander e o disco do embrião. O disco embrionário, de 2-3 mm de diâmetro, localiza-se no núcleo do pander e é utilizado para o desenvolvimento do embrião (Mineki e Kobayashi, 1998).

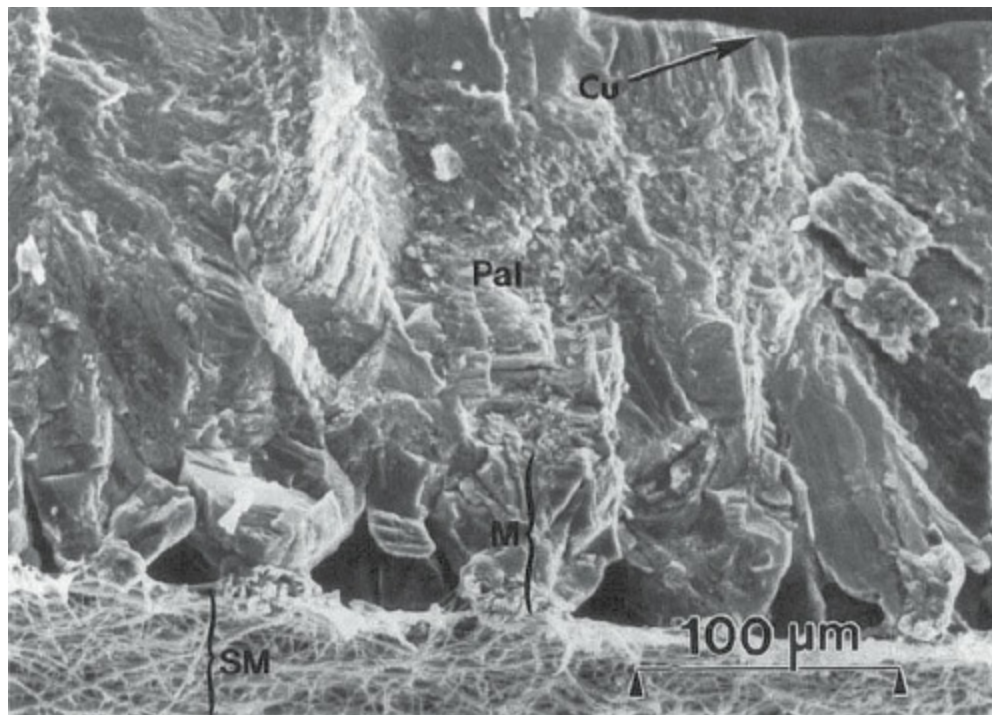


FIGURA 5.2 Micrografia por microscópio eletrônico de varredura de uma casca de ovo quebrada mostrando um corte transversal das zonas mineralizadas e não mineralizadas. As membranas da casca (SM) são uma matriz com base de colágeno não mineralizada interposta entre a clara e a casca mineralizada. A zona mamilar (M), ou região cone, é uma área mineralizada na superfície externa da membrana exterior da casca e forma a base para a região de paliçada (Pal), que se estende para a porção extrema da casca, a cutícula (Cu). De Dennis *et al.* (1996).

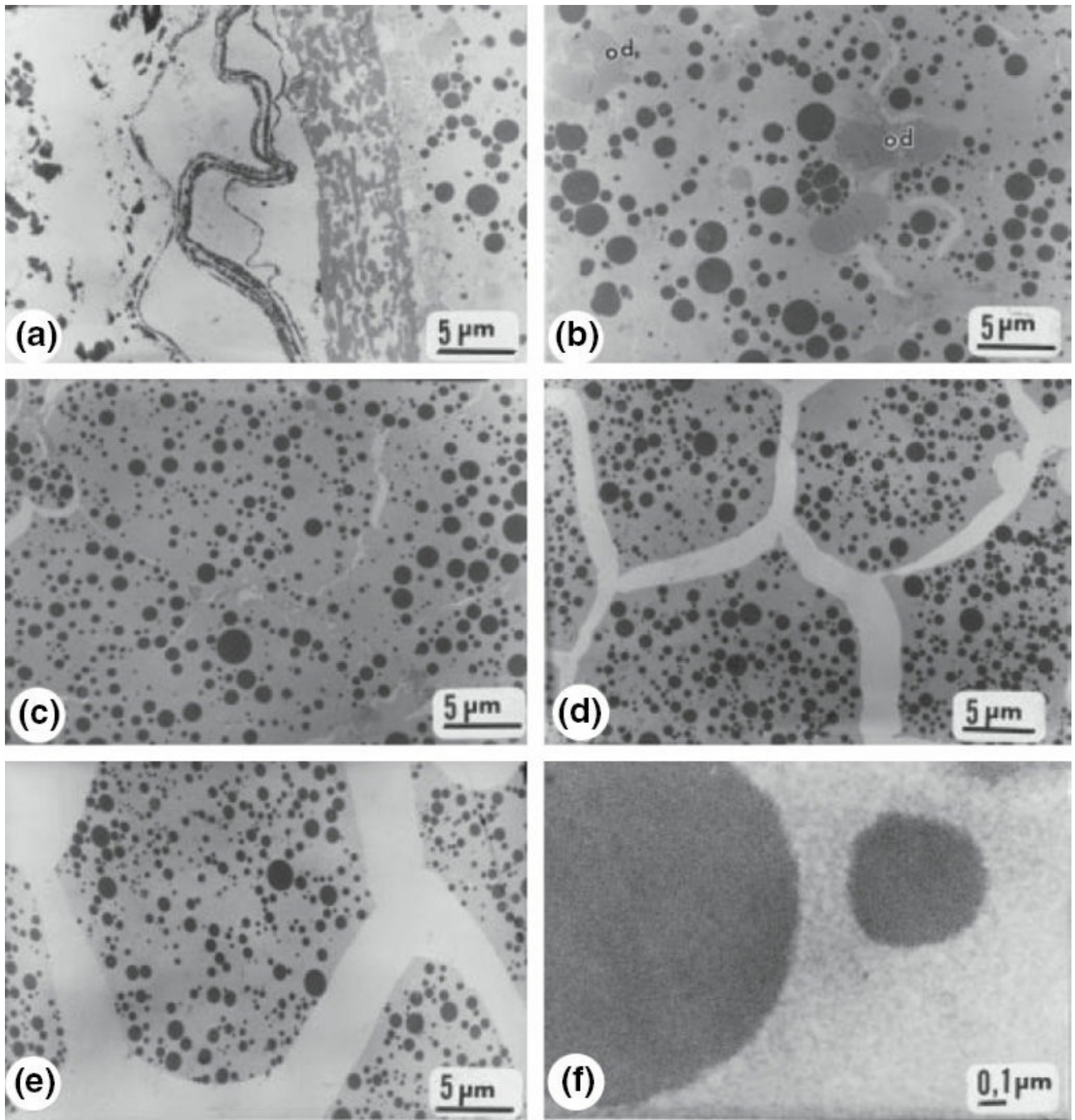


FIGURA 5.3 Micrografia por microscópio eletrônico de transmissão de gema de ovo fresco. (a) Membrana vitelínica; (b) camada cortical da gema (od: *oil droplet*, esfera de óleo); (c) esferas da gema ladeando a camada cortical; (d) esferas da gema em camada externa; (e) esferas da gema em camada interna; (f) grânulos de proteína em esfera de gema. De Mineki e Kobayashi (1977).

A microestrutura da gema do ovo tem sido analisada através da microscopia ótica (LM), microscópios eletrônicos de transmissão (TEM), e microscópios eletrônicos de varredura (SEM), mostrando detalhadamente a estrutura da esfera da gema do ovo e da membrana vitelina (Mineki e Kobayashi, 1998). Mineki e Kobayashi utilizaram o método de secções congeladas como uma nova abordagem para analisar a gema do ovo ao fixar o espécime da gema do ovo em temperaturas extremamente baixas para, em seguida, fazer nova fixação utilizando substâncias químicas. O resultado da pesquisa está ilustrado na Figura 5.3. A camada cortical da gema do ovo (Figuras 5.3b, 5.3c) foi descrita como uma estrutura independente caracterizada por esferas de gema

subdesenvolvidas com estruturas de membranas sem formato, pequenos grânulos, possivelmente de proteínas e esferas de óleo, vistas como grânulos maiores. Além do mais, as esferas da gema, observadas na camada externa (Figura 5.3d) foram descritas como sendo redondas e menores do que as esferas poliedrais observadas na camada interna (Figura 5.3e). Nas esferas da gema foram observados grânulos de proteína com alta densidade de elétrons, totalmente dispersos (Figura 5.3f).

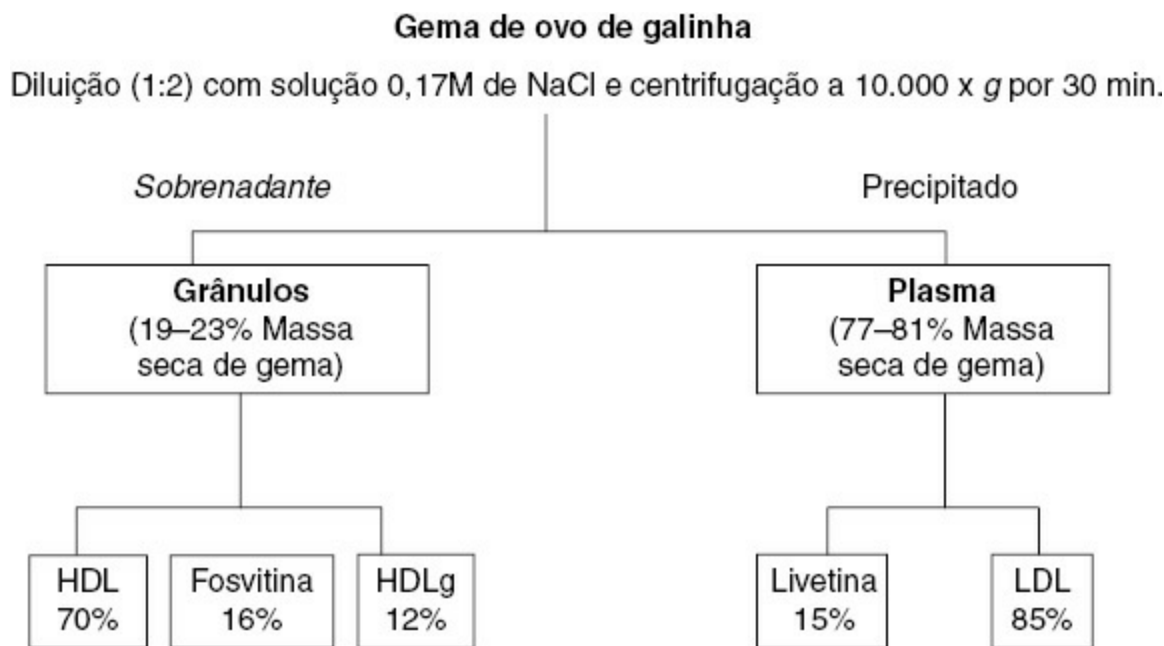


FIGURA 5.4 Fracionamento da gema de ovo em grânulos e plasma. Anton (2007).

B. Composição química dos ovos

Os ovos possuem uma variedade de componentes químicos, incluindo água, proteínas, ácidos graxos, minerais, vitaminas e pigmentos. São reconhecidos, portanto, como alimento valioso com alto valor nutritivo. Os ovos possuem 75% de água e seus componentes principais são proteínas e lipídeos. Também contêm uma pequena quantidade de carboidratos, que incluem glicose, frutose, lactose, maltose e galactose (Li-Chan e Kim, 2008). Sugino *et al.* (1997) sugerem que a composição química dos ovos é afetada pela ração das galinhas, assim como por outros fatores que incluem as espécies e idades dos animais.

1. Composição química da casca do ovo

A casca do ovo consiste de 95% de minerais, basicamente cálcio, e outros, incluindo fósforo e magnésio (Sugino *et al.*, 1997). Cerca de 3,5% da composição orgânica da casca do ovo é constituída de proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos ricos em moléculas sulfatadas (Nys *et al.*, 1999; Li-Chan e Kim, 2008). Li-Chan e Kim (2008) pesquisaram alguns dos componentes dos ácidos orgânicos da casca do ovo, que aparecem em quantidades traço. A camada da cutícula – uma camada orgânica fina, que cobre a camada de cristal mineral da casca do ovo e que fornece proteção contra infecções microbianas – é composta por 90% de proteína insolúvel, 5% de carboidratos e 3% de cinzas. Estas camadas também contêm uma grande proporção de pigmentos que explicam as diferentes cores dos ovos.

Após a camada de cutícula, a camada de cristal vertical é uma camada única e fina que se localiza acima da camada de paliçada e é composta por carbonato de cálcio. Para alicerçar a cristalização do carbonato de cálcio, um grupo de proteínas, denominadas proteínas matrizes da casca do ovo, pertence à parte basal da camada de paliçada

e à camada mamilar. Hunton (2005) revisou a distribuição das proteínas matrizes da casca do ovo. Algumas das proteínas matrizes da casca do ovo também são expressas na clara do ovo e em vários tecidos das galinhas, incluindo ovalbumina, lisozima, ovotransferrina, osteopontina e clusterina.

A osteopontina – uma glicoproteína fosforilada – é distribuída pela parte basal da casca do ovo e inclui fibras das membranas, além das camadas de paliçada e mamilar. Sua principal função é evitar a precipitação do cristal de oxalato de cálcio, estendendo-se sobre a parte basal da casca do ovo. A ovalbumina, ovotransferrina e a lisozima são as principais proteínas da clara do ovo distribuídas pela camada mamilar e pela membrana da casca. A função principal é antimicrobiana. Além disso, a ovotransferrina e a lisozima possuem duas funções diferentes na casca do ovo. Estas duas proteínas das membranas da casca do ovo e a camada basal influenciam a nucleação e a cristalização da calcita, além de inibir o crescimento de micro-organismos na albumina do ovo (Hincke *et al.*, 2000; Gautron *et al.*, 2001b).

Outro grupo de proteínas matrizes da casca do ovo é específico da casca, identificado apenas em galinhas domésticas, e inclui ovocleidina (OC)-17, -23 e -116 e ovocalixina (OCX)-21, -25, -32 e -36. Estas proteínas matrizes específicas da casca do ovo foram purificadas com sucesso e identificadas como possuidoras de propriedades particulares específicas que regulam o processo de mineralização da casca do ovo (Dominguez-Vera *et al.*, 2000; Li-Chan e Kim, 2008). A mineralização se desenvolve em um fluido uterino acelular, que contém os precursores das matrizes e íons da casca do ovo. As proteínas produzidas de células glandulares tubulares uterinas são largamente distribuídas por intermédio da camada mamilar e da paliçada da casca do ovo (Gautron *et al.*, 1997). OC-17 é uma proteína fosforilada com 142 aminoácidos com domínios do tipo lectina C, e foi a primeira proteína da matriz identificada, que regula a precipitação do carbonato de cálcio na casca do ovo (Mann e Siedler, 1999; Reyes-Grajeda *et al.*, 2004). A forma glicosilada da proteína OC-17 é OC-23, e possui uma massa molecular de 23 kDa (Li-Chan e Kim, 2008). OC-116 é uma proteína glicosilada com 742 aminoácidos, que possui pontes dissulfeto e que tem função importante no controle do crescimento da calcita durante a calcificação da casca do ovo (Hincke *et al.*, 1999). OCX-32, identificada por Gautron *et al.*, é secretada pelas epiteliais da superfície do útero durante a fase da terminação da formação da casca do ovo (Gautron *et al.*, 2001a). Xing *et al.* (2007) determinaram recentemente que as OCX-32 possuem a capacidade de reforçar a atividade antimicrobiana da casca do ovo. Gautron e Nys (2007) também clonaram com sucesso as OCX-21, -25 e -36. A OCX-36 é expressa abundantemente durante a calcificação da casca e atua nos mecanismos de defesa natural dos ovos. Entretanto, as propriedades funcionais das OCX-21 e -25 ainda não foram determinadas.

As membranas internas e externas da casca consistem principalmente de proteínas e de uma pequena quantidade de cinza e glicose, baseada na massa seca (Sugino *et al.*, 1997). As membranas da casca são constituídas basicamente de colágenos, sulfato de queratina e proteínas matrizes. As proteínas matrizes, inclusive ovotransferrina, lisozima e ovalbumina, estão distribuídas pelas membranas da casca do ovo para aumentar o sistema de defesa antimicrobiano do ovo. Dermatan, uma substância proteoglicana e o sulfato de queratina são cobertos por tais fibras, formando, assim, um núcleo (Dennis *et al.*, 1996). A mamila é uma vesícula de reserva de cálcio, que contém moléculas que ligam cálcio, e é formada por sulfato de queratina (Li-Chan e Kim, 2008). O sistema de fibras de colágeno unidas por ligações cruzadas possui importante função na proteção do ovo da contaminação de micro-organismos.

2. Composição química da clara do ovo

Cerca de 60% da massa total do ovo é composta de clara. O principal componente da clara do ovo é a água, que compõe mais de 80% da clara (Li-Chan e Kim, 2008). As proteínas da clara foram purificadas e fracionadas pela primeira vez por Rhodes *et al.* (1958). Com base em massa seca, as proteínas são os principais componentes da clara do ovo e incluem, predominantemente, 54% de ovalbumina, 12-13% de ovotransferrina, 11% de ovomucoide

e 3,5% de lisozima, 2% de G2 e G3 ovoglobulinas e 1,5-3% de ovomucina. Quantidades traço de outras proteínas também são encontradas nas claras dos ovos, incluindo ovostatina, ovoflavoproteínas, avidina e enzimas, como α -manosidase, β -galactosidase e catalase (Li-Chan e Nakai, 1989). As funções biológicas e físico-químicas das principais proteínas da clara do ovo estão resumidas na Tabela 5.2.

A ovalbumina é o componente mais abundante da clara do ovo. Trata-se de uma fosfoglicoproteína com massa molecular de 45 kDa e composta de 386 resíduos de aminoácidos (McReynolds *et al.*, 1978; Huntington e Stein, 2001; Lechevalier *et al.*, 2007). Por ser uma proteína secretória, a ovalbumina tem uma sequência hidrofóbica que se estende de 21 a 47 resíduos, que são utilizados como uma sequência de sinais internos envolvidos na localização das transmembranas em vez da clássica sequência N-terminal (Huntington e Stein, 2001). Metade dos aminoácidos da ovalbumina é hidrofóbica e um terço é carregado negativamente. Em consequência, a proteína possui ponto isoeletrico de 4,5 (Li-Chan e Nakai, 1989). Fothergill e Fothergill (1970) determinaram que a ovalbumina contém 6 resíduos de cisteínas, mas somente dois deles estão envolvidos nas pontes dissulfeto, sendo que os outros quatro estão na forma de grupo sulfidril (SH). Três dos grupos de SH ficam ocultos quando em seu estado natural, enquanto o quarto só se torna reativo quando a proteína está desnaturada (Lechevalier *et al.*, 2007). Além dos resíduos de cisteína, a ovalbumina também contém uma unidade de carboidrato e nenhum, um ou dois resíduos de fosfoserina. Além disso, a ovalbumina possui quatro partes de moléculas cristalograficamente independentes e a distância entre a posição do centro reativo do laço helicoidal e o núcleo da proteína é de 2-3 Å (Huntington e Stein, 2001). Ela também contém três β -folhas e nove α -hélices (Stein *et al.*, 1991). Em consequência da desnaturação, a ovalbumina pode ser transformada em S-ovalbumina, mais estável ao aquecimento além de ser uma espécie intermediária (Lechevalier *et al.*, 2007). Altos valores de pH e de temperatura aumentam o teor de conversão. O aparecimento da S-ovalbumina pode aumentar com o tempo de estocagem dos ovos. O teor de S-ovalbumina pode chegar a 81% em um ovo estocado por 6 meses em baixa temperatura (Vaderhra and Nath, 1973). Cerca de 2-5% de perda de α -hélices e aumento na configuração em β -folhas pregueadas são atribuídos às alterações na conformação da S-ovalbumina (Huntington e Stein, 2001). A ovalbumina pertence à superfamília do serpin, inibidor de serina protease, mas não possui atividade inibidora e sua função biológica permanece bastante obscura (Huntington e Stein, 2001).

Quanto à aplicação de ovalbumina do ovo na indústria de alimentos, sua funcionalidade é principalmente de gelificação da clara dos ovos (Mine, 1995). A ovalbumina também é o maior alérgeno encontrado na clara do ovo e pode ativar a imunoglobulina E (IgE) que medeia reações alérgicas em mamíferos. As propriedades estruturais e físico-químicas da ovalbumina foram revisadas detalhadamente por Huntington e Stein (2001) e Lechevalier *et al.* (2007).

TABELA 5.2 Propriedades físico-químicas das proteínas encontradas na clara de ovo

Proteína	% (m/m)	pI	M_w (kDa)	T_d (°C)	Cisteínas	-SH	S-S
Ovalbumina	54	4,5-4,9	45	75-84	6	4	1
Ovotransferrina (conalbumina)	12-13	6,0-6,1	77,7	61-65 (76,5, Al ³⁺)	30	-	15
Ovomucoide	11	4,1	28	77	18	-	9
Ovomucina	1,5-3,5	4,5-5,0	110, 5500-8300, 220-270.000		(2)	-	
Lisozima	3,4-3,5	10,7	14,3-14,6	69-77	6		4
G2 Ovoglobulina	1,0	4,9-5,5	47-49				
G3 Ovoglobulina	1,0	4,8, 5,8	49-50				
Ovoflavoproteína	0,8	4,0	32-35, 80		5		2
Ovostatina	0,5	4,5-4,7	760-900				
Cistatina	0,05	5,1	12				

Fonte: Mine (1995).

O lisozima da clara do ovo, que é a hidrolase *N*-acetilmurâmica utilizada para hidrolisar peptídeo-glicano na ligação β -1,4 glicosídica, possui massa molecular de 14,4 kDa e consiste de 129 resíduos de aminoácidos (Lechevalier *et al.*, 2007; Li-Chan e Kim, 2008). Trata-se de uma proteína básica com ponto isoelétrico de 10,7. A lisozima é composta de dois domínios ligados por uma longa α -hélice, e é separada por uma hélice-alça-hélice (HLH) (Young *et al.*, 1994). HLH mostra atividade de permeabilização da membrana e atividade antibacteriana (Ibrahim *et al.*, 2001). Por ser uma enzima, a lisozima possui seus grupos polares no lado externo e grupos hidrofóbicos no interior da molécula. A conformação durante a transição da lisozima, denominada de articulação dobrável, resulta em um movimento relativo de seus dois lobos e fornece local para catálise e acesso aos substratos. Ibrahim *et al.* (1997) demonstraram que o íon cálcio é capaz de induzir as alterações de conformação na lisozima e ativar sua atividade antibacteriana. Algumas das atividades antibacterianas da lisozima foram demonstradas como independentes de sua função catalítica mediante análise da atividade de peptídeos antibacterianos preparados a partir da hidrólise enzimática da lisozima (Mine e Kovacs-Nolan, 2006).

A ovotransferrina, também conhecida como conalbumina, é uma glicoproteína encontrada na clara do ovo. Ela contém 686 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de 78-80 kDa e ponto isoelétrico de 6,0. Ela tem a capacidade de se ligar a vários íons, especialmente aos íons férricos Fe^{3+} , transferindo, assim, ferro em células hospedeiras através de membranas receptoras (Mason *et al.*, 1996). A ovotransferrina possui dois lobos com quatro domínios, incluindo um lobo terminal C e um N. Cada lobo consiste de dois domínios distintos alfa/beta de tamanhos similares e somente um local para ligação além de 15 pontes de dissulfeto (Superti *et al.*, 2007; Li-Chan e Kim, 2008). A ovotransferrina possui atividade antimicrobiana contra várias bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e vírus.

Outra proteína distribuída pela clara do ovo é o ovomucoide, uma proteína termoestável que compõe 11% das proteínas da clara do ovo (Li-Chan e Nakai, 1989). O ovomucoide contém cerca de um quarto de resíduos asparaginil ligados a carboidratos e é formado por 186 aminoácidos e massa molecular de 28 kDa (Kato *et al.*, 1987b; Li-Chan e Nakai, 1989). Trata-se de um inibidor de tripsina com três domínios distintos unidos por ligações cruzadas em um interdomínio de pontes dissulfeto. No total, nove pontes dissulfeto foram observadas em ovomucoide e nenhum grupo de sulfidril foi observado. O sítio ativo é encontrado somente no domínio II, que é atribuído à atividade inibidora de tripsina na clara de ovos de galinhas (Li-Chan e Nakai, 1989). O ovomucoide purificado da clara do ovo de galinha possui potencial alergênico, que desencadeia reações mediadas por IgE em seres humanos (Mine e Zhang, 2001; Mine e Rupa, 2004).

A ovomucina é uma glicoproteína sulfatada encontrada na clara do ovo, que possui subtipos solúveis e insolúveis, com proteínas e pequena quantidade de carboidratos. Os carboidratos encontrados na ovomucina estão na forma de oligossacarídeos (Hiidenhovi, 2007). A ovomucina insolúvel possui importante função na formação da fração insolúvel similar a um gel do albúmen espesso na clara do ovo, enquanto a ovomucina solúvel é distribuída basicamente no albúmen externo e interno (Burley e Vadehra, 1989d; Li-Chan e Kim, 2008). Ela consiste de duas subunidades, a α - e a β -ovomucina, que são encontradas tanto nos subtipos solúveis quanto insolúveis de ovomucina, mas em proporções diferentes (Li-Chan e Kim, 2008). A α -ovomucina contém 91% de proteína e 9% de carboidrato e possui 2.087 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 230-250 kDa (Watanabe *et al.*, 2004). A β -ovomucina consiste de 872 aminoácidos e massa molecular de cerca de 400-720 kDa (Itoh *et al.*, 1987; Hiidenhovi, 2007; Hammershøj *et al.*, 2008).

As outras proteínas presentes no albúmen são ovoglicoproteína, flavoproteína, avidina, protease e algumas menores, que incluem as lipocalinas, clusterinas e proteínas Ch21. Elas foram descritas em detalhes por Li-Chan e Kim (2008) e Huopalahti *et al.* (2007).

Além das proteínas, outros tipos de componentes químicos são encontrados na clara do ovo (Li-Chan e Kim, 2008). Carboidratos estão presentes na clara do ovo na forma de oligossacarídeos conjugados e glicose livre. Baixo conteúdo de lipídeos, 0,03%, em massa do albúmen também está presente, assim como quantidades traço de vários minerais e vitaminas solúveis em água. Li-Chan e Kim (2008) explicaram detalhadamente a composição química da clara do ovo.

3. Composição química da gema do ovo

A gema do ovo contém 50% de sólidos com uma razão de proteínas e lipídeos de 2:1 (Li-Chan e Kim, 2008). A distribuição de proteínas e lipídeos na vitelogenina é diferente da encontrada na gema. Ela contém 87% de proteínas, 10% de carboidratos e 3% de lipídeos com base na massa seca (Li-Chan e Kim, 2008). A gema do ovo pode ser separada em duas fases: plasma e grânulo. O plasma é composto de até 80% de gema líquida com maior conteúdo de lipídeos, enquanto os grânulos contêm aproximadamente três vezes mais proteínas (Li-Chan *et al.*, 1995). Os componentes da gema do ovo estão ilustrados na Figura 5.4 e a análise da composição da gema fresca está resumida na Tabela 5.3.

O conteúdo proteico da gema líquida é de aproximadamente 16%. A proteína da gema do ovo é constituída de 16% de lipoproteínas de alta densidade (HDL), 68% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), 10% de livetinas, 4% de fosvitina e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (McCully *et al.*, 1962). Aproximadamente dois terços dos sólidos da gema são compostos por LDL, partículas esféricas com um núcleo lipídico envolvidas por uma camada de fosfolipídeos e proteínas (Anton *et al.*, 2003). Os LDLs possuem cerca de 14% de proteínas e 86% de lipídeos, com 74% de lipídeos neutros e 26% de fosfolipídeos (Martin *et al.*, 1964). Como os LDLs consistem de apoproteínas e de fosfolipídeos, apresentam propriedades anfífilicas que podem ser dispersas em interface com óleo e água. LDLs, portanto, são componentes essenciais responsáveis pelas propriedades de emulsificação da gema do ovo. Há seis tipos de apoproteínas no LDL da gema do ovo, com massas moleculares entre 15 kDa e 130 kDa e uma faixa de pI de 6,3 a 7,5. A apoproteína I constitui cerca de 70% do total de apoproteínas e é menos solúvel em água. A apoproteína II contém alta proporção de cadeias de α -hélice anfipáticas, o que contribui para sua dispersão na interface óleo-água (Anton *et al.*, 2003). Os VLDLs são precursores do LDL da gema do ovo e são transferidos do sangue da galinha para o ovário.

Os HDLs da gema do ovo, também conhecidos como lipovitelininas, são distribuídos em grânulos. Eles possuem uma massa molecular de 400 kDa e contêm 75-80% de proteínas e 20-25% de lipídeos, incluindo 65% de fosfolipídeos, 30% de triglicerídeos e 5% de colesterol (Cook e Martin, 1969; Anton *et al.*, 2003). Dois subtipos de lipovitelininas, α e β , são encontrados na gema do ovo, na razão 1:1,5, e contêm sequências diferentes de aminoácidos assim como resíduos de fósforo e de carboidratos (Li-Chan e Kim, 2008). Há cerca de cinco tipos de apoproteínas identificados nos HDL com massas moleculares variando de 35 kDa a 110 kDa, as quais são glicosiladas por manose, galactose, glucosamina e ácido siálico (Anton *et al.*, 2007). Além disso, as HDLs e fosvitinas possuem o mesmo precursor da vitelogenina, que é sintetizado pelo fígado da galinha. Um complexo granular é formado na gema do ovo por HDL e fosvitina através das pontes fosfocálcicas (Wang *et al.*, 1983). Li-Chan e Kim (2008) observaram que o HDL da gema do ovo pode ter potencial terapêutico além de propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

TABELA 5.3 Análise composicional da gema de ovo

	Gema fresca (%)	Gema seca (%)
Água	51,1	-
Lipídeos	3,6	62,5
Proteínas	16,0	33,0

Carboidratos	0,6	1,2
Minerais	1,7	3,5

Fonte: Li Chan *et al.* (1995).

A fosfovitina é uma fosfoglicoproteína que compõe 4% da matéria seca da gema do ovo (Anton *et al.*, 2007). Pouco menos da metade dos aminoácidos da fosfovitina são resíduos de serina com 90% de fosforilação e formam uma área central hidrofílica cercada por duas áreas hidrofóbicas nos terminais N e C. Dois subtipos de fosfovitina, a α - e a β -fosfovitina, são encontrados na gema de ovo da galinha e respondem por 80% das proteínas que ligam fósforo na gema (Li-Chan e Kim, 2008). O alto teor de resíduos de fosfoserina e a estrutura especial da conformação da fosfovitina contribuem para sua resistência à desnaturação pelo calor e pela hidrólise proteolítica (Juneja e Kim, 1997; Anton *et al.*, 2000). A fosfovitina possui fortes propriedades quelantes e é uma biomolécula que liga metal.

A livetina responde por 30% das proteínas do plasma da gema do ovo. A livetina contém 20% de α -livetina, a soro albumina, 50% de β -livetina e α_2 -glicoproteína e 30% de γ -livetina, imunoglobulina Y (IgY), que é similar ao IgG de mamíferos (Schade e Chacana, 2007). A α -livetina tem massa molecular de 70 kDa e um valor de pI entre 4,3 e 5,7. Ela também possui atividade alergênica que induz hipersensibilidade de tipo I (Schade e Chacana, 2007; Williams, 1962). A β -livetina tem massa molecular de 45 kDa e contém 7% de hexose. A massa molecular da γ -livetina (IgY) é de aproximadamente 167 kDa. O anticorpo IgY é formado por duas cadeias leves e duas pesadas, e é transferido para a gema para proteger passivamente o embrião em desenvolvimento.

Os principais constituintes da massa seca da gema do ovo são lipídeos, responsáveis por 62% da gema do ovo em pó (Juneja, 1997). Entre esses lipídeos, os triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol ocupam 65%, 31% e 4%, respectivamente. A análise da composição de seus ácidos graxos está resumida na Tabela 5.4. Os triglicerídeos e fosfolipídeos possuem glicerol na estrutura. Os fosfolipídeos possuem glicerol e fosfato na estrutura. Além disso, uma vez que são moléculas anfifílicas, os fosfolipídeos possuem grupos polares e não polares com propriedades de emulsificação. Os principais componentes dos fosfolipídeos da gema do ovo são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, sendo que o restante consiste de lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina e esfingomielinas (Li-Chan e Kim, 2008). O conteúdo de colesterol na gema de ovo crua é de cerca de 1,6%. Cerca de 80% do total de colesterol na gema do ovo é de colesterol livre, e o restante existe na forma de ésteres de colesterol.

TABELA 5.4 Proteínas e lipídeos na gema de ovo

Componente	Principais componentes	% Relativo
Proteínas ^a	Apovitelina I-VI	37,3
	Apoproteínas lipovitelina	
	α -Lipovitelinas	26,7
	β -Lipovitelinas	13,3
	Livetinas	
	α -Livetina (soroalbumina)	2,7
	β -Livetina (α_2 -glicoproteína)	4,0
	γ -Livetina (γ -globulina)	2,7
	Fosvitina	13,3
	Proteína de ligação à biotina	Traços
Lipídeos ^b	Triglicerídeos	65
	Fosfatidilcolina	26
	Fosfatidiletanolamina	3,8
	Lisofosfatidilcolina	0,6
	Colesterol	4
	Esfingomielina	0,6

^a Modificado de Burley e Vahedra (1989a).^b Adaptado de Juneja (1997).**TABELA 5.5 Vitaminas e minerais presentes no ovo inteiro, no albúmen e na gema**

Componente (unidades)	Ovo inteiro	Albúmen (clara)	Gema
Minerais (mg)			
Cálcio	29,2	3,8	25,2
Cloro	96,0	66,1	29,9
Cobalto	0,033	0,009	0,024
Iodo	0,026	0,001	0,024
Ferro	1,08	0,053	1,02
Magnésio	6,33	4,15	2,15
Manganês	0,021	0,002	0,019
Fósforo	111	8	102
Potássio	74	57	17
Sódio	71	63	9
Enxofre	90	62	28
Zinco	0,72	0,05	0,66
Vitaminas			
Vitamina A (IU)	264	–	260
Vitamina D (IU)	27	–	27
Vitamina E (mg)	0,88	–	0,87
Vitamina B ₁₂ (µg)	0,48	–	0,48
Colina (mg)	11,0	2,58	8,35
Ácido fólico (mg)	237	0,46	238
Inositol (mg)	0,023	0,006	0,026
Niacina (mg)	5,94	1,52	4,35
Ácido pantotênico (mg)	0,045	0,035	0,010
Piridoxina (mg)	0,83	0,09	0,73
Riboflavina (mg)	0,065	0,008	0,057
Tiamina (mg)	0,18	0,11	0,07
	0,05	0,004	0,048

Adaptado de Watkins (1995); Li-Chan e Kim (2008).

Há ainda pequenas quantidades de carboidratos, cerca de 1% da massa seca da gema do ovo (Li-Chan e Kim, 2008). A glicose é um carboidrato livre e um dos principais constituintes da gema do ovo. O restante dos carboidratos encontrados na gema do ovo permanece na forma conjugado, por exemplo, o ácido siálico, ligado a glicoproteínas e glicolípídeos (Li-Chan e Kim, 2008). A gema do ovo também contém quantidade traço de vitaminas, minerais e pigmentos, que estão relacionados na Tabela 5.5. O conteúdo mineral da gema do ovo é de cerca de 1%. O fósforo é o mineral mais abundante, em razão do alto conteúdo de fosfolípídeos (Li-Chan e Kim, 2008). A gema do ovo contém várias vitaminas e é uma boa fonte de vitamina A, D, E e B₁₂. Vitaminas solúveis em água, incluindo ácido fólico, riboflavina e niacina, estão presentes na clara e na gema do ovo. Como precursor da vitamina A, os carotenoides também estão na gema do ovo e são seu pigmento principal. Deve ser notado que os carotenoides não podem ser sintetizados pela galinha; os carotenoides da gema do ovo são obtidos do alimento das galinhas poedeiras.

III. BIOSÍNTESE DOS OVOS

A. Introdução ao processo de formação do ovo

O ovo de galinha, como um óvulo desenvolvido, é formado no ovário onde se transforma em folículo e é finalmente enviado ao útero, para ser finalizado (Burley e Vadehra, 1989c; Okubo *et al.*, 1997). Os constituintes utilizados para o desenvolvimento da gema do ovo são supridos pelo fígado e liberados no sangue. Em primeiro lugar, o oócito do ovário começa a crescer e se transformar em um folículo branco, que é envolvido pelas veias da galinha. Em seguida, um folículo amarelo começa a desenvolver-se no ovário, na base do folículo branco, aproximadamente 7 a 10 dias antes da ovulação, resultando na deposição da gema amarela do ovo (Okubo *et al.*, 1997). Por fim, o folículo amarelo encapsulado, conhecido como óvulo maduro, vai para o oviduto, processo que dura de 24 a 27 horas. O oviduto em galinhas poedeiras possui de 60 cm a 80 cm de comprimento e é composto de cinco regiões: o infundíbulo, o magno, o istmo, o útero e a vagina (Burley e Vadehra, 1989a). O comprimento e o tempo em que ele permanece nessas cinco regiões são definidos pela funcionalidade particular de cada uma delas (Okubo *et al.*, 1997). A parte mais longa do oviduto é o magno, que também é reconhecido como a região secretora do albúmen. Os ovos ficam no magno de duas a três horas para acumular albumina. O útero tem parede espessa e é onde a casca do ovo é formada. Os ovos permanecem no útero durante 21 horas para completar o processo de mineralização da casca do ovo antes de ele ser posto.

B. Biossíntese da casca do ovo e mudanças bioquímicas relacionadas

1. Regulação da biossíntese da casca do ovo

A casca do ovo é uma parte essencial de todos os ovos de aves e possui uma estrutura muito organizada e porosa para permitir trocas de água e de gases, fornecer cálcio ao embrião durante seu desenvolvimento e proteger o ovo de infecções microbianas. As cascas dos ovos são basicamente compostas de minerais inorgânicos e componentes matriciais orgânicos, os últimos possuindo proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas, fornecidos pelo fluido uterino (Hincke e Wellman-Labadie, 2008). O principal componente inorgânico da casca do ovo são os íons de cálcio, que são transportados pela mucosa uterina em ligação com a calbindina. Em seguida, íons de bicarbonato são produzidos a partir do cálcio e pela hidratação de dióxido de carbono por catálise da anidrase carbônica (Gautron *et al.*, 1997). A síntese da casca do ovo é regulada pelo sistema endócrino da galinha poedeira, que inclui estrogênio, calcitonina, hormônio da paratireoide e 1,25-dihidroxitamina D₃ (Burley e Vadehra, 1989b). A concentração do cálcio do sangue e o ritmo da postura dos ovos são controlados por hormônios do sistema endócrino. A formação da casca de ovo completa tem início com a deposição de membranas da casca na superfície externa do albúmen na região do istmo do oviduto. A matriz orgânica da membrana da casca do ovo é feita principalmente por uma proteína fibrilar formada por uma rede de pontes dissulfetos entrecruzadas e colágenos do tipo I, V e X (Nys *et al.*, 2004; Hincke e Wellman-Labadie, 2008). Tais componentes são sintetizados e liberados por numerosas células glandulares tubulares e outros tipos de células localizadas no istmo. Uma estrutura entrecruzada derivada da lisina da membrana da casca do ovo é produzida por meio de uma enzima que contém cobre (Burley e Vadehra, 1989c). Essa estrutura de fibras entrecruzadas tem uma dupla função no controle da mineralização da casca do ovo: evita a calcificação na direção das membranas internas e a formação de locais de nucleação na superfície externa das membranas.

2. Biomineralização da casca do ovo

A biomineralização da casca do ovo caracteriza um processo diferente, quando comparado com a mineralização de tecidos de outras espécies de vertebrados e invertebrados. Em outras espécies, a matriz, em geral, contém elementos com ou sem colágeno que interagem diretamente com a fase mineral para formar uma matriz calcificada

bifásica e, assim, controlar a deposição de minerais (Addadi e Weiner, 1992; Belcher *et al.*, 1996; Robey, 1996). Na casca de ovos de aves também há uma separação na casca do ovo entre a sua armadura orgânica externa e os componentes mineralizados, por meio da qual a membrana da casca do ovo interage com agregados orgânicos conhecidos como núcleos mamilares (Hincke e Wellman-Labadie, 2008). Os núcleos mamilares distribuem-se pela superfície externa da membrana da casca do ovo e são usados como núcleos para a agregação de carbonato de cálcio e formação de uma estrutura policristalina. A calcificação é um processo que ocorre em seguida com uma linha de tempo específica relacionada com a ovulação. Uma variedade de mudanças bioquímicas está associada à biomineralização da casca do ovo, incluindo alterações na composição da matriz da proteína e a formação de calcita no fluido uterino. O fluido uterino acelular contém precursores orgânicos e inorgânicos da matriz da casca, influenciando assim a cinética da precipitação, a morfologia e a orientação dos cristais. O perfil de proteínas coletadas do fluido uterino é diferente durante os três estágios da formação da casca do ovo, isto é, a fase inicial, de crescimento e a fase terminal (Dominguez-Vera *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstraram que o fluido uterino pode aumentar a precipitação do carbonato de cálcio na fase inicial e na de crescimento, mas possui efeitos inibitórios na mineralização (Gautron *et al.*, 1997; Dominguez-Vera *et al.*, 2000).

Na fase inicial da mineralização da casca do ovo, numerosas proteínas foram identificadas no fluido uterino, envolvidas na precipitação do carbonato de cálcio e na formação cristalina da calcita. Elas são, principalmente, as ovocleidinas, ovalbumina, albúmen, osteopontinas e ovotransferrinas. A ovotransferrina e a ovalbumina são predominantes no fluido uterino na fase inicial e apresentam a capacidade de ligar cálcio, o que pode ter uma função na regulação da nucleação da calcita (Gautron *et al.*, 2001b). OC-17 e -116 também são predominantes no fluido uterino na fase inicial. OC-17 pode estar envolvido na regulação da morfologia da calcita como crescimento de cristais da casca do ovo (Nys *et al.*, 2004). OC-116, conhecido como ovoglucana, que é um proteoglicano de sulfato de dermatana, é uma proteína única da matriz da casca do ovo que pertence à família da fosfoproteína secretora que liga cálcio (SCPP) e é produzida nas células granulares do epitélio uterino do istmo (Arias e Fernandez, 2001; Hincke e Wellman-Labadie, 2008). OC-116 pode ter a mesma funcionalidade como uma proteoglicana que tem função importante na calcificação da cartilagem e na mineralização do colágeno (Hunter, 2001; Hincke e Wellman-Labadie, 2008).

Na fase de crescimento, o fluido uterino ainda controla ativamente a cinética da precipitação do carbonato de cálcio. No entanto, alguns constituintes de proteínas coletados nesta fase possuem efeitos inibitórios na precipitação da calcita e atrasam o crescimento da calcita ao ligar-se diretamente ao cristal (Gautron *et al.*, 1997; Nys *et al.*, 2004). OCX-32 e -36 estão presentes no fluido uterino durante a fase de crescimento. Em decorrência de seu envolvimento nos mecanismos de defesa natural, o OCX-36 pode aumentar o desenvolvimento da casca do ovo, porém sua atividade na mineralização da calcita não é conhecida (Hincke e Wellman-Labadie, 2008). OCX-32 é capaz de inibir a mineralização e, portanto, tem função no controle da deposição de carbonato de cálcio na fase de crescimento da casca do ovo (Nys *et al.*, 2004; Hincke e Wellman-Labadie, 2008). Algumas proteínas, inclusive a lisozima, foram identificadas como tendo efeitos bifásicos na regulação da precipitação do carbonato de cálcio, que são relevantes para a sua concentração no fluido uterino (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2003). Em alta concentração, tais proteínas podem bloquear o crescimento dos cristais de calcita ao se ligarem à superfície de cristal. Suas funções bifásicas podem inibir o crescimento dos cristais de calcita no final do processo de formação da casca do ovo.

Na fase terminal, o fluido uterino contém principalmente uma matriz orgânica que os pesquisadores acreditam ter efeitos inibitórios na precipitação da calcita. A matriz orgânica contida nesta fase atrasa a queda do pH associada à precipitação do carbonato de cálcio, inibindo, portanto, o crescimento de cristais de calcita (Gautron *et al.*, 1997). As proteínas identificadas na matriz orgânica coletadas nesta fase são, principalmente, o OCX-32 e -36 (Nys *et al.*, 2004; Hincke e Wellman-Labadie, 2008). A mineralização leva cerca de 1,5 hora para ser completada e para compor a camada de cutícula orgânica que envolve a casca do ovo antes da ovulação. Durante todo o processo

da mineralização e da formação das cascas dos ovos, os componentes da matriz no fluido uterino possuem um importante papel no controle da cinética de crescimento da calcita e na morfologia dos cristais.

C. Biossíntese da clara ou albúmen do ovo

As proteínas do albúmen do ovo são basicamente sintetizadas por células glandulares tubulares distribuídas ao longo da parede do oviduto. A clara do ovo é formada no magno após um óvulo ter chegado à região. A biossíntese das proteínas do albúmen do ovo só é iniciada em resposta a um estímulo hormonal (Schutz *et al.*, 1978; Burley e Vadehra, 1989d). As proporções das três principais proteínas do albúmen do ovo sintetizadas pelas células glandulares tubulares são de 50-60% de ovalbumina, 8% de ovomucoide e 2-3% de lisozima (Palmiter, 1972; Schutz *et al.*, 1978). A síntese da ovalbumina resulta de um primeiro estímulo de estrogênio seguido por remoção e estímulo secundário. O estímulo do estrogênio induz a um aumento da expressão do RNA mensageiro da ovalbumina e, em seguida, aumenta a glicosilação do albúmen no oviduto da galinha (Schutz *et al.*, 1978; Burley e Vadehra, 1989d). Outros mecanismos, como a transdução de sinal, também estão envolvidos na regulação da síntese das proteínas da clara dos ovos. Cooney *et al.* (1993) identificaram que o fator promotor de transcrição (COUP-TF) da ovalbumina de galinhas regula a expressão hormonal por meio da interação com outros fatores de transcrição. A expressão dos hormônios envolvidos na regulação das secreções de proteínas do albúmen do ovo no oviduto é controlada por sinais particulares que, por sua vez, são estimulados pelas proteínas secretadas. Um sistema de controle fica, assim, estabelecido. Outras proteínas do albúmen dos ovos produzidas pelas galinhas são, principalmente, proteínas antimicrobianas, como a lisozima e a ovotransferrina, que protegem o embrião de infecções microbianas. A lisozima do albúmen dos ovos é produzida basicamente pelas células glandulares tubulares do oviduto, em vez de serem transferidas pelo sangue das galinhas (Shawkey *et al.*, 2008). A biossíntese da ovotransferrina é regulada pelos hormônios do oviduto, inclusive o estrogênio e a progesterona (Lee *et al.*, 1978; Shawkey *et al.*, 2008). As atividades das proteínas antimicrobianas são aumentadas durante o chocar dos ovos, como resultado do aumento da temperatura. A produção e a deposição das proteínas antimicrobianas nos ovos caracterizam um sistema protetor típico da reprodução e da genética, estabelecido durante o processo evolucionário.

A estrutura de gel do albúmen do ovo é atribuída, em especial, às interações de glicoproteínas. Os principais componentes do albúmen do ovo são glicoproteínas que incluem ovalbumina, lisozima e ovomucina. Glicoproteína é um grupo de macromoléculas com carboidratos ligados às cadeias de polipeptídeos por meio de ligações covalentes (Robinson, 1972). Os graus variáveis de modificação de resíduos de aminoácidos resultam na geração de diferentes quantidades de glicoproteínas na clara do ovo; estas modificações incluem a N-acetilação dos resíduos N terminal, a fosforilação dos resíduos da serina e da treonina e a metilação dos resíduos de lisina e arginina (Robinson, 1972). As propriedades específicas da clara do ovo são atribuídas às ligações químicas com as glicoproteínas do ovo. Além do mais, a ovomucina e a lisozima contêm quantidades significativas de resíduos de cisteína que podem formar pontes dissulfetos e, conseqüentemente, gerar um complexo de lisozima e ovomucina. Este complexo contribui para uma rede rígida no gel na clara do ovo, enquanto as pontes dissulfeto do complexo lisozima-ovomucina podem ser inibidas por cátions bivalentes existentes, por exemplo, o magnésio e o cálcio (Robinson, 1972). Uma regulação integrada da estrutura do gel na clara do ovo depende da interação entre as glicoproteínas e outros constituintes da clara do ovo.

D. Biossíntese da gema do ovo

A formação da gema do ovo inicia-se após a diferenciação do embrião. As células da gema do ovo são formadas no epitélio dos ovários. Em seguida, as células da gema dividem-se rapidamente e oócitos são formados,

envolvidos continuamente por células foliculares (Burley e Vadehra, 1989b). A gema do ovo desenvolve-se no interior da parede do folículo do ovário da galinha, que é alimentado por capilares sanguíneos, por meio dos quais o precursor da proteína da gema do ovo, conhecido como vitelogenina, é transportado e depositado na gema. As proteínas da gema do ovo são principalmente sintetizadas no fígado, processo controlado por hormônios, e são transportadas para o oócito em desenvolvimento por meio do sangue (Burley e Vadehra, 1989b; Stevens, 2004). A ativação da transcrição e da tradução dos genes que codificam as proteínas dos ovos também está envolvida em tal processo (Stevens, 2004). Todo o processo da formação da gema do ovo envolve um aumento na síntese de lipídeos e de proteínas no fígado e é influenciado pelo habitat da galinha e pelos nutrientes da alimentação (Stevens, 2004).

1. Formação da vitelogenina

Cerca de 95% das proteínas da gema do ovo são constituídas de LDL, lipovitelina, fosvitina e livetina. Depois de ter entrado na gema, a vitelogenina é hidrolisada enzimaticamente transformando-se em fosvitina e lipovitelina, que são continuamente incorporadas em grânulos (Burley e Vadehra, 1989b). A vitelogenina é sintetizada nas células do fígado em resposta ao estímulo de estrogênio, o qual libera sinais que induzem a tradução da vitelogenina no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos ao se ligar com os receptores das membranas (Stevens, 2004). O polipeptídeo de vitelogenina é formado pela glicosilação e subsequente fosforilação nos hepatócitos antes da secreção. A vitelogenina que circula no sangue é finalmente captada pelo oócito (Stevens, 2004).

2. Síntese da lipoproteína de baixa densidade da gema

Os lipídeos da gema do ovo são sintetizados no fígado e transportados para tecidos periféricos na forma de VLDL, que é composto de proteínas e triglicérides, fosfolipídeos, colesterol e ésteres de colesterol. A apolipoproteína B (apoB), composta de apoVLDL I e II, é a proteína que constitui o VLDL e é produzida no fígado depois do estímulo pelo estrogênio (Burley e Vadehra, 1989b). As proteínas apoB e apoVLDL são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, enquanto o VLDL é formado no Complexo de Golgi (Burley e Vadehra, 1989b). O estrogênio e outras proteínas transacionais, conhecidas como fatores de transcrição enriquecidos pelo fígado, ajudam a induzir a produção de apoB por transcrição (Beekman *et al.*, 1991; Stevens, 2004). Evans *et al.* (1987) sugeriram que cinco genes das proteínas da gema são potencialmente regulados pelo estrogênio do fígado da galinha, incluindo *vtgI*, *vtgII*, *vtgIII*, *apoVL7DL-II* e *apoB*. Estes genes possuem um papel-chave no controle da biossíntese das lipoproteínas da gema do ovo.

3. Biossíntese das livetinas da gema

As livetinas são proteínas solúveis das gemas de ovo e contêm três subtipos: α , β e γ . Ao contrário de outras proteínas da gema do ovo, a biossíntese das livetinas não é controlada pelo estrogênio (Burley e Vadehra, 1989b). As α - e β -livetinas da gema do ovo possuem características similares à albumina do soro e à α_2 glicoproteína, respectivamente (Schade e Chacana, 2007). Além disso, a γ -livetina (IgY) é produzida na medula óssea, enquanto os outros dois tipos de livetina são sintetizados no fígado. A γ -livetina pertence ao grupo das imunoglobulinas de galinha, conhecidos como anticorpos, que são transferidos do sangue para a gema do ovo, e a IgY é o único tipo de anticorpo existente na gema do ovo (Burley e Vadehra, 1989b; Schade e Chacana, 2007). O anticorpo IgY é produzido pelas galinhas e transferido para a gema do ovo para proteger seus embriões de infecções microbianas (Schade e Chacana, 2007). Em função de seu envolvimento potencial na imunidade passiva, pesquisas das funções

biológicas e atividades da γ -livetina da gema do ovo estão aumentando.

IV. ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES DOS OVOS INDUZIDAS PELO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

O ovo é uma excelente fonte de nutrientes e possui papel fundamental no mercado consumidor de alimentos. Os componentes nutritivos dos ovos incluem proteínas, lipídeos, várias vitaminas e minerais. Uma vez que são ricos em proteínas e lipídeos, os ovos têm sido associados a uma variedade de funcionalidades e são amplamente utilizados na indústria de processamento de alimentos. Além disso, a tecnologia de processamento dos ovos progrediu, possibilitando o desenvolvimento de produtos de ovos de maior qualidade e estabilidade para atender ao aumento da demanda de produtos de ovos processados (Froning, 2008). Os principais objetivos na melhoria da tecnologia do processamento de produtos de ovos são prolongar o tempo de prateleira dos produtos de ovos e incorporar ingredientes de ovos em outros produtos do mercado baseados em suas propriedades químicas e físicas. No entanto, independentemente das técnicas, o próprio processamento pode levar a mudanças químicas e físicas dos componentes dos ovos. Nesta seção, alterações químicas induzidas pelo processamento serão discutidas, assim como as modificações químicas dos componentes dos ovos que costumam ser aplicadas pela indústria de alimentos para melhorar sua funcionalidade.

A. Desnaturação das proteínas dos ovos

Em geral, o processamento de produtos de ovos resulta em alterações em suas proteínas, causadas pela modificação da estrutura da proteína, denominada de desnaturação. Em condições normais, com pH e temperatura constantes, a molécula da proteína assume uma conformação específica, denominada de estado nativo (Boye *et al.*, 1997). No estado nativo, a molécula da proteína tem uma energia mínima livre e é considerada termodinamicamente estável. Quaisquer alterações nas condições normais causam alterações na homeostase termodinâmica da molécula da proteína, alterando sua estrutura nativa. A desnaturação das proteínas é definida como o processo no qual as moléculas de proteína perdem a estrutura nativa e mudam para um arranjo mais desorganizado em razão de um rearranjo espacial das cadeias de polipeptídeos no interior da molécula (Kauzmann, 1959). As alterações na conformação das moléculas de proteínas que ocorrem durante a desnaturação envolvem as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. A estrutura primária das moléculas de proteína, composta por sequências de polipeptídeos, não é alterada pela desnaturação. A desnaturação não afeta as ligações peptídicas da proteína.

Para produzir produtos de ovos ou incorporar ingredientes de ovos em outros produtos alimentares, proteínas de ovos, parcial ou totalmente desnaturadas, são necessárias para melhorar suas propriedades funcionais. A desnaturação parcial ou total das proteínas dos ovos é benéfica para a formação de espuma e a capacidade de emulsificação dos ovos e para aumentar a digestibilidade e a palatabilidade (Burley e Vadehra, 1989c). A desnaturação das proteínas dos ovos, no entanto, deve ser evitada durante o processo de preservação do ovo, pois a agregação da albumina do ovo aumenta com o passar do tempo. A desnaturação pode ser induzida por uma variedade de agentes físico-químicos, incluindo calor, pH, sal e efeitos de superfície. O processo de desnaturação induzida por calor e formação de agregados de ovalbumina está ilustrado nas Figuras 5.5 e 5.6. Nas proteínas dos ovos, especialmente nas ovalbuminas, há um estado intermediário conhecido como estado globular fundido, no qual as proteínas ficam parcialmente desnaturadas e mantêm sua estrutura compacta nativa (Mine, 1995). O estado globular fundido possui uma conformação parcialmente dobrada estável, que pode ser distinguida dos estados nativos ou completamente desnaturados.

B. Alterações nas proteínas dos ovos durante sua preservação

A composição dos ovos sofre uma variedade de alterações químicas à medida que o tempo de estocagem aumenta. As principais mudanças nas diferentes partes dos ovos, como resultado de seu envelhecimento, podem ser assim identificadas: (1) o pH da albumina aumenta em função da perda de dióxido de carbono; (2) a membrana de vitelina enfraquece e, finalmente, desaparece; (3) grupos de sulfidrilas (SH) da gema do ovo formam ligações dissulfeto e os lipídeos são oxidados; e (4) a água é perdida por evaporação por meio da casca do ovo (Burley e Vadehra, 1989c). As alterações causadas pelo processo de envelhecimento podem levar a mudanças irreversíveis nos produtos de ovos, que são atribuídas à desnaturação de suas proteínas, a qual inclui duas partes: a desnaturação endotérmica e a agregação exotérmica. No processo de desnaturação, as ligações de hidrogênio e as ligações não covalentes das proteínas dos ovos são rearranjadas extensivamente; portanto, as proteínas dos ovos se agregam e formam uma cadeia reticulada (Burley e Vadehra, 1989c).

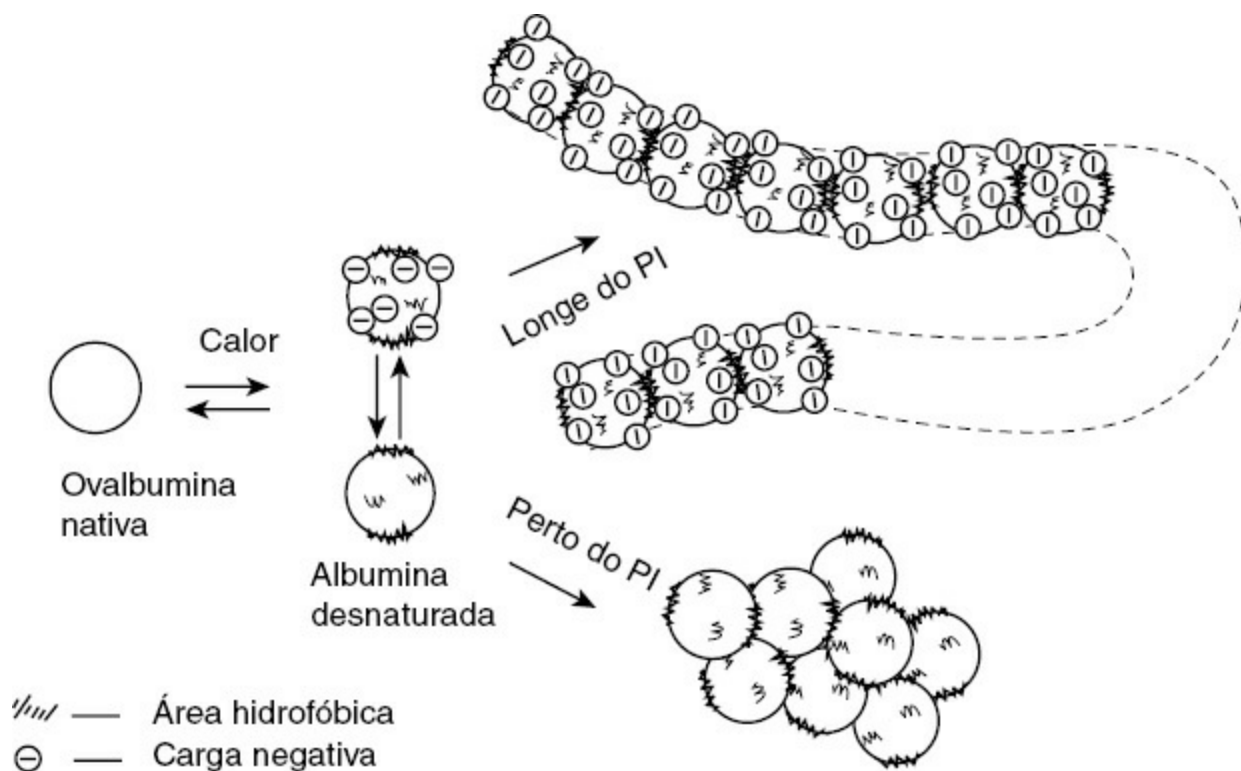


FIGURA 5.5 Modelo de desnaturação induzida por calor e formação de agregados de ovalbumina. Doi e Kitabatake (1989).

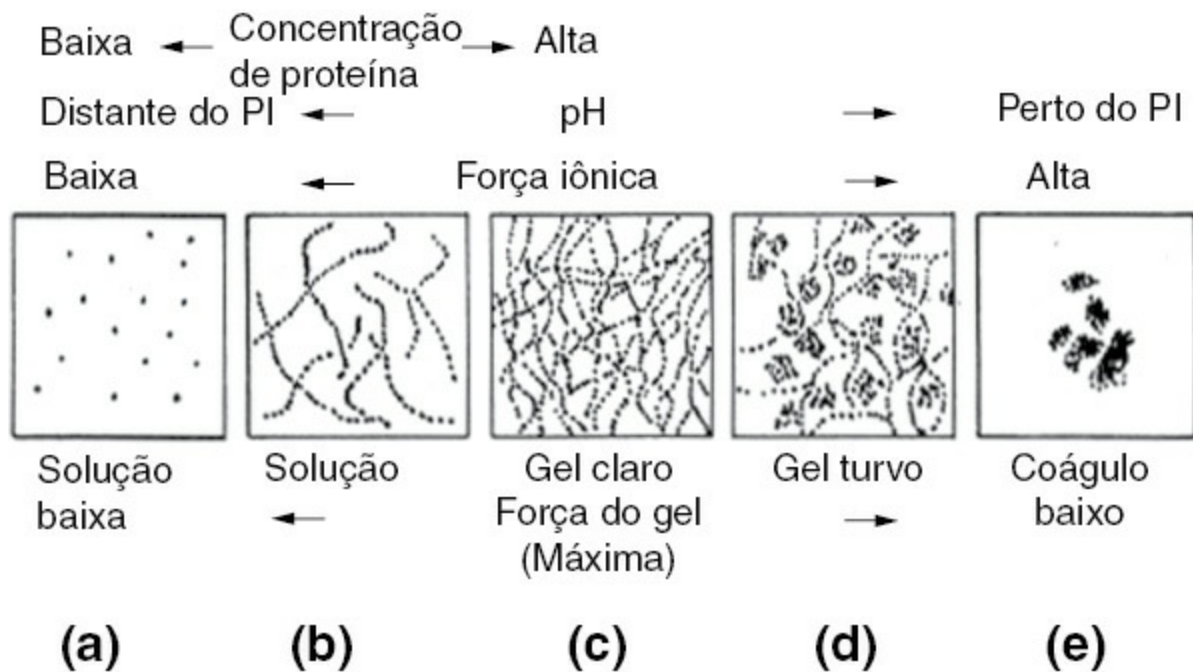


FIGURA 5.6 Fatores que afetam a textura dos géis de ovalbumina induzidos por calor. (a) Em valores de pH distantes do pI e para baixa força iônica, agregados lineares são formados. (b) Com repulsão eletrostática decrescente a baixa força iônica ou a $7,0 > pH > pI$, redes tridimensionais formam um gel transparente. (c) Com força iônica de pH intermediária, formam-se agregados tanto lineares como aleatórios. Neste caso, os agregados lineares formam uma rede de gel de ligação cruzada primária, e os agregados aleatórios se dispersam dentro da rede. O gel misto dos agregados lineares e aleatórios tem aspecto ora translúcido ora opaco, dependendo das quantidades relativas de agregados lineares e aleatórios. (d) Com alta força iônica ou valores de pH próximos de pI , proteínas se agregam para formar um gel turvo composto de agregados aleatórios. Dentre os tipos de gel, o transparente e o opaco/translúcido exibem força de gel e capacidade de retenção de água maiores que os outros. Doi e Kitabatake *et al.* (1989).

1. Efeitos do envelhecimento em ovos

À medida que os ovos envelhecem, as características de gelificação da clara do ovo deterioram e, portanto, ela se torna aguada. Enquanto isso, o pH da clara do ovo aumenta progressivamente de um valor inicial de 7,6 para um valor final de 9,5 (Fromm, 1967). Comparada com as proteínas da clara do ovo, a modificação da ovalbumina aumenta significativamente durante o envelhecimento. A S-ovalbumina foi detectada em clara de ovos após 34 dias de envelhecimento (Rossi e Schiraldi, 1992). A formação de um estado intermediário relativamente estável na clara do ovo durante o envelhecimento é atribuída à conversão de n-ovalbumina em S-ovalbumina. Esta transformação resulta na formação de uma película coesa na interface entre a água e o ar, reduzindo, dessa forma, a estabilidade da formação de espuma (Lomakina e Mikova, 2006). A gelificação e a precipitação da clara do ovo têm início após a desnaturação, e aumentam subsequentemente a viscosidade da clara do ovo.

Mineki e Kobayashi (1998) verificaram que o tempo de estocagem e suas condições podem influenciar a microestrutura da gema do ovo. Um tempo de estocagem mais longo ou o aumento da temperatura resulta na expansão dos espaços intersticiais entre as esferas da gema e a fusão dos grânulos. A membrana de vitelina da gema do ovo torna-se mais elástica e fraca e acaba por desintegrar-se. Kirunda e McKee (2000) observaram que a integridade original da membrana de vitelina desaparece com o envelhecimento. A deterioração da membrana de vitelina como resultado do envelhecimento é influenciada pelos mesmos fatores que causam a degeneração da estrutura do gel da clara do ovo (Feeney *et al.*, 1952). A velocidade de deterioração da membrana de vitelina aumenta com o aumento da temperatura de estocagem (Kirunda and McKee, 2000). Fromm (1967) observou que o peso da membrana de vitelina diminuiu para a metade após 5 dias a 35°C , enquanto a concentração de proteína e hexosamina da membrana de vitelina também decresceu. A deterioração da membrana de vitelina deve-se ao rompimento das ligações cruzadas das fibras que compõem sua estrutura (Fromm, 1967). A degradação da estrutura de glicoproteína II e das ligações de dissulfeto da ovomucina foi atribuída principalmente ao

rompimento da estrutura fibrosa da membrana de vitelina durante o envelhecimento (Kido *et al.*, 1976; Kato *et al.*, 1979). Além disso, o excesso de água que penetra na gema vinda da clara do ovo resulta em diminuição da elasticidade da membrana de vitelina durante estocagem prolongada (Kirunda e McKee, 2000).

2. Efeitos do calor nos ovos

O calor é o maior fator de desnaturação das proteínas. O tratamento térmico das proteínas globulares leva a um aumento da energia livre e do movimento das moléculas de proteína, em resposta ao calor. Assim sendo, a homeostase termodinâmica das proteínas nativas é rompida, pois é mantida por ligações intermoleculares e intramoleculares (Boye *et al.*, 1997). A desnaturação térmica causa o rompimento das ligações originais das proteínas nativas e a formação de uma nova rede tridimensional, resultante de dois tipos de agregações de proteínas, coagulação e gelificação térmica (Boye *et al.*, 1997). O tratamento térmico é geralmente usado na produção comercial de derivados de ovos, para eliminar contaminação por bactérias ou facilitar a produção de produtos específicos desejáveis. É necessária uma nova tecnologia para minimizar os efeitos da desnaturação induzida pelo calor nas proteínas dos ovos. Um método que utiliza tratamento térmico por curto período tem sido usado na preservação dos ovos, colocando-os em água em ebulição durante 5 segundos, de modo a formar uma camada fina próxima à casca do ovo (Romanoff e Romanoff, 1944). O efeito indesejado do tratamento por calor em ovos inteiros é o desenvolvimento de uma camada escura na superfície da gema do ovo, causada pela deposição de resíduos de sulfeto ferroso resultantes da reação entre sulfeto de hidrogênio da clara do ovo e ferro dos grânulos do ovo (Tinkler e Soar, 1920; Burley e Vadehra, 1989c). As subseções a seguir ilustram os efeitos do calor nos componentes individuais dos ovos, assim como gema e clara de ovo misturadas.

a. Efeitos do calor na gema

O tratamento térmico da gema do ovo resulta em alterações nas lipoproteínas da gema. Grande aumento na viscosidade das gemas dos ovos foi observado após aquecimento acima de 65°C e a coagulação ocorreu ao redor de 70°C (Denmat *et al.*, 1999). A causa é a desnaturação induzida pelo calor do LDL e das lipovitelininas na gema do ovo (Burley e Vadehra, 1989c). Contudo, algumas proteínas das gemas dos ovos, como a fosvitina e algumas livetinas, são menos sensíveis ao tratamento a calor. As proteínas da gema do ovo desnaturadas são capazes de formar uma rede com ligações cruzadas, que resulta em gelificação térmica. Nguyen e Burley (1984) demonstraram que as interações sulfidrilas-dissulfeto do LDL desnaturado são responsáveis, em grande parte, pela gelificação da gema do ovo aquecida, uma vez que seu LDL contém grupos de SH utilizados para ligar apoproteínas. Segundo Denmat *et al.* (1999), os grânulos da gema do ovo são menos sensíveis do que o plasma da gema do ovo ao tratamento a calor. Seus variados constituintes possuem sensibilidades diferentes ao tratamento a calor. Tal fato pode ser causado pelas diversas distribuições das proteínas entre os variados constituintes das gemas dos ovos.

b. Efeitos do calor na clara de ovo

Em razão do importante papel das proteínas da clara do ovo na indústria de alimentos, os efeitos do calor na clara do ovo foi extensivamente estudado (Seideman *et al.*, 1963; Shimada e Matsushita, 1980; Egelandsdal, 1980; Mine *et al.*, 1990; Rossi e Schiraldi, 1992). A clara do ovo coagula e gelifica com o calor. Seu tratamento térmico, portanto, pode melhorar a solubilidade em água, a capacidade de formação de espuma e emulsificação dos produtos alimentícios. Os principais componentes das proteínas da clara do ovo, incluindo a ovalbumina e a conalbumina, possuem alta capacidade de coagulação quando aquecidas (Shimada e Matsushita, 1980). Payawal *et al.* (1946) identificaram uma série de alterações descontínuas na clara do ovo induzidas pelo calor. De acordo com tais resultados, a clara do ovo líquida muda de aparência, deixando de ser turva para tornar-se clara depois de

aquecida de 63°C a 70°C. A clara do ovo forma um gel claro na superfície quando atinge a temperatura de 63°C. A precipitação da mistura da clara do ovo iniciou-se com temperaturas entre 63°C e 66°C, mas a aparência de gel claro foi observada a 66°C. Por fim, a clara do ovo formou um coágulo branco acima de 66°C e apresentou aparência sólida branca em temperaturas ainda mais altas. Utilizando calorimetria de varredura diferencial, Donovan *et al.* (1975) observaram que a desnaturação induzida pelo calor, das três principais proteínas constituintes da clara do ovo, foi representada por picos endotérmicos entre 60°C e 100°C. A contribuição destas três proteínas para a total desnaturação da clara do ovo foi de 64,5% da ovalbumina, 16,8% da conalbumina e de 3,7% da lisozima. A ovotransferrina foi a proteína menos estável, com uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 57°C. As globulinas, ovalbuminas e lisozimas apresentaram temperaturas de desnaturação de 72°C, 71,5°C e 81,5°C, respectivamente (Cunningham, 1994). Ovomucoide e ovotransferrina contribuíram menos para a desnaturação da albumina dos ovos, por causa da baixa capacidade de coagulação com o calor.

As interações intermoleculares produzem uma rede tridimensional contínua com estrutura rígida, que possui função de controle na coagulação térmica das proteínas. Diferentes interações químicas, incluindo hidrofóbica, iônica e interações intermoleculares sulfidrilas-dissulfeto, estão envolvidas na agregação induzida pelo calor entre as proteínas heterogêneas da clara do ovo (Shimada e Matsushita, 1980). A formação de um gel com rede de ligações cruzadas é atribuída principalmente às trocas das interações sulfidrilas-dissulfeto na clara do ovo depois do tratamento térmico, enquanto interações hidrofóbicas são as principais responsáveis pela coagulação da albumina do ovo, pois aumentam com a elevação da temperatura (Shimada e Matsushita, 1980). Mine *et al.* (1990) relataram que a desnaturação térmica das proteínas da clara do ovo aumenta significativamente com a exposição dos resíduos hidrofóbicos na superfície das moléculas, e descreveram as alterações da estrutura secundária nas proteínas da clara do ovo durante a desnaturação térmica. O conteúdo de folhas- β aumentou mais de três vezes, enquanto o conteúdo da estrutura helicoidal diminuiu com a elevação da temperatura. De acordo com os resultados, a clara do ovo desnaturada pelo calor continha quantidade considerável de proteínas na forma de estrutura secundária, que formou uma rede de ligações cruzadas por intermédio de ligações dissulfeto, e a rede de estruturas folhas- β foi reforçada pelos resíduos hidrofóbicos expostos. A desnaturação térmica da albumina do ovo é representada pela agregação das proteínas da clara do ovo, resultante da transformação da proteína nativa para um estado de desnaturação.

c. Pasteurização dos ovos por calor

A pasteurização tem sido amplamente utilizada na indústria de produtos de ovos para eliminar a contaminação microbiana e reconhecida, em geral, como um método válido desde o século XX. Entre as bactérias patogênicas, a detecção de *Salmonella* é a preocupação principal na indústria de processamento de ovos, em função da alta prevalência em ovos e seus derivados. As diferenças na composição dos ovos devem ser consideradas quanto à variação das condições de pasteurização (Cunningham, 1994). Uma vez que a *Salmonella* é mais termorresistente em pH levemente ácido ou quase neutro, ela é mais viável em gemas de ovos (pH 6,0) do que em claras (pH 9,1). Por causa da diferença nos valores de pH, dos sólidos e da natureza dos componentes do ovo inteiro, a resistência da *Salmonella* ao calor é diferente na clara e na gema do ovo. Portanto, as condições de pasteurização aplicadas à gema do ovo são mais severas do que as utilizadas para a clara do ovo (Cunningham, 1994). A desnaturação induzida por calor em produtos de ovos também é afetada pelas condições mecânicas do processo de pasteurização, incluindo o tipo de equipamento, a velocidade do fluxo e o diferencial de temperatura entre o meio utilizado para o aquecimento e os produtos dos ovos (Cunningham, 1994).

As mudanças físicas e químicas induzidas pelo calor nas proteínas dos ovos podem afetar de modo adverso a qualidade dos produtos resultantes. A pasteurização da clara do ovo a 60°C resulta em aumento da viscosidade e decréscimo na capacidade de formação de espuma (Burley e Vadehra, 1989c). A redução da capacidade de

formação de espuma é causada pela desnaturação da ovotransferrina durante o processo de pasteurização e a desnaturação irreversível da rede de ovomucina-lisozima (Lomakina e Mikova, 2006).

Íons metálicos podem ser adicionados para restaurar as propriedades de formação de espuma da clara de ovo depois da pasteurização. Durante a pasteurização da clara de ovo líquida, reagentes químicos são, em geral, acrescentados para estabilizar a conalbumina, que forma um complexo termoestável pela ligação com íons metálicos, como o sulfato de alumínio. O peróxido de hidrogênio – conhecido agente bactericida – também é adicionado na clara de ovo líquida para eliminar contaminação microbiana e permitir a pasteurização em temperaturas relativamente baixas. Os padrões de pasteurização para o processamento de ovos já foram estabelecidos em diversos países. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos exige que o ovo inteiro líquido seja aquecido por 3,5 minutos a 60°C (Burley e Vadehra, 1989c; Cunningham, 1994). Nestas condições, os produtos de ovos pasteurizados são considerados seguros para o consumo.

3. Efeitos do congelamento de ovos

O processo de congelamento facilita a preservação e a produção de produtos de ovos. Produtos de ovos congelados são, em geral, produzidos a partir da forma de clara do ovo líquida, gema ou outro ingrediente que contenha ovos nos produtos finais. Depois do congelamento e do descongelamento, a mistura da gema e da clara se torna não homogênea e agregada e possivelmente sofre gelificação.

a. Efeitos do congelamento da mistura do ovo inteiro

Torten e Eisenberg (1982) pesquisaram as alterações induzidas pelo congelamento nas propriedades coloidais do ovo inteiro. Aumentos da viscosidade e da tensão da superfície foram detectados em amostras de ovos inteiros após seu congelamento. Com base em tais resultados, concluiu-se que o processo de congelamento destrói a organização tridimensional dos ovos, e complexos são formados por contatos moleculares ao acaso resultando em aspecto grumoso da mistura gema-clara de ovo após o descongelamento. O processo de congelamento, portanto, pode induzir às maiores alterações de textura nos produtos de ovos. A viscosidade da fração sobrenadante do líquido descongelado da mistura do ovo inteiro é consistente com a mistura do ovo inteiro não congelado. A fração que se precipita da mistura do ovo inteiro, que contém grânulos da gema, não sofre gelificação após ser congelada (Cotterill, 1994). Portanto, a gelificação da mistura do ovo inteiro depende da interação de ambos os componentes, gema e clara. O congelamento não tem efeitos significativos nas propriedades funcionais da mistura do ovo inteiro (Miller e Winter, 1950).

b. Efeitos do congelamento na gelificação da gema do ovo

Durante o congelamento e a estocagem de gemas de ovo a temperaturas inferiores a -6°C, a viscosidade aumenta e ocorre a gelificação. Abaixo dessa temperatura, a gelificação da gema do ovo torna-se irreversível. A gelificação da gema do ovo, no entanto, não ocorre quando congelada a uma velocidade de supercongelamento ou de congelamento rápido (Lopez *et al.*, 1954). A velocidade de congelamento, a temperatura e as condições de descongelamento têm importante função no controle da gelificação da gema do ovo. É preferível minimizá-la, quando utilizada como ingrediente de produtos alimentares. A gelificação irreversível da gema do ovo pode ser controlada com a adição de solutos, tais como sal e sacarose (Burley e Vadehra, 1989c; Cotterill, 1994). Um possível mecanismo é o soluto diminuir o ponto de congelamento dos produtos e, por consequência, inibir a desnaturação da proteína causada pelo congelamento (Burley e Vadehra, 1989c). LDL – a maior lipoproteína da gema do ovo – é o principal componente alterado pelo congelamento. Kamat *et al.* (1976) observaram que a adição

de solutos inibe a gelificação das lipoproteínas da gema do ovo ao aumentar a solvatação nas regiões de interface, formando camadas estabilizadas. Wakamatu *et al.* (1983) estudaram a gelificação do LDL das gemas dos ovos induzida pelo congelamento e os efeitos do sal no processo. As alterações do pH na fase não congelada e a transformação de água em gelo também afetam a agregação do LDL. A formação de cristais de gelo resulta na desnaturação das proteínas e subsequente agregação de lipoproteínas da gema (Cotterill, 1994). Uma alta concentração de sal na fase não congelada rompe os grânulos da gema do ovo. Além disso, o tratamento prévio da gema do ovo com enzimas proteolíticas e lipolíticas pode auxiliar a inibir a gelificação induzida pelo congelamento (Lopez *et al.*, 1955).

Várias interações intra e intermoleculares estão envolvidas na agregação de lipoproteínas da gema do ovo e foram resumidas por Cotterill (1994). O cálcio e a fosvitina da gema do ovo podem contribuir para a formação de pontes intracelulares para combinar proteínas, como foi identificado na fração gelificada da gema (Cotterill, 1994). Ligação hidrofóbica, pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas também contribuem para as interações entre moléculas de proteína na gema gelificada depois do rompimento de seus componentes induzido pelo congelamento (Palmer *et al.*, 1970). Burley e Vadehra (1989c) observaram que o comportamento eletroforético, as propriedades cromatográficas e a aparência no microscópio eletrônico da LDL da gema do ovo são alterados como resultado da gelificação induzida pelo congelamento.

c. Efeitos do resfriamento e congelamento na membrana de vitelina

A deformação da membrana de vitelina e sua perda de elasticidade ocorrem durante a estocagem a frio. No entanto, as alterações na força da membrana de vitelina não é notada durante a estocagem refrigerada. Jones e Musgrove (2005) demonstraram que a resistência da membrana de vitelina mostrou-se estável, sem nenhum decréscimo significativo, após estocagem de até 10 semanas a 4°C em sala refrigerada e com umidade relativa de 80%. Ao contrário, o congelamento causou alterações na resistência da membrana de vitelina, a qual foi reduzida durante estocagem refrigerada prolongada (Jones *et al.*, 2002). A capacidade de retenção de água da membrana isolada aumentou com o congelamento a -18°C (Cotterill, 1994). Assim, as propriedades da membrana de vitelina podem ser alteradas pelo congelamento. Durante um processo de congelamento lento, a formação de cristais de gelo também pode causar danos físicos ao perfurar a membrana de vitelina.

d. Efeitos do congelamento da clara do ovo

As propriedades funcionais da clara do ovo são afetadas pelo congelamento. A estocagem por congelamento resulta em diminuição de sua capacidade de formação de espuma. A quantidade de clara espessa do total da clara do ovo diminui significativamente quando congelada a -16°C e estocada por três meses a -3°C (Moran, 1925). Uma razão considerada é a ocorrência da desnaturação das proteínas, levando à coagulação da clara espessa em condições de estocagem por congelamento (Cotterill, 1994). Wootton *et al.* (1981) observaram que a ovotransferrina foi a proteína mais susceptível e, junto com a ovalbumina, são as responsáveis pelas alterações induzidas pelo congelamento da clara do ovo. Davis *et al.* (1952) determinaram que a formação de cristais de gelo foi o principal fator que causou danos à clara do ovo cozido quando congelada.

4. Efeitos da irradiação nos ovos

Radiação eletromagnética e a ionizante, em dosagem de até 3 kGy, foram aprovadas para uso em ovos com casca, pela US Food and Drug Administration (USDA, 2000). A irradiação tem sido vista como método alternativo ao aquecimento e à pasteurização dos ovos com casca. A irradiação de ovo inteiro com casca influencia as

propriedades físicas do ovo, enfraquecendo a membrana de vitelina e diminuindo cerca de duas vezes a viscosidade da clara do ovo (Burley e Vadehra, 1989c). Observou-se perda de ovomucina, ovotransferrina e ovalbumina analisando-se a clara do ovo após exposição à irradiação, por eletroforese em gel (Burley e Vadehra, 1989c). A viscosidade da clara do ovo após irradiação foi dramaticamente reduzida, porque a desnaturação das proteínas induzida pela irradiação resulta na transformação de parte dos carboidratos e das proteínas e, assim, leva ao rompimento dos complexos de ovomucina (Ma *et al.*, 1990). As alterações na ovomucina induzidas pela irradiação podem ser atribuídas à clivagem de O-glicosídeos da proteína (Wong e Kitts, 2002). Wong e Kitts (2002) reportaram que a irradiação da clara do ovo com doses entre 2 kGy e 4 kGy resulta em perda da clara de ovo espessa acompanhada por aumento nos grupos de SH livres, o que gera redução no volume de espuma e da dureza do gel. Em tal estudo, o número de grupos de SH liberados da clara do ovo não aumentou com a alta dosagem de irradiação.

Uma vez que a desnaturação facilita a formação de um filme rígido na interface, as propriedades funcionais dos ovos frescos, inclusive formação de espuma, atividade de emulsificação, rigidez do gel e volume do bolo de anjo, melhoram com a irradiação (Ma, 1996). No entanto, Min *et al.* (2005) demonstraram que a capacidade de formação e estabilidade da espuma da clara do ovo foi reduzida pelo aumento da dosagem de irradiação. A deterioração da propriedade de formação de espuma foi causada, possivelmente, pelas alterações oxidativas induzidas pela irradiação, nas globulinas, ovomucina e lisozima.

As alterações induzidas pela irradiação na gema do ovo são menos drásticas do que aquelas na clara do ovo. O maior efeito da irradiação na gema do ovo foi a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, o que resulta na formação de hidroperóxidos (Thakur e Singh, 1994). A capacidade de emulsificação e a de gelificação da gema do ovo não são afetadas pela exposição à irradiação. Não foram detectados efeitos significativos da irradiação em ovos congelados ou secos por spray-dryer. Ma *et al.* (1993) demonstraram a não observância de mudanças induzidas em claras de ovos líquidas congeladas submetidas à irradiação, pela análise dos perfis calorimétricos de varredura e eletroforéticos dos componentes de proteínas dos ovos, assim como quanto às propriedades funcionais. No estudo do efeito da irradiação na funcionalidade de gema de ovo líquida congelada, Huang *et al.* (1997) demonstraram que a capacidade de emulsificação de amostras irradiadas foi significativamente maior do que nas amostras não irradiadas durante a estocagem de ovos congelados.

C. Alterações na funcionalidade das proteínas do ovo induzidas por processamento

As propriedades funcionais únicas dos ovos trazem numerosos benefícios para sua aplicação como ingredientes de uma grande variedade de produtos alimentícios. Produtos de ovos incorporados em outros produtos alimentícios podem aumentar os lucros da indústria da alimentação, em razão do alto valor nutricional dos ovos. Quando utilizados como ingredientes, os produtos feitos com ovos podem contribuir com várias funcionalidades, incluindo as propriedades de formação de espuma, gelificação e emulsificação (Tabela 5.6). Os dois principais componentes dos ovos, diretamente responsáveis por suas propriedades funcionais, são as proteínas e os lipídeos. Na indústria da alimentação, há uma preocupação crescente quanto às alterações químicas e estruturais induzidas nos ingredientes dos ovos pelos procedimentos físico-químicos usados no processamento de alimentos, mudanças associadas às modificações das propriedades funcionais dos componentes dos ovos. O principal interesse desta seção é o de melhorar o entendimento das modificações induzidas pelo processamento de alimentos nas propriedades funcionais dos ovos.

TABELA 5.6 Propriedades funcionais atribuídas às proteínas do ovo em sistemas alimentícios

Função	Mecanismos fundamentais	Exemplos
Ligação com água	Pontes de hidrogênio e hidratação iônica	Bolos e pães

Gelificação	Apresamento e imobilização de água, formação de rede	Géis, bolos, produtos de panificação
Adesão, coesão	Adesão hidrofóbica, iônica e de hidrogênio	Massas, produtos de panificação
Emulsificação	Adsorção e formação de película na interface	Bolos, molhos
Espuma	Adsorção e formação de película na interface	Coberturas batidas, sorvete, bolos, sobremesas
Aroma – ligação de sabor	Interações hidrofóbicas, apresamento	Produtos de panificação de baixo teor de gordura, rosquinhas

Reproduzido de American Egg Board (<http://www.aeb.org>).

1. Efeitos da secagem por calor na gelificação

O gel pode ser descrito como um sistema sólido contínuo com ligações cruzadas, que consiste de uma rede tridimensional imersa em um solvente aquoso (Smith, 1994). Géis possuem capacidade de reter a água em produtos alimentícios com propriedades reológicas. A gelificação induzida por calor em proteínas de alimentos costuma ocorrer durante o processamento a calor. A formação de gel inclui dois processos principais: (1) o calor induz à desnaturação das proteínas, o que depende de tempo, temperatura e natureza das proteínas; e (2) as proteínas desenroladas se agregam e formam interações intermoleculares que resultam em desenvolvimento de um coágulo ou gel, dependendo das condições (Raikos *et al.*, 2007). A diferença entre um coágulo de proteína e um gel é que este último possui um sistema de rede ordenado formado pela polimerização de moléculas de proteína, enquanto um coágulo consiste de um sistema de rede com estrutura agregada desordenada (Hayakawa e Nakai, 1985).

As proteínas das claras dos ovos desempenham papel importante na melhoria da consistência dos produtos alimentícios ao formar géis induzidos por calor, que fornecem um meio de reter sabor e manter uma textura homogênea (Sun e Hayakawa, 2002). As proteínas da clara do ovo são as principais responsáveis pelas propriedades de gelificação dos ovos, em razão de sua grande quantidade, flexibilidade, conteúdo de tiol e capacidade de desnaturar e formar uma rede entrecruzada. A ovalbumina – o principal elemento da clara do ovo – tem função fundamental na formação do gel. Os fatores que afetam as alterações na textura de géis de albumina expostos ao calor estão ilustrados na Figura 5.6. A rigidez e a turbidez de géis de ovalbumina induzidas pelo tratamento térmico são influenciadas por fatores, como pH, força iônica e concentração de proteínas (Hatta *et al.*, 1986). A gelificação da ovalbumina e de outras proteínas da clara do ovo induzida por calor é atribuída principalmente às interações moleculares de proteínas desnaturadas. A agregação da ovalbumina após tratamento térmico resulta da interação hidrofóbica e de ligações de dissulfetos por causa da troca de reações sulfidrilas-dissulfetos e da oxidação de sulfidrilas (Sun e Hayakawa, 2002).

Kato *et al.* (1989) foram os primeiros a constatar que a secagem por calor era uma abordagem eficiente para melhorar as propriedades de gelificação da clara do ovo. O processo de secagem por calor pode resultar na formação de géis de ovalbumina firmes e transparentes em uma ampla faixa de pH e de força iônica (Matsudomi *et al.*, 1991). Matsudomi *et al.* (1991) também sugeriram que o mecanismo que o possibilita seja a secagem pelo calor fornecer um equilíbrio entre forças de atração e de repulsão, facilitando a formação de agregados lineares solúveis a partir de ovalbumina parcialmente desenrolada. Tratamentos alcalinos moderados contribuem para o desenvolvimento de géis de ovalbumina firmes e elásticos durante o processo de secagem pelo calor (Mine, 1996; 1997). A gelificação e a polimerização das proteínas foram melhoradas pelo aumento da hidrofobicidade com o tempo de aquecimento e a troca de grupos sulfidrilas-dissulfetos. Watanabe *et al.* (2000) demonstraram que a ovalbumina seca por calor tem efeitos inibitórios na coagulação da ovotransferrina, por interferir na interação das moléculas desta pela formação de ligações de dissulfeto com a ovotransferrina.

2. Efeitos do calor e da formação de espuma

Espumas são sistemas complexos nos quais bolhas de ar dispersas ficam presas por filmes na interface entre ar e

líquido ou fases sólidas contínuas (Davis e Foegeding, 2007). A desnaturação das proteínas dos ovos na interface ar-água ocorre durante os processos de misturar ou de bater, o que leva à introdução de ar na solução de proteína. Como consequência da aplicação de forças mecânicas em uma solução de proteína, que resulta em aumento da energia livre, as proteínas se desenrolam e formam filmes bifásicos por meio da exposição de seus grupos hidrofóbicos à fase do ar, enquanto os grupos hidrofílicos permanecem em fase líquida. As proteínas da clara do ovo são ótimos agentes para a formação de espuma para a indústria de alimentos por causa de sua capacidade de estabelecer interações complexas entre os vários componentes da proteína. A hierarquia das proteínas das claras dos ovos quanto à capacidade de formação de espuma, de baixa a alta, é a seguinte: globulinas, ovalbumina, ovotransferrina, lisozima, ovomucoide e ovomucina (Mine, 1995). As glicoproteínas contêm carboidratos hidrofílicos, que aumentam a viscosidade e a estabilidade da espuma pela ligação com água. As propriedades de formação de espuma das proteínas das claras dos ovos contribuem para a estrutura esponjosa e espumosa nos vários produtos alimentícios, incluindo bolo de anjo, merengues, suflês e musses. Nestes produtos, as proteínas das claras dos ovos são os agentes principais que atuam na superfície, facilitando a estabilização da fase de gás dispersa. A estabilidade da espuma pode ser atribuída a uma variedade de forças, incluindo a viscosidade da fase líquida e as forças eletrostáticas e estéricas existentes entre as proteínas. Entre as proteínas das claras dos ovos, as globulinas e as ovalbuminas contribuem para a formação de espuma, enquanto a ovomucina e a lisozima atuam na estabilidade da espuma e as ovoglobulinas, para aumentar a viscosidade (Yang e Baldwin, 1995).

Os parâmetros que afetam as propriedades formadoras de espuma das proteínas das claras dos ovos incluem as concentrações das proteínas, a espessura do filme, a força iônica, pH, temperatura e outros constituintes dos produtos alimentícios, além das propriedades físico-químicas das proteínas. Kim e Setser (1982) demonstraram que os lipídeos das gemas dos ovos possuem efeitos danosos na capacidade de formação de espuma da clara do ovo. Recentemente, Wang e Wang (2009) também demonstraram que a contaminação da gema do ovo causa impacto significativo nas propriedades de formação de espuma induzidas pelo calor, na clara de ovo fresca. Além disso, fatores intrínsecos também afetam a qualidade de formação de espuma das proteínas das claras dos ovos, incluindo a proporção do albúmen fluido, condições de estocagem, envelhecimento, e genética das galinhas. Como já mencionado, o aumento do conteúdo de albumina S na clara do ovo durante o processo de estocagem prolongada resulta em redução da estabilidade da espuma (Lomakina e Mikova, 2006). Vários estudos têm sido realizados para melhorar as propriedades da formação de espuma da clara do ovo. Kato *et al.* (1994) divulgaram que a secagem da clara do ovo pelo calor pode aumentar a capacidade de formação e estabilidade da espuma cerca de quatro vezes mais sem perda de solubilidade. Um aumento da flexibilidade molecular e da hidrofobicidade superficial após secagem por calor facilita as interações intermoleculares e a formação de um filme coesivo na interface (Kato *et al.*, 1994). Relkin *et al.* (1999) relataram que o tratamento da ovalbumina com calor moderado gera a formação de um estado globular fundido, o qual estava em um estado desenrolado de estabilidade intermediária. A desnaturação parcial da ovalbumina no estado globular fundido, que é reversível, melhora as propriedades de formação de espuma ao aumentar a flexibilidade e hidrofobicidade da superfície (Campbell *et al.*, 2003).

3. Efeitos do calor na emulsificação

Emulsões fluidas são misturas termodinamicamente instáveis de líquidos não miscíveis, dentre eles, lipídeos e água (Mangino, 1994). As moléculas ativas da superfície estão dispersas em um sistema de líquidos imiscíveis e cobrem a interface óleo-água para formar emulsões, processo facilitado por homogeneização mecânica. Compostos anfifílicos, que contêm moléculas polares e não polares, costumam possuir atividade de emulsificação. A gema do ovo é um sistema de emulsificação, no qual o lipídeo está disperso em uma fase aquosa contínua. A gema do ovo contém quantidade substancial de complexos de lipoproteínas e colesterol, além de fosfolipídeos que

são agentes emulsificantes eficientes. A gema do ovo, portanto, é um ingrediente essencial em vários alimentos, incluindo maioneses e molhos para saladas, por estabilizar as emulsões. Para estudar as funções dos diferentes componentes da emulsão da gema do ovo, suas capacidades de emulsificação foram divididas em duas partes: o plasma (LDL e livetinas) e os grânulos (HDL e fosvitina) (Denmat *et al.*, 1999). A interação proteínas-fosfolipídeos e o comportamento da absorção dos componentes da gema do ovo, incluindo HDL, LDL, fosvitina e livetina, contribuem para as propriedades de emulsificação. As condições da capacidade de emulsificação dos componentes dos ovos são similares às propriedades de gelificação e afetam principalmente a formação dos filmes das interfaces. Elas incluem pH, concentração iônica e concentração de proteínas. Mine (1998) estudou os efeitos do pH nas propriedades de emulsificação da gema do ovo e demonstrou que o tamanho das partículas de emulsão formadas pelas proteínas das gemas dos ovos diminuiu à medida que o pH aumentou. Excelente solubilidade do plasma da gema do ovo foi encontrada em faixa usual de pH e concentrações de sal (Sirvente *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento térmico teve efeitos diferentes nas propriedades de emulsificação do plasma e dos grânulos da gema do ovo. Denmat *et al.* (1999) demonstraram que os grânulos da gema do ovo são menos sensíveis ao calor do que o plasma, pois os componentes do HDL e da fosvitina tendem a formar um complexo insolúvel com pontes fósforo-cálcio que protegem as moléculas de proteínas da desnaturação térmica. Com base em seus resultados, os grânulos da gema do ovo possuem maior atividade emulsificante e melhor estabilidade do que o plasma, especialmente em tratamento térmico acima de 72°C. A propriedade emulsificante do plasma não foi afetada pelo aquecimento a 69°C (Denmat *et al.*, 1999). No entanto, depois de aumentar continuamente a temperatura, a solubilidade do plasma diminuiu dramaticamente, o que levou ao aumento da viscosidade em razão da agregação do LDL induzido pela desnaturação térmica.

Mine *et al.* (1991) demonstraram que as proteínas das claras dos ovos possuem capacidade eficiente de emulsificação e podem ser utilizadas como agentes de superfície ativos. As propriedades de emulsificação das proteínas das claras dos ovos são mais resistentes ao calor do que os componentes das gemas dos ovos. Kato *et al.* (1989) demonstraram que a secagem da albumina do ovo pelo calor melhorou a capacidade de emulsificação e a estabilidade da emulsão, em função do aumento da flexibilidade e da hidrofobicidade das proteínas das claras dos ovos. A desnaturação térmica das proteínas das claras dos ovos resultou em aumento da capacidade de absorção da interface óleo-água, causada pela exposição de resíduos hidrofóbicos na fase oleosa (Campbell *et al.*, 2003). A capacidade de emulsificação da ovalbumina da clara do ovo é especialmente influenciada por fatores, como o volume da fase oleosa, a presença de sais e as concentrações de proteína. A secagem da albumina do ovo pelo calor é uma das aplicações da desidratação na produção de alimentos. A desidratação é um método-padrão utilizado no processamento de alimentos para a preservação de seus componentes. O processo de secagem pelo calor é uma abordagem promissora para melhorar a funcionalidade da clara do ovo. Os efeitos benéficos da secagem pelo calor nas propriedades de gelificação, formação de espuma e emulsificação da clara do ovo foram debatidos e resumidos nesta seção. As condições ótimas de secagem da albumina do ovo pelo calor na melhora das funcionalidades das proteínas da clara do ovo é aquecimento a 80°C com conteúdo de umidade de 7,5% (Kato *et al.*, 1989). Um estudo recente demonstrou que as alterações na conformação das proteínas da clara do ovo induzidas pela secagem pelo calor são dependentes do conteúdo de umidade (Plancken *et al.*, 2007). Com base nestes resultados, o conteúdo de umidade considerado ótimo é abaixo de 6,8% durante a secagem da clara do ovo por aquecimento a 80° C.

D. Modificação da funcionalidade da proteína do ovo

Estudos estão sendo realizados para desenvolver novas abordagens para modificar a desnaturação e a agregação das proteínas do ovo com a finalidade de melhorar sua funcionalidade quanto ao preparo de produtos alimentícios com qualidade estável. Os desenvolvimentos buscam principalmente a aplicação de reagentes químicos e de novas técnicas de processamento. Hoje, a abordagem que tem obtido mais sucesso é a utilização da reação de Maillard

para melhorar as propriedades funcionais das proteínas dos ovos.

1. Modificações químicas e físicas dos ovos

Modificações químicas usando carboxilação e succinilação da clara de ovo seca por spray-dryer foram desenvolvidas para melhorar as propriedades de formação de espuma. Ma *et al.* (1986), no entanto, demonstraram que a modificação de carboxilas tem efeitos moderados na melhora das propriedades de formação de espuma da clara de ovo seca por spray-dryer, e que a succinilação causa diminuição da capacidade de formação de espuma e baixa coagulação com o calor. A hidrólise enzimática da clara do ovo tem sido estudada para melhorar a capacidade de formação de espuma da proteína da clara e uma variedade de enzimas tem sido analisada (Lomakina e Mikova, 2006). A aplicação de pepsina em proteínas de alimentos demonstrou ter bons efeitos no aumento da estabilidade da espuma em razão da hidrólise de regiões hidrofóbicas na superfície da proteína (Horiuchi e Fukushima, 1978). A hidrólise da clara do ovo com papaína também parece ter um efeito promissor na capacidade de formação de espuma (Lee e Chen, 2002). Phillips *et al.* (1987) verificaram que a adição de íons de cobre à clara de ovo fresca melhorou a estabilidade da espuma por meio da formação de um complexo cobre-ovotransferrina, que evita a desnaturação da proteína. Knorr *et al.* (2004) relataram que uma combinação de ultrassom e alta pressão contribuiu para uma distribuição mais uniforme de proteínas e lipídeos no ovo inteiro líquido, além de aumentar sua capacidade de formação de espuma.

As propriedades de emulsificação da LDL também melhoram com a aplicação de um tratamento de alta pressão combinado com pH alcalino. Uma diminuição significativa na floculação das gotículas de dispersão de LDL foi detectada com o tratamento descrito anteriormente (Speroni *et al.*, 2005). Consequentemente, a agregação e a desnaturação das proteínas foram aumentadas sem alterar a capacidade da adsorção de LDL na interface óleo-água (Speroni *et al.*, 2005).

Kato *et al.* (1987a) estudaram a modificação das propriedades de emulsificação da fosvitina por meio da neutralização química e enzimática ou pela remoção dos resíduos aniônicos de fosfato. Tais modificações resultaram em impacto significativo na estabilidade da emulsão e diminuição nas propriedades de emulsificação da fosvitina. Kitabatake *et al.* (1989) relataram que a liofilização e a secagem da albumina do ovo por spray-dryer melhoraram as propriedades de emulsificação. Li *et al.* (2004) estudaram os efeitos da combinação de fosforilação e secagem por calor nas propriedades funcionais das proteínas da clara do ovo. Eles demonstraram que a secagem das proteínas da clara do ovo por calor na presença de pirofosfato melhorou suas propriedades de emulsificação ao aumentar a exposição dos resíduos hidrofóbicos na interface óleo-água. A combinação de fosforilação e secagem pelo calor também melhorou a capacidade de formação de gel das proteínas da clara do ovo e levou à formação de um gel transparente resultante da interação hidrofóbica e forças de repulsão eletrostática entre resíduos de fosfato adicionados às proteínas durante o processo.

2. Melhoria das propriedades funcionais dos ovos utilizando as reações de Maillard

A reação de Maillard é uma reação química por meio da qual grupos amino de proteínas interagem com os grupos carbonilas redutores de polissacarídeos para formar ligações cruzadas covalentes (Danehy, 1986). Essa reação tem sido reconhecida como abordagem segura e promissora para a modificação da funcionalidade dos ovos. A reação de Maillard – uma reação de escurecimento não enzimático –, muito aplicada na indústria de alimentos, possui função-chave no desenvolvimento de compostos de sabor e cor em produtos alimentícios. Anteriormente, a reação de Maillard era evitada durante a preservação dos ovos frescos por meio da remoção de carboidratos anterior à pasteurização, porque resultava em reações de escurecimento durante a estocagem. No entanto, pesquisas comprovaram que a adição de carboidratos às moléculas de proteína dos ovos melhora suas

propriedades funcionais, inclusive a emulsificação e a gelificação. A adição de carboidratos às moléculas de proteínas aumenta a natureza anfifílica do complexo das moléculas conjugadas.

Kato *et al.* (1990) aplicaram tal abordagem na preparação de conjugados de ovalbumina-dextrana para melhorar as propriedades funcionais da ovalbumina. A reação de Maillard nas proteínas das claras dos ovos pode facilitar a solubilidade e melhorar a estabilidade ao aquecimento em razão da diminuição da hidrofobicidade dos resíduos de proteína por ligação covalente com moléculas de açúcar hidrofílicas (Campbell *et al.*, 2003). Handa e Kuroda (1999) relataram que a aplicação da reação de Maillard na clara de ovos seca melhoraram as propriedades de gelificação, quando realizada a 55°C e 35% de umidade relativa. Na pesquisa, o grau de polimerização aumentou à medida que o tempo de aquecimento se estendeu. O aumento da polimerização pode ser atribuído às ligações dissulfetos e interações covalentes não dissulfetos. Além disso, Matsudomi *et al.* (2002) verificaram que a modificação de galactomana da clara de ovo seca, utilizando a reação de Maillard, pode melhorar sua capacidade de gelificação. Várias pesquisas demonstraram que a aplicação da reação de Maillard tem impacto positivo nas propriedades de emulsificação da clara do ovo (Kato *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 1999; Begum *et al.*, 2003). Aoki *et al.* (1999) demonstraram que a atividade de emulsificação da ovalbumina foi melhorada pela conjugação de ácido glucurônico por meio da reação de Maillard em determinadas condições. Begum *et al.* (2003) verificaram que a conjugação do ovinibidor com galactomanana sob condições de secagem pelo calor controlada resultou em melhora nas propriedades de emulsificação, com benefícios em potencial para aplicações industriais. Uma explicação possível seria a de que os conjugados anfifílicos formados por interação covalente entre os açúcares e as proteínas são mais bem absorvidos na interface óleo-água, com os resíduos hidrofóbicos expostos na fase do óleo, enquanto as cadeias laterais hidrofílicas interagem com a água.

REFERÊNCIAS

- Addadi, I., Weiner, S., 1992. Control and design principles in biological mineralization. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 153-169.
- Anton, M., 2007. Composition and structure of hen egg yolk. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 1-5.
- Anton, M., Le Denmat, M., Deaumul, V., Pilet, P., 2000. Thermostability of hen egg yolk granules: contribution of native structure of granules. *J. Food Sci.* 65, 584.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumul, V., David-Briand, E., Rabesona, H., 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83, 175-183.
- Anton, M., Castellani, O., Guerin-Dudiard, C., 2007. Phosvitin. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 7-12.
- Aoki, T., Hiidome, Y., Kitahata, K., Sugimoto, Y., Ibrahim, H.R., Kato, Y., 1999. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction. *Food Res. Int.* 32, 129-133.
- Arias, J.L., Fernandez, M.S., 2001. Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure. *World Poult. Sci. J.* 57, 349-357.
- Beekman, J.M., Wijnholds, J., Schippers, I.J., Pot, W., Gruber, M., Ab, G., 1991. Regulatory elements and DNA-binding proteins mediating transcription from the chicken very-low-density apolipoprotein II gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 5371-5377.
- Begum, S., Saito, A., Xu, X., Kato, A., 2003. Improved functional properties of the ovinhibitor by conjugating with galactomannan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1897-1902.
- Belcher, A.M., Wu, X.H., Christenen, R.J., Hansma, P.K., Stucky, G.D., Morse, D.E., 1996. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Lett. Nat.* 381, 56-58.
- Boye, J.I., Ma, C.Y., Harwalkar, V.R., 1997. Thermal denaturation and coagulation of proteins. In: Damodaran, S., Paraf, A. (Eds.), *Food Proteins and their Applications*. Marcel Dekker, New York, p. 25-56.
- Burley, R.W., Vadehra, D.V., 1989. An outline of the physiology of avian egg formation. *The Avian Egg Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, p. 17-23.
- Burley, R.W., Vadehra, D.V., 1989. Egg yolk: biosynthesis and assembly. *The Avian Egg Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, p. 235-268.
- Burley, R.W., Vadehra, D.V., 1989. Processing-induced chemical and other changes to eggs. *The Avian Egg Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, p. 299-336.
- Burley, R.W., Vadehra, D.V., 1989. The albumen: biosynthesis. *The Avian Egg Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, p. 129-145.
- Campbell, L., Raikos, V., Euston, S.R., 2003. Modification of functional properties of egg-white proteins. *Nahrung/Food* 47, 369-376.
- Cook, W.H., Martin, W.G., 1969. Egg lipoproteins. In: Tria, E., Scanu, A.M. (Eds.), *Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems*. Academic Press, London, p. 579-615.
- Cooney, A.J., Leng, X., Tsai, S.Y., Malley, B.W., Tsai, M., 1993. Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 4152-4160.
- Cotterill, O.J., 1994. Freezing egg products. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J. (Eds.), *Egg Science and Technology*. Food Products Press, New York, p. 265-288.
- Cunningham, F.E., 1994. Egg-product pasteurization. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J. (Eds.), *Egg Science and Technology*. Food Products Press, New York, p. 289-315.
- Danehy, J.P., 1986. Maillard reactions: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. In: Chichester, C.O. (Ed.),

- Advances in Food Research. Academic Press, New York, p. 77-124.
- Davis, J.G., Hanson, H.L., Lineweaver, H., 1952. Characterization of the effect of freezing on cooked egg white. *J. Food Sci.* 17, 393-401.
- Davis, J.P., Foegeding, E.A., 2007. Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 54, 200-210.
- Denmat, M.L., Anton, M., Gandemer, G., 1999. Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. *J. Food Sci.* 64, 194-197.
- Dennis, J.E., Xiao, S.-Q., Agarwal, M., Fink, D.J., Heuer, A.H., Caplan, A.I., 1996. Microstructure of matrix and mineral components of egg shells from white leghorn chickens (*Gallus gallus*). *J. Morphol.* 228, 287-306.
- Doi, E., Kitabatake, N., 1989. Structure of gycinin and ovalbumin gels. *Food Hydrocoll.* 3, 327.
- Dominguez-Vera, J.M., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M., Nys, Y., 2000. The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals. *Poult. Sci.* 79, 901-907.
- Donovan, J.W., Mapes, C.J., Davis, J.G., Garibaldi, J.A., 1975. A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.* 26, 73-83.
- Egelandsdal, B., 1980. Heat-induced gelling in solutions of ovalbumine. *J. Food Sci.* 45, 981-993.
- Evens, M.I., O'Malley, P.J., Krust, A., Burch, J.B., 1987. Developmental regulation of the estrogen receptor and the estrogen responsiveness of five yolk protein genes in the avian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8493-8497.
- Feeney, R.E., Weaver, J.M., Jones, J.R., Rhodes, M.B., 1952. Studies of the kinetics of yolk deterioration in shell eggs. *Poult. Sci.* 35, 1061-1066.
- Fothergill, L.A., Fothergill, J.E., 1970. Thiol and disulphide contents of hen ovalbumin: C-terminal sequence and location of disulphide bond. *Biochem. J.* 116, 555-561.
- Fromm, D., 1967. Some physical and chemical changes in the vitelline membrane of the hen's egg during storage. *J. Food Sci.* 32, 52-56.
- Froning, G.W., 2008. Egg products industry and future perspectives. In: Mine, Y. (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, p. 307-320.
- Gautron, J., Nys, Y., 2007. Eggshell matrix protein. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 103-108.
- Gautron, J., Hincke, M.T., Nys, Y., 1997. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect. Tissue Res.* 36, 195-210.
- Gautron, J., Hincke, M.T., Mann, K., Panheleux, M., Bain, M., McKee, M.D., Solomon, S.E., Nys, Y., 2001. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein, isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization. *J. Biol. Chem.* 276, 39243-39252.
- Gautron, J., Hincke, M.T., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J.M., Boldicke, T., Nys, Y., 2001. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connect. Tissue Res.* 42, 255-267.
- Hammershøj, M., Nebel, C., Carstens, J.H., 2008. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. *Food Res. Int.* 41, 522-531.
- Handa, A., Kuroda, N., 1999. Functional improvements in dried egg white through the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1845-1850.
- Hatta, H., Kitabatake, N., Doi, E., 1986. Turbidity and hardness of a heat-induced gel of hen egg ovalbumin. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2083-2089.
- Hayakawa, S., Nakai, S., 1985. Contribution of hydrophobicity, net charge and sulfhydryl groups to thermal properties of ovalbumin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18, 290-295.
- Hernandez-Hernandez, A., Navarro, A.R., Garcia-Ruiz, J.M., 2003. Influence of model proteins on the precipitation of calcium carbonate. *Proceedings of the 16th European Symposium on the Quality of Poultry Meat and 10th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*. Vol. III, 28-34 Saint-Brieuc, France 28-34.
- Hiidenhovi, J., 2007. Ovomucin. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 61-68.
- Hincke, M.T., Wellman-Labadie, O., 2008. Biosynthesis and structural assembly of eggshell components. In: Mine, Y. (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley and Sons, New York, p. 97-128.
- Hincke, M.T., Gautron, J., Tsang, C.P., McKee, M.D., Nys, Y., 1999. Molecular cloning and ultrastructural localization of core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.* 274, 32915-32923.
- Hincke, M.T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J., McKee, M.D., 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biol.* 19, 443-453.
- Horiuchi, T., Fukushima, D., 1978. Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents; effect of structure on foam stability. *Food Chem.* 3, 35-41.
- Huang, S., Herald, T.J., Mueller, D.D., 1997. Effect of electron beam irradiation on physical, physicochemical and functional properties of liquid egg yolk during frozen storage. *Poult. Sci.* 76, 1607-1615.
- Hunter, G.K., 2001. Role of proteoglycan in the provisional calcification of cartilage: a review and reinterpretation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 262, 256-280.
- Huntington, J.A., Stein, P.E., 2001. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B.* 756, 189-198.
- Hunton, P., 2005. Research on eggshell structure and quality: an historical overview. *Braz. J. Poult. Sci.* 7, 67-71.
- Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg.
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Sugimoto, Y., Aoki, T., 1997. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* 45, 89-94.
- Ibrahim, H.R., Thomas, P., Pellegrini, A., 2001. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J. Biol. Chem.* 276, 43767-43774.
- Itoh, T., Miyazaki, J., Sugawara, H., Adachi, S., 1987. Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. *J. Food Sci.* 52, 1518-1521.
- Jones, D.R., Musgrove, M.T., 2005. Effects of extended storage on egg quality factors. *Poult. Sci.* 84, 1774-1777.
- Jones, D.R., Tharrington, J.B., Curtis, P.A., Anderson, K.E., Keener, K.M., Jones, F.T., 2002. Effects of cryogenic cooling of shell eggs on egg quality. *Poult. Sci.* 81, 727-733.
- Juneja, L.R., 1997. Egg yolk lipids. In: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., Kim, M. (Eds.), *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. CRC Press, New York, p. 73-99.
- Juneja, L.R., Kim, M., 1997. Egg yolk proteins. In: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., Kim, M. (Eds.), *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. CRC Press, New York, p. 57-71.
- Kamat, V., Graham, G., Barratt, M., Stubbs, M., 1976. Freeze-thaw gelation of hen's egg yolk low density lipoprotein. *J. Sci. Food Agric.* 27, 913-927.
- Kato, A., Ogino, K., Kuramoto, Y., Kobayashi, K., 1979. Degradation of the O-glycosidically linked carbohydrate units of ovomucin during egg white thinning. *J. Food Sci.* 44, 1341-1344.
- Kato, A., Miyazaki, S., Kawamoto, A., Kobayashi, K., 1987. Effects of phosphate residues on the excellent emulsifying properties of phosphoglycoprotein phosvitin. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2989-2994.
- Kato, I., Schrode, J., Kohr, W.J., Laskowski, M.J., 1987. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 26, 193-201.
- Kato, A., Ibrahim, H.R., Watanabe, H., Honma, K., Kobayashi, K., 1989. New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg

- white by heating in dry state. *J. Agric. Food Chem.* 37, 433-437.
- Kato, A., Sasaki, Y., Furuta, R., Kobayashi, K., 1990. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures. *Agric. Biol. Chem.* 54, 107-112.
- Kato, A., Minaki, K., Kobayashi, K., 1993. Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state. *J. Agric. Food Chem.* 41, 540-542.
- Kato, A., Ibrahim, H.R., Nakamura, S., Kobayashi, K., 1994. New methods for improving the functionality of egg white proteins. In: Sim, J.S., Nakai, S. (Eds.), *Egg Uses and Processing Technologies: New Developments*. CAB International, Wallingford, p. 250-267.
- Kauzmann, W., 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Prot. Chem.* 14, 1-63.
- Kido, S., Janado, M., Nunoura, H., 1976. Macromolecular components of the vitelline membrane of hens eggs I. Membrane structure and deterioration with age. *J. Biochem.* 79, 1351-1356.
- Kim, K., Setser, C.S., 1982. Foaming properties of fresh and commercially dried eggs in the presence of stabilizers and surfactants. *Poult. Sci.* 61, 2194-2199.
- Kirunda, D.F., McKee, S.R., 2000. Relating quality characteristics of aged eggs and fresh eggs to vitelline membrane strength as determined by a texture analyzer. *Poult. Sci.* 79, 1189-1193.
- Kitabatake, N., Indo, K., Doi, E., 1989. Changes in interfacial properties of hen egg ovalbumin caused by freeze-drying and spray drying. *J. Agric. Food Chem.* 37, 905-910.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U., 2004. Application and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 261-266.
- Koseki, T., Kitabatake, N., Doi, E., 1989. Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. *Food Hydrocoll.* 3, 123.
- Lechevalier, V., Croguennec, T., Nau, F., Guerin-Dubiard, C., 2007. Ovalbumin and gene-related proteins. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 51-60.
- Lee, D.C., McKnight, G.S., Palmiter, R.D., 1978. The action of estrogen and progesterone on the expression of the transferrin gene. *J. Biol. Chem.* 253, 3494-3503.
- Lee, W.C., Chen, T.C., 2002. Functional characteristics of egg white solids obtained from papain treated albumen. *J. Food Eng.* 51, 263-266.
- Li, C.P., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Hatta, H., Aoki, T., 2004. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5752-5758.
- Li-Chan, E.C.Y., Kim, H.-O., 2008. Structure and chemical composition of eggs. In: Mine, Y. (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology*. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, p. 1-8.
- Li-Chan, E., Nakai, S., 1989. Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit. Rev. Poult. Biol.* 2, 21-58.
- Li-Chan, E.C.Y., Powrie, W.D., Nakai, S., 1995. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelmen, W.J., Cotterill, O.J. (Eds.), *Egg Science and Technology*. Food Products Press, New York, p. 105-175.
- Lomakina, K., Mikova, K., 2006. A study of the factors affecting the foaming properties of egg white – a review. *Czech. J. Food Sci.* 24, 110-118.
- Lopez, A., Fellers, C.R., Powrie, W.D., 1954. Some factors affecting gelation of frozen egg yolk. *J. Milk Food Technol.* 17, 334-339.
- Lopez, A., Fellers, C.R., Powrie, W.D., 1955. Enzymic inhibition of gelation in frozen egg yolk. *J. Milk Food Technol.* 18, 77-80.
- Ma, C.Y., 1996. Effects of gamma irradiation on physicochemical and functional properties of eggs and egg products. *Radiat. Phys. Chem.* 48, 375.
- Ma, C.Y., Poste, L.M., Holme, J., 1986. Effects of chemical modifications on the physicochemical and cake-baking properties of egg white. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 19, 17-22.
- Ma, C.Y., Sahasrabudhe, M.R., Poste, L.M., Harwalker, V.R., Chambers, J.R., 1990. Gamma irradiation of shell eggs: internal and sensory quality, physicochemical characteristics and functional properties. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23, 226-232.
- Ma, C.Y., Harwalker, V.R., Poste, L.M., Sahasrabudhe, M.R., 1993. Effect of gamma irradiation on the physicochemical and functional properties of frozen liquid egg products. *Food Res. Int.* 26, 247-254.
- McCully, K.A., Mok, C.C., Common, R.H., 1962. Paper electrophoresis characterization of proteins and lipoproteins of hen's yolk. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40, 937-952.
- McReynolds, L., O'Malley, B.W., Nisbet, A.D., Fothergill, J.D., Givol, D., Fields, S., Robertson, M., Brownlee, G.G., 1978. Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature* 273, 723-728.
- Mangino, M.E., 1994. Protein interactions in emulsions: protein-lipid interactions. In: Hettiarachchy, N.S., Ziegler, G.R. (Eds.), *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker, New York, p. 147-180.
- Mann, K., Siedler, F., 1999. The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, 997-1007.
- Martin, W.G., Augustyniak, J., Cook, W.H., 1964. Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk. *Biochim. Biophys. Acta* 84, 714-720.
- Mason, A.B., Woodworth, R.C., Oliver, R.W., Green, B.N., Lin, L.N., Brandts, J.F., Savage, K.J., Tam, B.M., MacGillivray, R.T., 1996. Association of the two lobes of ovotransferrin is a prerequisite for receptor recognition: studies with recombinant ovotransferrins. *Biochem. J.* 15, 361-368.
- Matsudomi, N., Ishimura, Y., Kato, A., 1991. Improvement of gelling properties of ovalbumin by heating in dry state. *Agric. Biol. Chem.* 55, 879-881.
- Matsudomi, N., Nakano, K., Soma, A., Ochi, A., 2002. Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4113-4118.
- Miller, C., Winter, A.R., 1950. The functional properties and bacterial content of pasteurized and frozen whole egg. *Poult. Sci.* 29, 88-97.
- Min, B.R., Nam, K.C., Lee, E.J., Ko, G.Y., Trample, D.W., Ahn, D.U., 2005. Effect of irradiating shell eggs on quality attributes and functional properties of yolk and white. *Poult. Sci.* 84, 1791-1796.
- Mine, Y., 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 225-232.
- Mine, Y., 1996. Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins. *Food Res. Int.* 29, 155-161.
- Mine, Y., 1997. Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2924-2928.
- Mine, Y., 1998. Emulsifying characterization of hens egg yolk proteins in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 12, 409-415.
- Mine, Y., 2002. Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World Poult. Sci. J.* 58, 31-39.
- Mine, Y., Kovacs-Nolan, J., 2006. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen eggs. *World Poult. Sci. J.* 62, 87-95.
- Mine, Y., Rupa, P., 2004. Immunological and biochemical properties of egg allergens. *World Poult. Sci. J.* 60, 321-330.
- Mine, Y., Zhang, J.W., 2001. The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1540-1546.
- Mine, Y., Noutomi, T., Haga, N., 1990. Thermally induced changes in egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.* 38, 2122-2125.
- Mine, Y., Noutomi, T., Haga, N., 1991. Emulsifying and structural properties of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 39, 443-446.
- Mineki, M., Kobayashi, M., 1997. Microstructure of yolk from fresh eggs by improved method. *J. Food Sci.* 62, 757-761.
- Mineki, M., Kobayashi, M., 1998. Microstructural changes in stored hen egg yolk. *Jpn. Poult. Sci.* 35, 285-294.
- Moran, T., 1925. Effect of low temperature on hen eggs. *Proc. R. Soc. Lond. B* 98, 436-456.
- Nguyen, L.T., Burley, R.W., 1984. Studies on the apoproteins of the major lipoprotein of the yolk of hen's egg. *Aust. J. Biol. Sci.* 37, 7-16.
- Nys, Y., Hincke, M., Arias, J.L., Garcia-Ruiz, J.M., Solomon, S., 1999. Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biol. Rev.* 10, 143-166.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M., Hincke, M.T., 2004. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins.

- Comptes Rendus Palevol. 3, 549-562.
- Okubo, T., Akachi, S., Hatta, H., 1997. Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., Kim, M. (Eds.), *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. CRC Press, New York, p. 1-12.
- Palmer, H.H., Ijichi, K., Roff, H., 1970. Partial thermal reversal of gelation in thawed egg yolk products. *J. Food Sci.* 35, 403-406.
- Palmiter, R., 1972. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* 247, 6450-6461.
- Payawal, S.R., Lowe, B., Stewart, G.F., 1946. Pasteurization of liquid-egg products. II. effect of heat treatments on appearance and viscosity. *Food Res.* 11, 246-260.
- Phillips, L.G., Haque, Z., Kinsella, J.E., 1987. A method for the measurement of foam formation and stability. *J. Food Sci.* 52, 1074-1077.
- Plancken, I.V., Loey, A.V., Hendrick, M., 2007. Effect of moisture content during dry-heating on selected physicochemical and functional properties of dried egg white. *J. Agric. Food Chem.* 55, 127-135.
- Raikos, V., Campbell, L., Euston, S.R., 2007. Rheology and texture of hen's egg protein heat-set gels as affected by pH and the addition of sugar and/or salt. *Food Hydrocoll.* 21, 237-244.
- Relkin, P., Hagolle, N., Dagleish, D.C., Laurey, B., 1999. Foam formation and stabilisation by pre-denatured ovalbumin. *Colloid Surf. B. Biointerfaces* 12, 409-416.
- Reyes-Grajeda, J.P., Moreno, A., Romero, A., 2004. Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified *Gallus gallus* eggshell – implications in the calcite mineral growth pattern. *J. Biol. Chem.* 39, 40876-40881.
- Rhodes, M.B., Azari, P.R., Feeney, R.E., 1958. Analysis, fractionation and purification of egg white proteins with cellulose-cation exchanger. *J. Biol. Chem.* 230, 399-408.
- Robey, P.G., 1996. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect. Tissue Res.* 35, 131-136.
- Robinson, D.S., 1972. Egg white glycoproteins and the physical properties of egg white. In: Freeman, B.M., Lake, P.E. (Eds.), *Egg White Glycoproteins and the Physical Properties of Egg White*. British Poultry Science, Edinburgh, p. 65-86.
- Romanoff, A.L., Romanoff, A.J., 1944. A study of preservation of eggs by flash heat treatment. *Food Sci.* 9, 358-366.
- Rossi, M., Schiraldi, A., 1992. Thermal denaturation and aggregation of egg proteins. *Thermochim. Acta.* 199, 115-123.
- Schade, R., Chacana, P.A., 2007. Livetin fractions (IgY). In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 25-32.
- Schutz, G., Nguyen-Huu, M.C., Giesecke, K., Hynes, N.E., Groner, B., Wurtz, T., Sippekl, A.E., 1978. Hormonal control of egg white protein messenger RNA synthesis in the chicken oviduct. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 24, 617-624.
- Seideman, W.E., Cotterill, O.J., Funk, E.M., 1963. Factors affecting heat coagulation of egg white. *Poult. Sci.* 42, 406-417.
- Shawkey, M.D., Kosciuch, K.L., Liu, M., Rohwer, F.C., Loos, E.R., Wang, J.M., Bessinger, S.R., 2008. Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of egg? *Behav. Ecol.* 19, 920-927.
- Shimada, K., Matsushita, S., 1980. Thermal coagulation of egg albumine. *J. Agric. Food Chem.* 28, 409-412.
- Sirvente, H., Beaumal, V., Gaillard, C., Bialek, L., Hamm, D., Anton, M., 2007. Structuring and functionalization of dispersions containing egg yolk, plasma and granules induced by mechanical treatments. *J. Agric. Food Chem.* 5, 9537-9544.
- Smith, D.M., 1994. Protein interactions in gels: protein-protein interactions. In: Hettiarachchy, N.S., Ziegler, G.R. (Eds.), *Protein Functionality in Food System*. Marcel Dekker, New York, p. 209-224.
- Speroni, F., Puppo, M.C., Chappelle, N., Lamballerie, M.D., Castellani, O., Anon, M.C., Anton, M., 2005. High-pressure induced physicochemical and functional modifications of low-density lipoproteins from hen egg yolk. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5719-5725.
- Stein, P.E., Leslie, A.G., Finch, J.T., Carrell, R.W., 1991. Crystal structure of uncleaved ovalbumine at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221, 941-950.
- Stevens, L., 2004. Metabolic adaptation in avian species. In: Stevens, L. (Ed.), *Avian Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, New York, p. 82-99.
- Sugino, H., Nitoda, T., Juneja, L.R., 1997. General chemical composition of hen eggs. In: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., Kim, M. (Eds.), *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. CRC Press, New York, p. 13-24.
- Sun, Y., Hayakawa, S., 2002. Heat-induced gels of egg white/ovalbumins from five avian species: thermal aggregation, molecular forces involved, and rheological properties. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1636-1642.
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Berlutti, F., Valenti, P., 2007. Ovotransferrin. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer, Heidelberg, p. 43-50.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., 1994. Food irradiation chemistry and applications. *Food Rev. Int.* 10, 437-473.
- Tinkler, C.K., Soar, M.C., 1920. The formation of ferrous sulfide in eggs during cooking. *Biochem. J.* 14, 114-119.
- Torten, J., Eisenberg, H.K., 1982. Studies on colloidal properties of whole egg magma. *J. Food Sci.* 47, 1423-1428.
- US Department of Agriculture, Food and Drug Administration, 2000. Irradiation in the production, processing and handling of food: shell eggs, fresh; safe use of ionizing radiation for salmonella reduction. *Federal Register* 65, 45280-45282.
- Vaderhra, D.V., Nath, K.R., 1973. Eggs as a source of protein. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 4, 193-309.
- Wakamatu, T., Sato, Y., Saito, Y., 1983. On sodium chloride action in gelation process of low density lipoprotein (LDL) from hen egg yolk. *J. Food Sci.* 48, 507-516.
- Wang, G., Wang, T., 2009. Effects of yolk contamination, shearing, and heating on foaming properties of fresh egg white. *J. Food Sci.* 74, 147-156.
- Wang, S., Smith, D.E., Williams, D.L., 1983. Purification of avian vitellogenin III: comparison with vitellogenins I and II. *Biochem.* 22, 6206-6212.
- Watanabe, K., Nakamura, Y., Xu, J.Q., Shimoyamada, M., 2000. Inhibition against heat coagulation of ovotransferrin by ovalbumin dry-heated at 120° C. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3965-3972.
- Watanabe, K., Tsuge, Y., Shimoyamada, M., Onizuka, T., Niwa, M., Ido, T., Tsuge, Y., 2004. Amino acid sequence of alpha-ovomucin in hen egg white ovomucin deduced from cloned cDNA. *DNA Seq.* 15, 251-261.
- Watkins, B.A., 1995. The nutritive value of the egg. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J. (Eds.), *Egg Science and Technology*, (4th ed). Food Products Press, New York, p. 177-194.
- Williams, J., 1962. Serum proteins and the livetins in hen's-egg yolk. *Biochem. J.* 83, 346-355.
- Wong, P.Y., Kitts, D.D., 2002. Physicochemical and functional properties of shell eggs following electron beam irradiation. *J. Sci. Food Agric.* 83, 44-52.
- Wootton, M., Hong, N.T., Thi, L.P., 1981. A study of the denaturation of egg white proteins during freezing using differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 46, 1336-1338.
- Xing, J., Wellman-Labadie, O., Gautron, J., Hincke, M.T., 2007. Recombinant eggshell ovocalyxin-32: expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein. *Comp. Biochem. Physiol. B* 172, 172-177.
- Yang, S.C., Baldwin, R.E., 1995. Functional properties of eggs in foods. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J. (Eds.), *Egg Science and Technology*. Haworth Press, New York, p. 405-464.
- Young, A.C., Tilton, R.F., Dewan, J.C., 1994. Thermal expansion of hen egg-white lysozyme comparison of the 19 Å resolution structures of the tetragonal form

of the enzyme at 100K and 298K. J. Mol. Biol. 235, 302-317.

Parte II

Bioquímica dos alimentos processados

Reações de escurecimento em alimentos

N. A. Michael Eskin,^{**} Chi-Tang Ho,[†] Fereidoon Shahidi^{**}

I. INTRODUÇÃO

Reações de escurecimento em alimentos são fenômenos muito difundidos, que ocorrem durante o processamento e a estocagem. Essas reações ocorrem durante o preparo de produtos que contenham carnes, peixes, frutas e vegetais, assim como quando frutas e vegetais frescos sofrem danos mecânicos. O escurecimento afeta o sabor, a aparência e o valor nutricional dos alimentos. No entanto, para alguns alimentos, o escurecimento é uma parte importante do processo de preparo. Por exemplo, no preparo do café, chá, da cerveja e do xarope de bordo e pães tostados, o escurecimento melhora a aparência e o sabor. O escurecimento, até um determinado grau, é considerado desejável no suco de maçã, batatas fritas e batatinha palha. Para controlar ou inibir tais reações, é importante conhecer os mecanismos envolvidos.

Três mecanismos de escurecimento parecem ocorrer com os alimentos, como pode ser observado na Tabela 6.1. O escurecimento do ácido ascórbico ocorre por intermédio da enzima ácido ascórbico oxidase ou direto pelo oxigênio atmosférico e oxidação por ácido ascórbico.

TABELA 6.1 Reações de mecanismos de escurecimento

Mecanismo	Requer oxigênio	Requer grupo amino na reação inicial	pH ótimo
Maillard	–	+	Alcalino
Caramelização	–	–	Alcalino, ácido
Oxidação do ácido ascórbico	+	–	Levemente ácido

II. ESCURECIMENTO NÃO ENZIMÁTICO

Durante o preparo e o processamento dos alimentos, evidencia-se que o fenômeno de escurecimento está associado a produtos aquecidos e estocados. Este fenômeno, conhecido como escurecimento não enzimático, difere das reações catalisadas por enzimas, descritas no Capítulo 10. A importância desta reação na produção de alimentos está amplamente ilustrada pela sua contribuição para o sabor, cor e aroma do café, do caramelo, do pão e dos cereais consumidos no café da manhã. Um controle cuidadoso deve ser exercido para minimizar o escurecimento excessivo, que poderia causar alterações desagradáveis nos alimentos. Nos últimos anos, os estudos voltaram-se consideravelmente aos efeitos deletérios das reações de escurecimento não enzimático nos alimentos (Nursten, 2005). De particular preocupação é a toxicidade e o potencial mutagênico de alguns intermediários formados (Aeschbacher *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1982; Sugimura *et al.*, 1988; Mottram *et al.*, 2002; Tareke *et al.*, 2002; Friedman, 2003). Entretanto, nem todos os intermediários que se formam são danosos à saúde e alguns chegam a apresentar considerável atividade antioxidante (Yamaguchi e Fujimaki, 1974; Kawashima *et al.*, 1977; Lingnert e Eriksson, 1980; Eichner, 1981; Lingnert e Hall, 1986; Yen e Hsieh, 1995; Yoshimura *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2002; 2007; Tagliacruzchi *et al.*, 2010a; 2010b).

Desde a segunda edição deste livro, grande número de pesquisas tem sido publicado sobre sistemas de escurecimento não enzimático. No entanto, nosso conhecimento na área continua fragmentado. Evidências recentes confirmam a existência de três mecanismos principais: a reação de Maillard, a caramelização e a oxidação de ácido ascórbico.

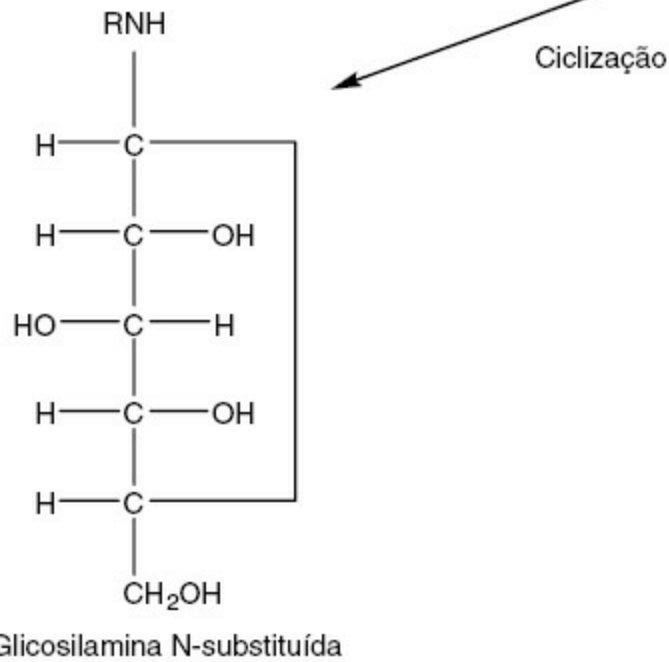
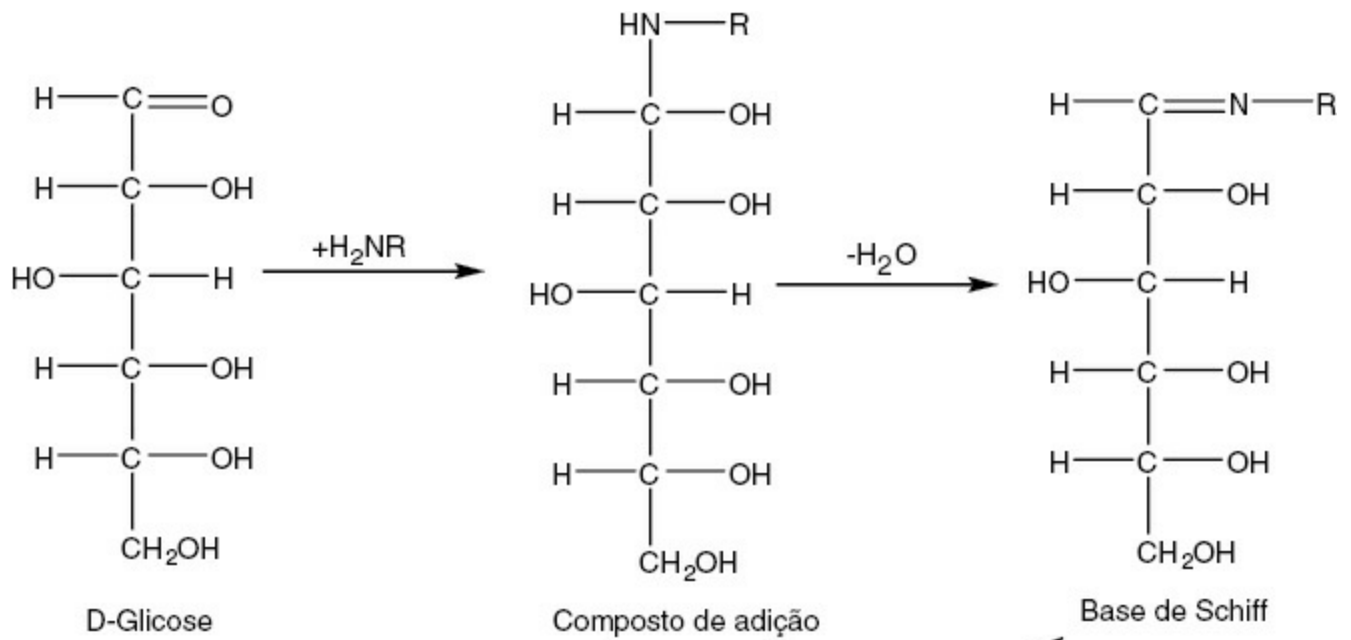
A. Reação de Maillard

A formação de pigmentos marrons e de melanoidinas foi observada pela primeira vez pelo químico francês Louis Camille Maillard (1912), ao acompanhar o aquecimento de uma solução de glicose e lisina (Finot, 2005). Mais tarde, foi denominada de reação de Maillard, e abrange, essencialmente, todas aquelas reações que envolvem compostos de grupos aminos e carbonilas presentes nos alimentos. Elas incluem aminas, aminoácidos e proteínas que interagem com açúcares, aldeídos e cetonas, assim como produtos de oxidação lipídica (Feeney *et al.*, 1975; Hidalgo e Zamora, 2004a; 2004b; 2005; Kwon *et al.*, 1965; Montgomery e Day, 1965). O mecanismo geral do escurecimento foi proposto inicialmente por Hodge (1953) e, depois, revisado por Ellis (1959), Heyns e Paulsen (1960), Reynolds (1963; 1965; 1969), Baltes (1973), Namiki (1988) e Ledl e Schleicher (1990). Apesar da enorme quantidade de pesquisa ligada a esta reação, a sequência da reação original (Esquema 6.1), proposta por Hodge (1953), ainda permanece válida.

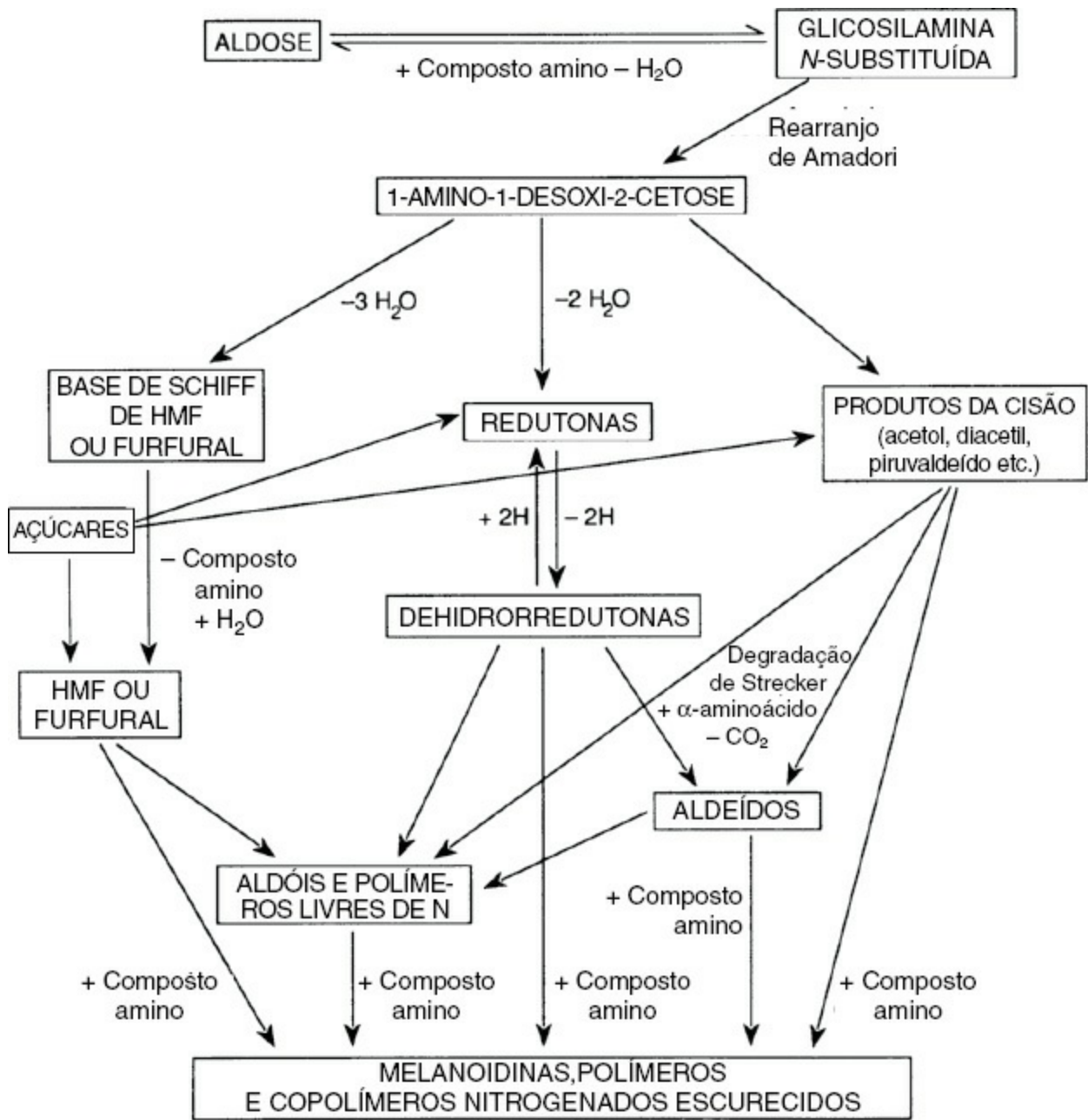
Sua importância em sistemas vivos também tem sido pesquisada extensivamente durante os últimos 30 anos. Essa reação também pode ocorrer *in vivo*; no início, ficou conhecida como glicosilação não enzimática e, mais tarde, como glicação (Tessier, 2010). Os danos aleatórios nas proteínas extracelulares do corpo humano em consequência da glicação possuem implicações importantes no envelhecimento e em doenças crônicas como o diabetes (Brownlee, 2001).

1. Reação de carbonilamina

O primeiro passo da reação de Maillard envolve a condensação entre α -amino grupos de aminoácidos ou proteínas e grupos carbonilas de açúcares redutores, definindo, assim, a reação de carbonilamina. O produto inicial é um composto de adição que perde água com rapidez e que forma uma base Schiff seguida por ciclização para a correspondente glicosilamina N-substituída:



Todas as reações são reversíveis, já que existe um equilíbrio para tais compostos em soluções aquosas.



ESQUEMA 6.1 Escurecimento não enzimático. Baseado em Hodge (1952). Nursten (1981).

2. Mecanismo da reação de carbonilamina

A formação da glicosilamina N-substituída envolve a condensação do grupo amina de aminoácidos com um grupo carbonila de açúcar redutor. Esta reação não é necessariamente restrita aos α -aminoácidos e pode ter a participação de outros amino grupos encontrados em peptídeos e proteínas, o que é facilitado quando o pH do meio está acima do ponto isoeletrico do amino grupo, produzindo, assim, grupos aminos básicos.

As moléculas de proteína são compostas de muitos aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, nas quais os aminoácidos, presumivelmente, estão indisponíveis para interações. Harris e Mattil (1940) observaram que a lisina fornece a maioria dos grupos amina em proteínas, na forma de grupos ϵ -amino, sendo a principal participante na reação. Embora seja um fato, outros aminoácidos com grupos amina adicionais também poderiam participar, por exemplo, a arginina. À medida que a temperatura aumenta, muitos outros aminoácidos tornam-se indisponíveis, o que não pode ser explicado pela clivagem das ligações peptídicas, processo pouco provável mesmo em temperaturas bastante altas. Horn *et al.* (1968) tiveram dificuldade para explicar a rápida e extensa destruição de aminoácidos em proteínas na presença de açúcares, apenas com base nos aminoácidos livres

presentes. Foi sugerido o envolvimento de um grupo comum da ligação peptídica, como o grupo imida, no qual o hidrogênio teria sido substituído por uma parte do carboidrato. O complexo resultante seria responsável por tornar os aminoácidos envolvidos indisponíveis ou por prevenir a hidrólise enzimática da ligação peptídica.

Além dos mecanismos já expostos, a possibilidade de ligações anidridos entre grupos de amino e carboxílicos foi sugerida anteriormente por Harris e Mattil (1940). Mais tarde, foi proposto que elas podem ser consequência da interação entre os grupos de ϵ -amino de lisina e ácidos dicarboxílicos livres na cadeia de proteína. Patton *et al.* (1954) propuseram que tais ligações poderiam envolver ácidos aspártico e glutâmico das proteínas.

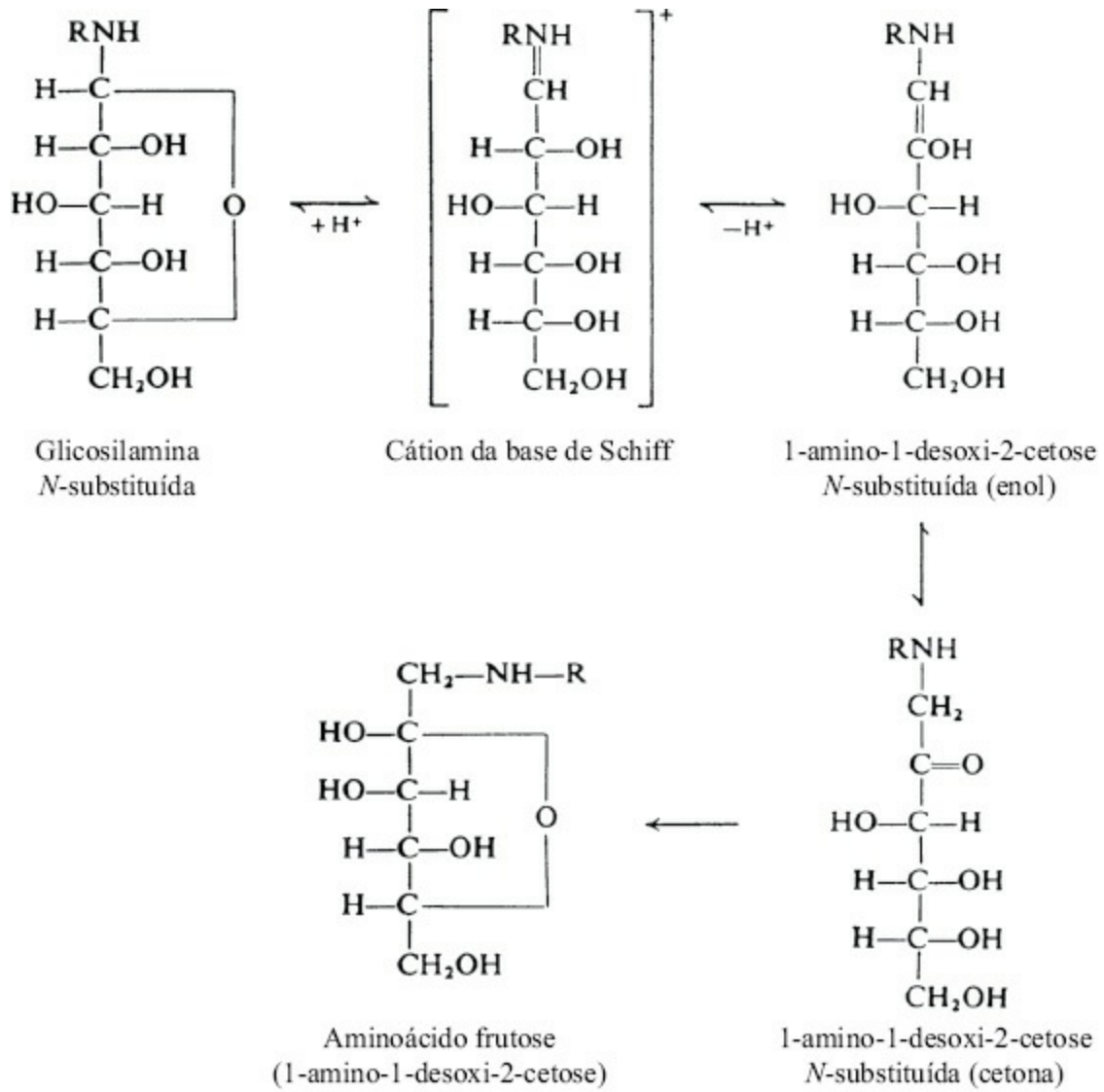
Além de proteínas, oligopeptídeos também foram identificados em uma variedade de hidrolisados de proteínas naturais e artificiais, como frutos do mar, grãos de café, soja e glúten de trigo (Aaslyng *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 2000). Kim e Lee (2009) observaram que a velocidade da reação de Maillard é afetada pelo comprimento da cadeia de peptídeos. Em especial, a reação entre a glicose e a diglicina foi muito maior do que entre a glicina e a triglicina. Este fato sugere que a velocidade da reação pode ser muito influenciada pela extensão da hidrólise da ligação peptídica e pela sua estabilidade, à medida que aumenta o tempo do aquecimento. Por outro lado, também foi observado que apesar de a mistura de diglicina-glicose apresentar maior grau de escurecimento, seguido pela mistura de glicina-glicose e diglicina-glicose, a reatividade geral dos peptídeos para a formação de sabor foi glicina > triglicina > diglicina (Lu *et al.*, 2005). Portanto, o comprimento da cadeia pode ser um fator importante que afeta a reação e a formação de produtos da reação de Maillard (MRPs).

3. Rearranjo de Amadori

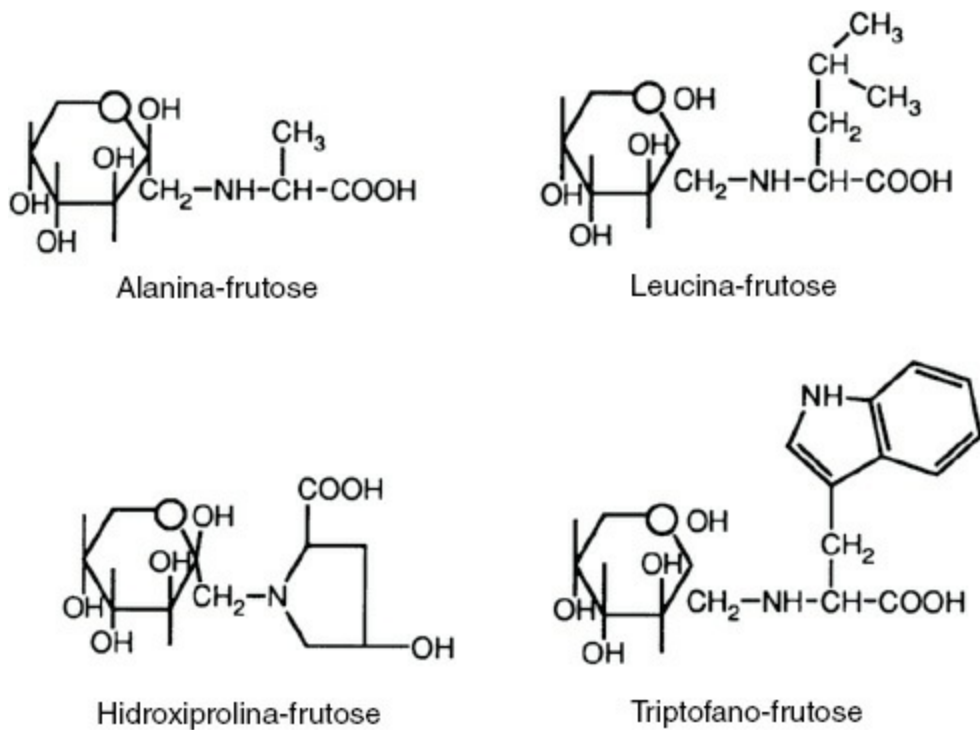
O produto de condensação final da reação de carbonilamina é a glicosilamina N-substituída. Em pouco tempo, evidenciou-se que tal composto, no entanto, é extremamente instável e passa por inúmeros rearranjos, fato que explica por que o poder redutor do sistema caseína-glicose é da mesma ordem que a glicose original (Lea e Hannan, 1950). Estas alterações envolvem a isomerização da glicosilamina N-substituída para o correspondente aminoácido-frutose. A transição de um derivado de açúcar aldose para cetose (Esquema 6.2) é conhecido como rearranjo de Amadori (Weygand, 1940) e envolve a protonação do nitrogênio no carbono 1 (C1). No caso de cetonas e aminas, são formadas cetosilaminas que em seguida sofrem o rearranjo de Heyns e formam 2-amino-2-deoxi aldoses (Reynolds, 1965) por protonação do oxigênio no C6 (Kort, 1970).

O rearranjo de Amadori foi demonstrado em uma série de complexos aminoácidos-glicose sintetizados por Abrams *et al.* (1955). Estas reações resultaram na formação de 1-amino-1-deoxi-2 cetonas, todas reversíveis. Na realidade, esses produtos são bastante estáveis e foram identificados em pêssegos e abricós liofilizados (Anet e Reynolds, 1957), tomate em pó (Eichner *et al.*, 1994), molho de soja (Hashiba, 1978) e leite (Finot *et al.*, 1968). Moll *et al.* (1982) isolaram e purificaram alguns compostos de Amadori, a partir de extratos brutos de sistemas de reação de Maillard utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Estavam incluídos compostos de Amadori de alanina-frutose, leucina-frutose, hidroxiprolina-frutose e triptofano-frutose, cujas estruturas podem ser consultadas no Esquema 6.3. Lee *et al.* (1979) estudaram o desenvolvimento das MRPs durante o processamento de abricós e descobriram que o teor dos compostos de Amadori atingem um valor máximo antes do desenvolvimento da coloração marrom. Em alimentos que contêm proteínas e glicose, um dos compostos de Amadori formado foi o ϵ -frutossil-lisina ou furosina (Olano e Martinez-Castro, 1996). A consequência mais significativa de tal reação é a perda da disponibilidade da lisina (Henle *et al.*, 1991a). Leite, cujo principal carboidrato é a lactose, forma lactulosil-lisina quando aquecido. Compostos de Amadori, como a furosina, são utilizados para avaliar a qualidade de vários produtos alimentícios, dentre eles, laticínios, ovos, cereais, vegetais, tomates, cereais infantis, mel e frutas desidratadas (Molnar-Perl *et al.*, 1986; Resmini e Pellegrino, 1991; Hildago *et al.*, 1998; Guerra-Hernandez *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000; 2001; 2003). Gokmen *et al.* (2008) demonstraram que a formação da furosina em bolinhos estava altamente correlacionada com a quantidade inicial de água da massa

exposta às mesmas condições de cozimento.



ESQUEMA 6.2 Rearranjo de Amadori.



Yaylayan e Locas (2007) demonstraram que 4-hidroxi-alcenais podem ser formados em um sistema não lipídico, a partir de 2-deoxiribose catalisados por aminoácidos. São alterações importantes, incluindo a criação de produtos de peroxidação lipídica que podem gerar adutos de base Schiff com nucleófilos de nitrogênio, por exemplo, aminoácidos e proteínas e, em seguida, sofrer rearranjo de Amadori de compostos similares a vinil. Tais mediadores não contribuem diretamente com o escurecimento e o sabor, entretanto causam perda do valor nutricional, em grande parte em função da indisponibilidade dos grupos ϵ -amino da lisina (Mauron, 1970; Finot e Mauron, 1972; Hurrell e Carpenter, 1974; 1981; Dworschak, 1980; Friedman, 1982; Lee *et al.*, 1982; Plakas *et al.*, 1988).

Compostos de Amadori sofrem, com facilidade, hidrólise ácida, de modo que vários métodos de análise diretos e indiretos foram desenvolvidos (Silvan *et al.*, 2006). Os primeiros métodos para a análise direta dos compostos de Amadori usavam coluna cromatográfica em analisador de aminoácidos (Ellis, 1959; Reynolds, 1959; Moller *et al.*, 1977; Ciner-Doruk e Eichner, 1979; Henle *et al.*, 1991b). O método foi substituído pelo HPLC acoplado com detector eletroquímico ou detector de arranjo de diodo. Os compostos de Amadori também podem ser medidos por bombardeamento rápido de átomos e espectrometria de massa (Staempfli *et al.*, 1994). Recentemente, Davidek *et al.* (2005) desenvolveram uma cromatografia de troca catiônica de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa ou detecção eletroquímica, como método eficiente para analisar compostos de Amadori derivados de açúcares de hexose e de pentose. Determinações indiretas de compostos de Amadori usam métodos rápidos de colorimetria ou fluorimetria (Silvan *et al.*, 2006).

4. Condições para a reação de Maillard

a. pH e sistemas tampões

A reação de carbonilamina pode ocorrer em meio ácido ou alcalino, embora seja favorecida em condições alcalinas quando os grupos amino dos aminoácidos, peptídeos e proteínas estão na forma básica. O aumento do pH também assegura que mais hexoses estejam como cadeia aberta ou na forma redutora (Burton e McWeeney, 1963). Na maioria dos casos, um pH mais alto intensifica o escurecimento por Maillard. Um maior escurecimento foi observado em sistemas leucina-glicose (Renn e Sathe, 1977), lisina-glicose (Ajandouz e Puigserver, 1999), lisina-frutose (Ajandouz *et al.*, 2001) e prolina-glicose (Blank *et al.*, 2003). Efeitos semelhantes foram observados em amostras irradiadas em micro-ondas (Yeo e Shibamoto, 1991a; Zamora e Hidalgo, 1995). No método de cozimento por extrusão, os efeitos do pH foram dependentes da temperatura. Os compostos voláteis aumentaram com o decréscimo do pH a 180°C, mas aumentaram com a elevação do pH a 120°C (Ames *et al.*, 2001). Verificou-se que a adição de tampões nas reações não enzimáticas aumentou a velocidade do escurecimento em sistemas açúcares-aminoácidos em razão da influência do ambiente iônico. Por exemplo, Lee *et al.* (1984) monitoraram a formação de compostos de Amadori monofrutosilisina (MFL) e difrutosilisina (DFL) em misturas de glicose-lisina em diferentes temperaturas e pH. Seus resultados, como demonstrado na Figura 6.1, indicam uma curva de pseudoprimeira-ordem na formação de MFL e DFL, que aumentou de pH 4 para pH 8. Tal padrão foi similar àquele observado na formação de pigmentos.

Um curva de formação de pigmentos em função do pH, no entanto, resultou em uma curva parabólica com pontos de interrupção no pH 6 e no pH 5 em sistemas aquecidos a 100°C e 110°C, respectivamente (Figura 6.2). Usando um sistema de modelo de glicina-glicose, Bell (1997) demonstrou que o tampão fosfato aumentou a velocidade de escurecimento e a perda de aminoácidos em pH 7 e 25°C, enquanto com o tampão citrato, o efeito foi mínimo. A capacidade catalítica do tampão fosfato foi atribuída, em parte, à sua capacidade de agir como catalisador básico no rearranjo de Amadori.

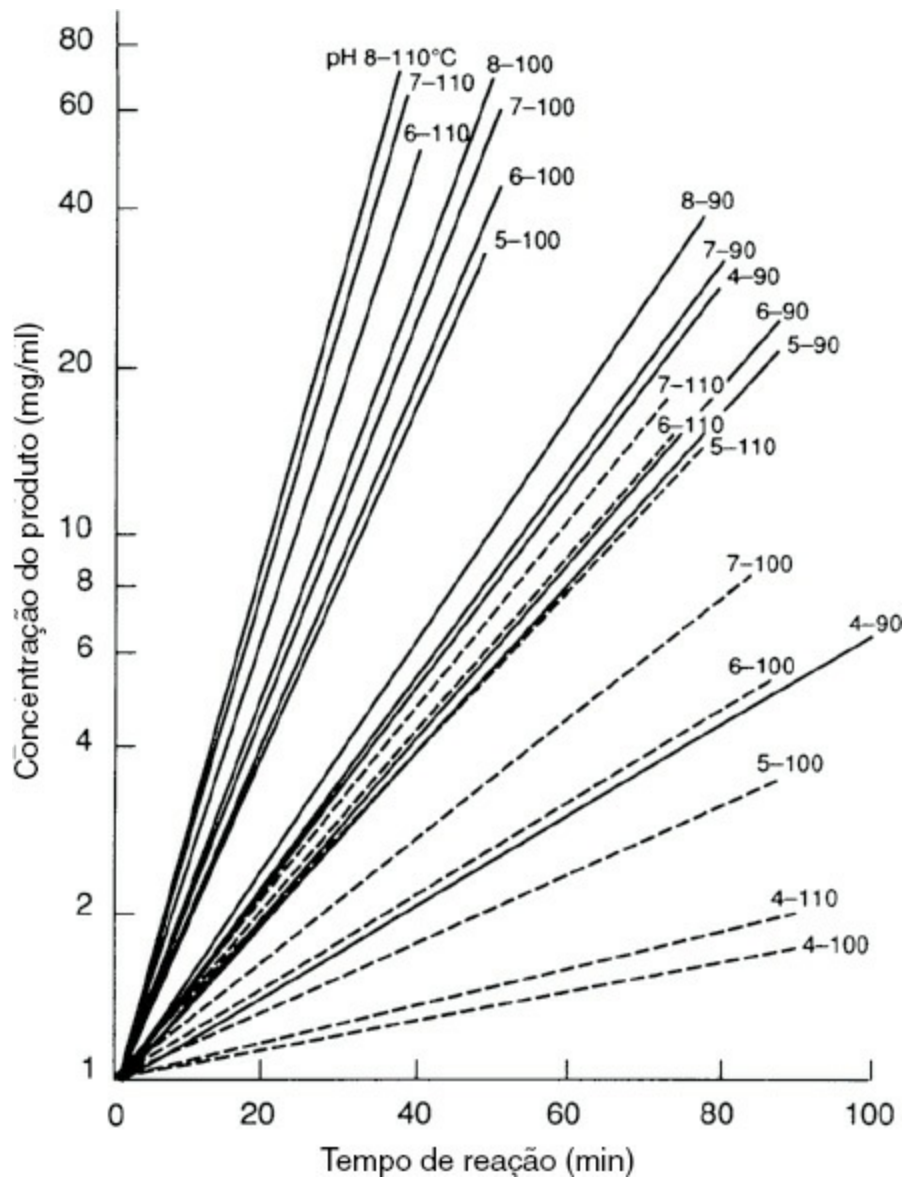


FIGURA 6.1 Formação de monofruosil-lisina (MFL) (—) e difruosil-lisina (DFL) (— —) como função do tempo de reação em diferentes temperaturas e pH. Todas as linhas foram traçadas para melhor ajuste dos pontos dos dados. Reimpressão autorizada por Lee *et al.* (1984). Copyright © The American Chemical Society.

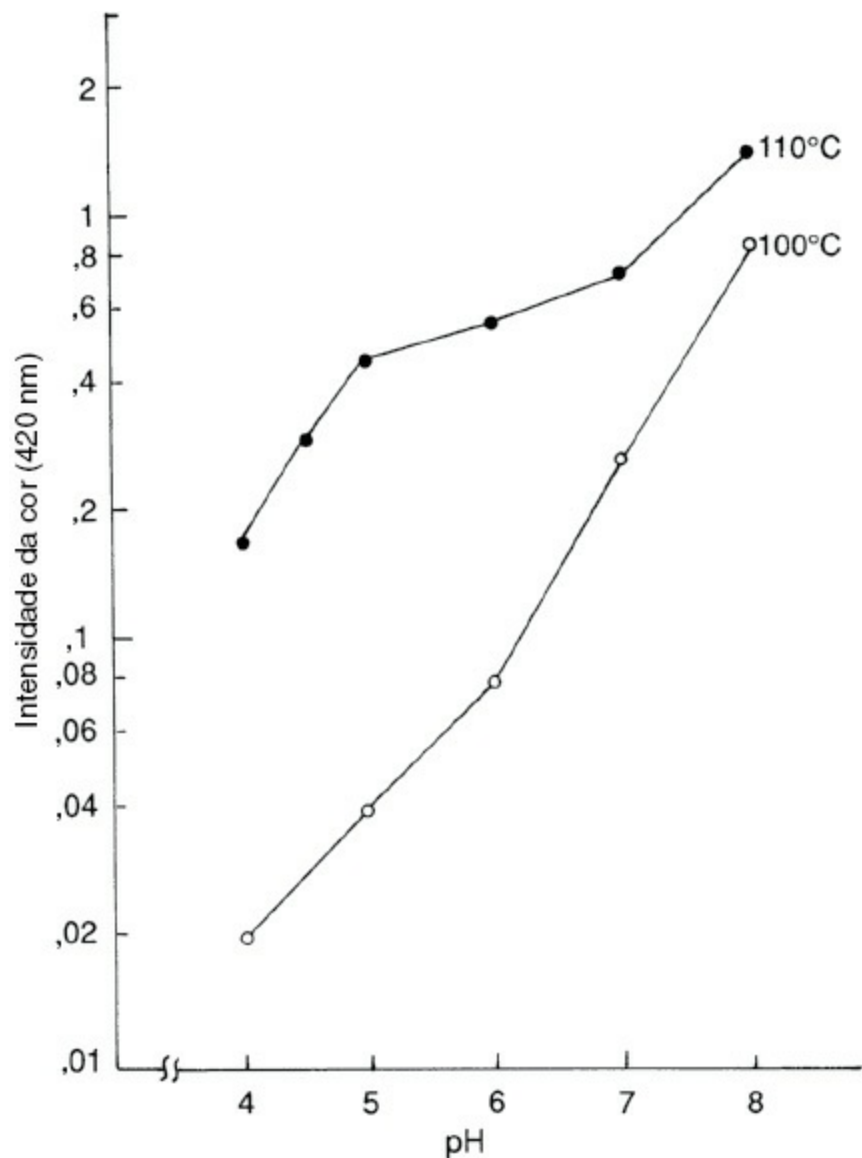


FIGURA 6.2 Alterações na formação de pigmentos como uma função do pH. Reimpressão autorizada por Lee *et al.* (1984). Copyright © The American Chemical Society.

b. Temperatura

A dependência da temperatura foi demonstrada em inúmeros estudos quantitativos, nos quais o aumento da velocidade foi atrelado ao aumento da temperatura. Lea e Hannan (1949) observaram que a diminuição no nitrogênio amino livre em sistemas caseína-glicose segue os padrões da equação de Arrhenius, em uma faixa de temperatura que se estende de 0-80°C, e que existe relação linear entre velocidade da reação em toda a extensão de temperatura. A perda de nitrogênio α -amino apresentou uma energia de ativação de 29 cal/mole no sistema caseína-glicose, enquanto houve um aumento na energia de ativação de 26 a 36 cal/mole durante o escurecimento de produtos de batatas desidratadas com o aumento de umidade (Hendel *et al.*, 1955). Utilizando a formação de hidroximetilfurfural (HMF) como medida do progresso da reação de Maillard, Dworschak e Hegedüs (1974) notaram aumento na energia de ativação para a lisina de 29,4 para 34,8 cal/mole, quando o leite em pó foi aquecido e a umidade aumentada de 2,45% para 5,7%. A quantidade de HMF produzida, no entanto, diminuiu de 43,6% para 34,6%. Hurrell e Carpenter (1974) observaram que a perda de grupos de ϵ -amino da lisina em um sistema de albumina-glicose a 37°C em 30 dias foi quase equivalente à do mesmo sistema aquecido a 121°C por 15 minutos. Em ambos os casos, a perda dos grupos ϵ -amino foi de 80%, enfatizando a importância do tempo de armazenamento e da temperatura. Horak e Kessler (1981) monitoraram a perda de resíduos de lisina durante o aquecimento de leite a 160°C e descreveram-na como uma reação de segunda ordem. Uma curva semilog de

retenção de lisina durante o aquecimento de sistemas de modelo glicose-lisina a 69°C foi demonstrada por Lee *et al.* (1984) como sendo linear durante as primeiras duas horas, com um tempo D de redução decimal extrapolado (tempo necessário para uma redução de 90% da lisina a 69°C) de 3,5 horas (Figura 6.3).

Compostos mais voláteis foram detectados quando xilose e glicose reagiram em temperaturas mais altas (Benzing-Purdie *et al.*, 1985). Os produtos de alta massa molecular formados foram caracterizados por compostos de carbono de diferentes comprimentos e com poucos carbonos insaturados. Um sistema de leucina e glicose também mostrou maior grau de escurecimento a 122°C do que a 100°C (Renn e Sathe, 1997). De modo semelhante, uma mistura de glicose e glicina geraram compostos mais voláteis em temperaturas de reação mais elevadas, de 100°C a 300°C (Tehrani *et al.*, 2002).

c. Conteúdo de umidade

A reação de Maillard ocorre rapidamente em soluções, apesar da desidratação total ou do conteúdo de umidade excessivo inibir o processo (Wolfgram e Rooney, 1953). Lea e Hannan (1949; 1950) estudaram o conteúdo ótimo de umidade para um sistema de caseína-glicose e descobriram que a perda máxima de grupos amino livres ocorreu na faixa de umidade relativa igual a 65% a 70%, o que corresponde a um valor no qual os reagentes ainda estavam em estado seco. Loncin *et al.* (1968) monitoraram o escurecimento de leite em pó a 40°C, em função da atividade da água (a_w) e da lisina por um dia. Seus resultados, ilustrados na Figura 6.4, mostram que a perda de lisina acompanhou o escurecimento e atingiu o nível máximo em a_w de 0,6 e 0,7. Dworschak e Hegedüs (1974) também observaram que a elevação da umidade causou aumento na perda de lisina e de triptofano, com um acréscimo concomitante de formação de HMF e escurecimento. Parece, de modo geral, que tal reação é favorecida em condições ótimas de conteúdo de umidade razoavelmente baixo (Danehy, 1986).

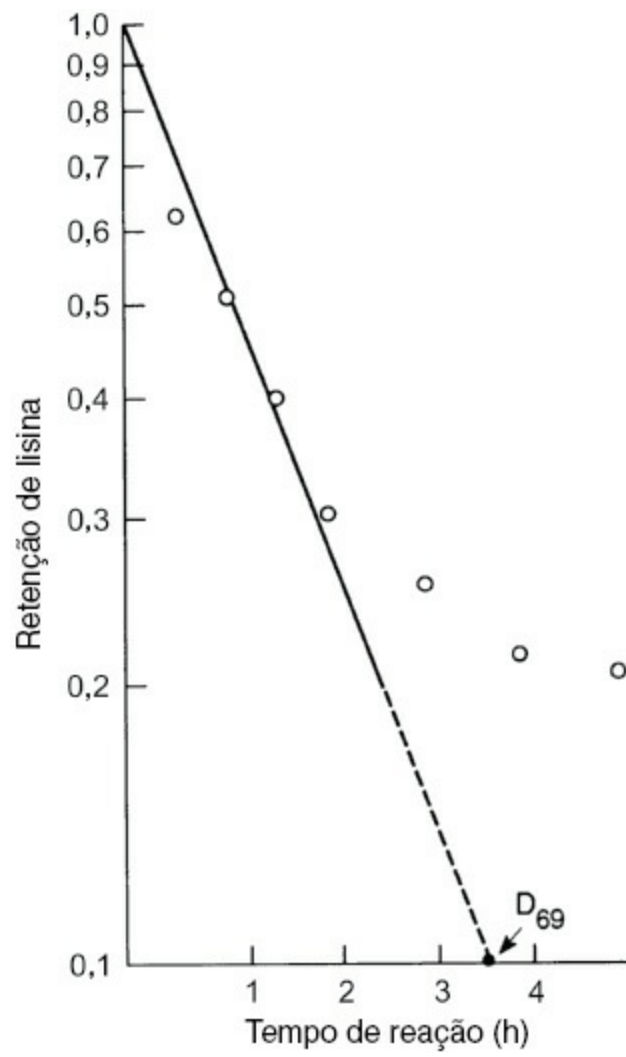


FIGURA 6.3 Retenção de lisina como função do tempo de reação. D_{69} : tempo necessário para uma redução de 90% na concentração de lisina a 69°C. Reimpressão autorizada por Lee *et al.* (1984). Copyright © The American Chemical Society.

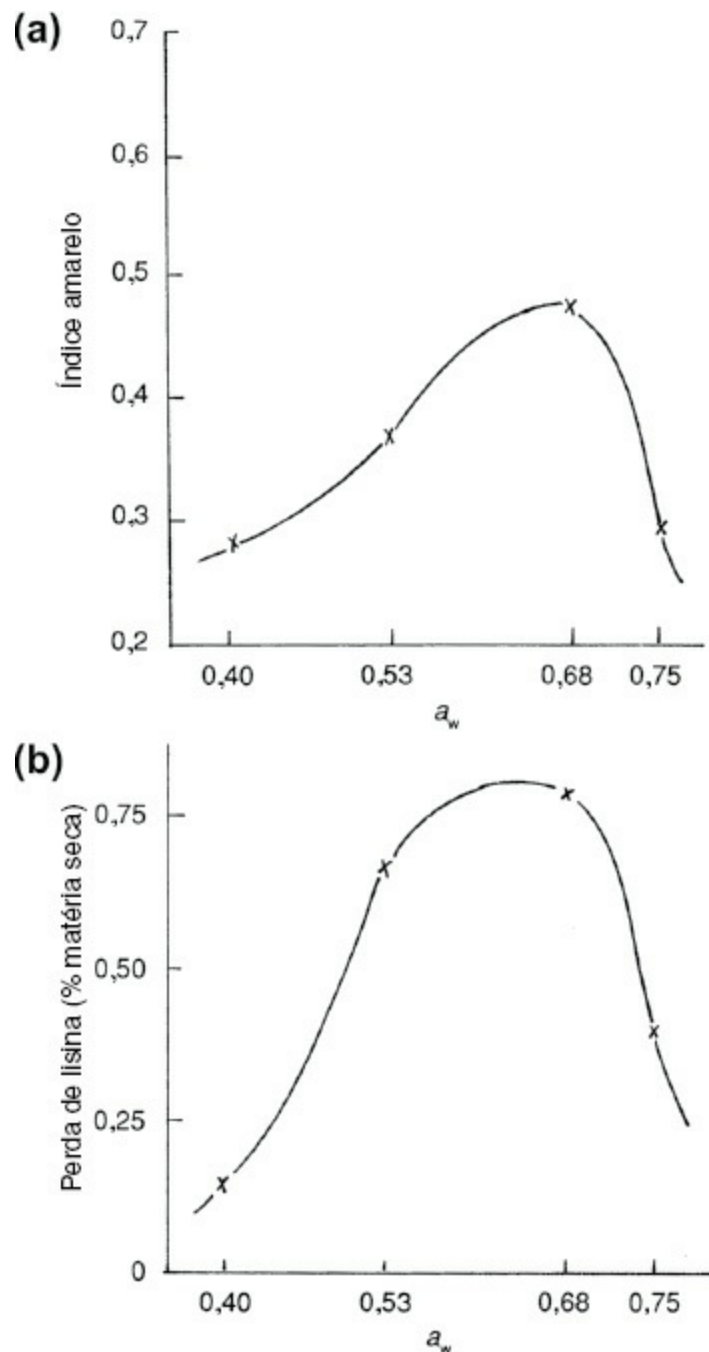


FIGURA 6.4 (A) alteração de cor e (B) perda de lisina livre no leite em pó mantido a 40°C por 10 dias como função da atividade da água (a_w). Lancin *et al.* (1968).

Pesquisas sobre o efeito da água em MRPs voláteis registraram que alterações qualitativas e quantitativas ocorrem no perfil de voláteis de um sistema de modelo sabor de carne com diferentes níveis de umidade (Hartman *et al.*, 1984a; 1984b). A quantidade máxima de substâncias voláteis foi observada a uma a_w de 0,72. Os tipos das principais substâncias voláteis também diferiram: compostos que continham enxofre estavam presentes no sistema com grande quantidade de água, enquanto produtos de desidratação predominaram em sistemas com pequena quantidade. Em um sistema de modelo glicina-glicose, a presença de água aumentou drasticamente a quantidade de voláteis, com furanos como o produto predominante (Ames *et al.*, 2001). O conteúdo de umidade também afetou as reações de Maillard com a utilização de aquecimento com micro-ondas (Yeo e Shibamoto, 1991b; Peterson *et al.*, 1994).

d. Alta pressão

Processamento a alta pressão tem sido objeto de muita atenção, em decorrência de seus efeitos mínimos no sabor

dos alimentos e de sua qualidade nutricional. No entanto, em combinação com outros fatores, a alta pressão pode causar algumas mudanças de sabor.

Segundo Hill *et al.* (1996), o efeito da alta pressão na reação de Maillard varia dependendo do pH do meio. Em um sistema de glicose e lisina com pH variando de 7,0 a 7,5, a alta pressão teve efeitos insignificantes. Contudo, com pH mais alto, a alta pressão acelerou a reação de Maillard, tendo sido observado efeito contrário com pH baixo. Tal fato sugere que a pressão induziu a ionização dos grupos ácidos do sistema, resultando em pH baixo e subsequente redução da velocidade. A dependência do pH no efeito da pressão e nas reações de escurecimento foi confirmada por Moreno *et al.* (2003).

A pressão também pode alterar o perfil de reação de um sistema. Por exemplo, quando soluções de glicose-lisina (com pH inicial de 10,1 e incubado a 60°C) foram submetidas a pressão atmosférica ou a 600 MPa, foram observadas diferenças quantitativas significativas (Hill *et al.*, 1998). Pressão alta também aumentou a formação de tetrametilpirazina em condições ácidas fracas (Huang *et al.*, 1996). Moreno *et al.* (2003) indicaram que produtos de rearranjos de Amadori formaram-se mais rapidamente e degradaram-se em seguida sob alta pressão, resultando em aumento dos produtos intermediários e finais da reação.

e. Campo elétrico pulsado e ultrassom

Com o uso do sistema de modelo asparagina-glicose, Guan *et al.* (2010a) demonstraram que a aplicação de um campo elétrico pulsado com intensidade acima de 30 kV/cm desencadeou aumento significativo na formação de MRPs. Guan *et al.* (2010b) também observaram que tratamentos por ultrassom, a alta intensidade, podem ser utilizados para promover a reação de Maillard em um sistema de modelo glicina-maltose. Contudo, o tempo utilizado em seu estudo (100 minutos) para o tratamento de ultrassom o torna impraticável para objetivos comerciais, de modo que mais pesquisas são necessárias para que haja viabilidade no processo.

f. Açúcares

Açúcares redutores são ingredientes essenciais nas reações, fornecendo os grupos carbonilas para interações com os grupos amino livres de aminoácidos, peptídeos e proteínas. A velocidade inicial da reação depende da velocidade em que o anel de açúcar se abre para a forma oxo ou redutora. Burton e McWeeny (1963) monitoraram a concentração da forma oxo do açúcar utilizando polarografia e descobriram que há elevação com o aumento do pH. A quantidade da forma oxo aumenta muito mais em pentoses do que em hexoses, explicando, assim, a maior reatividade das pentoses nos sistemas de escurecimento, aspecto confirmado por Spark (1969), que observou que a ordem da reatividade é maior em aldopentoses do que em aldohexoses, enquanto dissacarídeos redutores foram muito menos reativos. Tu e Eskin (1973) observaram que os açúcares redutores exercem efeito inibitório na hidrólise da caseína por tripsina em decorrência da indisponibilidade de alguns aminoácidos essenciais, resultante das reações de escurecimento não enzimático. Eles descobriram que a xilose exerce o maior efeito inibitório, seguido pela frutose e pela glicose. Katchalsky (1941) observou que a frutose não se condensa com aminoácidos em soluções diluídas, apesar de cientistas terem confirmado mais tarde a ocorrência de interação (Heyns e Breuer, 1958; Heyns e Noack, 1962; 1964). Shallenberger e Birch (1975) e Bobbio *et al.* (1973) relataram que a d-frutose escurece em uma velocidade muito mais rápida do que a glicose durante os estágios iniciais da reação de escurecimento, mas, em seguida, a velocidade diminui. Este fato foi confirmado por Reyes *et al.* (1982) utilizando sistemas modelos contendo glicose-glicina e frutose-glicina (razão molar de 1:1) a 60°C, pH 3,5 por 280 horas. O sistema de frutose escureceu em uma velocidade muito mais rápida durante o primeiro período de 80 horas, porém depois foi superado pelo sistema de glicose. O padrão de consumo da glicose e da frutose acompanhou a velocidade de escurecimento (Figura 6.5). A diferença entre as perdas foi atribuída à maior polimerização das

melanoidinas derivadas da glicose medidas pela formação de turvação após 240 horas de armazenamento, se comparado com o sistema de frutose, que permaneceu essencialmente claro. Uma turvação semelhante foi observada em um sistema de sacarose-glicina (razão molar de 1:1) resultante da hidrólise da sacarose e da liberação de glicose.

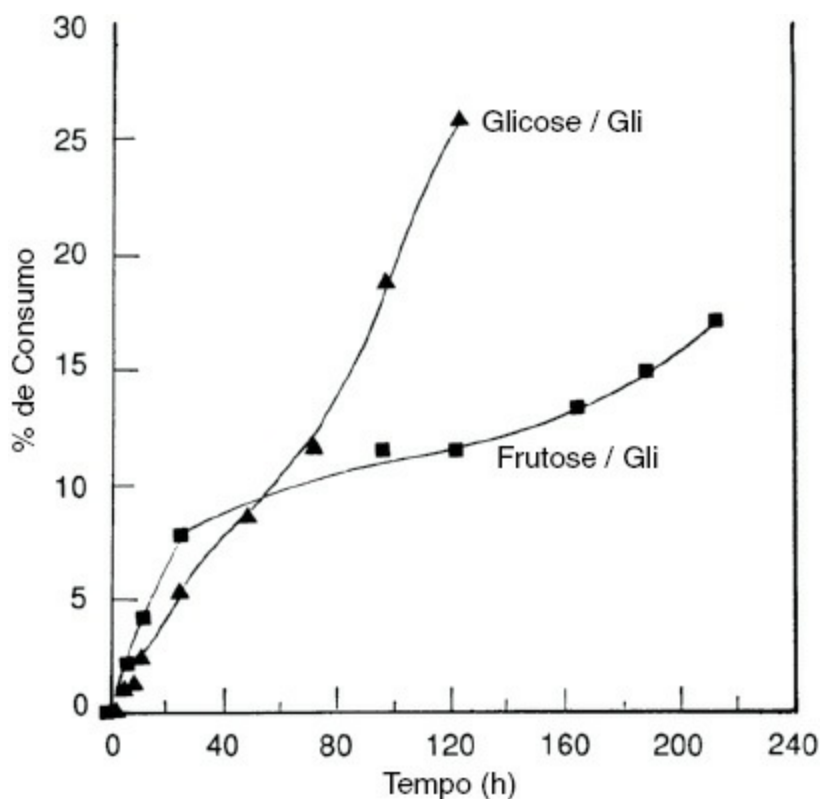


FIGURA 6.5 Consumo de glicose e frutose no sistema glicose e frutose-glicina durante armazenagem a 60 °C e pH 3,5. O percentual de consumo representa a porcentagem de perda individual de açúcar. Reyes *et al.* (1982). Copyright © The Institute of Food Technologists.

Utilizando um hidrolisado de camarão, Laroque *et al.* (2008) examinaram o efeito de cinco açúcares redutores (ribose, xilose, arabinose, glicose e frutose) na cinética da reação de Maillard a 55°C e pH 6,5. Os açúcares de pentose foram todos mais reativos do que os açúcares de hexose correspondentes, com a ribose sendo a mais ativa, seguida pela xilose e pela arabinose (Figura 6.6).

g. Metais

A formação de complexos de metais com aminoácidos pode influenciar a reação de Maillard. A reação é catalisada pelo cobre e pelo ferro e inibida pelo manganês e pelo estanho (Ellis, 1959; Markuze, 1963). A inibição do escurecimento em sistemas de modelos glicose-glicina por quantidades traços de metal foi relatada por Bohart e Carson (1955). Ao utilizar uma mistura de ovalbumina e glicose, Kato *et al.* (1981) examinaram o efeito de Na^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} na velocidade do escurecimento a 50°C e umidade relativa de 65%. A Figura 6.7 mostra que ocorreu uma aceleração do escurecimento na presença de Cu^{2+} e Fe^{3+} , enquanto Na^+ não exerceu nenhum efeito. Íon Fe^{3+} foi mais efetivo do que Fe^{2+} na aceleração da reação de escurecimento, o que indica que a primeira etapa foi uma ativação da oxidação resultando na redução do metal. O escurecimento mais rápido de um sistema de glicose sólida-clara de ovo seca foi atribuído por Kato *et al.* (1978) e por Watanabe *et al.* (1980) à presença de traços de metais na clara do ovo. Além do efeito catalisador do ferro na reação de escurecimento (Hashiba, 1979), também foi demonstrado que o ferro participa como cromóforo do pigmento (Hashiba, 1986). A possível interação do ferro com hidroxipiridona e hidroxipiranona, ambos capazes de quelar ferro no polímero de melanoidina, pode ser responsável pela cor. A presença de tais compostos heterocíclicos havia sido relatada por Tsuchuda *et al.* (1976) após pirólise de melanoidinas não dialisadas.

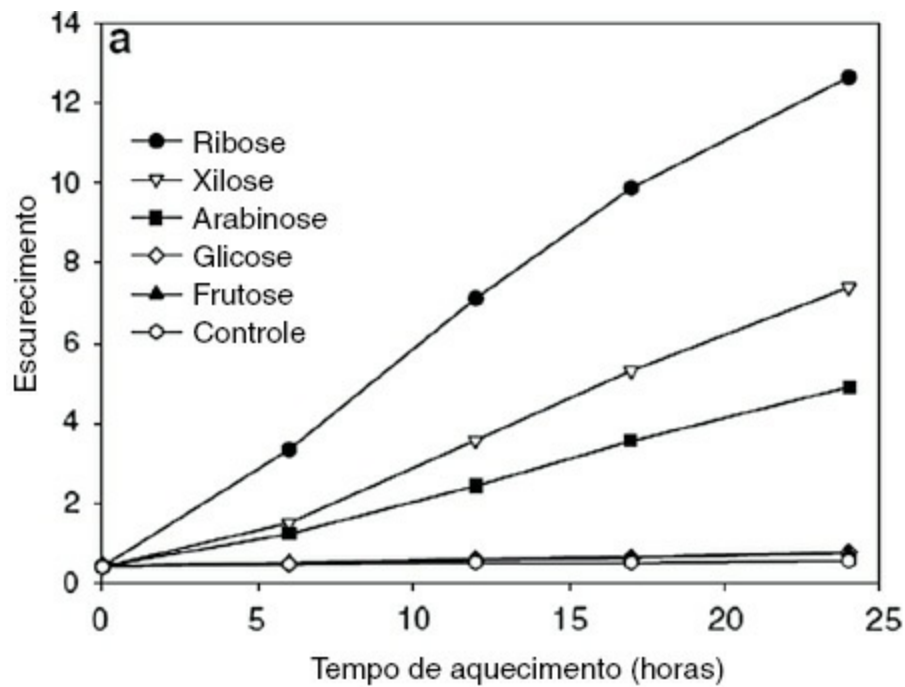


FIGURA 6.6 Efeito de diferentes açúcares no desenvolvimento do escurecimento em um hidrolisado de camarão. O progresso do escurecimento está expresso como absorvância a 420 nm \times fator de diluição. Laroque *et al.* (2008).

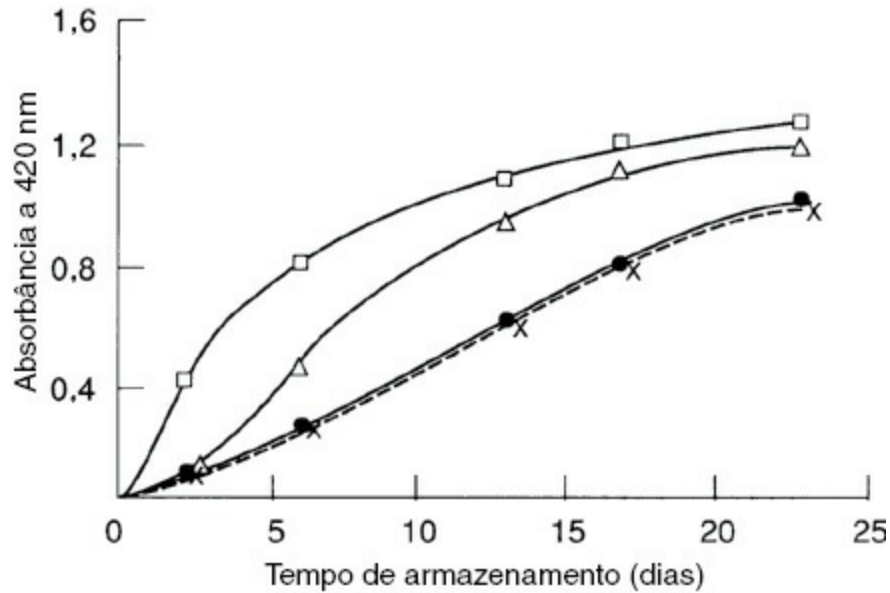


FIGURA 6.7 Efeito de adição de Na^+ , Cu^{2+} , e Fe^{3+} no desenvolvimento da cor escura em misturas ovalbumina-glicose. (OVG), (\times) OVG-Na; (\square) OVG-Cu; (Δ) OVG-Fe. Reimpressão autorizada de Kato *et al.* (1981). Copyright © The American Chemical Society.

A capacidade dos cátions monovalentes e divalentes de prevenir a formação da acrilamida em sistema de modelo frutose-asparagina foi descrita recentemente por Gokmen e Senyuva (2007). Cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , foram capazes de impedir a formação de acrilamida comparados com os cátions monovalentes, Na^+ e K^+ , que apenas reduziram a formação de acrilamida pela metade. Uma explicação foi a capacidade dos cátions de afetar a velocidade de decomposição de um dos precursores da acrilamida, por exemplo, os açúcares redutores.

III. FORMAÇÃO DE PIGMENTOS

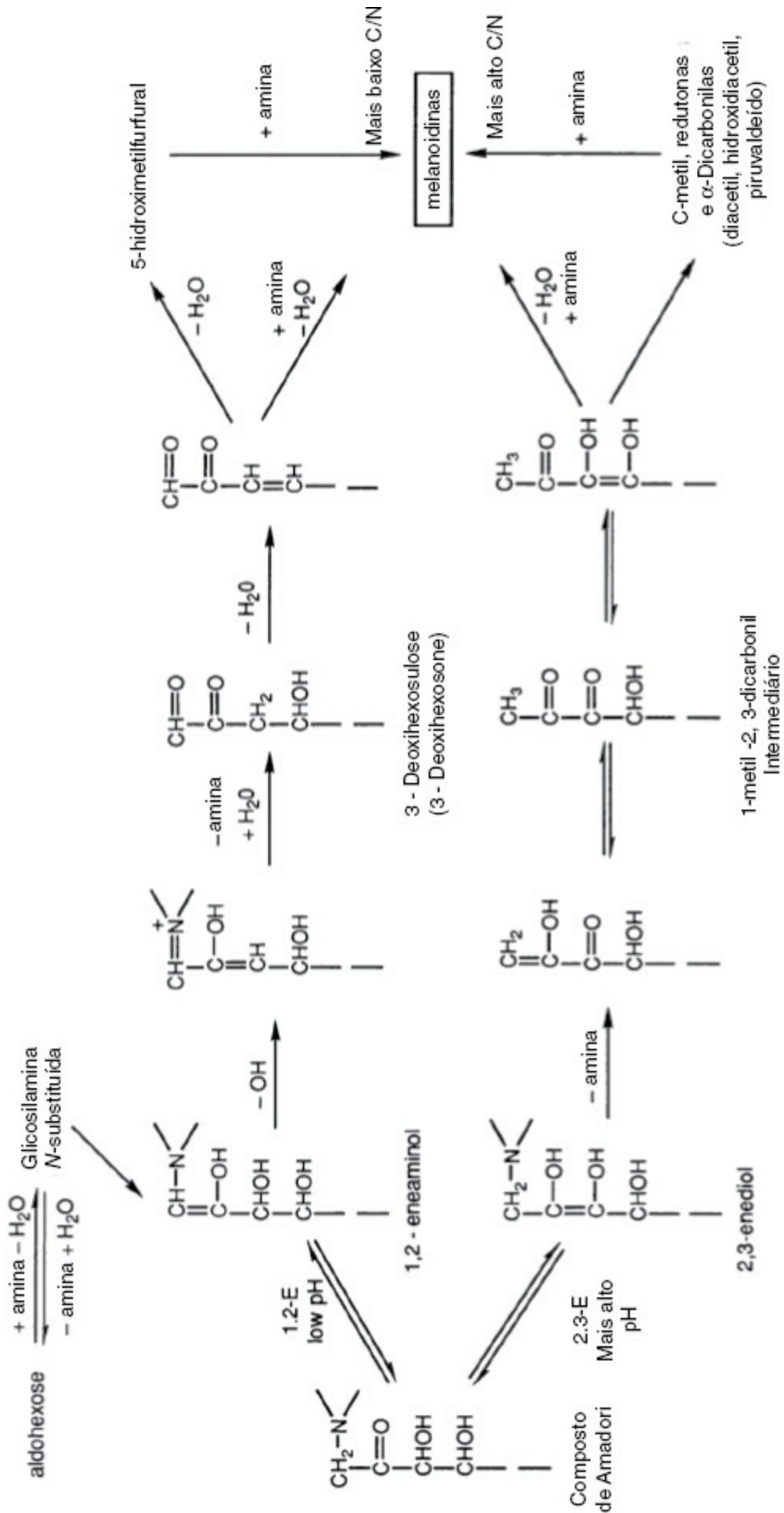
A. Compostos da via de Amadori

As reações envolvidas na conversão de derivados de 1-amino-1-deoxi-1-cetose em pigmentos escuros ou

melanoidinas são extremamente complexas e conhecidas de maneira incompleta. No entanto, três vias diferentes foram sugeridas, duas delas diretamente envolvidas com a formação de pigmentos (Esquema 6.4). Elas incluem diversos intermediários lábeis, que são as formas enol dos compostos de Amadori. Em uma das vias, a enolização de 1-amino-1-deoxi-2-cetose ocorre nas posições 2 e 3 para produzir, de modo irreversível, 2,3-enediol. Este último sofre, em seguida, uma série de alterações, incluindo a perda do grupo amino do C1 para formar um intermediário de dicarbonil metil (Hodge, 1953; Hodge *et al.*, 1963; Simon e Heubach, 1965). A segunda via envolve a formação de 1,2-eneaminol a partir do produto de Amadori no qual um grupo hidroxila é perdido no C3, seguido pela deaminação no C1 e adição de água para formar 3-deoxihexosulose (Anet, 1960; 1964; Kato, 1962). Os derivados da hexose, 1-deoxihexosulose e 3-deoxihexosulose, são muito reativos e sofrem retroaldolização para formar α -dicarbonilas, como glioxal, metilglioxal e 2,3-butanediona (Weenen e Apeldoorn, 1996). As reações subsequentes são complexas e envolvem uma série de reações de polimerização e condensação de aldol. Os produtos finais são compostos nitrogenados que dão origem aos pigmentos marrons escuros. Um pH baixo favorece a via 1,2-eneaminol enquanto um pH alto favorece a via que envolve a conversão de 2,3-enediol a redutonas e a subsequente fragmentação dos furaneol e pironas.

B. Vias alternativas

A formação de radicais livres nas misturas escuras de compostos de carbonilas e aminos ou aminoácidos foi observada pela primeira vez nos anos 1970 por Namiki *et al.* (1973), Namiki e Hayashi (1975) e Hayashi *et al.* (1977). A geração de radicais livres durante os estágios iniciais da reação de ácido carbonilamino para isômeros de d-glicose-ácido aminobutírico foi estabelecida por Milic *et al.* (1978; 1979; 1980). Namiki e Hayashi (1981) estudaram sistemas modelo com alanina e arabinose e obtiveram espectros de ressonância de elétrons spin com 17 e 23 linhas. Estes sinais simples foram atribuídos à presença de radicais de cátion *N,N*-dialquil pirazina, detectados antes da formação dos compostos de Amadori. Os pesquisadores propuseram a formação de um fragmento de açúcar C_2 como precursor de tal radical, que foi confirmado por isolamento e identificação de dialquilimina glioxal. Este fato sugere uma via alternativa para o escurecimento, na qual parte do açúcar da base de Schiff foi clivada antes do rearranjo de Amadori, induzindo à formação de alquilimina glicolaldeído ou ao seu correspondente, a eneaminol (Esquema 6.5) (Namiki e Hayashi, 1983). Pesquisas posteriores realizadas por Hayashi e Namiki (1986) confirmaram a formação de metilglioxal dialquilimina, um composto C_{2n} nos estágios iniciais da reação de Maillard. Pensava-se que a formação do composto C_2 surgisse diretamente do rearranjo de Amadori. Glicolaldeído e metilglioxal, que representam os fragmentos de açúcar C_2 e C_3 , exibiram taxas muito mais rápidas de escurecimento, correspondendo a 2.000 vezes e 650 vezes as de glicose, frutose ou xilose, quando aquecidos com β -alanina (Tabela 6.2). Outro composto, C_3 gliceraldeído, também mostrou taxa de escurecimento 2.000 vezes mais rápida comparada com açúcares correspondentes. Hayashi e Namiki (1986) apresentaram um sumário dos primeiros estágios do escurecimento, no qual concluíram que, em condições ácidas, a via tradicionalmente aceita inclui a formação de osona por intermédio do rearranjo de Amadori. Em condições alcalinas, porém, eles atribuíram o aumento do escurecimento à fragmentação de açúcares em fragmentos de C_2 e C_3 (Esquema 6.6). Danehy (1986), no entanto, sugeriu que seja considerada uma via concomitante com o esquema já estabelecido da reação de Maillard.



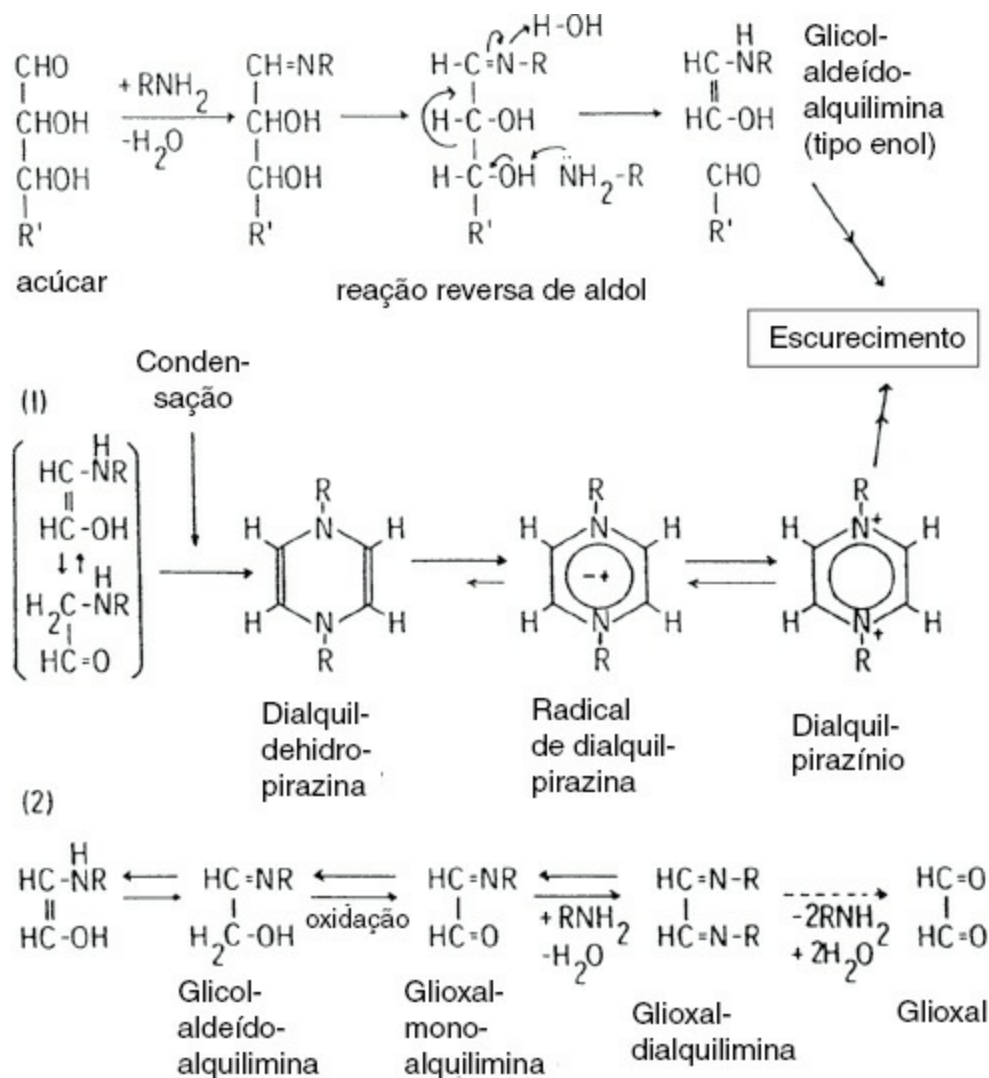
ESQUEMA 6.4 Reação de Maillard: dois caminhos importantes dos compostos de Amadori até as melanoídnas. Baseado em Hodge (1967). Nursten (1981).

TABELA 6.2 Taxas de escurecimento de β-alanina com sistema de açúcar ou carbonila

Composto de açúcar ou carbonila	Temperatura da reação (°C)	Atividade de escurecimento ^a (litros/min)	Valor relativo
Glicose	95	0,019	1
Frutose	95	0,014	0,74
Xilose	95	0,166	8,74
Xilose	80	0,037	
Metilglioxal	80	2,77	654,3
Gliceraldeído	80	8,33	1967
Glioxal	80	0,515	121,6
Glicolaldeído	80	8,93	2109

^a Taxa de escurecimento medida como alteração em absorbância a 420 nm.

Fonte: Hayashi e Namiki (1986).

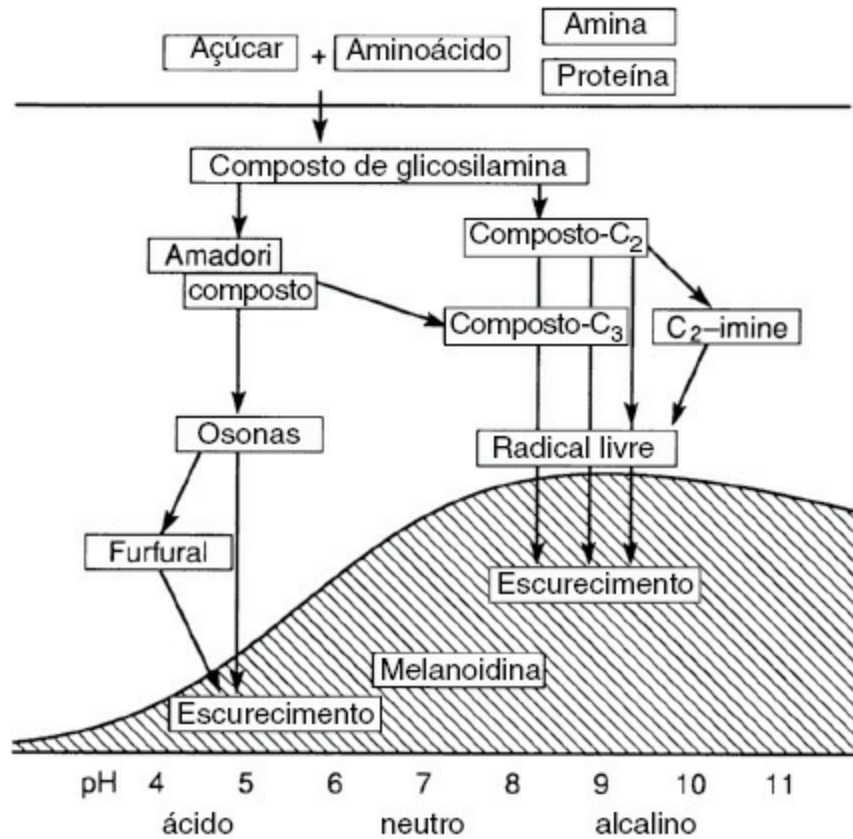


ESQUEMA 6.5 Caminho alternativo para escurecimento. Namiki e Hayashi (1983).

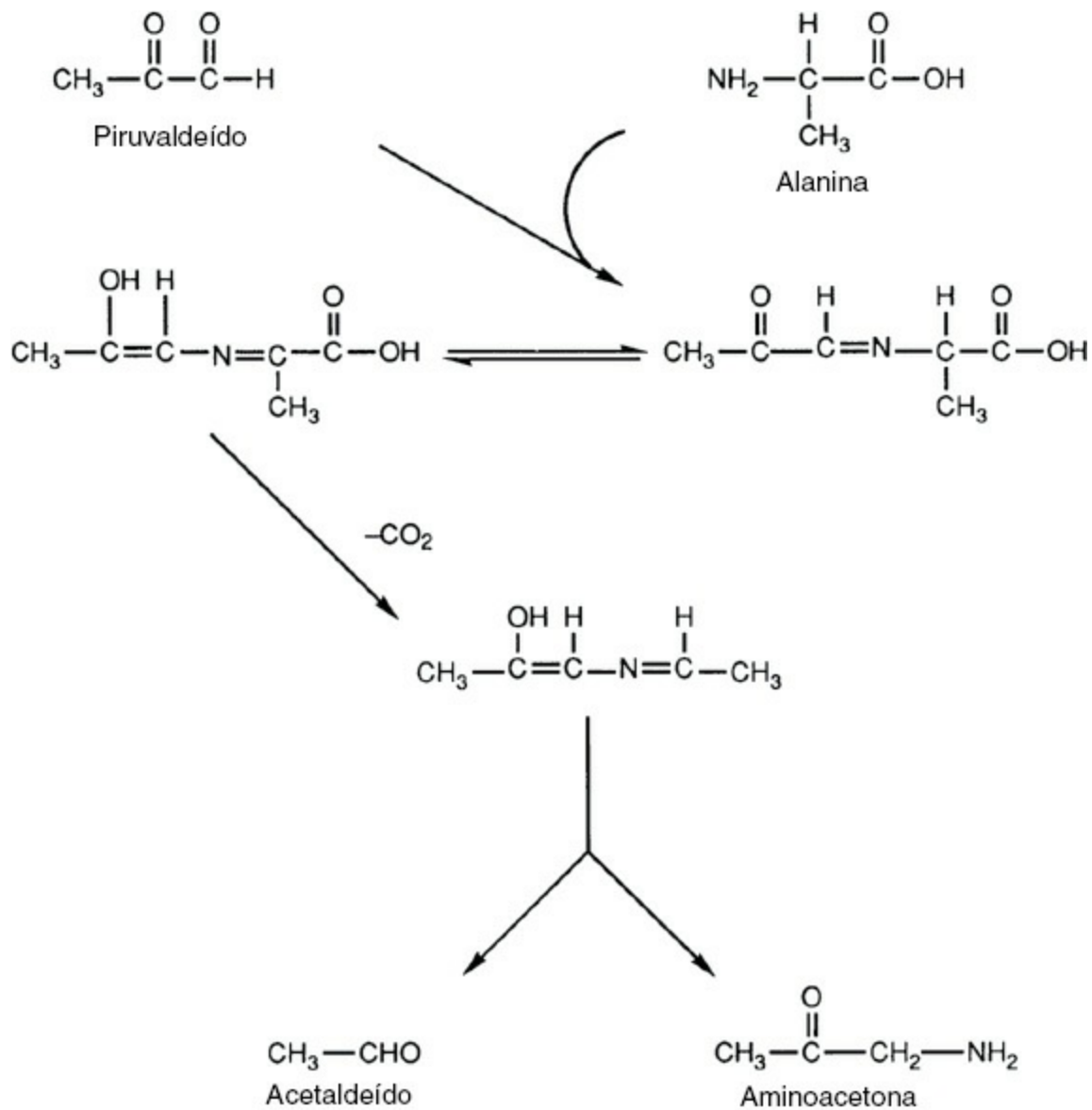
C. Degradação de Strecker

A terceira via da reação de Maillard está relacionada com a degradação oxidativa dos aminoácidos na presença de α-dicarbonilas ou outros compostos conjugados de dicarbonilas formados a partir dos compostos de Amadori. Esta reação é baseada no trabalho realizado originalmente por Strecker há mais de um século, no qual ele observou a oxidação da alanina por aloxan, um fraco agente de oxidação. Conhecida hoje como degradação de Strecker, ela não está envolvida diretamente com a formação de pigmentos, porém fornece compostos redutores essenciais para

sua formação (Rizzi, 2008). A reação inicial contempla a formação de uma base Schiff com o aminoácido. A forma tautomérica final se descarboxila, produzindo o eneaminol, que, em seguida, sofre hidrólise e forma um aldeído com um carbono a menos, junto com um composto de 1-amino-2-ceto (Esquema 6.7). Os aldeídos formados durante a reação de degradação de Strecker contribuem para o sabor. Alguns deles estão descritos na Tabela 6.3 com seus aromas característicos. Há algum tempo, os aldeídos eram considerados os responsáveis diretos pelo aroma de alimentos assados, embora já se saiba que possuem um papel de contribuição como compostos auxiliares dos aromas (Reynolds, 1970; Hodge *et al.*, 1972). Van Praag *et al.* (1968) demonstraram que são os produtos secundários da degradação de Strecker os responsáveis pelo forte aroma do cacau.



ESQUEMA 6.6 Diferentes caminhos para formação da melanoidina dependendo da reação pH. Hayashi e Namiki (1986).



ESQUEMA 6.7 Reação da degradação de Strecker. Adaptado de Schonberg e Moubacher (1952).

Hodge *et al.* (1972) também notaram que a contribuição dos aldeídos de Strecker, isobutíricos, isovaléricos e metional, para aroma de alimentos tostados, é somente auxiliar. A condensação dos intermediários formados pela degradação de Strecker produz muitos compostos heterocíclicos, como os derivados de pirazinas, pirrolinas, oxazóis, oxazolininas e tiazóis, responsáveis pelo aroma dos alimentos aquecidos (Hodge *et al.*, 1972; Maga e Sizer, 1973; Maga, 1982).

A geração de compostos de aroma e de sabor por intermédio da reação de Maillard tem sido baseada primeiramente em misturas de açúcares e de aminoácidos. Izzo e Ho (1992) foram os primeiros a sugerir que a formação do aroma de aminoácidos ligados a proteínas e peptídeos ainda não tinha sido investigada já que, na ausência de aminoácidos, a reação da degradação de Strecker não ocorria. Como foi apontado por van Boekel (2006), tal situação ainda não foi modificada, pois as pesquisas não geraram compostos de aroma específicos de peptídeos ou proteínas.

TABELA 6.3 Aromas e compostos voláteis produzidos de l-aminoácidos em sistemas de reação de Maillard

Aminoácido	Composto volátil	Aroma
Alanina	Acetaldeído	Cevada torrada
Cisteína	Tiol, H_2S	Cárneo
Valina	2-Metilpropanal	

Leucina	3-Metilbutanal	Queijoso
Lisina		Semelhante ao pão
Metionina	Metional	

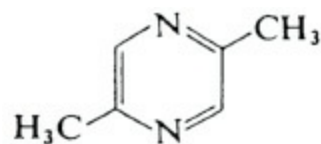
1. Reação de degradação de Strecker e a formação de acrilamida

Tareke *et al.* (2002) foram os primeiros a detectar a acrilamida, neurotoxina e carcinógeno em alimentos aquecidos. O consumo de alimentos com alto conteúdo de acrilamida foi associado a maior incidência de câncer de ovários, endometrial, mamas e rins em seres humanos (Hogervorst *et al.*, 2007; 2008; Olesen *et al.*, 2008). Este fato gerou extensas pesquisas para melhorar a precisão da análise e para compreender melhor sua formação e subsequente redução nos alimentos (Locas e Yaylayan, 2008; Anese *et al.*, 2010; Knol *et al.*, 2010; Pedreschi *et al.*, 2010; Kotsiou *et al.*, 2011). A acrilamida parece ser formada pela degradação térmica da asparagina na presença de compostos de carbonila (Zamora *et al.*, 2011). O Esquema 6.8 ilustra os papéis que os aldeídos de Strecker e os α -cetos ácidos desempenham na conversão de asparagina para acrilamida. A asparagina é, primeiro, descarboxilada em 3-alkilaminopropionamidas ou 3-aminopropionamidas, o que requer carbonilas (Yaylayan *et al.*, 2003) e é deaminada, em seguida, para formar acrilamida. Por sorte, vários métodos foram desenvolvidos para evitar a formação de acrilamida em alimentos aquecidos (Amrein *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2011).

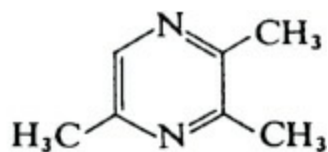
IV. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS

A. Pirazina

Entre os compostos heterocíclicos formados pelos produtos da degradação de Strecker estão as pirazinas. Trata-se de compostos com sabores muito potentes, formados pelos produtos da degradação de Strecker que foram identificados em quase todos os alimentos processados, incluindo produtos de carnes, de soja, de queijos processados, café, batatas, chá e noz-pecã assada (Maga e Sizer, 1973; Maga, 1981; 1982). Dawes e Edwards (1960) identificaram vários substitutos de pirazinas em sistemas de modelos de açúcar-aminoácidos, incluindo 2,5-dimetilpirazina e trimetilpirazina.

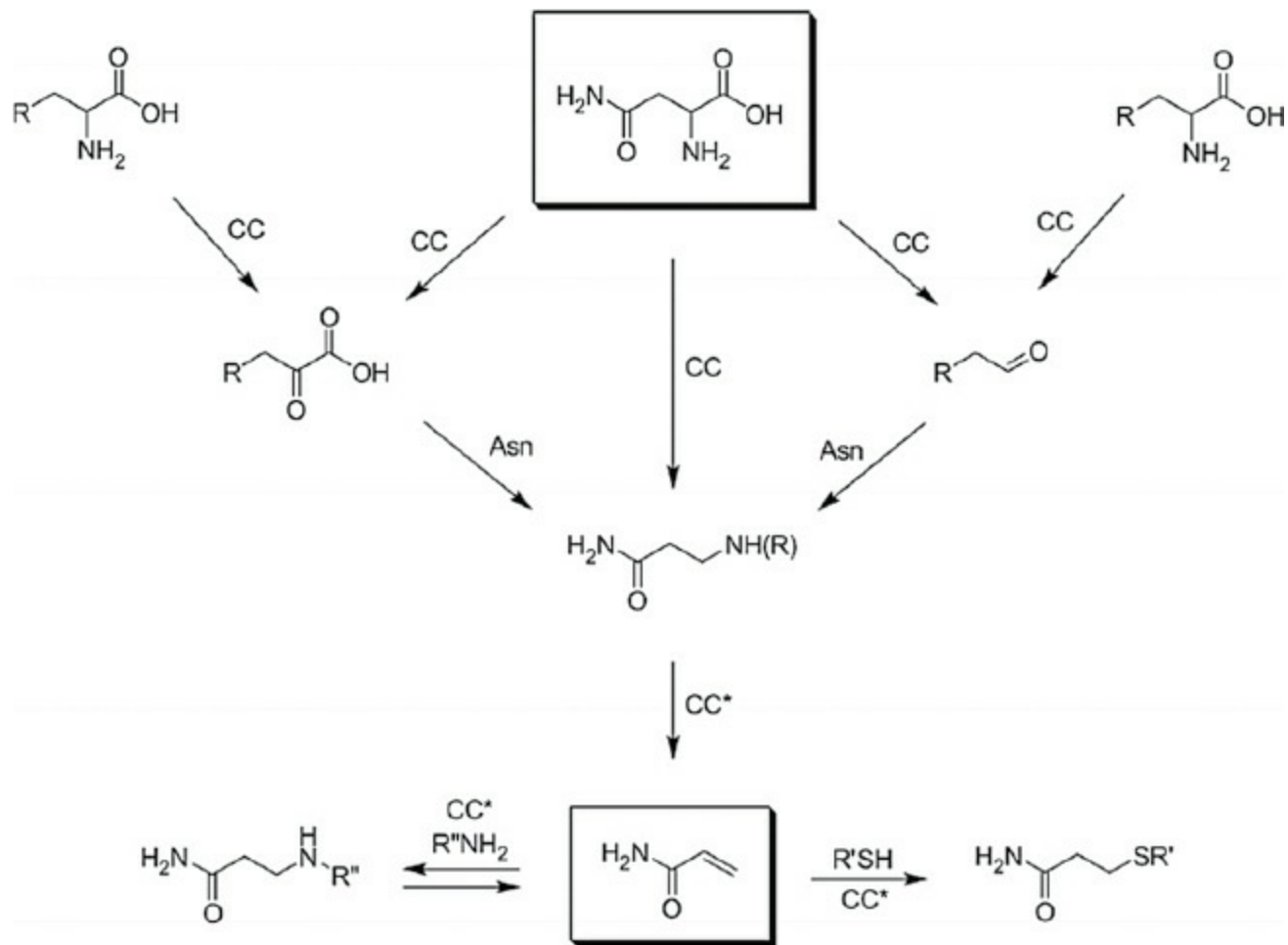


2,5-Dimetilpirazina

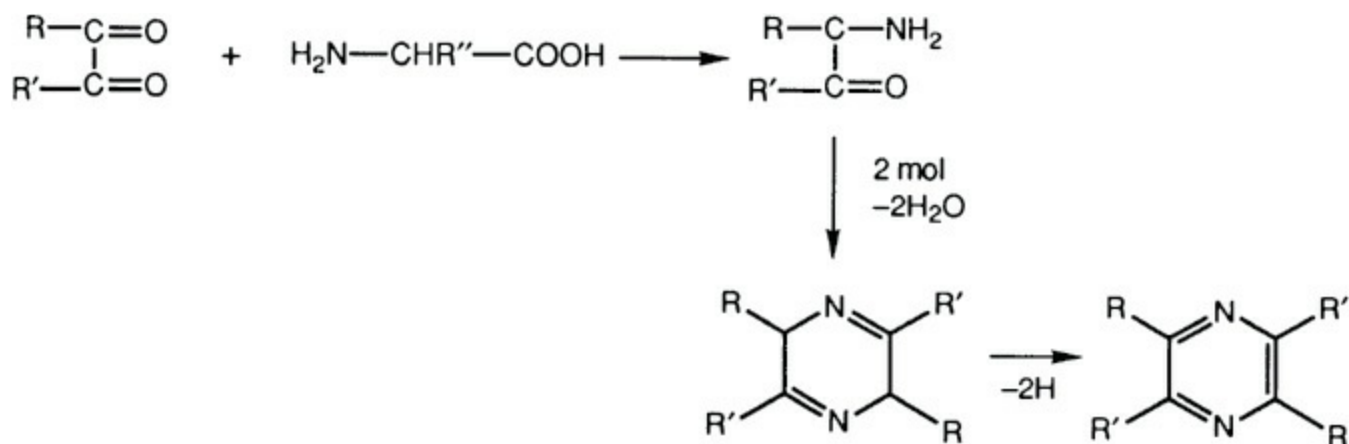


Trimetilpirazina

Koehler *et al.* (1969) demonstraram que o anel-C nos substitutos de pirazinas deriva da fragmentação de açúcares. Koehler e Odell (1970) monitoraram a formação de metilpirazinas e dimetilpirazinas a partir de sistemas açúcar-asparagina. Eles notaram que a frutose libera o maior número de produtos, ao passo que a arabinose liberou as menores quantidades destes compostos. Os fatos aqui apresentados sugerem que os padrões de produção e de distribuição dos anéis de pirazina são determinados pela natureza do açúcar. Shibamoto e Bernard (1977), utilizando sistemas de modelo açúcar-amônia, encontraram um padrão de distribuição similar de pirazinas em açúcares de pentose e aldose. Somente no caso do açúcar de aldose, o teor de pirazinas não substituídas foi mais alto, apesar de produções mais elevadas terem sido obtidas na presença de pentoses. Uma das vias principais que induzem à formação de pirazinas está ilustrada no Esquema 6.9, envolvendo a condensação de aminoacetonas.



ESQUEMA 6.8 Esquema do papel de compostos de carbonila e aminoácidos nas reações de formação e eliminação de acrilamida. CC indica que a presença de um composto de carbonila é necessária; CC* significa que as carbonilas têm um papel na reação. Zamora *et al.* (2011).



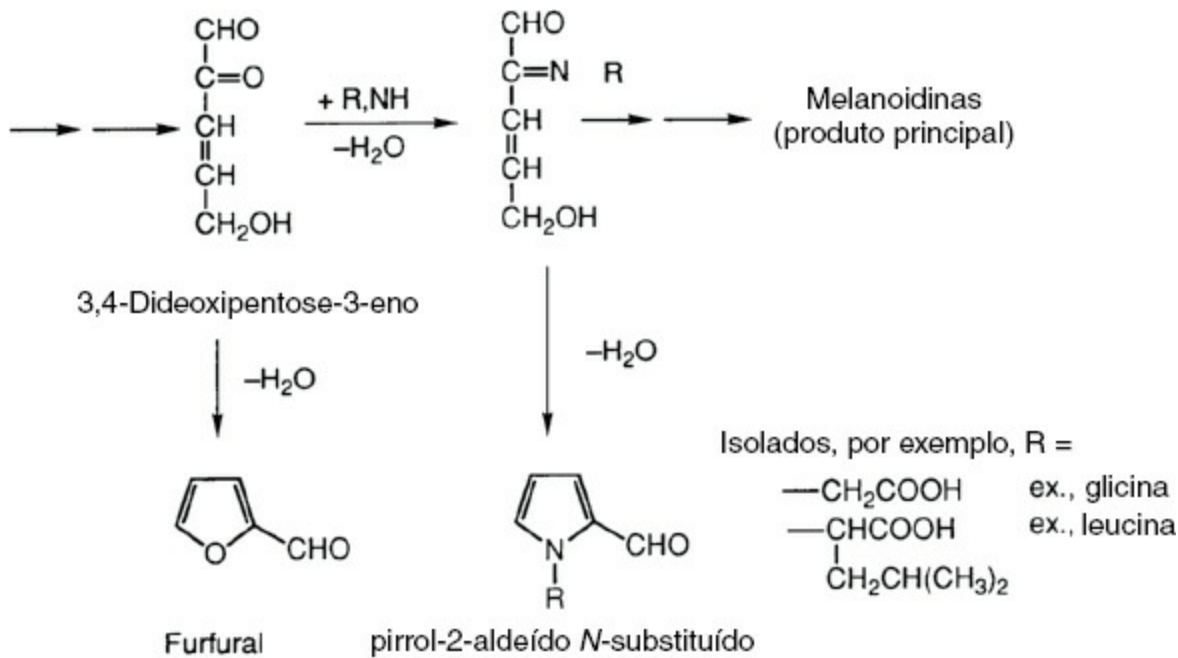
ESQUEMA 6.9 Formação de pirazinas. Shibamoto e Bernard (1977).

Koehler *et al.* (1969) propuseram uma via alternativa que envolve a degradação de Strecker, na qual o nitrogênio ligado ao grupo aminoácido foi o maior contribuinte de nitrogênio nos anéis de pirazina. A condensação de dois fragmentos de açúcar 2-carbonos com nitrogênio produziu pirazina, enquanto uma reação similar envolvendo a condensação de fragmento de açúcar 2-carbonos com fragmento de açúcar 3-carbonos produziu metilpirazina. A formação de dimetilpirazina foi atribuída à condensação de dois fragmentos de açúcar 3-carbonos e nitrogênio. Wong e Bernhard (1988) examinaram cinco fontes de nitrogênio diferentes (hidróxido de amônio, acetato de amônio, formiato de amônio, glicina e glutamato de monossódio) para a formação de pirazinas. Eles concluíram que a fonte de nitrogênio possui efeito marcante na quantidade e nos tipos de pirazina formados durante o escurecimento não enzimático, como já havia sido sugerido por Koehler e Odell (1970) e

Koehler *et al.* (1969). Havendo mais de um aminoácido em alimentos, a competição entre aminoácidos para gerar pirazinas pode ocorrer. Para investigar a competição, glicina com isótopo ^{15}N marcado foi utilizada como referência em outro teste com aminoácidos (glutamina, ácido glutâmico, asparagina, ácido aspártico, lisina, arginina, fenilalanina ou isoleucina), para comparar com a glicina na produção de pirazinas (Hwang *et al.*, 1995). Eles descobriram que a mistura de reação contendo lisina apresentou a maior produção de pirazinas, enquanto a mistura contendo arginina mostrou a menor produção. Os resultados indicam que a lisina foi capaz de aumentar a reatividade da glicina. Conseqüentemente, a variedade e a quantidade de formação de pirazina dependem da reatividade e do tipo de aminoácido utilizado.

B. Pirróis

Os pirróis são um grupo importante de compostos heterocíclicos formados durante o escurecimento de alimentos (Hodge, 1953). Uma das vias que levam à sua formação envolve a ciclização de metildicarbonilas para 2,4-dideoxipentulose-3-eno, que cicliza para furfural ou reage com o aminoácido no C2 para formar uma base Schiff, que, em seguida, cicliza para pirrol-2-aldeído N- substituído (Kato e Fujimaki, 1968). A formação de derivados de pirróis foi, então, identificada em vários sistemas de açúcares-aminoácidos (Ferretti e Flanagan, 1971; 1973; Shigematsu *et al.*, 1972; Rizzi, 1974). Shaw e Berry (1977) relataram a formação 2-acetilpirrol e 5-metilpirrol-2-carboxialdeído em sistemas de modelo frutose-alanina. A via é mostrada no diagrama a seguir, no qual o derivado 3-deoxihexulose sofreu a degradação de Strecker com o aminoácido, induzindo à formação de 1-amino-3-deoxi-2-cetose. Alterações posteriores incluíram a enolização e a desidratação, resultando na formação de 2-acetilpirrol.



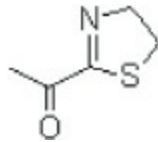
C. Oxazóis e oxazolinas

Oxazóis e oxazolinas foram identificados entre os aromas voláteis do café (Stoeffelsman e Pypker, 1968), da batata assada (Coleman *et al.*, 1981) e de amendoins torrados (Lee *et al.*, 1981). O papel dos compostos citados no aroma dos alimentos foi revisto por Maga (1978; 1981). Um deles, o 2,3,5-trimetil-2-oxazol, foi identificado nas substâncias voláteis da carne cozida (Chang *et al.*, 1968) e no ensopado de carne enlatada (Peterson *et al.*, 1975). Os pesquisadores também relataram a presença da oxazolina (2,4,5-trimetil-3-oxazolina) correspondente. O papel da reação de degradação de Strecker na formação de tais compostos foi sugerido pela primeira vez por Rizzi (1969), que afirmou que 2-isopropil-4,5-dimetil-3-oxazolina é formado de d-histidina e 2,3-butadiona (diacil). A

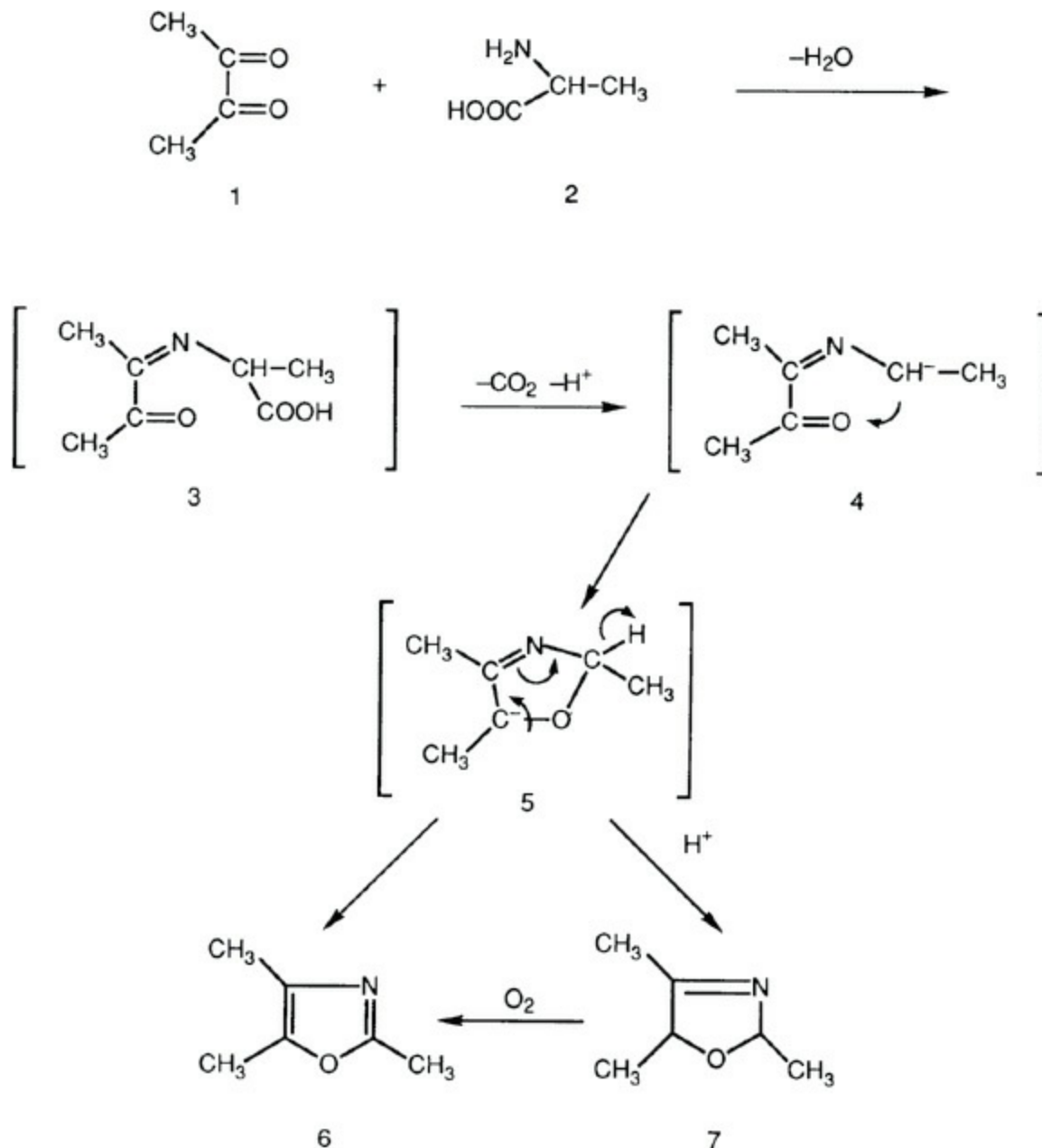
formação de oxazóis e oxazolinias pela degradação de Strecker foi confirmada por Ho e Hartman (1982), explicando, assim, a presença dos compostos apresentados nas substâncias voláteis de sabor da carne e dos amendoins tostados. Estes pesquisadores propuseram a via do Esquema 6.10 para explicar o mecanismo da formação de 2,4,5-trimetiloxazol e 2,4,5-trimetiloxazolina de dl-alanina e butanediona. A eliminação de água resultou em uma base Schiff instável, que, em seguida, sofreu descarboxilação para o anion correspondente acompanhada de ciclização para íon de 3-oxazolinida. Foi sugerido que a protonação ou a perda de um íon de hidreto produz 2,4,5-trimetiloxazolina. O oxazol correspondente foi atribuído à oxidação da oxazolina ou à perda do hidreto.

D. Tiazóis

Tiazóis são formados de aminoácidos sulfurados. Estes compostos foram identificados em café, amendoim torrado, carne cozida e batata frita (Stoll *et al.*, 1967a; 1967b; Walradt *et al.*, 1971; Buttery e Ling, 1974; Buttery *et al.*, 1983). A presença de 2-acetil-2-tiazolina em caldo de carne foi atribuída, por Tonsbeek *et al.* (1971), à reação por degradação de Strecker entre a cisteína e a metilglioxal, seguida por ciclização.



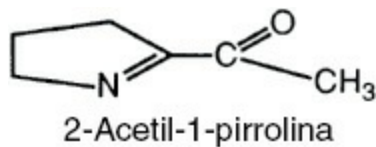
Posteriormente, Hofmann e Schieberle (1995) realizaram experimentos com modelos para compreender com mais detalhes os mecanismos de reação e intermediários, que comandam a formação de 2-acetil-2-tiazolina. Os intermediários da reação da via que forma o 2-acetil-2-tiazolina foram identificados como o composto sem odor 2-(1-hidroxi-etil)-4,5-diidrotiazol.



ESQUEMA 6.10 Formação de 2,4,5-trimetiloxazol e 2,4,5-trimetiloxazolina a partir da reação de dl-alanina e 2,3-butanediona. Reimpressão autorizada de Ho e Hartman (1982). Copyright © The Americal Chemical Society.

A formação de 3-tiazolinas a partir de α -hidroxicetona envolve a substituição do grupo de hidroxila por um grupo de tiol, seguido por ataque nucleofílico pelo átomo de enxofre ao átomo de carbono de um intermediário de imina formado pela reação entre amônia e um aldeído. O fechamento subsequente do anel e a eliminação de uma molécula de água produzem as 3-tiazolinas. A oxidação da tiazolina resulta na formação do tiazol correspondente (Schutte, 1974).

A reação da degradação de Strecker desempenha função fundamental na produção de importantes compostos de aromas, mediante condensação e ciclização dos diferentes aldeídos formados. Além dos compostos heterocíclicos discutidos, há muitos outros, incluindo as pirrolidinas e piridinas. O isolamento e a síntese química de 2-acetil-1-pirrolina, um composto-chave responsável pelo aroma característico do arroz cozido, é outro exemplo do papel da degradação de Strecker na formação do sabor (Buttery *et al.*, 1982; 1983). Já foi confirmado que a 2-acetil-1-pirrolina é um produto da degradação de Strecker da prolina e é considerado um composto de impacto, gerando também odores de assado para pães e pipocas (Schieberle, 1990; Adams e De Kimpe, 2006).



Além deles, outros compostos heterocíclicos e carboxílicos identificados em sistemas de açúcares-amidos aquecidos incluem furanonas, pirrolinonas e ciclopentenonas (Ledl e Fritsch, 1984).

V. REAÇÃO DE MAILLARD – INTERAÇÕES LIPÍDICAS

Lipídeos são componentes comuns em alimentos e estão intrinsecamente presentes ou adicionados como ingredientes. Sua ampla ocorrência afeta a reação de Maillard e a interação com seus produtos. Alterações importantes no aroma ocorrem como consequência. O mecanismo da variação do aroma está sendo estudado em modelos e sistemas de alimentos.

A degradação de produtos em decorrência da oxidação de lipídeos e da reação de Maillard origina alguns compostos específicos. A oxidação lipídica é resultante da formação de aldeídos, cetonas e outros compostos. Por outro lado, a degradação de Strecker no esquema da reação de Maillard produz outros intermediários reativos, que podem reagir com os produtos da degradação lipídica. As substâncias voláteis formadas das interações incluem compostos heterocíclicos contendo oxigênio, nitrogênio ou enxofre com longas cadeias de substitutos de *n*-alquil (Whitfield, 1992).

A reação de Maillard e os produtos da oxidação lipídica reagem para formar pirazinas. Chiu *et al.* (1990) demonstraram a síntese de pentilpirazinas ou de hexilpirazinas em um sistema que contém acetato de amônio, acetol e pentanal ou hexanal. As pirazinas alquil substituídas também foram detectadas em batatas fritas (Carlin *et al.*, 1986), em sistemas baseados em milho (Bruechert *et al.*, 1988) e em frango frito (Tang *et al.*, 1983). Uma interação entre 2,4-decadienal – um produto da oxidação linoleica e cisteína ou glutatona – produziu alquil ditiazinas e tritiolanas de cadeias longas (Zhang e Ho, 1989; Zhang *et al.*, 1994). Zhang e Ho (1989) também observaram a formação de grande quantidade de 2-pentilpiridina no sistema modelo que continha glutatona em vez de cisteína. Eles propuseram que 2,4-decadienal está envolvido na formação direta de base Schiff com o grupo amino de cisteína ou de glutatona, seguido por reação eletrocíclica e aromatização para formar pentilpiridina. A glutatona, relativamente estável, em vez da cisteína, libera mais grupos amino livres para a formação da base de Schiff e é responsável pela produção de uma quantidade maior de 2-pentilpiridina. Este último composto foi identificado em alimentos fritos (Tang *et al.*, 1983) e em carnes (Mottram, 1985).

Compostos heterocíclicos contendo enxofre são importantes para o sabor da carne (Mottram, 1998). Vários alquiltiazóis foram observados na carne (Hartman *et al.*, 1983; Tang *et al.*, 1983), com muitos alquil-3-tiozolinás e alquiltiazóis identificados em carne cozida (Elmore *et al.*, 1997). Pensava-se que a formação era derivada de α -hidroxicetonas ou de α -dionas, sulfeto de hidrogênio, amônia e aldeídos oriundos da oxidação lipídica ou da reação de Strecker (Elmore e Mottram, 1997).

Com frequência, os fosfolipídeos fazem parte de uma matriz de alimentos. Eles são ricos em ácidos graxos, tornando-os bastante propensos à oxidação. Foi demonstrado que sua presença altera a configuração dos produtos voláteis em sistemas cisteína-ribose (Farmer *et al.*, 1989). Neles, os fosfolipídeos causaram declínio na quantidade de compostos heterocíclicos que possuíam enxofre.

Óleos comestíveis atuam na produção de pirazina. Negroni *et al.* (2001) observaram efeitos opostos dos óleos comestíveis em pirazinas, substituídas ou não, em sistemas de modelos lisina-xilose-glicose. Quantidades decrescentes de pirazinas não substituídas foram observadas na presença de azeite, óleo de canola ou de girassol. Ao contrário, níveis crescentes de 2-metilpirazina, 2,5-metilpirazina e 2,3-dimetilpirazina foram observados em azeite, óleos de canola e de girassol. A sensibilidade das pirazinas foi atribuída às diferenças no grau de insaturação

entre os óleos. No entanto, tal hipótese precisa ser testada com óleos purificados.

Óleos vegetais comerciais também contêm quantidades e tipos diferentes de antioxidantes fenólicos, que podem influenciar o grau de interações lipídicas da reação de Maillard. Como anteriormente discutido, Yayalan e Locas (2007) demonstraram que produtos de peróxidos de lipídeos importantes podem formar adutos de base de Schiff com nucleófilos de nitrogênio, por exemplo, aminoácidos e proteínas, os quais podem sofrer rearranjos de Amadori como compostos similares a vinil, que podem, então, ciclizar e formar a porção de pirrol. No caso da prolina, no entanto, a ciclização é evitada e produtos estáveis de rearranjos de Amadori, como compostos similares a vinil (vARP), são formados.

A degradação de Strecker de aminoácidos por α -epoxienais foi detectada por Hildago e Zamora (2004b), durante suas extensas pesquisas da interação de produtos da degradação lipídica com aminoácidos e proteínas. Em seus estudos com modelo de fenilalanina e 4,5-epoxi-2-decenal, a 37°C durante uma noite, os produtos indicativos da degradação de Strecker foram identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa, incluindo fenilacetaldeído e 2-pentilpiridina.

Existem muitos alimentos na forma de emulsões, que afetam a percepção de compostos de aroma. Van Ruth *et al.* (2002) relataram que frações de baixo teor de lipídeos e emulsificantes e emulsões de óleo-água com partículas de maior diâmetro aumentam a liberação de aroma de álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, terpenos e compostos de enxofre.

VI. EFEITO DOS POLIFENÓIS NOS POLÍMEROS DE MAILLARD

Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas, utilizados como defesa contra ambientes adversos, dentre eles, radiação ultravioleta ou ataques por patógenos. Tais compostos são classificados, comumente, como flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos. Eles são encontrados com frequência em produtos alimentares à base de plantas; contudo seus efeitos, na reação de Maillard, só foram recentemente estudados.

Há pouco tempo, foi demonstrado que alguns polifenóis conseguem aprisionar espécies de carbonilas reativas, indicando, assim, uma nova característica química dos polifenóis (Jiang e Peterson, 2010; Lo *et al.*, 2006; 2011; Lv *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Espécies de carbonilas reativas, como glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglucosona, geradas pela reação de Maillard são intermediários importantes para a formação do sabor e da cor. Polifenóis que conseguem aprisionar espécies reativas de carbonilas podem alterar a via da reação de Maillard. Alguns compostos de aroma gerados normalmente pela reação de Maillard, como as pirazinas, as metilpirazinas, 2,5-dimetilpirazina e trimetilpirazina, foram inibidos quando epicatequina foi adicionada no sistema de modelo glicose-glicina (Totlani e Peterson, 2005). Utilizando o sistema glicose-glicina, Noda e Peterson (2007) compararam a eficiência de aprisionamento de espécies carbonilas reativas por flavan-3-ol epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epigallocatequina galato (EGCG) e vários outros compostos fenólicos (1,3,5-triidroxibenzeno, 1,2,3-triidroxibenzeno e metil galato) na formação de pirazinas. Uma redução significativa similar da formação de pirazina foi observada para EC, ECG e ECGC. Metil galato seguido de 1,2,3-triidroxibenzeno foram os menos reativos, enquanto o 1,3,5-triidroxibenzeno mostrou-se o mais eficiente. O resultado sugere que o mecanismo responsável pela inibição foi a atividade de aprisionamento da carbonila no anel-A de compostos de flavonoides.

VII. POLÍMEROS MELANOIDINA-MAILLARD

Os produtos finais formados pela reação de Maillard são polímeros ou melanoidinas. Ao contrário dos compostos de sabor e aroma discutidos anteriormente, a origem e a natureza dos polímeros aqui abordados não é bem

conhecida. Inúmeros estudos foram realizados para examinar as melanoidinas em sistemas modelos, incluindo Barbetti e Chiappini (1976a; 1976b), Ledl (1982a; 1982b), Ledl e Severin (1982), Velisek e Davidek (1976a; 1976b), Imasato *et al.* (1981) e Bobbio *et al.* (1981). Uma pesquisa realizada por Feather e Nelson (1984) tentou isolar os polímeros de Maillard produzidos em sistemas modelo compostos de d-glicose/d-frutose/5-(hidroximetil)-2-furaldeído e glicina e d-glicose/d-frutose com metionina. Quantidades crescentes de polímeros solúveis em água e não dialisáveis com massas moleculares maiores de 16.000 foram obtidos para os sistemas de glicina e de metionina em função do tempo (Figuras 6.8 e 6.9). Análises elementares (carbono, hidrogênio e nitrogênio) dos polímeros preparados a partir de sistemas de modelo de glicina foram similares, o que sugere que o aminoácido foi incorporado no polímero. O polímero isolado da d-glicose/d-frutose e glicina era composto de açúcar e aminoácidos menos 3 moléculas de água. A detecção de enxofre e de nitrogênio nos polímeros obtidos da d-glicose e da metionina também aponta para a incorporação do aminoácido intacto. A ligação de íons metálicos às melanoidinas ficou evidente pela sua maior estabilidade em água de torneira do que em água destilada.

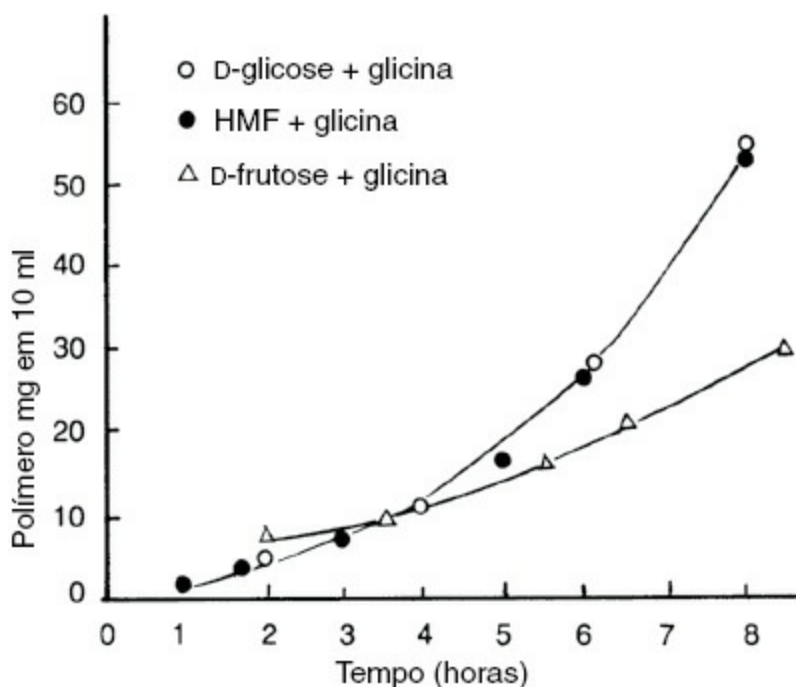


FIGURA 6.8 Rendimentos de polímeros não dialisáveis como função de tempo usando glicina como aminoácido. HMF: hidroximetilfurfural. Reimpressão autorizada de Feather e Nelson (1984). Copyright © The American Chemical Society.

O espectro de ressonância magnética nuclear (NMR) de tais polímeros sugeriu a presença de algum composto de aroma. Feather e Huang (1986) examinaram o espectro ^{13}C -NMR de polímeros solúveis em água produzido com d-[1- ^{13}C]glicose, l-[1- ^{13}C]alanina e l-[2- ^{13}C]alanina (90% átomos) marcado. Os polímeros preparados com l-alanina com átomo de carbono C-1 marcado apresentaram menor atividade, quando comparados aos aminoácidos com C-2 marcados. Tal aspecto pode ser atribuído à degradação para aldeídos voláteis, sugerindo um papel mais direto para a degradação de Strecker na reação de Maillard, como proposto por Holtermann (1966) (seção III, B). Trabalhos anteriores de Olsson *et al.* (1982) demonstraram que o espectro NMR de aldeídos é similar ao de um composto de Amadori análogo. Com base neste estudo e em outros espectros de NMR, parece que o polímero não dialisável foi formado pela desidratação e pela polimerização de um composto de Amadori (Olsson *et al.*, 1982).

Benzing-Purdie *et al.* (1985) examinaram o efeito da temperatura na estrutura das melanoidinas formadas em sistemas modelo compostos por d-xilose e glicina. Na presença de quantidades equimolares de reagentes, um aumento na temperatura (22°C, 68°C e 100°C) foi acompanhado por elevação na natureza aromática de ambos os produtos de melanoidinas, de baixa e de alta massa molecular. Estes pesquisadores também notaram uma diferença considerável na natureza das melanoidinas produzidas a 22°C comparadas às formadas a temperaturas mais altas, com tipos diversos de carbonos alifáticos e menos carbonos insaturados.

As melanoidinas não dialisáveis produzidas de sistemas de glicose-glicose, aquecidas a 95°C e pH de 6,8, foram examinadas por Kato *et al.* (1985). São compostas por carbonos alifáticos saturados além de quantidades menores de carbonos aromáticos. Milic (1987) examinou a cinética da formação da melanoidina entre a d-glicose e isômeros de ácidos de 2- 3- e 4-aminobutanoico, utilizando espectroscopia de ressonância magnética ^{13}C nuclear com rotação em torno do ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS ^{13}C -NMR). Os sistemas foram aquecidos em tubos testes de quartzo selados a 313 K, 343 K e 371 K por $1,0 \times 10^5$ a $3,60 \times 10^5$ segundos em condições alcalinas (pH 9,0) e as melanoidinas marrons foram eluídas na resina de troca iônica Permutit ES com 5% NaCl. Em seguida, as melanoidinas purificadas foram concentradas, dialisadas e secas a vácuo antes de serem analisadas por CP-MAS ^{13}C -NMR. Com base no espectro CP-MAS, constatou-se aumento na insaturação e/ou aromatização a 100 ppm e/ou 180 ppm com aumento da temperatura e do tempo, que foi interrompido quando a glicose e o ácido aminobutanoico foram esgotados. Milic (1987) calculou a ordem de reação da formação da melanoidina assumindo que a aromatização, medida por espectroscopia de CP-MAS ^{13}C -NMR, correspondia à temperatura de escurecimento (K). A quantidade de aminoácidos (A_0) (área de pico a 180 ppm) foi plotada contra a temperatura de reação em tempo constante de $2,34 \times 10$ segundos e a linha reta obtida mostrou que a formação da melanoidina seguiu uma cinética de primeira ordem (Figura 6.10).

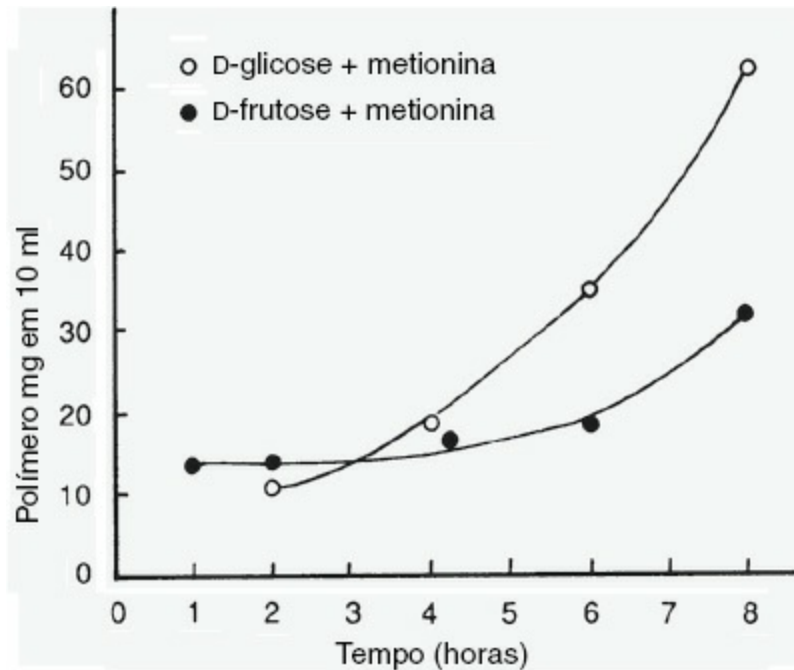


FIGURA 6.9 Rendimentos de polímeros não dialisáveis como uma função de tempo usando metionina como o aminoácido. Feather e Nelson (1984).

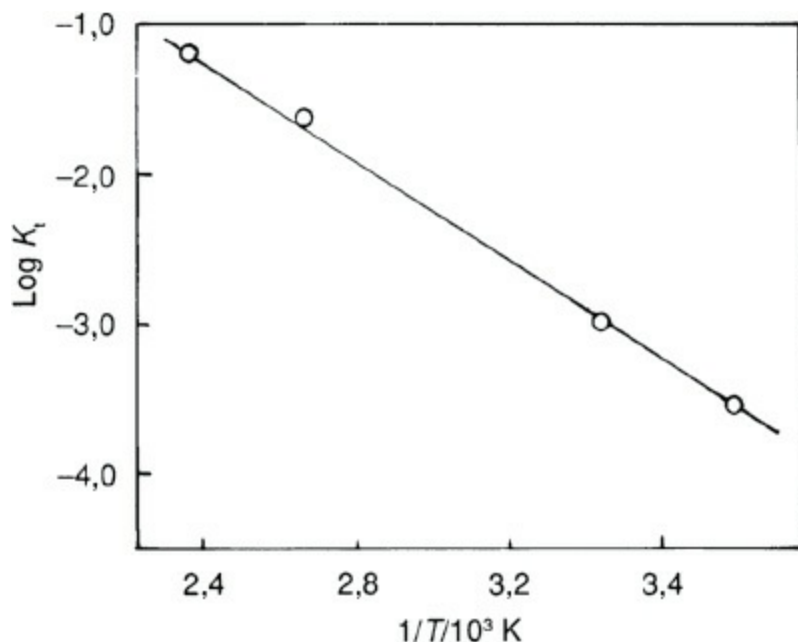
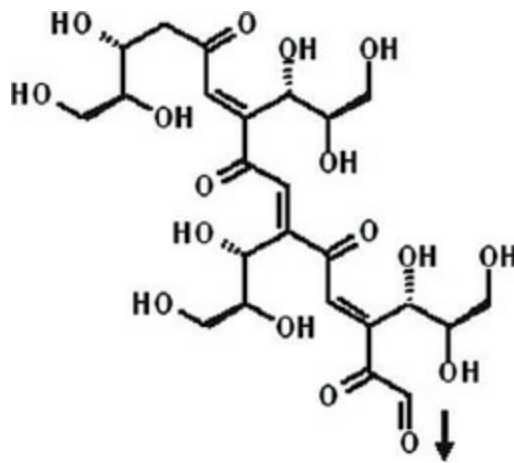


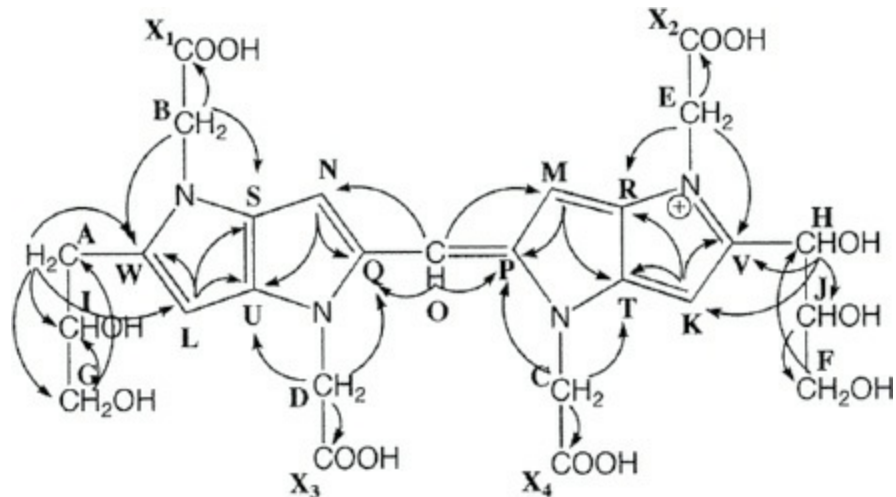
FIGURA 6.10 Dependência de temperatura da taxa aproximada da constante K_t para o modelo sistêmico d(+)-glicose-ácido 2-aminoabutanoico. Milic (1987).

A formação das melanoidinas parece envolver duas vias independentes. Uma delas conduz à formação de melanoidinas com base em proteínas oriundas de deoxisonas, enquanto a outra tem por base produtos da degradação de açúcar (Kroh *et al.*, 2008). A última reação foi demonstrada por Hofmann (1998) e induz à formação de compostos coloridos de baixa massa molecular com estruturas de furano e pirrolidina em compostos de cor marrom de alta massa molecular. α -dicarbonilas foram demonstradas recentemente por Kroh *et al.* (2008) como sendo intermediários-chave na formação de melanoidinas baseadas em carboidratos. Estes incluem dicarbonilas de cadeias longas, 1,3-deoxiosona e 1,4-dideoxiosonas e os dicarbonilas de cadeia curta, metilglioxal e glioxal. Eles propuseram a estrutura com base em carboidratos, ilustrada a seguir, que resulta da condensação a partir do aldol em compostos de α -dicarbonilas (Esquema 6.11). Melanoidinas coloridas foram formadas na presença de metilglioxal. Em condições alcalinas, formam um carbânion no terceiro átomo de carbono, que, em seguida, passa a formar melanoidinas coloridas através da condensação de aldol. No caso do glioxal, uma reação similar não pode ocorrer, pois ele não forma um carbânion.

Extensas pesquisas foram conduzidas sobre a formação de melanoidinas baseadas em proteínas, utilizando sistemas de modelo d-xilose-glicina. Utilizando este sistema como modelo, Hayase *et al.* (1999) isolaram um pigmento (Azul-M1) da reação de Maillard, considerado um oligômero intermediário na formação de melanoidinas. Como pode ser visto no Esquema 6.12, ele é formado por quatro moléculas de d-xilose e glicina com um próton *methine* entre os dois anéis de pirrolpirrol. Pesquisas posteriores, feitas por Sasaki *et al.* (2006), identificaram um segundo pigmento azul (Azul-M2), que possui massa molecular mais alta do que o composto M-1, e considerado sendo formado a partir da interação Azul-M1 e di-d-xiuloseglicina. Além dos pigmentos azuis, Azul-M1 e Azul-M2, Shirahashi *et al.* (2009) identificaram recentemente vários pigmentos vermelhos (Vermelho-M1 e Vermelho-M2), utilizando o mesmo sistema d-xilose-glicina. Mais uma vez, os pigmentos vermelhos eram intermediários na formação das melanoidinas. Eles propuseram uma via que leva à formação de melanoidinas, ilustrada no Esquema 6.13.



ESQUEMA 6.11 Proposta de uma estrutura de melanoidina baseada em carboidratos. Kroh *et al.* (2008).



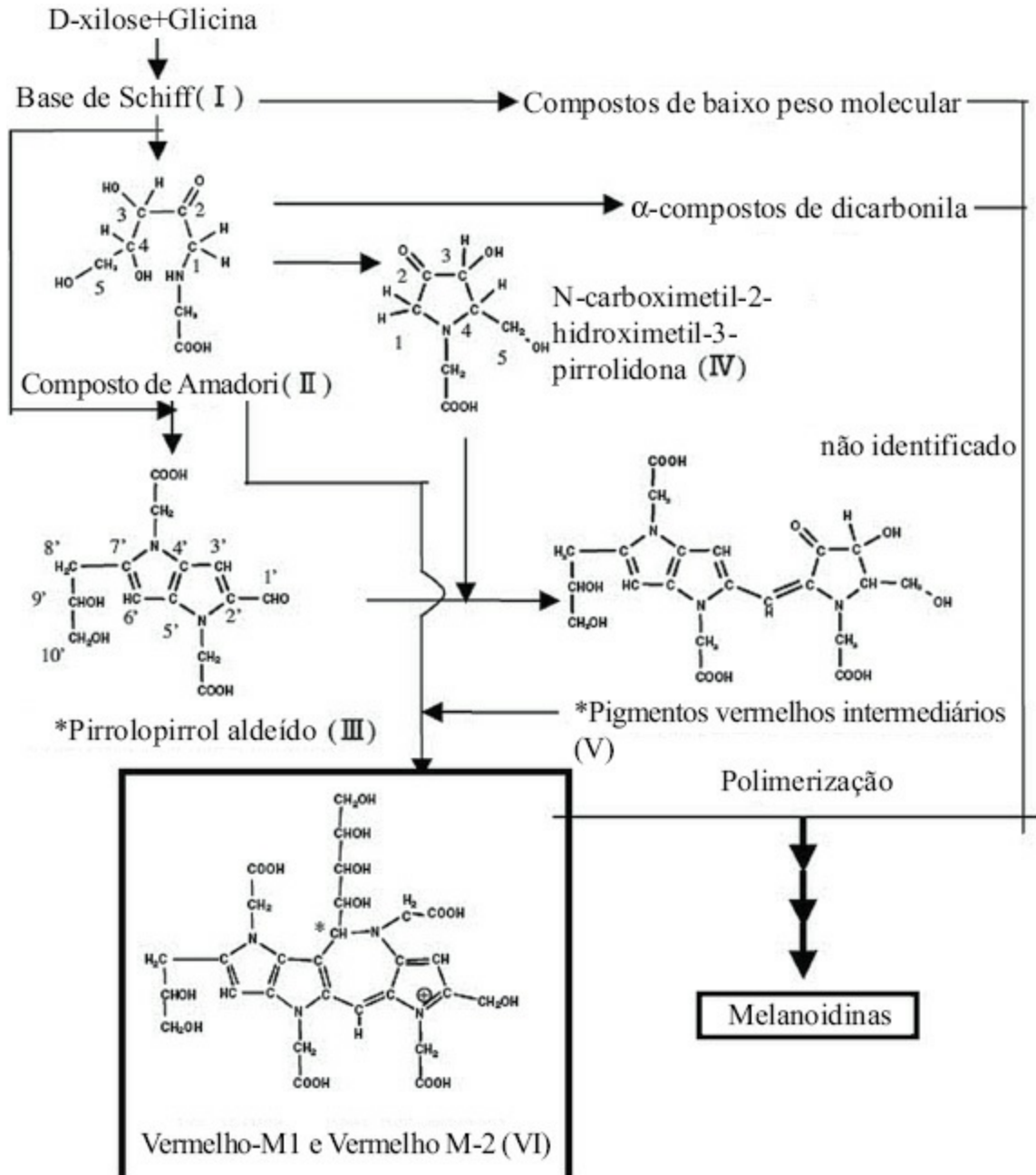
ESQUEMA 6.12 Estrutura isolada do Azul-M1. Hayase *et al.* (1999).

O mecanismo envolvido na formação das melanoidinas, produtos finais avançados de glicação dos pigmentos intermediários, foi finalmente solucionado por Hayase *et al.* (2008). O Esquema 6.14 ilustra a formação de uma base Schiff e um composto de Amadori derivado de xilose e glicina, seguido pela formação de 3-deoxixilosona (3-DX). Este último composto reage com a glicina para formar o pirrol-2-carbaldeído, que, em seguida, reage com a imina para formar pirrolopirrol-2-carbaldeídos (PPA). O PPA é o precursor do pigmento Azul-M1, um pigmento intermediário formado pela descarboxilação de duas moléculas de PPA. Depois, os pigmentos azuis polimerizam facilmente formando as melanoidinas de coloração marrom. Pigmentos azuis similares também foram identificados em sistemas de modelos glicose-glicina e d-xilose- β -alanina.

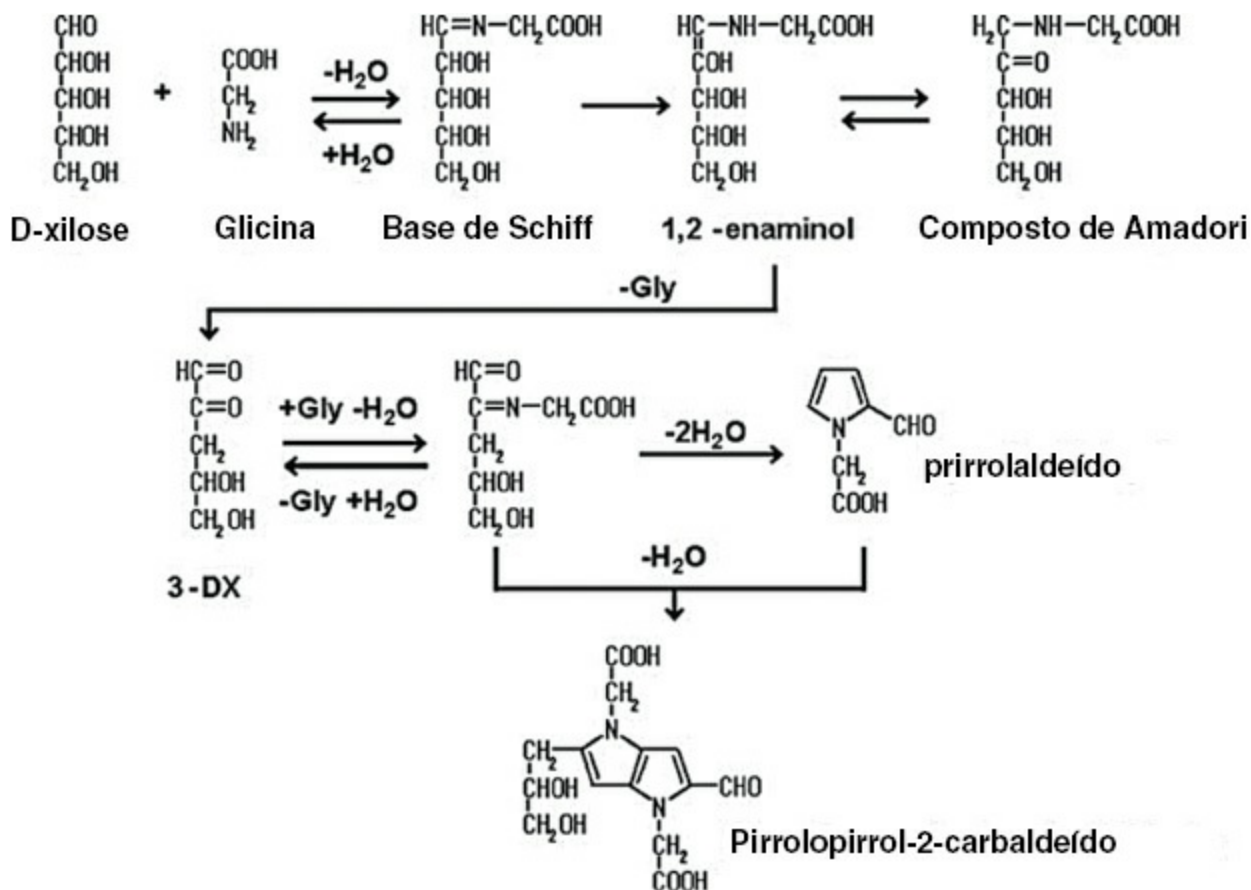
VIII. CARMELIZAÇÃO

A caramelização é outro exemplo de escurecimento não enzimático, que envolve a degradação de açúcares e que tende a se processar simultaneamente com a reação de Maillard (Ajandouz e Puigserver, 1999). A caramelização de açúcares contribui, de maneira significativa, para a produção de pigmentos marrons e pode induzir uma supervalorização da reação de Maillard e de suas propriedades associadas em alimentos (Ajandouz *et al.*, 2001), fato evidenciado pelo desaparecimento mais rápido da frutose em uma solução contendo lisina e frutose, quando comparada com a de aminoácidos. A caramelização da frutose foi responsável por 10-36% do desenvolvimento total de escurecimento com pH entre 4,0 e 7,0. Quando os açúcares são aquecidos acima de seu ponto de fusão escurecem em condições alcalinas ou ácidas. Caso esta reação não seja controlada cuidadosamente, haverá a formação de produtos desagradáveis, queimados e amargos. Portanto, é importante controlá-la durante o processamento de alimentos, de modo a manter as qualidades agradáveis do caramelo. As cores do caramelo

variam de marrom-escuro ao preto e o corante caramelo pode ser líquido e similar a xaropes ou pós. Em 1987, von Smolnik classificou as cores dos caramelos em quatro grupos distintos, com base em suas propriedades funcionais, como pode ser visto na Tabela 6.4. As cores diferentes do caramelo são preparadas ao aquecer carboidratos com amônia, sulfito e/ou reagentes ácidos ou alcalinos (Licht *et al.*, 1992a). Entre eles, a cor caramelo IV é responsável por cerca de 70% de todas as cores de caramelo produzidas no mundo inteiro (Licht *et al.*, 1992b). Tal classificação é reconhecida pelo Comitê de Especialistas em Aditivos a Alimentos da FAO/WHO (Expert Committee on Food Additives – JECFA) e pela definição de Caramelo, no Código de Regulamentações Federais da Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (US Food and Drug Administration). O caramelo permanece sendo um dos corantes mais utilizados nas áreas farmacêutica e alimentícia.



ESQUEMA 6.13 Proposta de via de formação de produtos de melanoidinas a partir da reação de D-xilose (1M) incubada com glicina (0,1M) e bicarbonato de sódio (0,1M) em uma solução de etanol a 60% (pH 8,1). Shirahashi *et al.* (2009).



ESQUEMA 6.14 Proposta de caminho para a formação de pirrolopirrol-2-carbaldeídos (PPA). Hayase *et al.* (2008).

A composição química do caramelo é extremamente complexa e ainda pouco conhecida. No entanto, caramelos produzidos com açúcares diferentes possuem, todos eles, composições similares. Bryce e Greenwood (1963), utilizando técnicas cromatográficas, descobriram que a pirólise da sacarose, da glicose e a do amido produzem caramelos com composições similares. Heyns e Klier (1968), em uma série de estudos sobre grupos de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos diferentes também identificaram que produtos voláteis formados a altas temperaturas eram quase idênticos. Pesquisas feitas por eles e por outros pesquisadores, como a revisada por Feather e Harris (1973), indicaram com clareza uma via comum para a degradação ácida ou alcalina de açúcares. Estudos posteriores identificaram novos grupos de compostos formados durante o processo (Popoff e Theander, 1976; Theander, 1981).

TABELA 6.4 Classificação das cores de caramelo para uso alimentar

Classificação

- I. Caramelo simples (álcool)
- II. Caramelo sulfito cáustico
- III Caramelo amônia
- IV. Caramelo sulfito amônia

Uso alimentar

- Destilados
- Destilados
- Cervejas
- Bebidas não alcoólicas

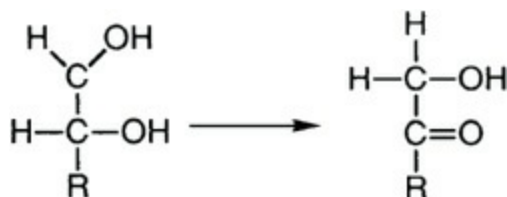
Fonte: von Smolnik (1987).

A. Degradação ácida

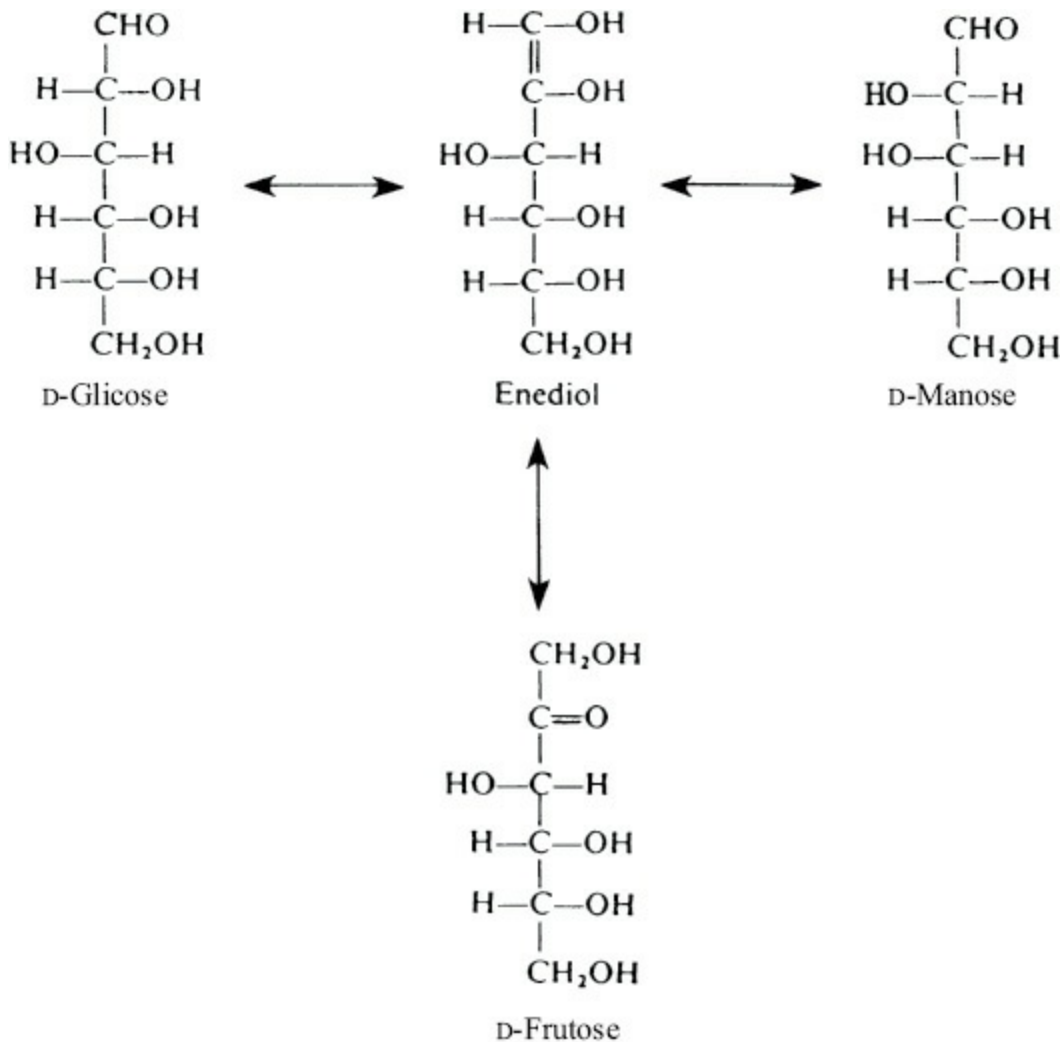
O primeiro passo envolve a conversão, passo a passo, da d-glicose para d-frutose e d-manose, conhecida como transformação Lobry de Bruyn-Alberda van Eckenstein (Esquema 6.15). Tais transformações podem ser mediadas por catalisadores ácidos orgânicos, em um pH que varia de 2,2-2,9 (Hodge e Osman, 1976). A interconversão dos açúcares ocorre principalmente por meio da forma 1,2-enólica e depende da facilidade com que o anel se abre.

Uma vez que a d-glicose é a mais estável do ponto de vista da conformação em meio ácido ou alcalino, há muito menos formas carbonilas (cadeias abertas) presentes na solução. Isto explica níveis relativamente altos de glicose quando a frutose é aquecida a altas temperaturas em um pH que se estende de 3,0-6,9, enquanto quantidades traço de frutose é encontrada quando a d-glicose é aquecida nas mesmas condições. A enolização ocorre muito devagar em condições acídicas, enquanto o grupo de hidroxil, ao lado do grupo carbonila, é removido com rapidez.

O processo de enolização via 1,2-enediol de açúcares em condições acídicas foi questionado por Ohno e Ward (1961), ao detectarem a presença de pequenas quantidades de frutose quando a d-glicose foi tratada com ácido sulfúrico a 2,5%, sem nenhuma menção à manose. Mawhinney *et al.* (1980) constataram a presença de frutose e manose quando a d-glicose foi isomerizada em solução acídica. A Tabela 6.5, com os dados dessa pesquisa, mostra que os teores de frutose eram de cerca de 0,8 µg, enquanto a manose aumentou com o tempo de reação. Os dados mencionados mostram os teores de açúcares gerados, mas não informam sobre sua degradação por desidratação, que deve ter ocorrido a taxas de reação diferentes. O mecanismo desta reação é similar ao da enzima isomerase correspondente, envolvendo uma transferência de hidrogênio intramolecular C1→C2 na qual a d-glicose-2-H é convertida em d-frutose-1-H (Harris e Feather, 1973; 1975):



Um aquecimento contínuo desencadeia a desidratação dos açúcares, e, por consequência, a formação de hidroximetilfurfural, ácido levulínico e humina. Este processo é iniciado pela remoção do grupo hidroxila da forma 1,2-enediol localizada na posição α em relação ao grupo carbonila. O produto inicial, dicarbonila, sofre degradação posterior. Os intermediários propostos na reação foram citados como sendo 3-deoxialdos-2-eno, 3-deoxiosulose e osulos-3-eno (Isbell, 1944; Wolfrom *et al.*, 1948). Estes compostos foram isolados por Anet (1962) durante a degradação acídica da frutose. Se o açúcar inicial fosse uma pentose, o produto final seria 2-furaldeído. Por exemplo, d-xilose formou aproximadamente 93% de 2-furaldeído, apesar de liberações de outras pentoses terem sido muito mais baixas. A taxa de desidratação da d-glicose foi identificada como sendo de cerca de 1/40 da observada para a d-frutose, com rendimento de produtos consideravelmente mais baixo (Kuster e Van der Bean, 1977). O mecanismo da desidratação do açúcar de 1,2-enol para 5-(hidroximetil-2-furaldeído), descrito originalmente por Anet (1964), tem sido modificado e resultou da pesquisa de Feather *et al.* (1972) utilizando troca de isótopos na qual a d-xilose em água com hidrogênio trítio foi convertida em 2-furaldeído. Ao monitorar a proporção e a quantidade de isótopos convertidos em 2-furaldeído, eles estabeleceram a existência de um equilíbrio entre a aldose-cetose 1,2 enediol à medida que a incorporação do açúcar em C1 correspondeu ao α-carbono do 2-furaldeído. A formação de 3-deoxigliculose como intermediário, porém, deveria resultar em incorporação de isótopos na posição C3 do anel de furano. A ausência de troca de isótopos excluiu qualquer equilíbrio de 1,2-enediol durante a reação, fazendo de 1,2 enediol a etapa limitante. Também foi eliminada a 3-deoxigliculose como intermediário, confirmando a sequência da reação mostrada no Esquema 6.16.



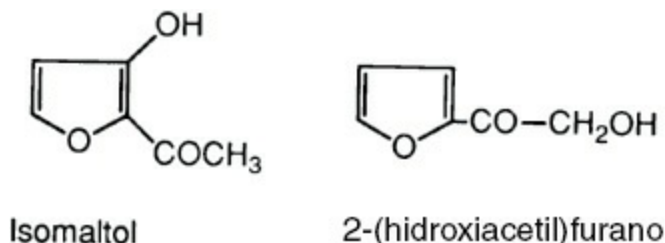
ESQUEMA 6.15 A transformação Lobry de Bruyn-Alberda van Eckenstein. Eskin *et al.* (1971).

TABELA 6.5 Rendimento de açúcar obtido de 50 mg de d-glicose após tratamento com 2,5% de ácido sulfúrico a 120 °C

Tempo de reação (horas)	Glicose (µg)	Manose (µg)	Frutose (µg)
0	50,0	0	0
1,0	46,2	4,7	0,6
2,5	43,6	10,8	0,8
5,0	39,7	19,1	0,8
7,5	37,1	27,7	0,9
10,0	35,9	43,8	0,8

Mawhinney *et al.* (1980).

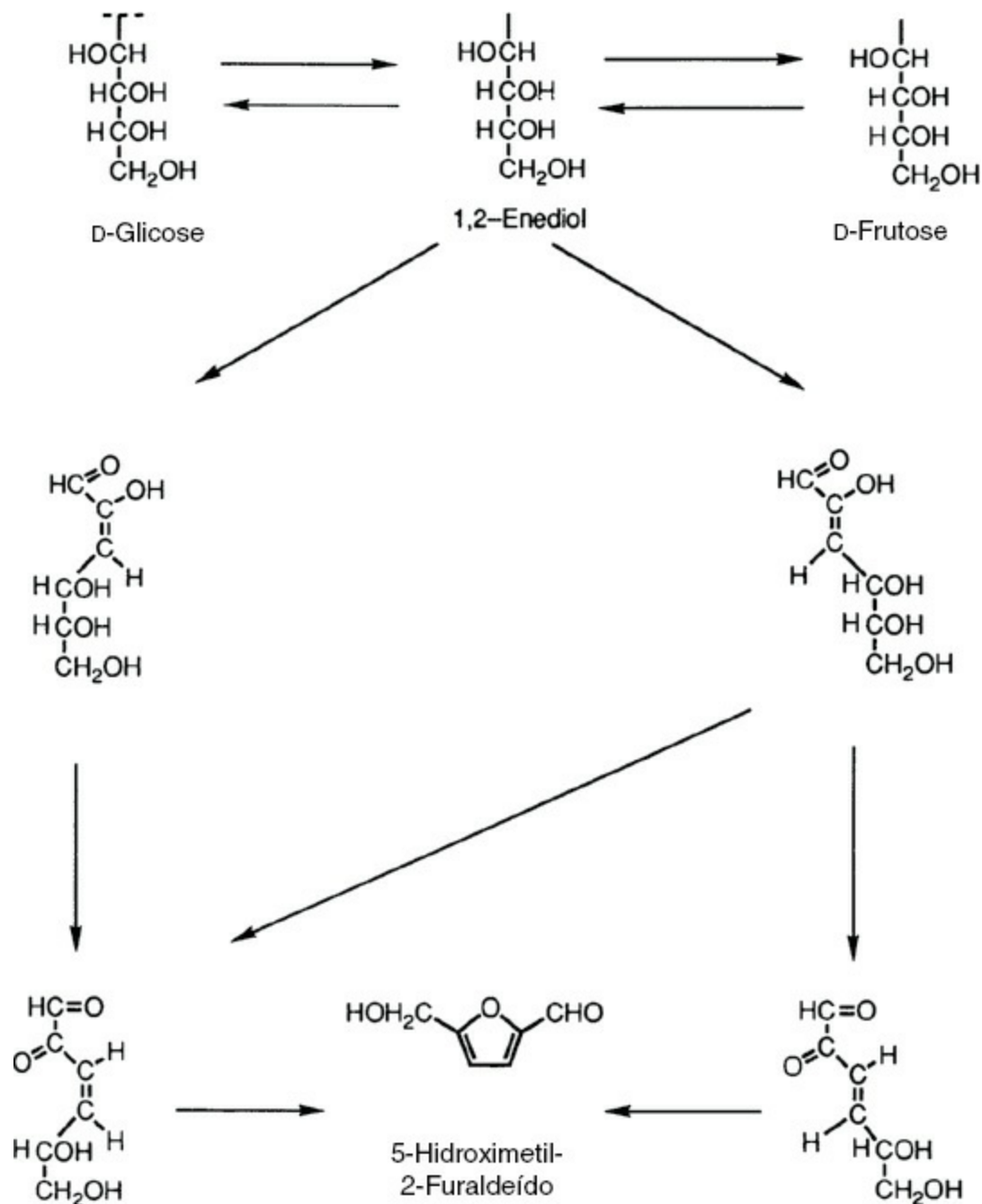
Isomaltol e 2-(hidroxiacetil)furano são formados durante o tratamento ácido da d-frutose, sugerindo que o 2,3-enediol é o precursor:



Sua formação envolveu a remoção de uma hidroxila no C4 e C1, seguida pela desidratação do anel de furanona. Harris e Feather (1975) descobriram que a d-frutose sofre desidratação catalisada pelo ácido e degradação em uma velocidade muito mais rápida do que os açúcares de aldose. Entre os principais produtos observados estão o 5-

(hidroximetil)-2-furaldeído, 2-(hidroxiacetil)furano e o ácido levulínico. A diferença nas velocidades de degradação explica, em parte, porque os níveis da frutose observados por Mawhinney *et al.* (1980) permaneceram baixos e constantes durante a isomerização da d-glicose acidificada. Kuster e Temmink (1977) investigaram a influência do pH e dos ânions ácidos fracos na desidratação da d-frutose, contudo não conseguiram detectar a formação de 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) a partir de d-frutose em $\text{pH} > 3,9$, enquanto que em $\text{pH} > 2,7$ não houve formação de ácido levulínico. A isomerização da d-frutose para d-glicose foi observada com um pH acima de 4,5. Evidenciou-se que a formação de HMF por desidratação da d-frutose e reidratação do HMF a ácidos levulínicos e fórmicos foi catalisada pelos ácidos, os últimos requerendo maior acidez. O HME, um dos principais produtos de caramelização produzidos na faixa de pH entre 6,0-6,7, é, provavelmente, um precursor do pigmento. Além do HMF, um produto menos importante, o 2-(2-hidroxiacetil)furano, também parece se formar por 2,3-enolização em vez da 1,2-enolização da d-frutose.

Segundo Johnson *et al.* (1969), a pirólise da sacarose produz maltol. A formação de maltol e de isomaltol, além de etil lactato, furfural, ácido 3-hidroxi propiônico e 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido 2-furoico foi detectada, mais tarde, por Ito (1977), quando uma solução aquosa de sacarose com pH de 2,3 foi aquecida a 120°C . O primeiro passo no escurecimento com sacarose catalisado por ácido é a clivagem hidrolítica com liberação dos monossacarídeos constituintes. Várias pesquisas demonstraram que o mecanismo tende a ocorrer em sistemas de sacarose liofilizados a 37°C , quando a monocamada de água absorvida está envolvida na hidrólise (Karel e Labuza, 1968; Schoebel *et al.*, 1969). Flink (1983) monitorou o desenvolvimento do escurecimento não enzimático em sistemas contendo sacarose durante a liofilização e a estocagem a temperatura ambiente. A hidrólise da sacarose para glicose e frutose ocorreu logo após o primeiro estágio de sublimação da secagem. A produção aumentada do HMF, medido mediante monitoramento da absorção a 280 nm, ficou evidente ao final do primeiro processo de congelamento e secagem. A estocagem de amostras liofilizadas em uma faixa de a_w de 0-0,40 apontou redução da absorbância na presença de teores aumentados de água em razão da desaceleração da reação. A redução do peso em a_w de 0 foi uma clara indicação de que água pode ser produzida na reação de escurecimento. Após a produção de HMF, uma cor escura surgiu e foi monitorada em 400 nm. A reação de escurecimento foi atribuída ao aumento da concentração de íons de hidrogênio, que tem lugar com a passagem da interface do gelo durante o congelamento e a secagem. O aumento da temperatura foi acompanhado por uma hidrólise rápida da sacarose para glicose e frutose, na qual a frutose desidratou-se rapidamente. Tal pesquisa explicou a estabilidade dos produtos durante a liofilização e as condições adequadas para estocagem de alimentos muito ácidos que contêm açúcar, como sucos de frutas.



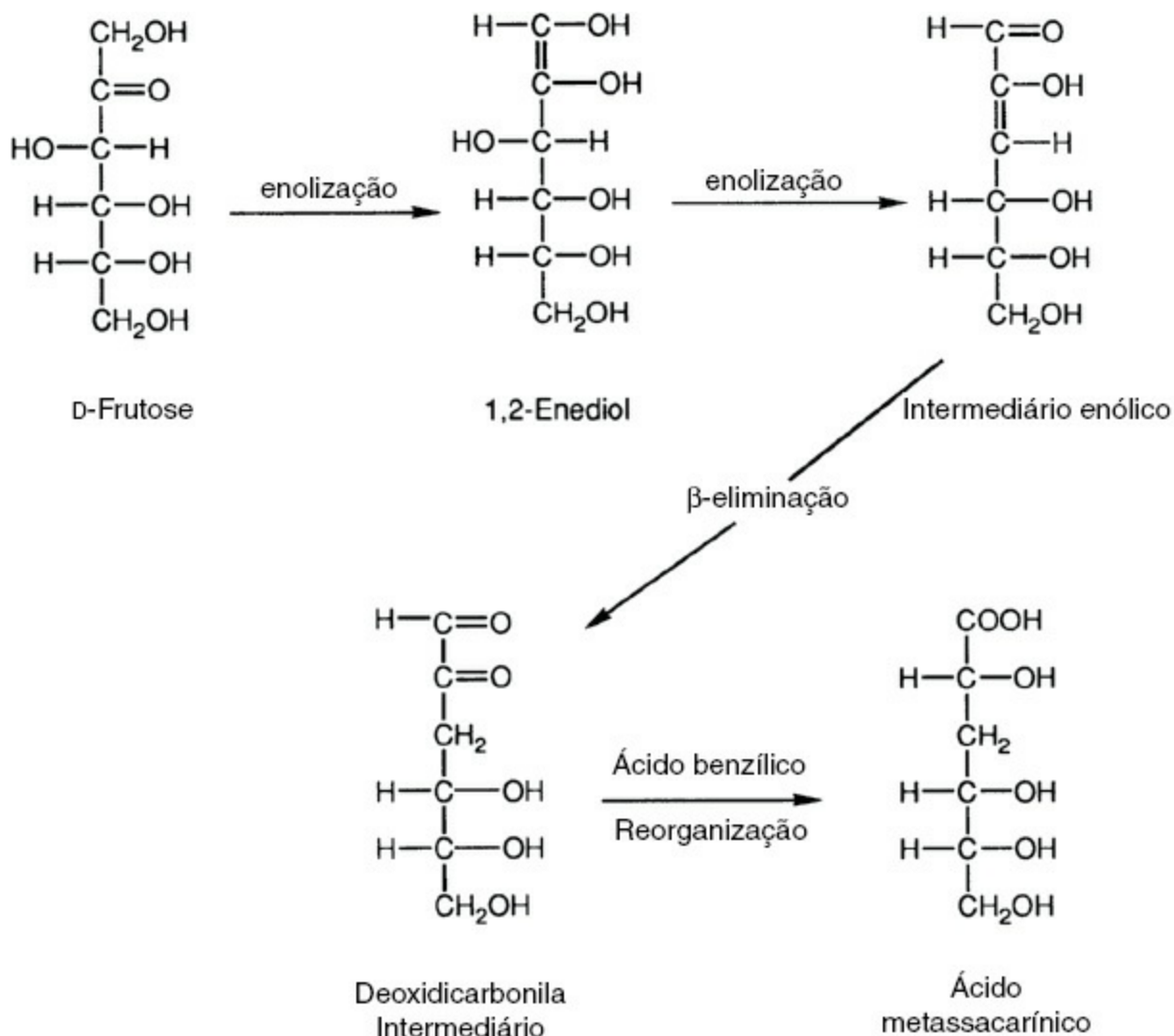
ESQUEMA 6.16 Mecanismo de desidratação de açúcar de 1,2-enediol para 5-hidroxi metil-2-furaldeído. Adaptado de Feather e Harris (1973).

B. Degradação alcalina

A reação inicial na degradação dos açúcares em condições alcalinas segue as transformações descritas por Lobry de Bruyn-Alberda van Eckenstein por meio de 1,2- e 2,3-enediol. Como já foi discutido, a enolização é uma reação geral dos compostos de carbonila com um átomo de α -hidrogênio. Os álcalis são catalisadores muito mais eficientes do que os ácidos na enolização de açúcares (Pigman e Anet, 1972). Sob condições alcalinas moderadas, ocorrem as séries de reações mostradas no Esquema 6.17. Sob condições alcalinas fortes, enolização contínua procede ao longo da cadeia de carbonos, resultando em uma mistura complexa de produtos clivados incluindo ácidos sacarínicos. A formação de ácido metasacarínico está detalhada no Esquema 6.17.

Um aspecto específico da degradação alcalina de hexoses é a extensa fragmentação que ocorre e que resulta na produção de fragmentos de 2- e 4-carbonos, incluindo ácidos sacarínicos, ácido láctico e ácido 2,4-dihidroxibutírico (Harris, 1972; Feather e Harris, 1973). A recombinação de alguns dos fragmentos é responsável

pela formação de uma variedade de compostos, dentre eles o ácido 2,4-diidroxibutírico (Harris, 1972). Um levantamento detalhado das reações de fragmentação e recombinação dos açúcares em condições alcalinas foi feito por Feather e Harris (1973).

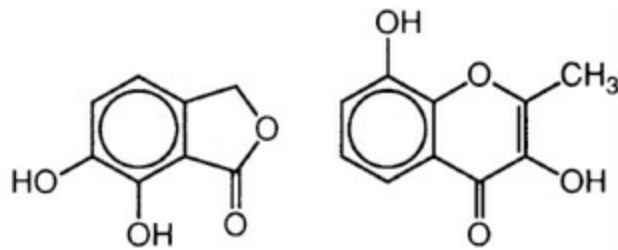


ESQUEMA 6.17 Degradação alcalina. Adaptado de Feather e Harris (1973).

C. Compostos aromáticos

Vários compostos cíclicos foram isolados entre os produtos formados quando soluções aquosas de d-glicose e d-frutose foram aquecidas a 160°C em pH de 4,5. Enquanto os compostos foram similares para ambas as hexoses, o rendimento foi muito mais baixo no caso da d-glicose. O principal composto formado foi o hidroximetilfurfural, apesar de um grande número de compostos fenólicos também ter sido produzido.

O fenol predominante detectado durante a degradação do ácido das hexoses foi o isobenzeno furanona, enquanto cromona alginetina foi o produto formado em maior quantidade no caso de pentoses e ácidos hexurônicos (Theander, 1981):



Isobenzofuranona

Alginetina

Entretanto, a diferença na especificidade não foi evidenciada quando os açúcares se degradaram em condições alcalinas. Forsskahl *et al.* (1976) notaram uma similaridade no padrão dos fenólicos formados em condições alcalinas ou neutras. Os compostos identificados incluíram vários enóis cíclicos e fenóis. O baixo rendimento obtido para tais compostos reflete sua instabilidade em condições alcalinas. A formação de ciclopentonas foi relatada por Shaw *et al.* (1968) no tratamento alcalino da d-frutose. Estes compostos foram isolados entre os componentes de aroma do café torrado por Gianturco *et al.* (1963) e tinham forte odor, igual ao caramelo. Os únicos compostos fenólicos comuns identificados nos tratamentos alcalinos e ácidos da glicose foram o catecol, 4-metil-1,2-benzeno diol e 3,4-dihidroxibenzaldeído (Popoff e Theander, 1976).

O desenvolvimento da cor é extremamente complexo e envolve uma série de reações de polimerização. Theander (1981) relatou que o ácido redutico e os catecóis são produtores de cor muito mais ativos do que os furfurais.

D. Anidridos de difrutose: um marcador de caramelização

A condensação de duas moléculas de frutose via caramelização foi observada durante o aquecimento de açúcares ou produtos alimentares ricos em açúcar conduzindo à formação de frações não voláteis importantes contendo anidridos de difrutose (Defaye *et al.*, 2000). Anidridos de difrutose, que são pseudodissacarídeos, foram descritos pela primeira vez por Tschiersky e Baltes (1989); posteriormente, Defaye e Garcia Fernandez (1994; 1995) estudaram a estrutura dos compostos. Eles foram monitorados como marcadores em alimentos e aditivos de alimentos, como caramelos, chicória e alimentos desidratados (Defaye *et al.*, 2000). Montilla *et al.* (2006) observaram que os anidridos de difrutose podem ser utilizados como indicadores da qualidade do café e também para testar a autenticidade do mel.

IX. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO

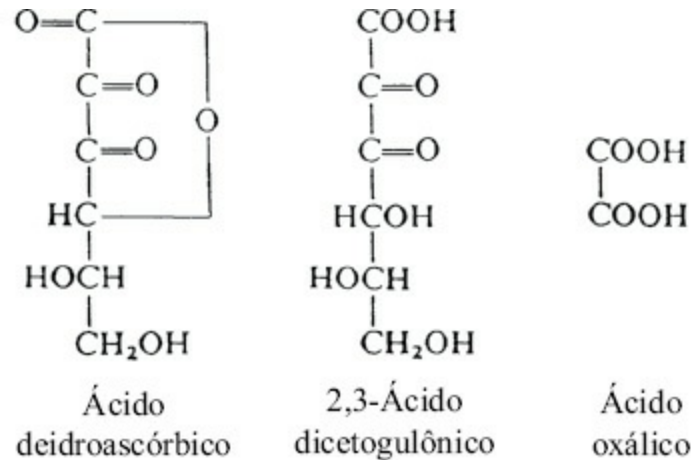
O escurecimento de sucos e concentrados de frutas cítricas também envolve reações do tipo Maillard entre aminoácidos e açúcares presentes em tais produtos, fato confirmado por Clegg (1969), que demonstrou uma melhoria na estabilidade da cor em suco de limão após a remoção de nitrogênio amino por resinas de troca catiônica. Uma patente foi subsequentemente registrada por Huffman, em 1974, baseada na estabilidade aumentada do aroma em concentrados de laranja quando tratados com resinas de troca catiônica. A aceleração do escurecimento por meio da adição de aminoácidos em sistemas de modelo contendo sucos de frutas cítricas confirmou sua função no escurecimento (Curl, 1949; Joslyn, 1957; Clegg, 1964).

Uma revisão do escurecimento de sucos de frutas cítricas, feita por Handwerk e Coleman (1988), sugeriu que a reação de Maillard é iniciada pela formação de hexosaminas de aminoácidos e de açúcares. A participação dos ácidos ascórbico e deidroascórbico ocorria em uma etapa posterior do processo mediante formação de α -dicarbonílas, similar àquela gerada durante a degradação de açúcares. Schulz *et al.* (2007) utilizaram espectrometria de massa com ionização eletronebulização para detectar simultaneamente α -dicarbonílas formadas pelo tratamento

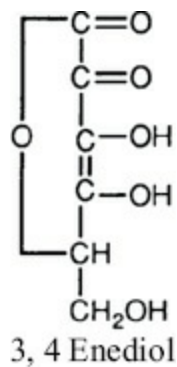
térmico de l-ácido ascórbico. Os compostos identificados foram o glioxal, metil glioxal, diacetil, 3-deoxi-l-pentose e l-treose. Esta seção vai focar a degradação do ácido ascórbico em produtos cítricos, sua função, além dos compostos amino no escurecimento de repolho desidratado.

O ácido ascórbico tem um papel central no escurecimento de sucos e concentrados cítricos, por exemplo, em sucos de limão e de pomelo. A reação de tal ácido em sucos de frutas e concentrados depende muito do pH, uma vez que o processo de escurecimento é inversamente proporcional na faixa de pH 2,0-3,5 (Braverman, 1963). Sucos com um pH mais alto são menos suscetíveis ao escurecimento, como sucos de laranja, com pH 3,4. Abaixo de pH 4,0, o escurecimento ocorre em especial pela decomposição do ácido ascórbico para furfural (Huelin, 1953; Huelin *et al.*, 1971).

A degradação do ácido ascórbico foi investigada por Herrmann e Andrae (1963), que identificaram 17 produtos de decomposição, incluindo ácido deidroascórbico e ácidos 2,3-dicetogulônicos e oxálico:



Otsuka *et al.* (1986) identificaram um produto da degradação do ácido 2,3-dicetogulônico em HPLC preparativa. A estrutura do composto parecia ser o 3,4-enediol na forma de 2,3-dicetogulono- δ -lactona. Era extremamente instável e desenvolvia uma coloração marrom intensa sob condições de temperatura moderadas. Estes pesquisadores consideraram o 3,4 enediol um elemento importante no escurecimento do ácido ascórbico:



A degradação do ácido ascórbico pode ocorrer tanto em condições aeróbicas como em anaeróbicas. Enquanto a quantidade de ar em um suco de frutas é mantida o mais baixo possível pelo uso de desaeração a vácuo e injeção de vapor ativo, pequena quantidade de oxigênio dissolvido ainda permanece no suco (0,05%) (Nagy, 1980). Apenas após o oxigênio ter sido usado é que a degradação anaeróbica da vitamina C ocorre, contudo em uma velocidade bastante lenta. Tatum *et al.* (1967) relataram a degradação de produtos de ácido ascórbico, metade dos quais idênticos aos produtos de escurecimento não enzimáticos encontrados nos sucos de laranja e toranjas desidratados e em pó, isto é, em sucos instantâneos. A degradação aeróbica e a anaeróbica do ácido ascórbico estão detalhadas no Esquema 6.18 (Bauernfreund e Pinkert, 1970). A dependência do oxigênio disponível na degradação da vitamina C foi reconhecida por Bauernfreund (1953). Kefford (1959) relatou que a degradação oxidativa do ácido ascórbico em sucos pasteurizados e enlatados ocorre durante os primeiros dias até o oxigênio livre ter sido

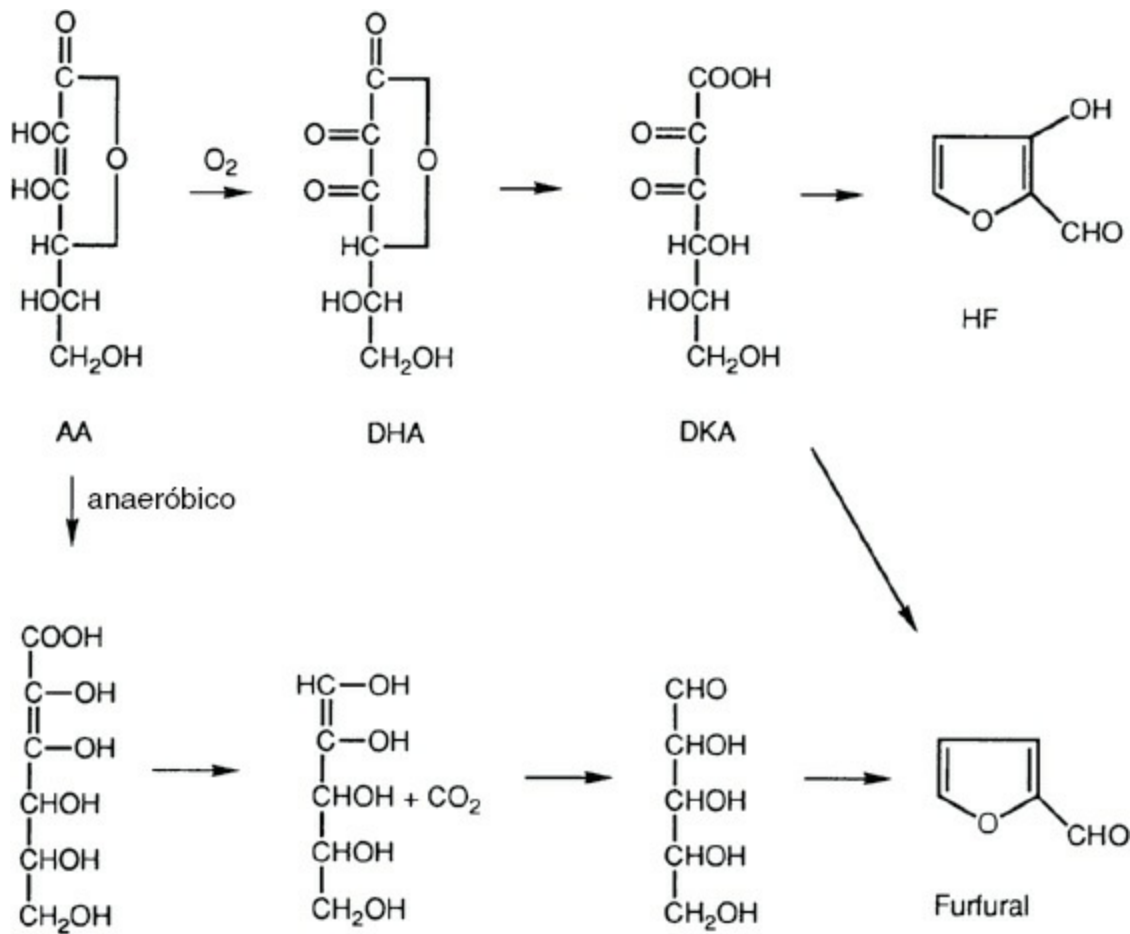
utilizado (Nagy e Smoot, 1977). Depois disso, o processo de degradação anaeróbica do ácido ascórbico prossegue, porém a um décimo da velocidade anterior. A melhoria da estabilidade da vitamina C foi observada em sucos vendidos em latas, quando comparada com latas revestidas de esmalte, pois o oxigênio reage com o metal e compete com o ácido ascórbico (Riester *et al.*, 1945). Um estudo sobre sucos de limão, feito por Mazin *et al.* (2007), demonstrou que a um aumento na concentração e na temperatura corresponde um aumento também na taxa de degradação do ácido ascórbico. Além disso, os pesquisadores desenvolveram uma equação direta que estima a vida útil de suco de limão estocado baseada na perda de ácido ascórbico na reação de primeira ordem em qualquer condição de temperatura e razão de degradação.

O escurecimento de sucos cítricos, como discutido anteriormente, não se deve somente ao ácido ascórbico. Aminoácidos também estão envolvidos via reação de Maillard, dependendo do pH do suco e da basicidade da amina, aspecto demonstrado pelo principal produto de degradação dos sucos com pH abaixo de 4,0 ser o furfural (Huelin, 1953; Huelin *et al.*, 1971). Em pH acima de 4,0, a via é ineficaz e explica a descoloração dos vegetais desidratados, que também tem a participação do ácido ascórbico. Ranganna e Setty (1968) verificaram que a descoloração do repolho desidratado ocorre em razão da degradação de Strecker entre ácido ascórbico e aminoácido, o que é facilitado pelas interações entre os produtos de oxidação do ácido ascórbico, o deidroascórbico ou os ácidos 2,3-dicetogulônico e os aminoácidos durante as etapas finais do processo de secagem.

A formação de pirazinas a partir do ácido ascórbico foi relatada em condições de torrefação e secagem (Adams e De Kimpe, 2009). A reação entre l-ácido ascórbico e l-treonina e l-serina resultou principalmente na formação de pirazinas. As alquilpirazinas formadas foram as 2-metilpirazina, 2,5-dietilpirazina, 2-etilpirazina, 2-etil-6-metilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina, 2,3-dietil-5-metilpirazina e 3,5-dietil-2-metilpirazina (Yu e Zhang, 2010).

X. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS PARA ESCURECIMENTO NÃO ENZIMÁTICO

A capacidade dos MRPs de retardar o desenvolvimento da rancidez foi relatada por vários pesquisadores (Griffith e Johnson, 1957; Anderson *et al.*, 1963; Kato, 1973; Yamaguchi e Fujimaki, 1974; Lingnert, 1980). A maioria dos estudos, incluindo os mais recentes, enfoca os efeitos antioxidantes *in vitro* de MRPs que escurecem ou de melanoidinas em sistemas modelo (Jing e Kitts, 2000; Morales e Jimenez-Perez, 2004; Hayase *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2009; 2010; Rao *et al.*, 2011). Os efeitos antioxidantes das melanoidinas também foram observados em cerveja (Morales e Jimenez-Perez, 2004), cacau torrado (Summa *et al.*, 2008), crostas de pão (Michalska *et al.*, 2008), vinagre (Tagliacruzchi *et al.*, 2010a), mel (Brudzynski e Miotto, 2011) e vinho (Lopez de Lerma *et al.*, 2010). Os efeitos protetores antioxidantes das melanoidinas foram atribuídos, em parte, à habilidade de quelar metais (Verzelloni *et al.*, 2010), enquanto a natureza aniônica torna-as capazes de quelar metais em transição (Daglia *et al.*, 2008; Rufian-Henares e de la Cueva, 2009; Tagliacruzchi *et al.*, 2010b). Cosovic *et al.* (2010) propuseram que os átomos de hidrogênio nas melanoidinas podem quelar Cu. Além de quelar íons de metal, a capacidade das melanoidinas de eliminar os radicais livres parece ser outro mecanismo que explica suas propriedades antioxidantes.



ESQUEMA 6.18 Possíveis caminhos para degradação da vitamina C (ácido ascórbico). AA: ácido ascórbico; DHA: ácido deidroascórbico; DKA: ácido dicetogulônico; HF: hidroxifurfural. Nagy (1980).

Uma forte relação linear foi observada entre a intensidade da cor da fração de melanoidina e a capacidade de eliminar radicais livres, como peroxil (Gomez-Ruiz *et al.*, 2008) e dicloreto de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamina (AAH) (Brudzynski e Miotto, 2011). Isto é mostrado na Figura 6.11 pela relação linear entre o escurecimento (expresso em a_{420}) e a capacidade das melanoidinas de eliminar os radicais livres do peroxil, expresso como R_{inh} (Morales e Jimenez-Perez, 2004). Alguns estudos não encontraram correlação linear entre a atividade de eliminação de radical e o escurecimento (Morales e Jimenez-Perez, 2004; Morales, 2005). No entanto, isto foi atribuído à natureza complexa dos componentes das melanoidinas assim como aos métodos de análise utilizados para medir a atividade de eliminação do radical (Wang *et al.*, 2011).

Utilizando o sistema de modelo MRP de café preparado com arabinose e serina (C), Liu e Kitts (2011) demonstraram que a reação de Maillard é a principal contribuinte para a atividade antioxidante nos grãos de café torrados (RC). A formação de MRPs nos grãos de café tostados e em não tostados (NRC) e o sistema de modelo arabinose-serina (C) foram medidos por fluorescência, espectro ultravioleta e visível e medições de três estímulos de Hunterlab. As atividades antioxidantes relativas de RC, NRC e C foram monitoradas pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio, além de métodos de determinação da capacidade antioxidante equivalente Trolox e poder redutor (R_p), enquanto o conteúdo ácido clorogênico total foi determinado nos extratos de RC e NRC. O espectro da absorção ultravioleta (250-700 nm) de RC foi semelhante ao dos extratos dos modelos de MRP (C), porém diverso daquele de NRC (Figura 6.12). O espectro de NRC, no entanto, foi similar ao padrão do ácido clorogênico, mas a ausência no RC confirmou sua quase completa destruição durante o processo de torrefação (Budryn *et al.*, 2009). Enquanto o espectro fluorescente para RC foi similar ao de controle (C), nenhuma fluorescência foi observada no extrato de NRC, em função da ausência da reação de Maillard e da falta de formação de MRPs. A alta atividade antioxidante associada ao extrato NRC foi atribuída aos fenólicos naturais que foram substancialmente perdidos na amostra torrada. Portanto, qualquer atividade antioxidante significativa em RC foi

atribuída principalmente aos MRPs formados durante a torrefação dos grãos de café e à similaridade com os MRPs produzidos no sistema modelo.

XI. INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO NÃO ENZIMÁTICO

Uma grande preocupação dos engenheiros e técnicos de alimentos é controlar ou minimizar as reações não enzimáticas no processamento de alimentos. Vários métodos foram propostos para o controle das reações, e constatou-se que um específico deve ser utilizado e adaptado para cada produto alimentar.

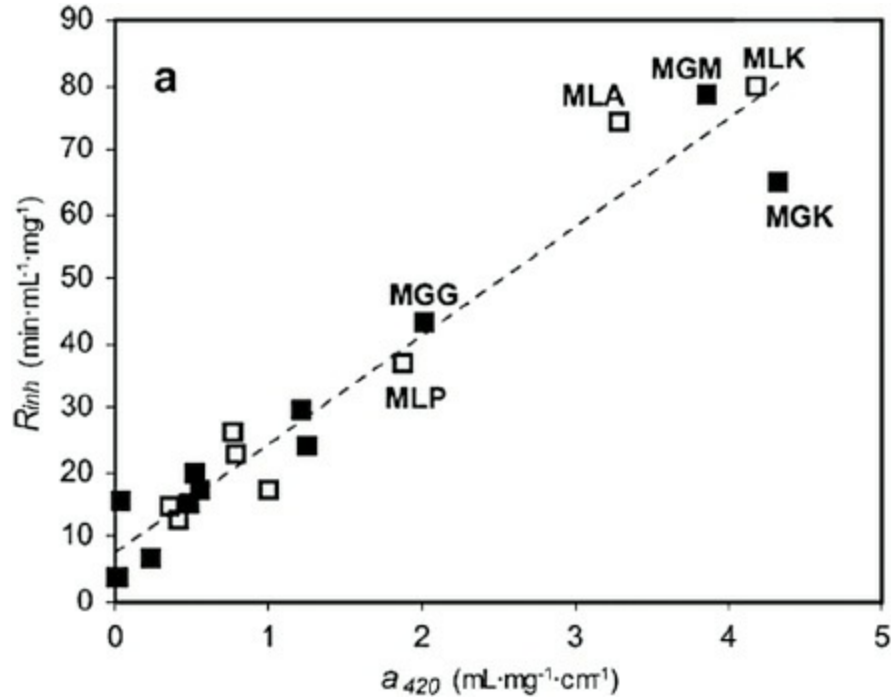


FIGURA 6.11 Relação entre atividade de eliminação dos radicais de peróxido das melanoidinas, expressa como R_{inh} , e escurecimento (expresso como a_{420}), para melanoidinas glicose (■) e melanoidinas lactose (□). A linha pontilhada mostra a regressão linear para melanoidinas a partir do sistema modelo. Morales e Jimenez-Perez (2004).

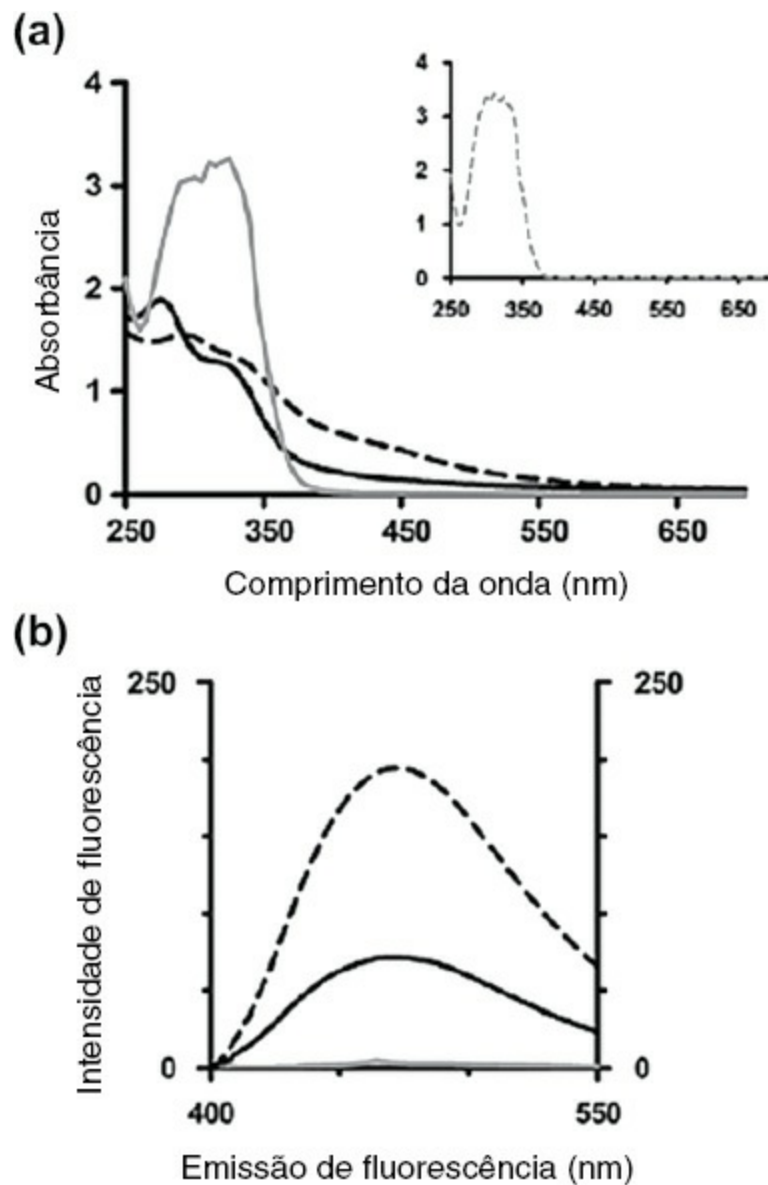


FIGURA 6.12 (A) espectros visíveis ultravioleta (UV) e (B) espectros de emissão de fluorescência de café e produtos da reação de Maillard (MRPs). Os espectros UV de 0,1 mg/ml de ácido clorogênico (CGA) também estão mostrados (linha tracejada; A inserido). As amostras foram diluídas em 0,5 mg/ml com água deionizada antes da medida do espectro UV e diluídas em 0,25 mg/ml como água milli-Q antes da medida do espectro de fluorescência. Grãos de café não torrados (NRC) (linha cheia cinza); grãos de café torrados (RC1) (linha cheia preta); modelo de produtos de reação de Maillard (MRP-1) (linha tracejada). Os padrões de espectros RC1 e RC2 são similares, portanto apenas os espectros de RC1 estão apresentados na figura. Liu e Kitts (2011).

A. Temperatura

Um aumento da temperatura ou do tempo do tratamento de aquecimento acelera a velocidade das reações (Labuza e Baisier, 1992). Assim, abaixando-se a temperatura durante o processamento e a estocagem pode-se retardar a fase lag, isto é, o período necessário para a formação de produtos com coloração marrom. A maioria dos alimentos não escurece em temperaturas abaixo de -10°C durante o período normal de armazenamento (Nursten, 2005).

B. Teor de umidade

A dependência das reações de escurecimento do conteúdo de umidade proporciona um método conveniente de controle. Uma redução no conteúdo da umidade em produtos alimentares sólidos por meio da desidratação diminui a mobilidade dos componentes reativos (Loncin *et al.*, 1968; Eichner e Karel, 1972; Labuza e Saltmarch,

1981; Fox *et al.*, 1983). No entanto, muitas vezes a velocidade de escurecimento atinge o ponto máximo com um conteúdo de umidade de 5-30%, de modo que uma desidratação parcial pode piorar o escurecimento em vez de melhorá-lo (Nursten, 2005). No caso de soluções, um aumento da atividade da água diminui a velocidade da reação, o que não apenas dilui o efeito dos reagentes, como a água, mas também representa o primeiro produto da reação da etapa de condensação da reação de escurecimento de Maillard. Este fato está ilustrado na Figura 6.13, em que a velocidade de escurecimento do sistema avicel-glicose-glicina permaneceu baixo tanto em alta quanto em baixa a_w (McWeeny, 1973).

C. pH

A reação de Maillard costuma ser favorecida em condições alcalinas, de modo que a diminuição de pH é um método de controle útil (Fox *et al.*, 1983; Nursten, 2005). Este método tem sido usado na produção de ovo em pó, no qual ácido é adicionado antes de ser iniciado o processo de desidratação para diminuir o pH. O pH é restaurado pela adição de bicarbonato de sódio ao ovo reconstituído.

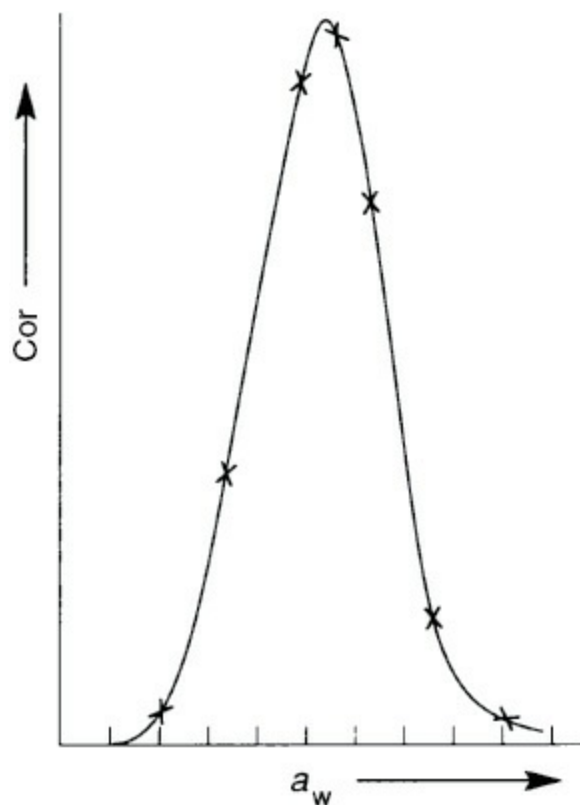


FIGURA 6.13 Escurecimento do sistema avicel-glicose-glicina quando afetado pela atividade de água (a_w) após 8 dias a 38°C. McWeeny (1973).

D. Empacotamento a gás

No empacotamento a gás, o oxigênio é excluído ao ser utilizado um gás inerte, reduzindo, assim, a formação de produtos da oxidação de lipídeos capazes de reagir com aminoácidos. Acredita-se que a exclusão de oxigênio afeta aquelas reações envolvidas no processo de escurecimento, mas não a etapa inicial da reação de carbonilamino.

E. Agentes bioquímicos

A remoção ou a conversão de um dos reagentes das interações açúcar-aminoácidos é o princípio do método bioquímico. Por exemplo, na produção comercial de clara de ovo, a glicose pode ser removida pela fermentação da levedura antes da secagem. A aplicação direta de enzimas, como a glicose oxidase e a catalase, controla a conversão de glicose em ácido glucônico, que passa, então, a não ser mais capaz de se combinar com aminoácidos. Esta enzima tem sido usada há anos para remover a glicose do ovo antes da secagem por pulverização (Lightbody e Fevold, 1948). A glicose oxidase tem a vantagem adicional de remover todo o oxigênio residual, e é utilizada para eliminá-lo durante a produção de produtos engarrafados.

F. Inibidores químicos

Uma variedade de inibidores químicos tem sido usada para limitar o escurecimento durante a produção e a estocagem de vários produtos alimentares. Os mais utilizados são dióxido de enxofre e sulfitos, apesar dos tióis, sais de cálcio e ácidos aspártico e glutâmico também terem sido estudados. O uso de tióis como inibidores é limitado em decorrência de suas propriedades desagradáveis.

1. Dióxido de enxofre/sulfitos

O dióxido de enxofre é único em sua habilidade de inibir a reação de Maillard; pode ser aplicado na forma de gás ou em solução de sulfito ou bisulfito. O dióxido de enxofre é capaz de clarear parcialmente os cromóforos já formados, e também coibir a coloração no início da reação (McWeeny, 1984). O mecanismo envolve a ligação de dióxido de enxofre/sulfito com glicose para formar a hidróxi-sulfonato e outros compostos, dos quais o dióxido de enxofre/sulfito pode ser liberado de modo reversível, resultando no bloqueio do grupo carbonila do açúcar, tornando-o indisponível para a interação da típica reação de Maillard. À medida que a reação ocorre, o dióxido de enxofre/sulfito torna-se ligado irreversivelmente, permitindo, assim, o monitoramento do progresso de escurecimento pela medida de sua quantidade na forma ligada ou livre. Por exemplo, o desenvolvimento da cor de um sistema modelo de glicose-glicina não foi observado por McWeeny (1969), até que todo o sulfito livre fosse esgotado, enquanto a razão sulfito ligado e livre aumentou à medida que ocorria a reação (Figura 6.14).

A inibição do escurecimento não enzimático por sulfito envolve a formação de sulfonatos estáveis. No caso do escurecimento por ácido ascórbico, 3-deoxi-4-sulfopentulose é formado com o composto de 6 carbonos correspondentes, 6-deoxi-4-sulfohexulose, pois a inibição por sulfito impede a reação de Maillard (Knowles, 1971; Wedzicha e McWeeny, 1974a; 1974b). Wedzicha e McWeeny (1975) monitoraram a formação de vários sulfonatos orgânicos de alimentos com sulfitos. Esses compostos possuem um grupo de dicarbonilas que os fazem particularmente reativos e a temperaturas elevadas podem levar à formação de compostos de enxofre com outros componentes de alimentos. McWeeny (1984) apontou que pesquisas futuras sobre o papel do dióxido de enxofre na inibição da reação de Maillard devem focar a natureza dos precursores com os quais ele reage. Além do mais, necessita-se de mais informações sobre o efeito do tempo, da temperatura, da pressão do pH e dos aditivos na formação qualitativa e quantitativa dos compostos formados em alimentos nos quais o dióxido de enxofre ou sulfito foi adicionado. Este trabalho é particularmente importante em vista da corrente atual que determina um limite no consumo de dióxido de enxofre e sulfitos em alimentos.

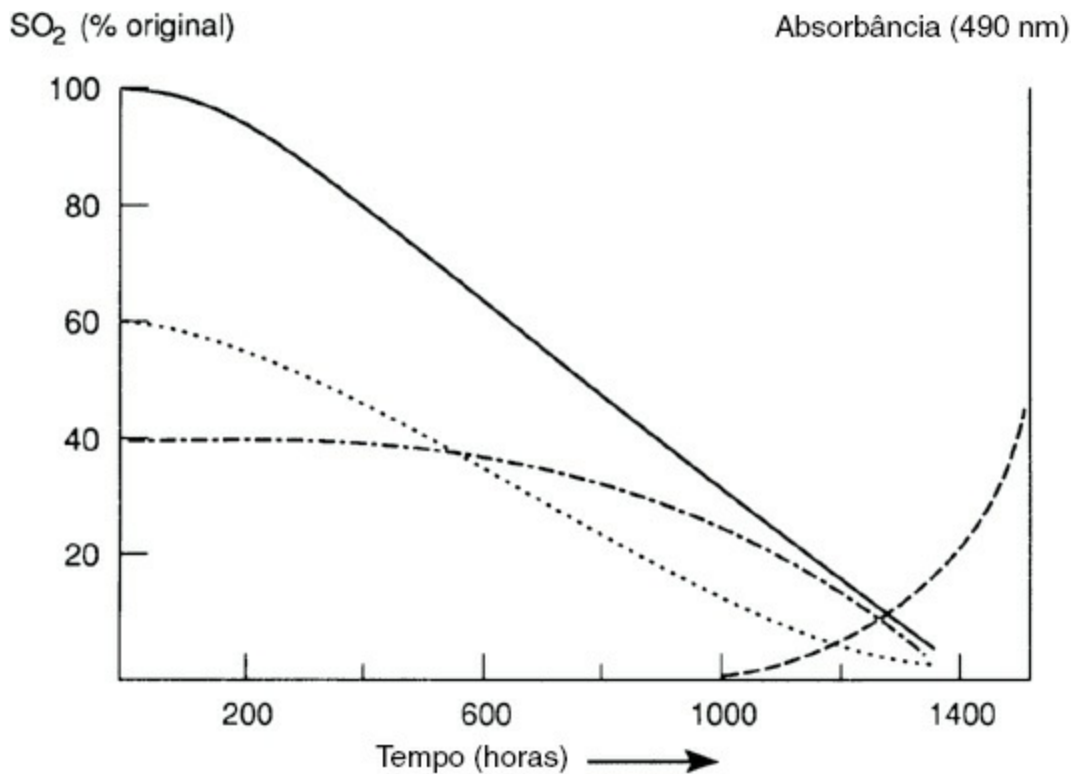


FIGURA 6.14 Produção de cor e perda de dióxido de enxofre (SO₂) de glicose-glicina-SO₂ durante incubação a 55 °C. (•••)SO₂ livre; (•-•-)SO₂ ligado; (---)SO₂ total; (—) absorbância a 490 nm. McWeeny (1969). Copyright © The Institute of Food Technologists.

2. Ácidos aspártico e glutâmico

Um estudo feito por Nafisi e Markakis (1983) esclareceu o potencial dos ácidos aspártico e glutâmico na inibição do escurecimento pela reação de Maillard. Utilizando sistemas modelo contendo lisina-glicose/lisina-frutose (pH de 8,0, 60°C por 58 horas), estes pesquisadores descobriram que o ácido l-aspártico ou o ácido l-glutâmico diminuiu a taxa de escurecimento, como pode ser visto na Tabela 6.6. Ao mergulhar batatas fatiadas especialmente preparadas em soluções com ácido l-aspártico ou l-glutâmico antes de fritá-las, observaram que escureceram menos, medidas em valores *L* por Hunter. Isto correspondeu a um valor médio de 38,4 para fatias de batatas não tratadas, quando comparadas com 46,4 e 43,7 das batatas fatiadas mergulhadas em ácido aspártico e em glutâmico, respectivamente.

Enquanto os vários inibidores químicos discutidos podem, com variados graus de sucesso, limitar o progresso do escurecimento, o valor nutricional dos alimentos também pode ser reduzido. Por exemplo, o estágio inicial da reação de Maillard – a etapa do carbonilamino – pode fazer com que os aminoácidos fiquem indisponíveis sem que nenhum escurecimento seja observado. No entanto, é muito difícil assegurar que tal estágio possa ser evitado.

TABELA 6.6 Valores *L* de Hunter para batatas fritas de controle e tratadas^a

Repetição	Controle	Mergulhadas em ácido aspártico	Mergulhadas em ácido glutâmico
1	39,0 ^b	47,6	44,2
2	38,3	44,6	44,7
3	38,2	45,3	43,0
4	39,0	47,0	43,0
5	37,9	46,8	43,7
6	36,7	46,6	43,9
7	39,5	47,2	43,6
Média	38,4 ± 0,57 ^c	46,4 ± 1,00	43,7 ± 0,57

^a O tratamento consistiu em desidratar por congelamento as fatias de batata e mergulhá-las em ácido aspártico ou glutâmico 0,04 M antes da fritura.

^b Cada valor de L é a média de três leituras obtidas pela rotação da amostra em ângulos de 120°.

^c As diferenças entre amostras-controle e tratadas são significativas no nível 99% de probabilidade. A diferença entre as amostras tratadas não é significativa.

Reproduzido de Nafisi e Markarkis (1983).

REFERÊNCIAS

- Aaslyng, M.D., Martens, M., Poll, L., Nielsen, P.M., Flyge, H., Larsen, L.M., 1998. Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring. *J. Agric. Food Chem.* 46, 481-489.
- Abrams, A., Lowy, P.H., Borsook, H., 1955. Preparation of 1-amino-1-deoxy-2-keto hexoses from aldohexoses and amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4794-4796.
- Adams, A., De Kimpe, N., 2006. Chemistry of 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, and 5-acetyl-2,3-dihydro-4H-thiazine: Extraordinary Maillard flavor compounds. *Chem. Rev.* 106, 2299-2319.
- Adams, A., De Kimpe, N., 2009. Formation of pyrazines from ascorbic acid and amino acids under dry-roasting conditions. *Food Chem.* 115, 1417-1423.
- Aeschbacher, H.V., Chappus, C., Manganel, M., Aesbach, R., 1981. Investigation of Maillard products in bacterial mutagenicity test systems. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 279-294.
- Ajandouz, E.H., Puigserver, A., 1999. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1786-1793.
- Ajandouz, E.H., Tchiakpe, L.S., Dalle Ore, F., Benajiba, A., Puigserver, A., 2001. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *J. Food Sci.* 66, 926-931.
- Ames, J.M., Guy, R.C.E., Kipling, G.J., 2001. Effect of pH, temperature, moisture on the formation of volatile compounds in glycine/glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4315-4323.
- Amrein, T.M., Andres, L., Escher, F., Amado, P., 2007. Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Addit. Contam.* 24, 13-25.
- Anderson, R.H., Moran, D.H., Huntley, T.E., Holahan, J.L., 1963. Responses of cereals to antioxidants. *Food Technol.* 17, 115-120.
- Anese, M., Suman, M., Nicoli, M.C., 2010. Acrylamide removal from heated foods. *Food Chem.* 119, 791-794.
- Anet, E.F.L.J., 1960. Degradation of carbohydrates. I. Isolation of 3-deoxyhexosones. *Aust. J. Chem.* 13, 396-403.
- Anet, E.F.L.J., 1962. Degradation of carbohydrates. III. Unsaturated hexosones. *Aust. J. Chem.* 15, 503-509.
- Anet, E.F.L.J., 1964. 3-Deoxyglycosuloses (3-deoxyglycosones) and the degradation of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.* 19, 181-218.
- Anet, E.F.L.J., Reynolds, T.M., 1957. Chemistry of nonenzymic browning. 1. Reactions between amino acids, organic acids, and sugar in freeze-dried apricots and peaches. *Aust. J. Chem.* 10, 182-192.
- Baltes, W., 1973. Nichtenzymatische Veraenderungen bei der Beund Verarbeitung von Lebens. Z. Ernahrungswiss. Suppl. 16, 34-49.
- Barbetti, P., Chiappini, I., 1976. Fractionation and spectroscopic characterization of melanoidic pigments from a glucose-glycine non-enzymic browning system. *Ann. Chim. (Rome)* 66, 293.
- Barbetti, P., Chiappini, I., 1976. Identification of the furan group in the melanoidic pigments from a glucose-glycine Maillard reaction. *Ann. Chim. (Rome)* 66, 485.
- Bauernfreund, J.C., 1953. The use of ascorbic acid in processing food. *Adv. Food Res.* 4, 359-431.
- Bauernfreund, J.C., Pinkert, D.M., 1970. Food processing with ascorbic acid. *Adv. Food Res.* 18, 219-315.
- Bell, L.N., 1997. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chem.* 59, 143-147.
- Benzing-Purdie, L.M., Ripmeester, J.A., Ratcliffe, C.L., 1985. Effects of temperature on Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 33, 31-33.
- Blank, L., Devaud, S., Matthey-Doret, W., Robert, F., 2003. Formation of odorants in Maillard model systems based on L-proline as affected by pH. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3643-3650.
- Bobbio, P.A., Bobbio, F.O., Trevisan, L.M.V., 1973. Estudos sobre a meacao de Maillard. 1. Efeitos da temperatura e do pH. *An. Acad. Bras. Cienc.* 45, 419.
- Bobbio, P.A., Imasato, H., Leite, S.R., de, A., 1981. Maillard reaction. Preparation and characterization of melanoidins from glucose and fructose with glycine. *An. Acad. Bras. Cienc.* 53, 83.
- Bohart, G.S., Carson, J.F., 1955. Effects of trace metals, oxygen, and light on the glucose-glycine browning reaction. *Nature (London)* 175, 470-471.
- Braverman, J.B.S., 1963. Introduction to the Biochemistry of Foods. Elsevier, Amsterdam.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature (London)* 414, 813-820.
- Brudzynski, K., Miotto, D., 2011. The recognition that of high molecular melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chem.* 125, 570-575.
- Bruechert, L.J., Zhang, Y., Huang, T.C., Hartman, T.G., Rosen, R.T., Ho, C.T., 1988. Contribution of lipids to volatile generation in extruded corn-based model systems. *J. Food Sci.* 53, 1444-1447.
- Bryce, D.J., Greenwood, C.T., 1963. Thermal degradation of starch. *Stärke* 15, 166-170.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsedek, A., Zyzelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S., Janda, B., 2009. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 913-922.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., 1974. Alkyl thiazoles in potato products. *J. Agric. Food Chem.* 22, 912-914.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., Juliano, B.O., 1982. 2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice. *Chem. Ind. (London)* 12, 958-959.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., Juliano, B.O., Turnbaugh, J.G., 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* 31, 823-826.
- Carlin, J.T., Jin, Q.Z., Huang, T.C., Ho, C.T., Chang, S.S., 1986. Identification of alkyloxalzone in the volatile compounds from french-fried potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 33, 621-623.
- Chang, S.S., Hirai, C., Reddy, B.R., Herz, K.O., Kato, A., Sipma, G., 1968. Isolation and identification of 2,4,5-trimethyl-3-oxazoline and 3,5-dimethyl 1,2,4-trithiolane in the volatile flavour compounds of boiled beef. *Chem. Ind. (London)*, 1639-1644.
- Chiu, E.M., Kuo, M.C., Bruechert, L.J., Ho, C.T., 1990. Substitution of pyrazines by aldehydes in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 89, 58-61.
- Ciner-Doruk, M., Eichner, K.Z., 1979. Bildung und stabilitat von Amadori-Verbindungen in wasseramen lebensmitteln. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 168, 9-20.
- Clegg, K.M., 1964. Non-enzymic browning of lemon juice. *J. Sci. Food Agric.* 15, 878-885.
- Clegg, K.M., 1969. Citric acid and the browning of solutions containing ascorbic acid. *J. Sci. Food Agric.* 17, 566.
- Coleman, E.C., Ho, C.-T., Chang, S.S., 1981. Isolation and identification of volatile compounds from baked potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 29, 42-48.
- Cosovic, B., Vojvodic, V., Boskovic, N., Plavsic, M., Lee, C., 2010. Characterization of natural and synthetic humi substances (melanoidins) by chemical composition and adsorption measurements. *Org. Geochem.* 41, 200-205.
- Curl, L.A., 1949. Ascorbic acid losses and darkening on storage at 69°C (120°F) of synthetic mixtures analogous to orange juice. *Food Res.* 14, 9-14.
- Daglia, M., Papetti, A., Aceti, C., Sordelli, B., Gregotti, C., Gazzani, G., 2008. Isolation of high molecular weight components and contributions to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsome system. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11653-11660.

- Danehy, J.P., 1986. Maillard reaction: nonenzymic browning in food systems with special reference to the development of flavor. *Adv. Food Res.* 30, 77-138.
- Dawes, I.W., Edwards, R.A., 1960. Methyl substituted pyrazines as volatile reaction products of heated aqueous aldose, amino acid mixtures. *Chem. Ind. (London)*, 2203.
- Defaye, J., Garcia Fernandez, J.M., 1994. Protonic thermal activation of saccharose and the oligosaccharide composition of caramel. *Carbohydr. Res.* 256, C1-C4.
- Defaye, J., Garcia Fernandez, J.M., 1995. The oligosaccharide components of caramel. *Zuckerindustrie* 120, 700-704.
- Defaye, J., Garcia Fernandez, J.M., Ratsimba, V., 2000. Les molécules de la caramélisation: structure et méthodologies de détection et d'évaluation. *L'Actualité Chim.* 11, 24-27.
- Dworschak, E., Hegedüs, M., 1974. Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins in milk powder. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.* 3, 337-347.
- Dworshak, E., 1980. Nonenzymic browning and its effect on protein nutrition. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 1-40.
- Eichner, D., 1981. Antioxidant effect of Maillard reaction intermediates. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 441-451.
- Eichner, K., Karel, M., 1972. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *Food Chem.* 20, 218-223.
- Eichner, K., Ruetter, M., Wittman, R., 1994. In: Fiot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrel, R.F., Liardon, R. (Eds.), *Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhauser, Basel, p. 63-77.
- Ellis, G.P., 1959. The Maillard reaction. *Adv. Carbohydr. Chem.* 14, 63-134.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., 1997. Investigation of the reaction between ammonium sulfide, aldehydes, and α -hydroxyketones or α -dicarbonyls to form some lipid-Maillard interaction products found in cooked beef. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3595-3602.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M.B., Wood, J.D., 1997. Novel thiazoles and 3-thiazolines in cooked beef aroma. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3603-3607.
- Eskin, N.A.M., Henderson, H.M., Townsend, R.J., 1971. *Biochemistry of Foods*. Academic Press, New York p. 96.
- Farmer, L.J., Mottram, D.S., Whitfield, F.B., 1989. Volatile compounds produced in Maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid. *J. Sci. Food Agric.* 49, 347-368.
- Feather, M.S., Harris, J.F., 1973. Dehydration reactions of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.* 28, 161-224.
- Feather, M.S., Huang, R.D., 1986. Some studies on a Maillard polymer derived from l-alanine and d-glucose. *Dev. Food Sci.* 13, 183-192.
- Feather, M.S., Nelson, D., 1984. Maillard polymers derived from d-glucose, d-fructose, 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde, and glycine and methionine. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1428.
- Feather, M.S., Harris, D.W., Nichols, S.B., 1972. Routes of conversion of d-xylose, hexuronic acids and l-ascorbic acid to 2-furaldehyde. *J. Org. Chem.* 37, 1606-1608.
- Feeney, R.E., Blankenhorn, G., Dixon, H.B.F., 1975. Carbonylamine reactions in protein chemistry. *Adv. Protein Chem.* 29, 135-203.
- Ferretti, A., Flanagan, C.P., 1973. Characterization of volatile constituents of an N-formyl-l-lysine-d-lactose browning system. *J. Agric. Food Chem.* 21, 35-37.
- Ferretti, A., Flanagan, V.P., 1971. The lactose-casein (Maillard) browning system: volatile components. *J. Agric. Food Chem.* 19, 245-249.
- Finot, P.A., Mauron, J., 1972. Le blocage de la lysine par la réaction de Maillard. II. Propriétés chimiques des dérivés N-(desoxy-1-d-fructosyl-1) et N-(desoxy-1-lactulosyl-1) de la lysine. *Helv. Chim. Acta.* 55, 1153-1164.
- Finot, P.-A., 2005. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 1-8.
- Finot, P.-A., Bricout, J., Viani, R., Maurion, J., 1968. Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia* 24, 1097-1099.
- Flink, J.M., 1983. Nonenzymic browning of freeze-dried saccharose. *J. Food Sci.* 48, 539-542.
- Forskahl, I., Popoff, T., Theander, O., 1976. Reactions of d-xylose and d-glucose in alkaline aqueous solutions. *Carbohydr. Res.* 48, 13-21.
- Fox, M., Loncin, M., Weiss, M., 1983. Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the velocity of the Maillard reactions in foods. *J. Food Qual.* 6, 103-118.
- Friedman, M., 1982. Chemically reactive and unreactive lysine as an index of browning. *Diabetes* 31, 5-14.
- Friedman, M., 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504-4526.
- Gianturco, M., Giammarino, A.S., Pitcher, R.G., 1963. The structures of five cyclic diketones isolated from coffee. *Tetrahedron* 19, 2051-2059.
- Gokmen, V., Senyuva, H.Z., 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.* 103, 196-203.
- Gokmen, V., Serpen, A., Acar, O.C., Morales, F.J., 2008. Significance of furosine as heat-induced marker in cookies. *J. Cereal Sci.* 48, 843-847.
- Gomez-Ruiz, J., Ames, J., Leake, D., 2008. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1017-1024.
- Griffith, T., Johnson, J.A., 1957. Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies. *Cereal Chem.* 34, 159-169.
- Gu, F.L., Kim, J.M., Abbas, S., Zhang, X.M., Xia, S.Q., Chen, Z.X., 2009. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system. *Food Chem.* 117, 48-54.
- Gu, F.L., Kim, J.M., Abbas, S., Zhang, X.M., Xia, S.Q., Chen, Z.X., 2010. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose. *Food Chem.* 120, 505-511.
- Guan, Y.-G., Wang, J., Yu, S.-J., Zeng, X.-A., Han, Z., Liu, Y.-Y., 2010. A pulsed electric field for promoting Maillard reaction in an asparagins-glucose model system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1303-1309.
- Guan, Y.-G., Wang, J., Yu, S.-Y., Xu, X.-B., Zhu, S.-M., 2010. Effects of ultrasound intensities on a glycin-maltose model system – a means of promoting Maillard reaction. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 758-764.
- Guerra-Hernandez, E., Corzo, N., Garcia-Vilanova, B., 1999. Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.* 29, 171-176.
- Handwerk, R.L., Coleman, R.L., 1988. Approaches to the citrus browning problem: a review. *J. Agric. Food Chem.* 36, 231-236.
- Harris, D.W., Feather, M.S., 1973. Evidence for a C-2→C-1 intramolecular hydrogen transfer during the acid-catalyzed isomerization of d-glucose to d-fructose. *Carbohydr. Res.* 30, 359.
- Harris, D.W., Feather, M.S., 1975. Studies on the mechanism of the interconversion of d-glucose, d-mannose and d-fructose in acid solution. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 178-181.
- Harris, J.F., 1972. Alkaline decomposition of d-xylose-1-C, d-glucose-1-C and d-glucose-6-C. *Carbohydr. Res.* 23, 207-215.
- Harris, R.L., Mattil, H.A., 1940. The effect of hot alcohol on purified animal proteins. *J. Biol. Chem.* 132, 477-485.
- Hartman, G.J., Jin, Q.Z., Collins, G.J., Lee, K.N., Ho, C.-T., Chang, S.S., 1983. Nitrogen-containing heterocyclic compounds identified in the volatile flavor constituents of roast beef. *J. Agric. Food Chem.* 31, 1030-1033.
- Hartman, G.J., Scheide, J.D., Ho, C.-T., 1984. Effect of water activity on the major volatiles produced in a meat model system approximating cooked meat. *J. Food Sci.* 49, 697-613.
- Hartman, G.J., Scheide, J.D., Ho, C.-T., 1984. Volatile products formed from a flavor model system at high and low moisture levels. *Lebensm. Wiss. Technol.* 17, 222-225.
- Hashiba, H., 1978. Isolation and identification of Amadori compounds from soy sauce. *Agric. Biol. Chem.* 42, 763-768.
- Hashiba, H., 1979. Oxidative browning of soy sauce. I. The roles of cationic fraction from soy sauce. *Nippon Shoyu Kenkyusho Zasshi* 5 (4), 169.

- Hashiba, H., 1986. Oxidative browning of Amadori compounds color formation by iron with Maillard reaction products. *Dev. Food Sci.* 13, 155-164.
- Hayase, F., Takahashi, Y., Tominaga, S., Miura, M., Gomyo, T., Kato, H., 1999. Identification of blue pigment in a d-xylose-glycine reaction system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1512-1514.
- Hayase, F., Usui, T., Watanabe, H., 2006. Chemistry and some biological effects of model melanoidins and pigments as Maillard intermediates. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1171-1179.
- Hayase, F., Usui, T., Shirahashi, Y., Machida, T., Ito, M., Nishitani, N., Shimohira, K., Watanabe, H., 2008. Formation mechanisms of melanoidin and fluorescent pyridinium compounds as advanced glycation end products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 53-58.
- Hayashi, T., Namiki, M., 1986. Role of sugar fragmentation: an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar and amino acid. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1965-1970.
- Hayashi, T., Ohata, Y., Namiki, M., 1977. Electron spin resonance spectral study of the structure of the novel free radical products formed by the reactions of sugars with amino acids or amines. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1282-1287.
- Hendel, C.E., Silveira, V.G., Harrington, W.O., 1955. Rates of non-enzymatic browning of white potato during dehydration. *Food Technol.* 9, 433-438.
- Henle, T., Walter, H., Krause, I., Klostermeyer, H., 1991. Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* 1, 125-135.
- Henle, T., Walter, H., Krause, I., Klostermeyer, H., 1991. Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori product lactulosylelysine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 193, 119-122.
- Herrmann, J., Andrae, W., 1963. Oxydative Abbauprodukte der l-Ascorbinsäure. I. Paper-chromatographischer Nachweis. *Nahrung* 7, 243.
- Heyns, K., Breuer, H., 1958. Darstellung und Verhalten weiterer N-substituierter 2-Amino-2-desoxy-aldosen aus d-fructose und Aminosäuren. *Chem. Ber.* 91, 2750-2762.
- Heyns, K., Klier, M., 1968. Braunungsreaktionen und Fragmentierungen von kohlenhydraten. *Carbohydr. Res.* 6, 436-448.
- Heyns, K., Noack, H., 1962. Die Umsetzung von d-Fructose mit l-Lysin und l-Histidine mit Hexosen. *Chem. Ber.* 95, 720-727.
- Heyns, K., Noack, H., 1964. Die Umsetzung von l-Tryptophan und l-Histidine mit Hexosen. *Chem. Ber.* 97, 415-418.
- Heyns, K., Paulsen, H., 1960. On the chemical basis of the Maillard reaction. *Wiss. Veroff. Dtsch. Ges. Ernähr.* 5, 15-44.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2004. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation product 4,5-(E)-heptenal. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 501-508.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2004. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7126-7131.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2005. Interplay between Maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 319-326.
- Hildago, A., Pompei, C., Zambuto, R., 1998. Heat damage evaluation during tomato products processing. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4387-4390.
- Hill, V.M., Ledward, D.A., Ames, J.M., 1996. Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of browning in a glucose-lysine system. *J. Agric. Food Chem.* 44, 394-400.
- Hill, V.N., Ames, J.M., Ledward, D.A., Royle, I., 1998. The use of capillary electrophoresis to investigate the effect of high hydrostatic pressure on the Maillard reaction. In: O'Brien, J., Nursten, H.E., Crabbe, M.J.C., Ames, J.M. (Eds.), *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 121-126.
- Ho, C.T., Hartman, G.J., 1982. Formation of oxazolines and oxazoles in Strecker degradation of dl-alanine and l-cysteine with 2,3-butanedione. *J. Agric. Food Chem.* 30, 793-794.
- Hodge, J.E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1, 928-943.
- Hodge, J.E., 1967. Origin of flavors in foods. Nonenzymic browning reactions. In: Schultz, H.W. (Ed.), *Symposium on Foods: The Chemistry and Physiology of Flavors*. Avi, Westport, CT, p. 466-491.
- Hodge, J.E., Osman, E.M., 1976. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Principles of Food Science. Part 1. Food Chemistry*. Dekker, New York.
- Hodge, J.E., Fisher, B.E., Nelson, E.C., 1963. Dicarbonyls, reductones and heterocyclics produced by the reactions of reducing sugars with secondary amine salts. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 84-92.
- Hodge, J.E., Mill, F.D., Fisher, B.E., 1972. Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reactions. *Cereal Sci. Today.* 17, 34-40.
- Hoffmann, T., Schieberle, P., 1995. Studies in the formation and stability of the roast-flavor compound 2-acetyl-2-thiazoline. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2946-2950.
- Hofmann, T., 1998. 2-Alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-yl]aza-methylidene-1,3-imidazolidine – a novel colored substructure in melanoidins formed by Maillard reactions of bound arginine with glyoxal and furan-2-carbaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3896-3901.
- Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., 2007. A prospective study of the dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 2304-2313.
- Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., 2008. Dietary acrylamide intake and risk of renal cell, bladder and prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1428-1438.
- Holtermand, A., 1966. The browning reaction. *Staerke* 18, 319-325.
- Horak, F.P., Kessler, H.G., 1981. The influence of UHT heating sterilization on lysine in milk. *Milchwissenschaft* 36, 543-547.
- Horn, J.M., Lichtenstein, H., Womack, M., 1968. Availability of amino acids. A methionine-fructose compound and its availability to microorganisms and rats. *J. Agric. Food Chem.* 16, 741-745.
- Huang, T.C., Fu, H.Y., Ho, C.T., 1996. Mechanistic studies of tetramethyl pyrazine under weak acidic conditions and high hydrostatic pressure. *J. Agric. Food Chem.* 44, 240-246.
- Huelin, P.E., 1953. Studies on the anaerobic decomposition of ascorbic acid. *Food Res.* 15, 78.
- Huelin, P.E., Coggiola, I.M., Sidhu, G.S., Kennett, B.H., 1971. The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. *J. Sci. Food Agric.* 22, 540-542.
- Huffman, C.F., 1974. Treatment of fruit juices with ion-exchange resins. US Patent No. 3,801,717.
- Hurrell, R.F., Carpenter, K.J., 1974. Mechanism of heat damage in proteins. IV. The reactive lysine content of heat-damaged material as measured in different ways. *Br. J. Nutr.* 32, 589-604.
- Hurrell, R.F., Carpenter, K.J., 1981. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reaction. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 159.
- Hwang, H.-I., Hartman, T.G., Ho, C.-T., 1995. Relative reactivities of amino acids in the formation of pyridines, pyrroles, and oxazoles. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2917-2921.
- Imasato, H., Leite, S.R., de, A., Bobbio, P.A., 1981. Maillard reaction. VI. Structural determinations in melanoidin from fructose and glycine. *An. Acad. Bras. Cienc.* 53, 83-86.
- Isbell, H.S., 1944. Interpretation of some reactions in the carbohydrate field in terms of consecutive electron displacement. *J. Res. Natl. Bur. Stand. (U.S.)* 32, 45.
- Ito, H., 1977. The formation of maltol and isomaltol through degradation of saccharose. *Agric. Biol. Chem.* 41, 1307-1308.
- Izzo, H.V., Ho, C.-T., 1992. Peptide-specific Maillard reaction products: a new pathway for flavour chemistry. *Trends Food Sci. Technol.* 3, 253-257.
- Jiang, D., Peterson, D.G., 2010. Role of hydroxycinnamic acids in food flavors: a brief overview. *Phytochem. Rev.* 9, 187-193.
- Jing, H., Kitts, D.D., 2000. Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food Res. Int.* 33, 509-516.

- Johnson, R.R., Alford, E.D., Kinzer, G.W., 1969. Formation of sacrose pyrolysis products. *J. Agric. Food Chem.* 17, 22-24.
- Joslyn, M.A., 1957. Role of amino acids in the browning of orange juice. *Food Res.* 22, 1-14.
- Karel, M., Labuza, T.P., 1968. Nonenzymatic browning in model systems containing saccharose. *J. Agric. Food Chem.* 16, 717-719.
- Katchalsky, A., 1941. Interaction of aldoses with α -amino acids or peptides. *Biochem. J.* 35, 1024-1027.
- Kato, H., 1962. Chemical studies on amino-carbonyl reaction. I. Isolation of 3-deoxypentose and 3-deoxyhexosones formed by browning degradation of N-glycosides. *Agric. Biol. Chem.* 26, 187-192.
- Kato, H., 1973. Antioxidative activity of amino-carbonyl reaction products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 14, 343-351.
- Kato, H., Fujimaki, M., 1968. Formation of N-substituted pyrrole-2-aldehydes in the browning reaction between d-xylose and amino compounds. *J. Food Sci.* 33, 445-449.
- Kato, K., Watanabe, K., Sato, Y., 1978. Effect of the Maillard reaction on the attributes of egg white proteins. *Agric. Biol. Chem.* 42, 2233-2237.
- Kato, K., Watanabe, K., Sato, Y., 1981. Effect of metals on the Maillard reaction of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 29, 540-543.
- Kato, Y., Matsua, T., Watanabe, K., Nakamura, R., 1985. Alteration of ovalbumin immunogenic activity by glycosylation through Maillard reaction. *Agric. Biol. Chem.* 49, 423-427.
- Kawashima, K., Itoh, H., Chibata, I., 1977. Antioxidant activity of browning products prepared from low molecular carbonyl compounds and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 25, 202.
- Kefford, J.F., 1959. The chemical constituents of fruits. *Adv. Food Res.* 9, 285-372.
- Kim, J.-S., Lee, Y.-S., 2009. Study of Maillard reaction products from aqueous model systems with different peptide chain lengths. *Food Chem.* 116, 846-853.
- Knol, J.J., Linssen, J.P.H., van Boekel, M.A.J.S., 2010. Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modeling. *Food Chem.* 120, 1047-1057.
- Knowles, M.E., 1971. Inhibition of non-enzymic browning by sulphites: identification of sulphonated products. *Chem. Ind. (London)*, 110-111.
- Koehler, P.E., Odell, G.V., 1970. Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions. *J. Agric. Food Chem.* 18, 895-898.
- Koehler, P.E., Mason, M.E., Newell, J.A., 1969. Formation of pyrazine compounds in sugar-amine model systems. *J. Agric. Food Chem.* 17, 393-396.
- Kort, M.J., 1970. Reactions of free sugars with aqueous ammonia. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 25, 311-349.
- Kotsuiou, K., Tasioula-Margari, M., Caicano, E., Fogliano, V., 2011. Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extract on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chem.* 124, 242-247.
- Kroh, L.W., Fiedler, T., Wagner, J., 2008. Dicarbonyl compounds – key intermediates for the formation of carbohydrate-based melanoidins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 210-215.
- Kuster, B.F.M., Temmink, H.M.G., 1977. The influence of pH and weak-acid anions on the dehydration of d-fructose. *Carbohydr. Res.* 54, 185-191.
- Kuster, B.F.M., Van der Bean, H.S., 1977. The influence of the initial and catalyst concentrations on the dehydration of d-fructose. *Carbohydr. Res.* 54, 165-176.
- Kwon, T.W., Menzel, D.B., Olcott, H.S., 1965. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J. Food Sci.* 30, 808-813.
- Labuza, T.P., Baisier, W.M., 1992. The kinetics of nonenzymatic browning. In: Schwartzberz, H.G., Hartel, R.W. (Eds.), *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, New York.
- Labuza, T.P., Saltmarch, M., 1981. The nonenzymic browning reaction as affected by water in foods. In: Rockland, L.B., Stewart, B.S. (Eds.), *Water Activity Influences Food Quality*. Academic Press, New York, p. 605.
- Laroque, D., Inisan, C., Berger, C., Vouland, E., Dufosse, L., Guerard, F., 2008. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chem.* 111, 1032-1042.
- Lea, C.H., Hannan, R.S., 1949. Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. I. The effect of activity of water, pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochim. Biophys. Acta* 3, 313-325.
- Lea, C.H., Hannan, R.S., 1950. Biochemical and nutritional significance of the reaction between proteins and reducing sugars. *Nature (London)* 165, 438-439.
- Ledl, F., 1982. Formation of coloured products in browning reactions: reaction of hydroxyacetone with furfural. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 175, 203.
- Ledl, F., 1982. Formation of coloured products in browning reactions: reaction of dihydroxy-acetone with furfural. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 175, 349.
- Ledl, F., Fritsch, G., 1984. Formation of pyrroline reductones by heating hexoses with amino acids. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 178, 41.
- Ledl, F., Schleicher, E., 1990. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew Chem. Int. Ed. Eng.* 29, 565-594.
- Ledl, F., Severin, T., 1982. Investigations of the Maillard reaction. XVI (1). Formation of coloured compounds from hexoses. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 175, 262.
- Lee, C.M., Lee, T.-C., Chichester, C.O., 1979. Kinetics of the production of biologically active Maillard browned products in apricot and glucose-l-tryptophan. *J. Agric. Food Chem.* 27, 478-482.
- Lee, C.M., Sherr, B., Koh, Y.-N., 1984. Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 32, 379-382.
- Lee, M.-H., Ho, C., Chang, S.S., 1981. Thiazoles, oxazoles and oxazolines identified in the volatile flavor of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1049-1050.
- Lee, T.-C., Pintauro, S.J., Chichester, C.O., 1982. Nutritional and toxicological effects of nonenzymatic browning. *Diabetes* 31, 37-46.
- Licht, B.H., Shaw, K., Smith, C., Mendoza, M., Orr, J., Myers, D.V., 1992a. Characterization of caramel colours I, II, III. *Food Chem. Toxicol.* 30, 375-382.
- Licht, B.H., Shaw, K., Smith, C., Mendoza, M., Orr, J., Myers, D.V., 1992b. Characterization of caramel colour IV. *Food Chem. Toxicol.* 30, 365-373.
- Lightbody, H.D., Fevold, H.L., 1948. Biochemical factors influencing the shelf life of dried whole eggs and means of their control. *Adv. Food Res.* 1, 149-202.
- Lingnert, N., 1980. Antioxidative Maillard reaction products. III. Application in cookies. *J. Food Process. Preserv.* 4, 219-233.
- Lingnert, N., Eriksson, E., 1980. Antioxidative Maillard reaction products from sugars and free amino acids. *J. Food Process. Preserv.* 4, 161.
- Lingnert, N., Hall, G., 1986. Formation of antioxidative Maillard reaction products during food processing. *Dev. Food Sci.* 13, 273.
- Liu, Y., Kitts, D.D., 2011. Confirmation that the Maillard reaction is the principal contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Res. Int.* 44, 2418-2424.
- Lo, C.Y., Hsiao, W.T., Chen, X.Y., 2011. Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *J. Food Sci.* 76, H90-H96.
- Lo, C.Y., Li, S., Tan, D., Pan, M.H., Sang, S., Ho, C.-T., 2006. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1118-1128.
- Locas, C.P., Yaylayan, V.A., 2008. Further insight into thermally and pH-induced generation of acrylamide from glucose/asparagine model systems. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6069-6074.
- Loncin, M., Bimbenet, J.J., Lengès, J., 1968. Influence of the activity of water on the spoilage of foodstuffs. *J. Food Technol.* 3, 131-142.
- Lopez de Lerna, N., Peinado, J., Moreno, J., Peinado, R.A., 2010. Antioxidant activity, browning and volatile Maillard compounds in Pedro Ximenez sweet wines under accelerated oxidative aging. *LWT-Food Sci. Technol.* 43, 1557-1563.
- Lu, C.Y., Hao, Z., Payne, R., Ho, C.T., 2005. Effects of water content on volatile generation and peptide hydrolysis in Maillard reaction of glycine, diglycine and triglycine. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6443-6447.
- Ludwig, E., Lipke, U., Raczek, U., Jäger, A., 2000. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 111-116.
- Lv, L., Shao, X., Chen, H., Ho, C.-T., Sang, S., 2011. Genistein inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 579-586.
- Maga, J.A., 1978. Oxazoles and oxazolines in food. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1049-1050.

- Maga, J.A., 1981. Pyrroles in foods. *J. Agric. Food Chem.* 29, 691.
- Maga, J.A., 1982. Pyrazines in foods: an update. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 16, 1-48.
- Maga, J.A., Sizer, C.E., 1973. Pyrazines in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 4, 39-115.
- Maillard, L.C., 1912. Action des acides amines sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Hebol. Seances Acad. Sci.* 154, 66-68.
- Markuze, Z., 1963. Effects of traces of metals on the browning of glucose-lysine solutions. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 14, 65 (Cited Chem. Abstr. 59: 4980).
- Mauron, J., 1970. Nutritional evaluation of proteins by enzymatic methods. *Wenner-Gren Cent. Int. Symp. Ser.* 14.
- Mawhinney, T.P., Madson, M.A., Feather, M.S., 1980. The isomerization of d-glucose in acidic solution. *Carbohydr. Res.* 86, 147-150.
- Mazin, M.I., Al-Zubaidy, Khalil, P.A., 2007. Kinetic and prediction studies of ascorbic acid in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chem.* 101, 254-259.
- McWeeny, D.J., 1969. The Maillard reaction and its inhibition by sulfite. *J. Food Sci.* 34, 641-643.
- McWeeny, D.J., 1973. The role of carbohydrates in non-enzymatic browning. In: Birch, G.G., Green, F. (Eds.), *Molecular Structure and Functions of Food Carbohydrates*. Applied Science Publishers, London.
- McWeeny, D.J., 1984. Sulfur dioxide and the Maillard reaction in food. *Proc. Food Nutr. Sci.* 5, 395-404.
- Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., del Castillo, M.D., 2008. Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.* 48, 123-132.
- Milic, B.L., 1987. CP-mass carbon-13 NMR spectral studies of the kinetics of melanoidin formation. *Analyst* 112, 783-785.
- Milic, B.L., Piletic, M.V., Grujic-Injac, B., Premovic, P.I., 1978. A comparison of the chemical composition of boiled and roasted aromas of heated beef. *J. Agric. Food Chem.* 25, 113.
- Milic, B.L., Piletic, M.V., Cembic, S.M., Odavic-Josic, J., 1979. Free radical formation kinetics in d(+)-glucose and amino acid model systems. *Proceedings of the 27th IUPAC Congress 1979*, 296.
- Milic, B.L., Piletic, M.V., Cembic, S.M., Odavic-Josic, J., 1980. Kinetic behaviour of free radical formation on the nonenzymatic browning reaction. *J. Food Process. Preserv.* 4, 13-26.
- Milic, B.L., Piletic, M.V., Grujic-Injac, B., Premovic, P.I., 1978. A comparison of the chemical composition of boiled and roasted aromas of heated beef. *J. Agric. Food Chem.* 25, 113.
- Moll, N., Gross, B., That, V., Moll, M., 1982. A fully automated high-performance liquid chromatographic procedure for isolation and purification of Amadori compounds. *J. Agric. Food Chem.* 30, 782-786.
- Moller, A.B., Andrews, A.T., Cheeseman, G.C., 1977. Chemical changes in ultra-heat-treated milk during storage: II. Lactuloselysine and fructoselysine formation in the Maillard reaction. *J. Dairy Res.* 44, 267-275.
- Molnar-Perl, I., Pinter-Szakacs, M., Wittman, R., Reutter, M.M., Eichner, K., 1986. Optimum yield of pyridosine and furosine originating from Maillard reactions monitored by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 361, 311-320.
- Montgomery, M.W., Day, E.A., 1965. Aldehyde-amine condensation reaction, possible fate of carbonyls in foods. *J. Food Sci.* 30, 828-832.
- Montilla, A., Ruiz-Matute, A.I., Sanz, M.L., Martinez-Castro, I., del Castillo, M.D., 2006. Difuctose anhydrides as quality markers of honey and coffee. *Food Res. Int.* 39, 801-806.
- Morales, F., Jimenez-Perez, S., 2004. Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 515-520.
- Morales, F.J., 2005. Assessing the non-specific hydroxyl radical scavenging properties of melanoidins in a Fenton-type reaction system. *Anal. Chim. Acta* 534, 171-178.
- Moreno, F.J., Molina, E., Olano, A., Lopez-Fandino, R., 2003. High pressure effects on the Maillard reaction between glucose and lysine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 394-400.
- Mottram, D.S., 1985. The effect of cooking conditions on the formation of volatile heterocyclic compounds in pork. *J. Sci. Food Agric.* 36, 337-382.
- Mottram, D.S., 1998. Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chem.* 62, 415-424.
- Mottram, D.S., Wedzich, B.L., Dodson, A.T., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448-449.
- Nafisi, K., Markakis, P., 1983. Inhibition of sugar-amine browning by aspartic and glutamic acids. *J. Agric. Food Chem.* 31, 1115-1117.
- Nagy, S., 1980. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *J. Agric. Food Chem.* 28, 8-18.
- Nagy, S., Smoot, J.M., 1977. Temperature and storage effects on percentage retention and percentage US recommended dietary allowance of vitamin C in canned single-strength orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 25, 135-138.
- Namiki, M., 1988. Chemistry of the Maillard reaction: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* 32, 115-184.
- Namiki, M., Hayashi, T., 1975. Development of novel free radicals during the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 23, 487-491.
- Namiki, M., Hayashi, T., 1981. Formation of free radical products in an early stage of the Maillard reaction. In: Eriksson, C. (Ed.), *Maillard Reactions in Food*, Prog. Food Nutr. Sci, Vol. 5. Pergamon, Oxford.
- Namiki, M., Hayashi, T., 1983. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. In: Walter, G.R., Feather, M.S. (Eds.), *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. ACS Symposium Series, 215, p. 21.
- Namiki, M., Hayashi, T., Kawakishi, S., 1973. Free radicals developed in the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 37, 2935-2936.
- Negrone, M., D'Agostina, A., Arnoldi, A., 2001. Effects of olive, canola, and sunflower oils on the formation of volatiles from the Maillard reaction of lysine with xylose and glucose. *J. Agric. Food Chem.* 49, 439-445.
- Noda, Y., Peterson, P.G., 2007. Structure-reactivity relationships of flavan-3-ols on product generation in aqueous glucose/glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3686-3691.
- Nursten, H., 1986. Maillard browning reactions in dried foods. In: McCarthy, D. (Ed.), *Concentration and Drying of Foods*. Elsevier, London.
- Nursten, H., 2005. *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications*. Royal Society of Chemistry, London.
- Ohno, Y., Ward Jr., K., 1961. Acid epimerization of d-glucose. *J. Org. Chem.* 26, 3928-3931.
- Olano, A., Martinez-Castro, I., 1996. Nonenzymatic browning. In: Nollet, L.M.L. (Ed.), *Handbook of Food Analysis*. Dekker, New York, p. 1683-1721.
- Olesen, P.T., Olsen, A., Frandsen, H., Fredericksen, K., Overvad, K., Tjonneland, A., 2008. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int. J. Cancer* 122, 2094-2100.
- Olsson, K., Peremalm, P.A., Theander, O., 1982. In: Eriksson, C. (Ed.), *Maillard Reactions in Food*, Prog. Food Nutr. Sci, Vol. 5. Pergamon, New York.
- Otsuka, M., Kurata, T., Arakawa, N., 1986. Isolation and characterization of an intermediate product in the degradation of 2,3-diketo-l-gulononic acid. *Agric. Biol. Chem.* 50, 531-533.
- Patton, A.R., Salander, R.C., Piano, M., 1954. Lysine destruction in casein-glucose interactions measured by quantitative paper chromatography. *Food Res.* 19, 444-450.
- Pedreschi, F., Segtnan, V.H., Knutsen, S.H., 2010. On-line monitoring of fat, dry matter and acrylamide contents of potato chips using near infrared intertance and visual reflectance imaging. *Food Chem.* 121, 616-620.

- Peterson, B.I., Tong, C.H., Ho, C.T., Welt, B.A., 1994. Effect of moisture content on Maillard browning kinetics of a model system during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1884-1887.
- Peterson, R.J., Izzo, H.J., Jungerman, E., Chang, S.S., 1975. Changes in volatile flavor compounds during the retorting of canned beef stew. *J. Food Sci.* 40, 948-954.
- Pigman, W., Anet, E.F.L.J., 1972. Mutarotation and actions of acids and bases. In: Pigman, W., Horton, D. (Eds.), 2nd ed. *The Carbohydrates*, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 165-194.
- Plakas, S.M., Lee, C.-T., Walke, K.E., 1988. Bioavailability of lysine in Maillard browned protein as determined by plasma response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 118, 19-22.
- Popoff, T., Theander, O., 1976. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of d-glucose and d-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scand.* 30, 397-402.
- Ranganna, S., Setty, L., 1968. Non-enzymatic discoloration in dried cabbage. Ascorbic acid-amino acid interaction. *J. Agric. Food Chem.* 16, 529-533.
- Rao, M.S., Chawla, S.P., Chander, R., Shirma, A., 2011. Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution. *Carbohydr. Polym.* 83, 714-719.
- Renn, R.T., Sathe, S.K., 1997. Effect of pH, temperature, and reactant molar ratio on l-leucine and d-glucose Maillard reaction in an aqueous system. *J. Food Sci.* 42, 38.
- Resmini, P., Pellegrino, L., 1991. Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chromatogr. Lab.* 6, 7-11.
- Reyes, F.G.R., Poocharoen, B., Wrolstad, R.E., 1982. Maillard browning reaction of sugar-glycine model systems: changes in sugar concentration, color and appearance. *J. Food Sci.* 47, 1376-1377.
- Reynolds, T.M., 1959. Chemistry of non-enzymatic browning III. Effect of bi-sulfite, phosphate and malate on the reaction of glycine and glucose. *Aust. J. Chem.* 12, 265-274.
- Reynolds, T.M., 1963. Chemistry of nonenzymic browning. I. *Adv. Food Res.* 12, 1-52.
- Reynolds, T.M., 1965. Chemistry of non-enzymatic browning. II. *Adv. Food Res.* 14, 167-183.
- Reynolds, T.M., 1969. Nonenzymic browning. Sugar-amine interactions. In: Schultz, H.W., Cain, R.F., Wrolstad, R.W. (Eds.), *Foods, Carbohydrates and their Roles*. Avi, Westport, CT.
- Reynolds, T.M., 1970. Flavours from nonenzymic browning reactions. *Food Technol. Austr.* 22, 610-611.
- Riester, D.W., Braun, O.G., Pearce, W.E., 1945. Why canned citrus juices deteriorate in storage. *Food Ind.* 17, 742-744.
- Rizzi, G.P., 1969. The formation of tetraethyl pyrazine and 2-isopropyl-4,5-dimethyl-3-oxazoline in the Strecker degradation of dl-valine with 2,3-butanedione. *J. Org. Chem.* 34, 2002.
- Rizzi, G.P., 1974. Formation of N-alkyl-2-acylpyrroles and aliphatic aldimines in model non-enzymic browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* 22, 279-282.
- Rizzi, G.P., 2008. The Strecker degradation of amino acid: newer avenues of flavor formation. *Food Rev. Int.* 24, 416-435.
- Ruffian-Henares, J.A., de la Cueva, S.P., 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins – a study of their metal-chelating properties. *J. Agric. Food Chem.* 57, 432-438.
- Sang, S., Shao, X., Bai, N., Lo, C.Y., Yang, C.S., Ho, C.-T., 2007. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate: a new trapping agent of reactive carbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1862-1870.
- Sanz, M.L., de Castillo, M.D., Corzo, N., Olano, A., 2000. Presence of 2-furoylmethyl derivatives in hydrolysates of processed tomato products. *J. Agric. Food Chem.* 48, 468-471.
- Sanz, M.L., de Castillo, M.D., Corzo, N., Olano, A., 2001. Formation of Amadori compounds in dehydrated fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5228-5231.
- Sanz, M.L., de Castillo, M.D., Corzo, N., Olano, A., 2003. 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4278-4283.
- Sasaki, S., Shirahashi, Y., Nishiyama, K., Watanabe, H., Havase, F., 2006. Identification of a novel blue pigment as a melanoid intermediate in the d-xylose-glycine reaction system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2529-2531.
- Schieberle, P., 1990. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191, 206-209.
- Schoebel, T., Tannenbaum, S.R., Labuza, T.P., 1969. Reaction at limited water concentration. 1. Sacarose hydrolysis. *J. Food Sci.* 34, 324.
- Schonberg, A., Moubacher, R., 1952. The Strecker degradation of α -amino acids. *Chem. Rev.* 50, 261-277.
- Schultz, A., Trage, C., Schwarz, H., Kroh, L.W., 2007. Electrospray ionization mass spectrometric investigations of α -dicarbonyl compounds – probing intermediates formed in the course of the nonenzymatic browning reaction of l-ascorbic acid. *Int. J. Mass Spectrom.* 262, 169-173.
- Schutte, L., 1974. Precursors of sulfur-containing flavor compounds. *CR Crit. Rev. Food Technol.* 4, 457-505.
- Shallenberger, R.S., Birch, C.G., 1975. *Sugar Chemistry*. Avi, Westport, CT p. 189.
- Shao, X., Bai, N., He, K., Ho, C.T., Yang, C.S., Sang, S., 2008. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 2042-2050.
- Shaw, P.E., Berry, R.E., 1977. Hexose-amino acid degradation studies involving formation of pyrroles, furans and other low molecular weight products. *J. Agric. Food Chem.* 25, 641-644.
- Shaw, P.E., Tatum, J.H., Berry, R.E., 1968. Base-catalyzed fructose degradation and its relation to nonenzymic browning. *J. Agric. Food Chem.* 16, 979-982.
- Shibamoto, T., Bernard, R.A., 1977. Investigation of pyrazine formation pathways in sugar-ammonia model systems. *J. Agric. Food Chem.* 25, 609-614.
- Shigematsu, H., Kurata, T., Kato, H., Fujimaki, M., 1972. Volatile compounds formed on roasting dl- α -alanine with d-glucose. *Agric. Biol. Chem.* 36, 1631-1637.
- Shirahashi, Y., Watanabe, H., Hayase, F., 2009. Identification of red pigments formed in a d-xylose-glycine reaction system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2287-2292.
- Silvan, J.M., van de Lagemaat, J., Olano, A., Doores del Castillo, M., 2006. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1543-1551.
- Simon, H., Heubach, G., 1965. Formation of alicyclic and open-chain nitrogenous reductones by reaction of secondary amine salts on monosaccharides. *Chem. Ber.* 98, 3703-3711.
- von Smolnik, H.D., 1987. Herstellung und Anwendung von Zucker-Kolor aus Starkeprodukten. *Stärke* 39, 28.
- Spark, A.A., 1969. Role of amino acids in non-enzymic browning. *J. Sci. Food Agric.* 20, 308-316.
- Staempfli, A.A., Blank, I., Fumeaux, R., Fay, L.B., 1994. Study on the decomposition of the amadori compound N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl)-glycine in model systems: quantification by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 23, 642-646.
- Stoeffelsman, J., Pypker, J., 1968. Some new constituents of roasted coffee. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 87, 241-242.
- Stoll, M., Dietrich, P., Sundt, E., Winter, M., 1967. Sur l'aroma de café. I. *Helv. Chim. Acta* 50, 628-694.
- Stoll, M., Winter, M., Gautschi, F., Filament, I., Willhalm, B., 1967. Sur l'aroma du cacao. II. *Helv. Chim. Acta* 50, 2065-2067.
- Sugimura, T., Sato, S., Wakabayashi, K., 1988. Mutagens/carcinogens in pyrolysates of amino acids and proteins and in cooked foods: heterocyclic aromatic amines. In: Woo, Y., Lai, D.Y., Aros, J.C., Argus, M.F. (Eds.), *Chemical Induction of Cancer: Structural Bases and Biological Mechanism*. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Summa, C., McCourt, J., Cammerer, B., Fiala, A., Probst, M., Kun, S., Anklam, E., Wagner, K.H., 2008. Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of cocoa bean Maillard reaction products with degree of roasting. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 342-351.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A., 2010a. Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of traditional balsamic vinegar. *J. Food Biochem.* 34, 1061-1078.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A., 2010b. Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2513-2519.
- Tang, J., Jin, Q.Z., Shen, G.H., Ho, C.T., Chang, S.S., 1983. Isolation and identification of volatile compounds in fried chicken. *J. Agric. Food Chem.* 31, 1287-1292.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998-5006.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998-5006.
- Tatum, J.H., Shaw, P.E., Berry, R.E., 1967. Some compounds formed during nonenzymic browning of orange powder. *J. Agric. Food Chem.* 15, 773-775.
- Tehrani, K.A., Kersiene, M., Adams, A., Venskutonis, R., de Kimpe, M., 2002. Thermal degradation studies of glucose/glycine melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4062-4068.
- Tessier, F.J., 2010. The Maillard reaction in the human body: the main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol.* 58, 214-218.
- Theander, O., 1981. Novel developments in caramelization. *Prog. Food. Nutr. Sci.* 5, 471-476.
- Tonsbeek, C.H.T., Copier, H., Plancken, A.J., 1971. Components contributing to beef flavor. Isolation of 2-acetyl-2-thiazoline from beef broth. *J. Agric. Food Chem.* 19, 1014-1016.
- Totlani, V.M., Peterson, D.G., 2005. Reactivity of epicatechin in aqueous glycine and glucose reaction models: quenching of C2, C3 and C4 fragments. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4130-4135.
- Tschiersky, H., Baltes, W., 1989. Investigation of caramel Curie-point-pyrolysis of caramel syrups and other investigations of structure. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 189, 132-137.
- Tsuchuda, H., Tachibana, S., Kamoto, M., 1976. Identification of heterocyclic compounds produced by pyrolysis of the nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 40, 2051-2056.
- Tu, A., Eskin, N.A.M., 1973. The inhibitory effect of reducing sugars on the hydrolysis of casein by trypsin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 6, 50-53.
- van Boekel, M.A.J.S., 2006. Formation of flavor compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.* 24, 230-233.
- van Praag, M., Stein, H.S., Tibbetts, M.S., 1968. Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* 16, 1005-1008.
- van Ruth, S.M., King, C., Giannouli, P., 2002. Influence of lipid fraction, emulsifier fraction, and mean particle diameter of oil-in-water emulsions on the release of 20 aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2365-2371.
- Velisek, J., Davidek, K., 1976. Reactions of glyoxal with amino acids. I. Formation of brown pigments. *Sb. Vys. Sk. Chem.-Technol. Praze Potraivin.* E46, 35.
- Velisek, J., Davidek, K., 1976. Reactions of glyoxal with amino acids. II. Analysis of the brown pigments. *Sb. Vys. Sk. Chem.-Technol. Praze Potraivin.* E46, 51.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Conte, A., 2010. From balsamic to healthy: traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2097-2102.
- Wagner, K.H., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W., Elmadfa, I., 2002. Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chem.* 78, 375-382.
- Wagner, K.-H., Reichhold, S., Koschutnig, K., Cheriot, S., 2007. The potential antimutagenic and antioxidant affects of Maillard reaction products used as "natural antibrowning" agents. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 498-504.
- Walradt, J.P., Pittet, A.O., Kinlin, T.E., Muralidhara, R., Sanderson, A., 1971. Volatile components of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* 19, 972-979.
- Wang, H.-Y., Qian, H., Yao, W.-R., 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity. *Food Chem.* 128, 573-584.
- Watanabe, K., Kato, Y., Sato, Y., 1980. Chemical and conformational changes of ovalbumin due to the Maillard reaction. *J. Food Process Preserv.* 3, 263-274.
- Wedzicha, B.L., McWeeny, D.J., 1974a. Non-enzymic browning reactions of ascorbic acid and their inhibition. The production of 3-deoxy-4-sulphopentulose in mixtures of ascorbic acid, glycine and bisulphite ion. *J. Sci. Food Agric.* 25, 577-587.
- Wedzicha, B.L., McWeeny, D.J., 1974b. Non-enzymic browning reactions of ascorbic acid, glycine and bisulphite ion. The identification of 3-deoxy-4-sulphopentulose in dehydrated, sulphited cabbage after storage. *J. Sci. Food Agric.* 25, 589-593.
- Wedzicha, B.L., McWeeny, D.J., 1975. Concentrations of some sulphonates derived from sulphite in certain foods. *J. Sci. Food Agric.* 26, 327-335.
- Weenen, H., Apeldoorn, W., 1996. Carbohydrate cleavage in the Maillard reaction. In: Taylor, A.J., Mottram, D.S. (Eds.), *Flavor Science – Recent Developments, Proceedings of the 8th Weurman Flavour Research Symposium*. Royal Society of Chemistry, Reading.
- Weygand, F., 1940. Über N-Glykoside. II. Amadori-Umlagerungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 73, 1259-1278.
- Whitfield, F.B., 1992. Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31, 1-58.
- Wolfrom, M.L., Rooney, C.C., 1953. Chemical interactions of amino compounds and sugars. VIII. Influence of water. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5435-5436.
- Wolfrom, M.L., Schuetz, R.D., Calvalieri, L.F., 1948. Discoloration of sugar solutions and 5-(hydroxymethyl)furfural. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 514-517.
- Wong, J.M., Bernhard, R.A., 1988. Effect of nitrogen source on pyrazine formation. *J. Agric. Food Chem.* 36, 123-129.
- Yamaguchi, N., Fujimaki, M., 1974. Studies on browning reaction products from reducing sugars and amino acids. XIV. Antioxidative activities of purified melanoidins and their comparisons with those of legal antioxidants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 21, 6.
- Yaylayan, V.A., Locas, C.P., 2007. Vinylogous Amadori rearrangement: implications in food and biological systems. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 437-444.
- Yaylayan, V.A., Wnorowski, A., Locas, C.P., 2003. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1753-1757.
- Yen, G.C., Hsieh, P.P., 1995. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *J. Sci. Food Agric.* 67, 415-420.
- Yeo, H.C.H., Shibamoto, T., 1991a. Microwave-induced volatiles of the Maillard model system under different pH conditions. *J. Agric. Food Chem.* 39, 370-373.
- Yeo, H.C.H., Shibamoto, T., 1991b. Effects of moisture content on the Maillard browning model system upon microwave irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1860-1862.
- Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T., Nakazawa, H., 1997. Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4106-4109.
- Yu, A.N., Zhang, A.D., 2010. The effect of pH on the formation of aroma compounds produced by heating a model system containing l-ascorbic acid with threonine/serine. *Food Chem.* 119, 214-219.
- Yuan, Y., Shu, C., Zhou, B., Qi, X., Xiang, J., 2011. Impact of selected additives on acrylamide formation in asparagine/sugar Maillard model systems. *Food Res. Int.* 44, 449-455.
- Zamora, R.M.R., Hildago, F.J., 1995. Influence of irradiation time, pH, and lipid/amino acid ratio on pyrrole production during microwave heating of lysine/(E)-4, 5-epoxy-(E)-2-heptenal model systems. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1029-1037.
- Zamora, R.M.R., Delago, R.M., Hildago, F.J., 2011. Aminophospholipids and lecithins as mitigating agents for acrylamide in asparagine/glucose and asparagines/2,4-decadienal model systems. *Food Chem.* 126, 104-108.

- Zhang, Y., Ho, C.-T., 1989. Volatile compounds formed from thermal interaction of 2,4-decadienal with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1016-1020.
- Zhang, Y., Ritter, W.J., Barker, C.C., Traci, P.A., Ho, C.T., 1994. Volatile formation of lipid-mediated Maillard reaction in model systems. In: Ho, C.T., Hartman, T.G. (Eds.), *Lipids in Food Flavor*, ACS Symposium Series, 558. American Chemical Society, Washington, DC.

Bioquímica da cerveja

Graham G. Stewart^{††}

I. INTRODUÇÃO

Este capítulo faz uma revisão do processo de produção da cerveja, que objetiva hidrolisar o amido do malte de cevada, junto com trigo, milho, arroz, sorgo, cevada não maltada e açúcar/xaropes, formando um líquido nitrogenado com açúcares que pode ser fermentado, denominado mosto, e convertê-lo em uma bebida alcoólica carbonatada utilizando levedura. Apesar de o processo ser essencialmente bioquímico, ele também envolve vários outros ramos da ciência. O enfoque principal aqui abrange as reações enzimáticas envolvidas no processo de fabricação da cerveja.

O saquê (bebida que tem arroz como base e com alto teor alcoólico) é preparado de modo similar à cerveja, sendo esta, provavelmente, a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo (Steiner, 2009), a mais antiga e a terceira mais popular de todas, depois da água e do chá (Priest e Stewart, 2006).

Em 2009, 1.800 milhões de hl de cerveja foram produzidos globalmente (1 hl \equiv 100 litros). Em 2009, o maior produtor mundial de cerveja foi a China (418 milhões de hl), seguido pelos Estados Unidos (234 milhões de hl), Rússia (110 milhões hl), Brasil (107 milhões de hl) e Alemanha (98 milhões de hl). A cerveja é produzida pelo processamento e fermentação de amidos e de açúcar (sacarose), derivados principalmente de grãos de cereais: cevada maltada e trigo (algumas vezes maltado), milho (grão), arroz, sorgo (maltado ou não) e cevada não maltada. A maioria das cervejas também contém lúpulo, que adiciona um sabor amargo e um aroma que pode atuar como conservante, apesar de outros aromatizantes, como ervas ou frutas, poderem, às vezes, ser adicionados. O processo de fabricação da cerveja data de 8000 a.C.; os primeiros vestígios químicos conhecidos datam de cerca de 3500 a.C. e foram encontrados no local denominado Godin Tepe, nas Montanhas Zagros, a oeste do Irã.

O processo de produção de cerveja está delineado no fluxograma da Figura 7.1. A malteação, a maceração e a fermentação/envelhecimento são, essencialmente, processos enzimáticos. A principal matéria-prima, o malte,

contém componentes de extratos (amido, proteínas etc.) e enzimas (amilases, proteases etc.), no entanto, é caro. Portanto, quando enzimas microbianas foram produzidas por fermentação, e tornaram-se disponíveis comercialmente em larga escala, nos anos 1960, os produtores de enzimas e os fabricantes de cerveja iniciaram pesquisas para substituir o malte por matérias-primas não malteadas e enzimas exógenas. Com algumas exceções notáveis, as pesquisas não foram bem-sucedidas, apesar de, como será discutido neste capítulo, terem sido revisadas e propostas elaboradas para reintroduzir a cevada para cerveja, como o processo ficou conhecido. Os estudos levaram a um amplo leque de aplicações para enzimas exógenas na fabricação de cerveja e trouxeram benefícios econômicos e técnicos:

- Melhoramento do controle do processo de produção de cerveja.
- Produção mais acelerada resultando em aumento da capacidade de fabricação.
- Potencial para desenvolvimentos de novos e diferentes tipos de cervejas.
- Utilização de matérias-primas mais baratas e não convencionais.

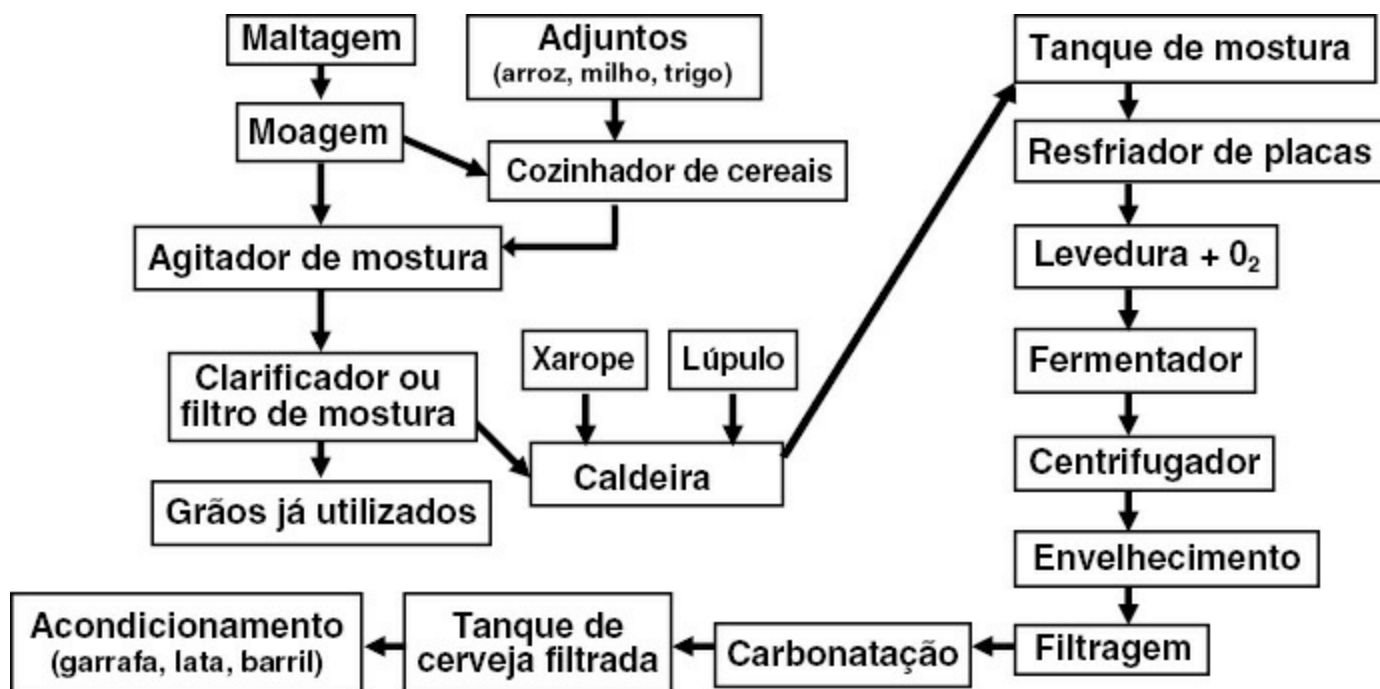


FIGURA 7.1 Processo de produção da cerveja.

Há, no entanto, questões não respondidas quanto ao uso de exoenzimas, incluindo a combinação de sabores de cervejas, a estabilidade do produto (principalmente nos aspectos físico e sensorial, e estabilidade da espuma) e a potabilidade.

O objetivo do processo é hidrolisar as fontes do amido/proteínas, produzir um líquido com nitrogênio e açúcar que possa ser fermentado, denominado mosto, e convertê-lo em uma bebida alcoólica carbonatada, conhecida como cerveja, por intermédio de um processo de fermentação realizado pela levedura, seguida pela maturação. A fabricação da cerveja foi um dos primeiros processos biológicos feitos em escala comercial e desenvolvidos a partir de um ofício, tornando-se uma tecnologia. A produção de cerveja é um processo único, dividido em cinco etapas distintas e subsequentes:

- A malteação é a germinação da cevada ou de outro cereal, e sua secagem (em estufa ou forno). O malte é feito em maltarias que são, em geral, separadas fisicamente das cervejarias. As matérias-primas costumam ser selecionadas entre variedades de cevada adequadas para a malteação. Seu objetivo é permitir o desenvolvimento de enzimas endógenas que irão hidrolisar proteínas e amidos durante as últimas etapas de germinação e de posterior maceramento ou mostura.

- A maceração envolve a hidrólise de proteínas/peptídeos, amido e outros materiais da cevada maltada ou de outros cereais não maltados, moídos (adjuntos) por um espectro de enzimas (o processo será detalhado na seção II) para produzir um extrato solúvel em água, bastante fermentável e que pode ser separado do material insolúvel (denominado grão gasto). Este líquido não fervido, sem lúpulo e que não é estéril é denominado mosto doce.
- O mosto fervido, com adição de lúpulo ou de extratos, e, algumas vezes, de açúcar e/ou xaropes, produz um meio estéril denominado mosto.
- A fermentação com levedura é seguida pela maturação e pela filtração.
- A cerveja costuma ser acondicionada em barris, garrafas e em latas.

A fabricação da cerveja é, essencialmente, um processo bioquímico, mas também envolve outras áreas, como a microbiologia e a botânica (ambas muito próximas da bioquímica), além de química analítica, orgânica e inorgânica, engenharia de processos, sistemas de separação, incluindo adsorventes e filtração, avaliação de sabores e aromas, estatística e física (calor, refrigeração etc.). A bioquímica estuda os processos dos organismos vivos (no caso do preparo de cervejas, plantas e leveduras). Ela enfoca a estrutura e a função de componentes celulares, como proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e outros biomateriais.

Talvez o aspecto mais importante da bioquímica do preparo da cerveja seja o de que todas as reações biológicas envolvem enzimas. Este capítulo abordará, portanto, as reações enzimáticas envolvidas no processo de fabricação de cerveja. Há muitas reações químicas que ocorrem em tal processo que não contemplam enzimas, por exemplo, a isomerização do lúpulo durante a fervura do mosto, a formação de materiais de coloração (especialmente de melanoidinas, como discutido no Capítulo 6) durante a secagem do malte verde e a fervura do mosto, o desenvolvimento de *off-flavors* quando a cerveja fica exposta à luz e o surgimento de turbidez ou turvação e alteração do perfil sensorial quando estocada por períodos longos. As reações químicas não serão debatidas em detalhe. Mais informações, no entanto, podem ser obtidas no texto de Bamforth (2009).

As principais matérias-primas utilizadas na fabricação da cerveja são cereais malteados (em geral, cevada; algumas vezes, trigo e sorgo), cereais não malteados (milho, trigo, arroz, sorgo, aveia), açúcares e xaropes (usualmente chamados adjuntos, lúpulo, água) e levedura (Figura 7.2). Além deles, pode haver a inclusão de vários aditivos (além de algumas enzimas) e coadjuvantes de processamento, que serão aqui discutidos, quando envolverem reações bioquímicas. Alguns tipos de coadjuvantes de processo e de aditivos participam das reações químicas, dentre eles, sílica gel e polivinilpirrolidone (PVPP) (Leiper *et al.*, 2003).

II. MALTE E MALTEAÇÃO

A malteação objetiva desenvolver um espectro de enzimas que hidrolisam os componentes do malte da cevada (e de outros cereais), de modo a gerar um extrato fermentável, denominado mosto, o qual caracteriza o meio que dará suporte ao crescimento da levedura e à fermentação da cerveja como produto final. É importante que ela seja bebida (em geral, a bebida não é ingerida aos goles, mas sorvida!) e que exiba um número de propriedades de estabilidade, isto é, características de sabor, físicas, de formação de espuma e características biológicas (Stewart, 2004). O malte contribui com inúmeras substâncias para a formação do mosto (Briggs, 1998a). Os componentes principais são o nitrogênio livre aminado (FAN) e os açúcares fermentáveis.

O FAN é a soma dos aminoácidos individuais do mosto, dos íons de amônio e pequenos peptídeos (dipeptídeos e tripeptídeos). É importante medida dos nutrientes que constituem o nitrogênio assimilável pela levedura durante a fermentação para o processo de fabricação da cerveja (Briggs, 1998b). Um aspecto importante das pesquisas sobre a cevada e o malte é a relação entre o teor de nitrogênio incorporado na cevada durante o crescimento no campo e o nível da atividade enzimática desenvolvida pela cevada na malteação (Jones e Pierce,

1965). Durante a malteação, os grãos da cevada – componentes de grande massa molecular das paredes das células do endosperma –, as proteínas de estocagem e os grânulos grandes e pequenos de amido no endosperma são hidrolisados (modificados) enzimaticamente por, por exemplo, amilases, proteases e glucanases, tornando-os mais solúveis em água quente no maceramento.

A palavra “mosto” deriva do termo anglo-saxão *mealt* e talvez tenha a mesma raiz de *melt*, que se refere ao amaciamento do grão que ocorre na germinação ou *malled* (*mauled*: quebrado ou moído), já que os maltes são moídos antes de serem usados no preparo da cerveja (e destilados) (Singer *et al.*, 1954). A malteação é a germinação limitada de grãos de cereais, em geral, de cevada. Às vezes, o malte é usado ainda “verde”, o que significa que não foi seco nem em estufas nem em fornos. Apesar do malte feito de cevada ser, de longe, o mais importante, ele também pode ser feito de trigo, centeio, aveia, triticale, milho, sorgo, várias espécies de milho e arroz.

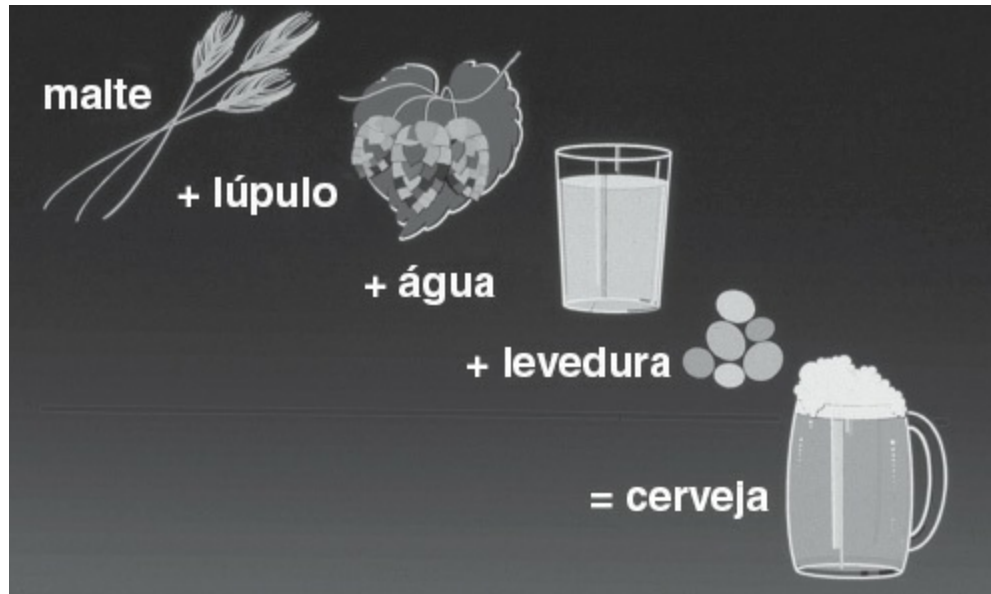


FIGURA 7.2 Principais matérias-primas na produção de cerveja.

A maltagem talvez seja a biotecnologia mais antiga. O cultivo de cevada e trigo deve ter começado por volta de 10.000 a.C. (Briggs, 1998c), e os grãos nativos, colhidos antes. A maltagem é a germinação controlada de cereais, seguida pelo término do processo natural mediante a aplicação de calor aos grãos secos no forno. Mais calor é aplicado para secar o grão no forno para produzir sabor e aroma necessários. Segundo o Instituto de Pesquisa de Maltagem e Preparo da Cerveja (Brewing and Malting Research Institute – BMBRI), com base em Winnipeg, Canadá, as seguintes características são necessárias para produzir cevada maltada de qualidade superior:

- Lote puro de uma variedade aceitável.
- Germinação de, no mínimo, 96% dos grãos.
- Nenhum indício de germinação antes da colheita.
- Concentração de proteínas de 11-12,5% com base em peso seco.
- Teor de umidade máxima de 13%.
- Núcleos redondos e de tamanho uniforme.
- Livre de doenças, micotoxinas, como deoxinivalenol (DON), e de resíduos químicos.
- Livre de danos por geadas e exposição ao clima.
- Baixa concentração de núcleos sem casca ou quebrados.
- Livre de insetos, ferrugem, sementes tratadas, fuligem e odores.

Em geral, os estágios da malteação são divididos em: maceração, germinação e secagem. Na realidade, a malteação envolve outros processos, e as divisões entre os estágios “clássicos” não são precisas. Antes que o processo

de produção comece, a cevada deve ser obtida do fabricante de malte, direta ou indiretamente do fazendeiro, e precisa estar limpa e pronta para uso. Antes disso, os fazendeiros precisam ser persuadidos a cultivar variedades aceitáveis de cevada, que preencham os padrões de qualidade para a malteação. Por sua vez, os cultivadores de cevada já devem ter cultivado as espécies. Depois do processo de secagem, o malte deve ser limpo (*dressed*, como é denominado em inglês) e estocado por um período mínimo antes de ser homogeneizado e transportado para um local de fabricação de cerveja (ou maltaria). Os subprodutos do processo, incluindo os grãos quebrados, as radículas e espículas e o pó, são coletados e vendidos para servir de ração para animais. Cada vez mais os fabricantes de malte misturam as radículas e espículas e as peletizam. Depois dos grãos serem convertidos em malte, algumas perdas tornam-se, inevitavelmente, subprodutos.

O processo de malteação é uma mistura de ciência aplicada e pura relacionada com plantas e inclui bioquímica microbiana, fisiologia, química, física e engenharia. As etapas de um típico processo de malteação podem ser vistas na Figura 7.3. Há, no entanto, muitas variações referentes aos procedimentos básicos. O procedimento utilizado baseia-se no princípio de que a cevada, assim como outros grãos, deve ser convertida em malte da melhor qualidade, de maneira econômica e no menor tempo possível, além de apresentar maior produtividade. A escolha do melhor procedimento é decidida em função de tais considerações. No entanto, aprofundamentos a respeito do processo de malteação não estão contemplados neste capítulo. O foco é a bioquímica do processo, que inclui as principais vias metabólicas que ocorrem durante a germinação do grão. Estas vias incluem centenas de compostos, que são interconvertidos sob a influência de grande número de enzimas e fornecem rotas por meio das quais os esqueletos de carbonos, carboidratos, aminoácidos e lipídeos podem ser convertidos. Além disso, substratos altamente polimerizados, como polissacarídeos e proteínas, podem fornecer combustível para o processo respiratório e blocos para construção de substâncias poliméricas, como os componentes das paredes celulares. Os tecidos dos grãos passam por transformações à medida que a malteação progride. As células aleuronas ficam parcialmente esgotadas de seus conteúdos, entretanto permanecem ativas em termos metabólicos. O conteúdo de amido dos endospermas é parcialmente degradado e esgotado. O embrião metaboliza e cresce, em grande parte em função dos produtos da hidrólise do amido do endosperma. Os processos de hidrólise e biossintéticos prosseguem de maneira simultânea. Há hidrólise das substâncias poliméricas, dentre as quais, o amido, e uma migração das substâncias da camada de aleurona e do endosperma do embrião.

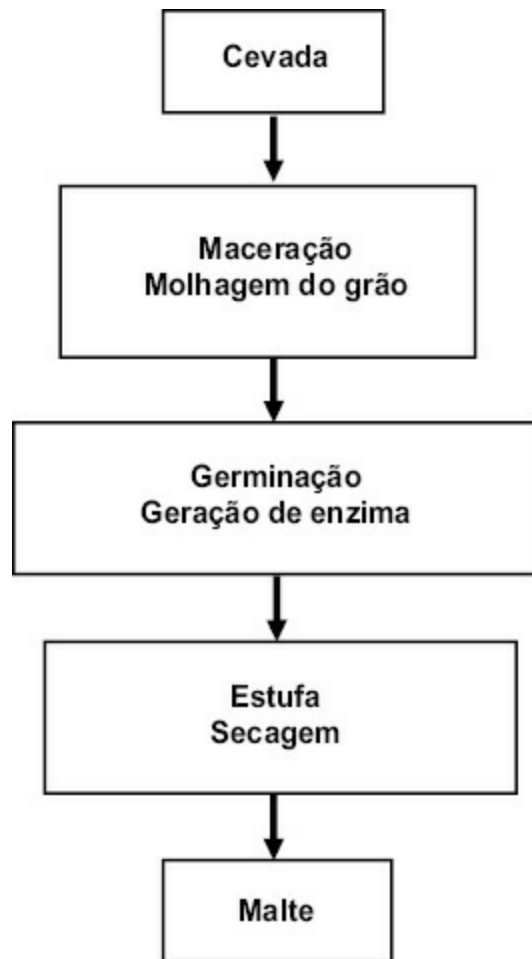


FIGURA 7.3 Processo típico de malteação da cevada.

Apesar das alterações que ocorrem na malteação serem descritas em função de modificações físicas do grão e da análise convencional do malte (Tabela 7.1), com base na bioquímica, as grandes mudanças resultam da degradação das substâncias de reserva, da interconversão das substâncias no embrião vivo e na camada de aleurona e do fluxo de substâncias para o embrião a partir da camada de aleurona e endosperma do amido, da síntese de novas substâncias do grão e sua incorporação nos tecidos novos e em crescimento (acrosipre e radículas) do embrião. Devem ser vistas com atenção as perdas de material seco que ocorrem durante a conversão do grão em malte. Estas perdas resultam de:

- Lixiviação de substâncias do grão na etapa de maceração.
- Processos de fermentação e de oxidação respiratória de substâncias em dióxido de carbono e água.
- Remoção das radículas.

As perdas totais na malteação, em geral, variam de 6-12% do peso seco original. Podem ser muito maiores quando cereais, como o trigo e o sorgo, são maltados.

As alterações químicas e bioquímicas que ocorrem na etapa da malteação são complexas. Elas só podem ser compreendidas quando a extensão das reações nos processos de maceração, germinação e secagem, que se sobrepõem, e os efeitos da retirada das radículas e limpeza do malte acontecem. Durante a maceração, o grão absorve água aumentando sua umidade de 12-14% para 42-48%. Isto ocorre ao imergir o grão em água ou ao usar spray de água no grão ou, como é usual acontecer, utilizando os dois processos. A água fica suja em função da maceração e é substituída, pelo menos, uma vez, para que os grãos sejam mantidos frescos. Os grãos incham e amolecem e os tecidos vivos retomam seu metabolismo, que havia cessado durante a maturação do grão e a secagem, antes da colheita e na estocagem antes da malteação ocorrer. Por vezes, ar é soprado na mistura grão-água (aeração) ou o grão descansa ao ar. A água é retirada e o ar é sugado para baixo através do grão. Quando o grão

obtém o grau de umidade correto, a água da maceração é removida. Em geral, o grão macerado é transferido para um recipiente para germinar. Em algumas maltarias, a maceração, a germinação e, às vezes, a secagem ocorrem em um só recipiente. Cada volume de grão sendo malteado é denominado de “uma peça”. Depois da maceração, a germinação é iniciada e o grão sofre modificações. Modificação é um termo pouco preciso que engloba todas as mudanças desejadas, tanto as químicas como as bioquímicas, que acontecem quando o grão é convertido em malte. As modificações continuam durante os estágios iniciais da secagem. Os três aspectos principais das modificações são:

- Acúmulo de enzimas hidrolíticas (os detalhes serão discutidos depois, na seção III).
- Uma variedade de reações químicas ocorre nos grãos.
- Alterações físicas nos grãos, que parecem estar quebradiços e moles.

TABELA 7.1 Análise convencional da malteação da cevada

Umidade (%)	3,8–4,2
Extração (%)	79,9–81,0
Cor do mosto (°SRM)	1,4–1,7
Poder diastático (°ASBC)	120–145
α -Amilase (DM)	39–49
Proteína do malte (%)	10,8–12,3
Proteína do mosto (%)	4,9–5,6
FAN (mg/l)	180–220
Viscosidade do mosto (cP)	1,38–1,48
β -glucanas do mosto (mg/l)	25–150
Valor no friabilômetro (%)	70–86
Fermentabilidade do mosto (%)	78–82

FAN: nitrogênio livre aminado (*free amino nitrogen*).

Fonte: Briggs (1998b).

Sinais visíveis de germinação surgem, e incluem o primeiro surgimento de um rebento branco na ponta do grão, seguido de uma espécie de penacho de radículas e espículas. Ao mesmo tempo, a acrospira (coleoptilo ou rebento) cresce. O rebento é coberto por uma casca na cevada, mas cresce livremente em muitos outros grãos. O grão germinado é transferido para o forno enquanto ainda está fresco (denominado verde ou não seco, mas não de cor verde). O conteúdo de umidade do malte de cevada seco é, geralmente, de 4-4,5%, reduzido a partir de 42-48%.

Alterações bioquímicas ocorrem nos grãos no processo de malteação, à medida que as modificações no endosperma do amido surgem. Um grão parcialmente malteado retém algum caráter da cevada. Em cada batelada de grãos, há uma heterogeneidade, no sentido de que os grãos individuais variam de tamanho, formato, maturidade, composição química e potencial para gerar enzimas.

Além disso, grãos individuais modificam-se em ritmos diferentes e recebem tratamentos diversos durante a maceração, germinação e secagem.

A. Estrutura dos grãos

Os grãos de cevada (Figura 7.4), exceto quando não têm casca, possuem casca, pericarpo, testa, camada de aleurona, endosperma de amido e embrião (Briggs, 1998b). O peso seco total do grão de cevada é o seguinte: casca, 10-12%, pericarpo e testa, 2-3%, camada de aleurona, 4-5%, endosperma de amido, 77-80%, e embrião, 2-3%.

A casca é composta de duas estruturas que lembram folhas. A metade que compõe o dorso é denominada lema e a metade ventral é a paleia. A casca protege a estrutura que fica abaixo dela, em especial, o embrião. Cascas danificadas são consideradas inaceitáveis e amostras de cevada são rejeitadas se seus danos vão além das exigências

especificadas. Grandes danos significam danos ao embrião, seu crescimento incontrolável e dificuldades operacionais de maceração e filtragem. A casca contém, em seu ambiente, micro-organismos, dentre eles, fungos e bactérias, os quais podem ter invadido os grãos quando ainda estavam no campo, antes da colheita, ou durante a estocagem, antes de serem malteados (Flannigan, 1996). O pericarpo seria a fruta do grão. Grãos de cereais são frutos e, em senso estrito, não deveriam ser denominados de sementes. Assim como a casca, o pericarpo contém uma cutícula cerosa, e, abaixo dela, uma estrutura comprimida de células. O pericarpo é semipermeável, de modo que algumas substâncias químicas passam por ele, enquanto outros, como o hormônio vegetal e o ácido giberélico, não o ultrapassam. Água é capaz de passar pelo pericarpo. Danos ao pericarpo durante a abrasão (processo no qual 7% a 9% do peso do grão é separado como uma espécie de envoltório, sendo grande parte da casca, causando redução mínima da germinação ou da quebra de grãos) permite ao ácido giberélico atingir diretamente a camada de aleurona em vez de fazê-lo por meio do embrião germinado, melhorando, assim, a modificação do endosperma do amido ao aumentar a eficiência da aleurona na produção de enzimas que degradam o endosperma (Sandegren e Beling, 1959). A abrasão, no entanto, não é muito utilizada.

A testa inclui duas camadas de lipídeos que envolvem o material celular, e é permeável ao ácido giberélico. Os compostos fenólicos, por exemplo, anticianógenos (proantocianógenos), são associados à aleurona e à testa e podem ser vistos claramente em algumas variedades de cevada e do sorgo. A pequena área do pericarpo-testa que fica sobre a coleoriza (rebento) é denominada micropila. Esta última pode facilitar a absorção de água e de sais para o interior do embrião durante a germinação.

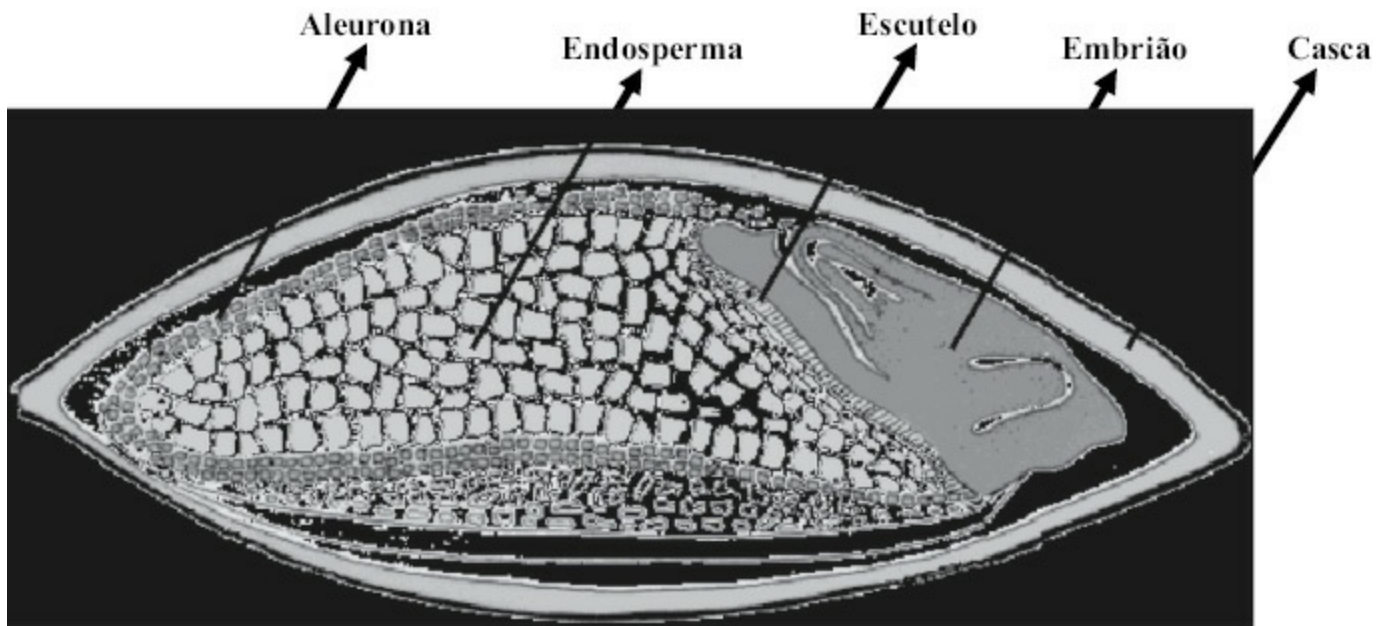


FIGURA 7.4 Grão de cevada. Briggs (1998c).

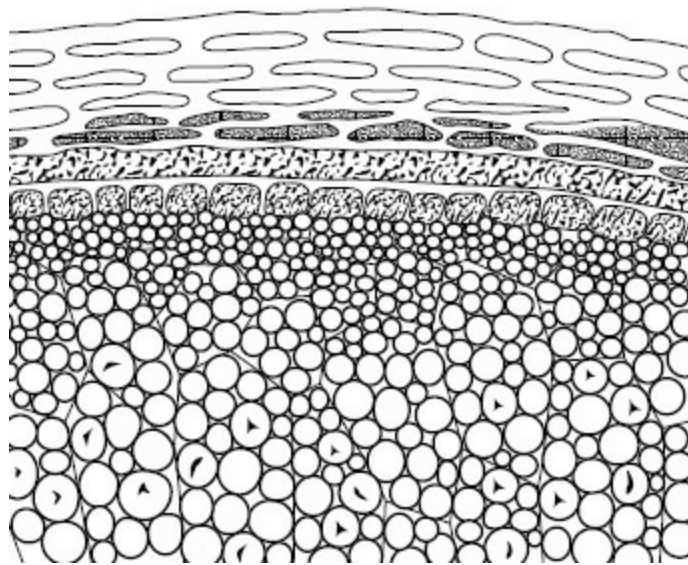


FIGURA 7.5 Estrutura da camada de aleurona da cevada. Briggs (1998c).

A camada de aleurona fica acima do endosperma do amido, com duas ou três células separando-os (Figura 7.5). Ela se estende sobre o embrião como uma única camada de células. Os embriões excisados, portanto, contêm células de aleurona e produzem enzimas que degradam o endosperma. Durante a maltagem, o ácido giberélico dos embriões germinados pode induzir células de aleurona a produzir enzimas que degradam o endosperma, como α -amylase, endo- β -1,3:1,4-glucanases, dextrinases limite, endoproteases e xilanases (pentosanases). Já é aceito o fato de que a α -amylase, a endoprotease e a dextrinase limite são produzidas por síntese *de novo* e camadas de aleurona são estimuladas pelo ácido giberélico.

III. MACERAÇÃO E FERVURA

Os objetivos da maceração são:

- Extrair amido, proteínas peptídeos e outros componentes do malte.
- Fazer com que o extrato se torne fermentável, assegurando a ocorrência da hidrólise enzimática necessária dos componentes em açúcares, aminoácidos, peptídeos pequenos etc.

Antes da maceração, o malte é moído mediante vários procedimentos possíveis. Trata-se de um processo físico e, portanto, está fora do objetivo deste capítulo (Briggs, 1998a). O grão moído é molhado para estimular a atividade enzimática, que hidrolisa o amido para açúcares fermentáveis, as proteínas em aminoácidos e peptídeos pequenos, e lipídeos em ácidos graxos livres e esteróis. Para obter tal complexo procedimento de hidrólise, a massa macerada é sujeita a uma série de períodos de aquecimento e de descanso, a temperaturas determinadas, para atingir as condições ótimas para a hidrólise enzimática, conforme o tipo de cerveja a ser produzido. O diagrama de infusão da massa macerada é utilizado extensivamente, e é mostrado na Figura 7.6. A temperatura inicial de 52°C é usada para estimular a atividade de protease e a de glucanase (muitas vezes, denominada de descanso da proteína), mas as taxas de atividade dos dois sistemas de enzimas ainda não foram esclarecidas.

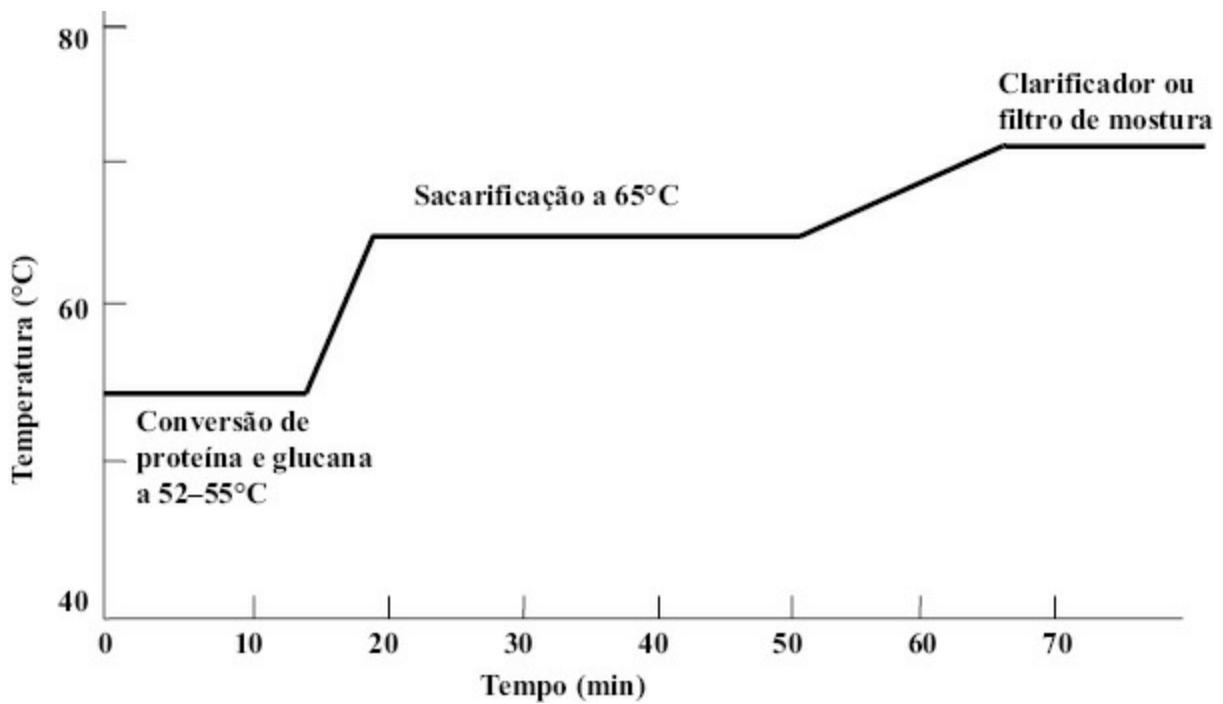


FIGURA 7.6 Diagrama de temperatura de uma infusão de massa macerada.

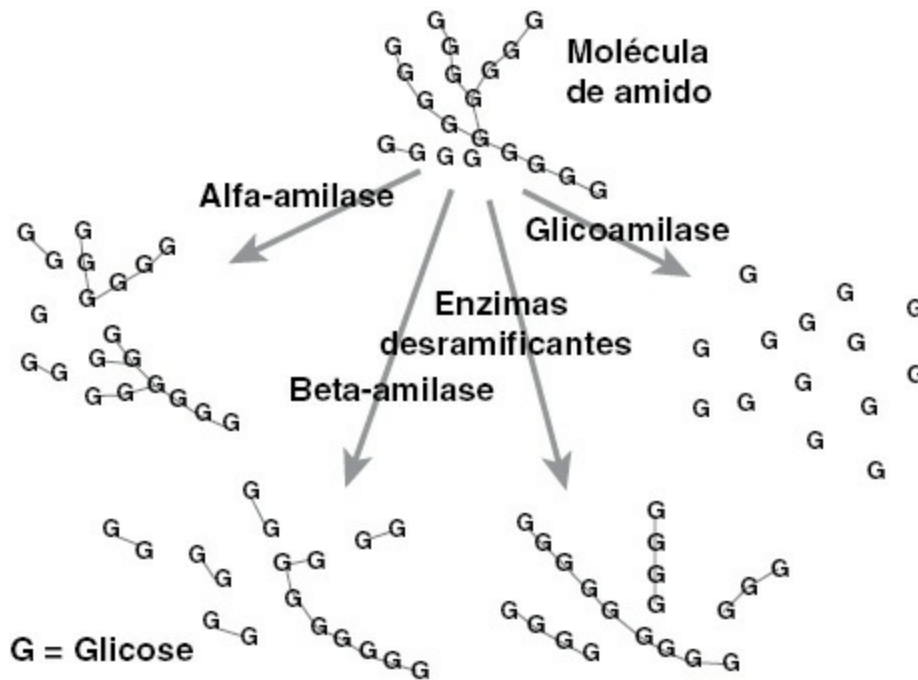
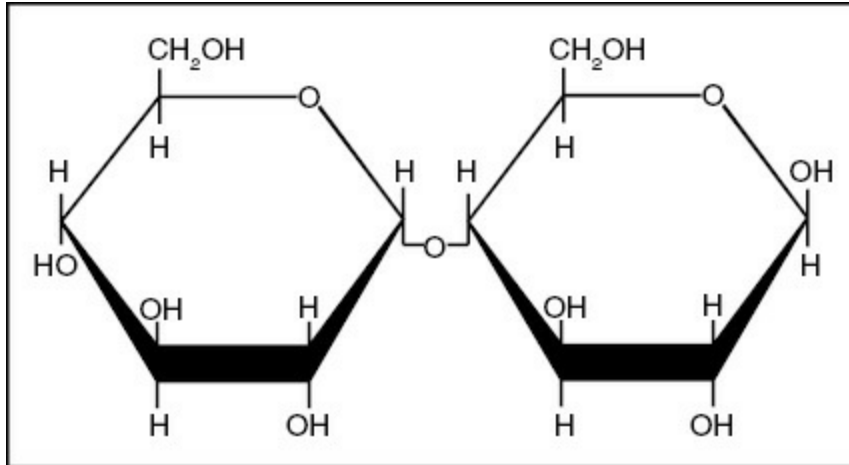


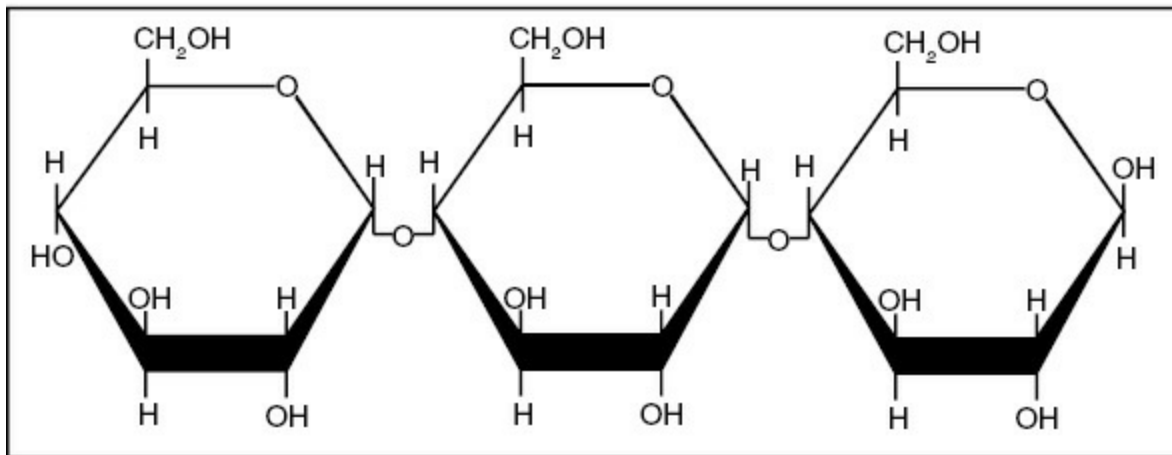
FIGURA 7.7 Hidrólise enzimática do amido.

Depois de 15-20 minutos, a temperatura é gradualmente aumentada até 65°C. Esta é a temperatura de sacarificação e é ótima tanto para a atividade de α - quanto de β -amilase. A α -amilase é uma endoamilase que hidrolisa as ligações α -1,4 glicosídicas da amilose e da amilopectina (que contém ligações α -1,4 e α -1,6). Esta enzima está praticamente ausente na cevada madura, a menos que já tenha germinado. No entanto, quantidades consideráveis são sintetizadas *de novo* no embrião e na camada de aleurona e grandes proporções são geradas no endosperma do amido. A β -amilase é uma exoenzima que catalisa a hidrólise de ligações α -1,4 glicosídicas a partir do final das cadeias não redutoras (Figura 7.7), liberando dissacarídeo maltose (Figura 7.8) e oligossacarídeos (também denominados dextrina) de baixa massa molecular resultantes da remoção de unidades de maltose. Ao contrário da α -amilase, ela é encontrada na cevada não malteada. Durante o início da malteação, o teor de β -amilase livre pode cair e, subsequentemente, após a germinação, quase toda a β -amilase fica livre e a forma ligada desaparece. Tal enzima não ataca ligações glicosídicas tipo α -1,6 ou α -1,4, que estão adjacentes.

Outra importante ação durante a maceração é a enzima desramificante, que hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas das amilopectinas, dextrinas e de outros oligossacarídeos. Também é conhecida como dextrinase limite e como pululanase, em decorrência de sua capacidade de degradar um polissacarídeo bacteriano específico, o pululano. No malte, esta enzima é encontrada na forma solúvel livre e ligada à membrana. Há, na cevada, uma proteína estável ao calor que inibe a dextrinase limite na cevada (Briggs, 1998c). A taxa de inibição aumenta durante a malteação. Há, no entanto, evidências de que ela é sintetizada *de novo* na camada de aleurona da cevada durante a germinação.



Maltose,
Peso molecular = 342



Maltotriose,
Peso molecular = 504

FIGURA 7.8 Estrutura da maltose e da maltotriose.

Depois de aproximadamente 30 minutos a 65°C (descanso de sacarificação), a temperatura é aumentada para 78°C : temperatura de maceração. O objetivo principal da temperatura de maceração é inativar a maioria das enzimas ativas na maceração. Além disso, alguma atividade final de α -amilase ocorre, enquanto a β -amilase será inativada rapidamente. A viscosidade do mosto doce, em tal temperatura, também será reduzida (por causa das β -glucanas e arabinosilanas) e muitos, embora não todos, micro-organismos que contaminam o malte serão inativados pelo calor. Este mosto doce é separado dos grãos já utilizados em um filtro de maceração.

O mosto doce é fervido em uma caldeira, em geral por 30 a 60 minutos e com 4-6% de taxa de evaporação. A fervura é necessária para isomerizar α -ácidos do lúpulo (ácidos isomerizados de lúpulo são amargos, enquanto os não isomerizados não o são), para retirar voláteis do malte e do lúpulo indesejados, para desnaturar e coagular proteínas com polifenóis (*hot break*) e padronizar a concentração do mosto (ver seção IV), inativando toda a atividade enzimática ou microbiológica que possa ter resistido à maceração. Em consequência da fervura e da

evaporação, ocorrerá o desenvolvimento da cor e o aumento na concentração do mosto, que deve ser acomodado para atingir o objetivo final de um mosto específico. Teoricamente, uma caldeira deveria ter sondas em linha para acompanhar a isomerização de α -ácidos, o desaparecimento do dimetil sulfeto, a coagulação das partículas de tamanho coloidal (0,1–10 μm), para formar *hot break* (30–70 μm), e a concentração do mosto. Atualmente, o controle em linha não é prático e o fabricante de cerveja depende de sua experiência prática para controlar os parâmetros críticos.

IV. COMPOSIÇÃO DO MOSTO

Comparado a outros meios usados na produção de álcool por fermentação (tanto o industrial como o potável), o mosto é, de longe, o mais complicado deles. Quando a levedura é adicionada (inoculada) ao mosto, ela é introduzida em um ambiente complexo, pois ele consiste de açúcares simples, dextrinas, aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, íons, ácidos nucleicos e outros elementos demasiado numerosos para serem citados. Um dos maiores progressos da ciência do processo de fabricação da cerveja nos últimos 40 anos foi o esclarecimento dos mecanismos pelos quais a célula da levedura utiliza, de modo ordenado, a variedade de nutrientes do mosto. Os açúcares do mosto (Stewart, 2006) e os aminoácidos (Jones e Pierce, 1964), como explicado em “Mosto com nitrogênio livre aminado”, são removidos em uma determinada ordem em vários momentos do ciclo de fermentação.

A. Açúcares do mosto

O mosto contém os açúcares sacarose, frutose, glicose, maltose e maltotriose, além da dextrina. Uma porcentagem típica do perfil de açúcares do mosto de fabricação da cerveja está ilustrada na Tabela 7.2. Em situações normais, as leveduras para o preparo da cerveja são capazes de utilizar a sacarose, a glicose, a frutose, a maltose e a maltotriose, nesta sequência aproximada (ou prioridade), apesar de ocorrer algum nível de superposição, deixando a maltotetraose (G4) e as dextrinas maiores não fermentadas (Figura 7.9).

TABELA 7.2 Espectro característico de açúcar do mosto

Açúcar	Composição (%)
Glicose	10–15
Frutose	1–2
Sacarose	1–2
Maltose	50–60
Maltotriose	15–20
Dextrinas	20–30

Fonte: Stewart (2006).

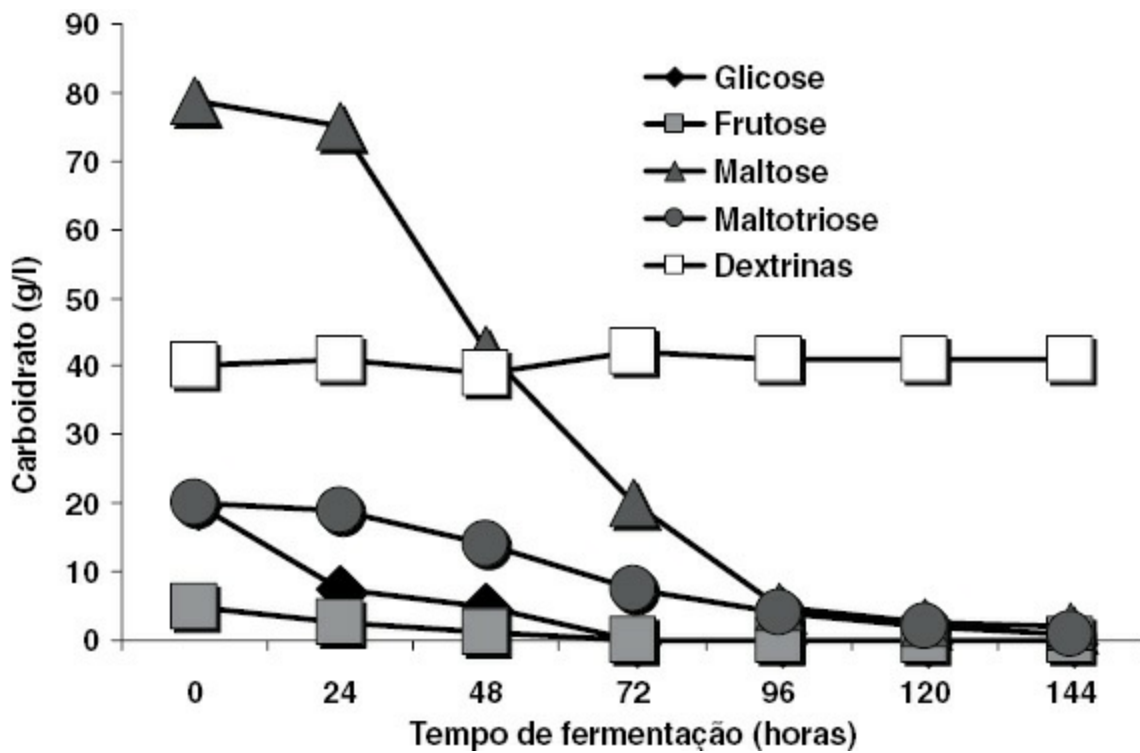


FIGURA 7.9 Sequência de utilização dos açúcares do mosto pela célula de levedura. Stewart (2006).

Os objetivos da fermentação do mosto são o de metabolizar de modo consistente seus elementos constituintes em etanol, dióxido de carbono e outros produtos de fermentação para produzir cerveja com qualidade e estabilidade satisfatórias; produzir culturas de leveduras que possam ser adicionadas de novo, com segurança, em cervejas feitas posteriormente (Stewart e Russell, 1986).

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, inclusive cepas de levedura para o processo de fabricação das cervejas, são fungos unicelulares (mais detalhes podem ser obtidos na seção IV, C). Os requisitos para uma cepa de levedura ser utilizada no preparo de cervejas são: “Para obter uma cerveja de alta qualidade é axiomático que não apenas a levedura seja efetiva para a remoção dos nutrientes necessários para o crescimento/fermentação do meio (mosto), que seja capaz de tolerar as condições ambientais existentes (por exemplo, tolerância ao etanol) e transmitir o sabor desejado à cerveja, além dos próprios micro-organismos serem removidos de modo efetivo do mosto por floculação, centrifugação e/ou filtração depois deles terem desempenhado sua função metabólica” (Stewart e Russell, 1986).

Tais cepas possuem a capacidade de assimilar e fermentar uma ampla gama de açúcares, incluindo sacarose, glicose, frutose, galactose, manose, maltose e maltotriose. Além do mais, a *Saccharomyces diastaticus* (uma subespécie da *S. cerevisiae*) é capaz de utilizar dextrina por meio da secreção de glicoamilase. O primeiro passo na utilização de qualquer açúcar, em geral, é a passagem, na forma intacta, pela membrana celular ou sua hidrólise no exterior da membrana da célula, seguida pela entrada, na célula, de alguns ou de todos os produtos da hidrólise (Figura 7.10). A maltose e a maltotriose são exemplos de açúcares que atravessam, intactos, as membranas das células, enquanto a sacarose e as dextrinas são hidrolisadas por enzimas extracelulares [invertase para a sacarose e glicoamilase (amiloglicosidase) para as dextrinas], e os produtos da hidrólise são transportados para o interior da célula. Uma diferença metabólica importante entre a absorção de monossacarídeos, tais como a glicose e a frutose, e a de dissacarídeos, como a maltose e a maltotriose, é que energia (conversão de ATP em ADP) é requisito necessário para a absorção da maltose e da maltotriose (transporte ativo), enquanto a glicose e a frutose são absorvidas de modo passivo, sem que nenhuma energia seja necessária (Bisson *et al.*, 1993). Como a maltose e a maltotriose (Figura 7.8) são os açúcares principais do mosto para o processo de fabricação de cerveja, a habilidade da levedura de utilizá-los é vital e depende do complemento genético correto. A levedura utilizada pelos cervejeiros possui mecanismos independentes de absorção (permeases de maltose e maltotriose) para transportar os dois

açúcares pela membrana da célula para seu interior. Uma vez dentro da célula, eles são hidrolisados em unidades de glicose pelo sistema de α -glicosidase (Figura 7.10). O transporte, a hidrólise e a fermentação da maltose são especialmente importantes no preparo, na destilação e no cozimento da cerveja, pelo fato de ela ser o principal componente de açúcar para o preparo do mosto, maceramento do álcool e massa de amido. Para a fermentação da maltose no processo de fabricação da cerveja, a levedura requer ao menos um dos cinco loci *MAL* desvinculados, cada um consistindo de três genes para a α -glicosidase (maltase) (*MALS*) permease de maltose (*MALT*) e um ativador cujo produto regula de maneira coordenada a expressão dos genes da α -glicosidase e da permease. A expressão dos *MALS* e *MALT* é regulada pela indução da maltose e repressão pela glicose. Quando a concentração de glicose está alta (> 10 g/l), os genes do *MAL* são reprimidos e apenas quando de 40-50% da glicose for retirada do mosto é que a absorção da maltose e a da maltotriose tem início (Figura 7.9).

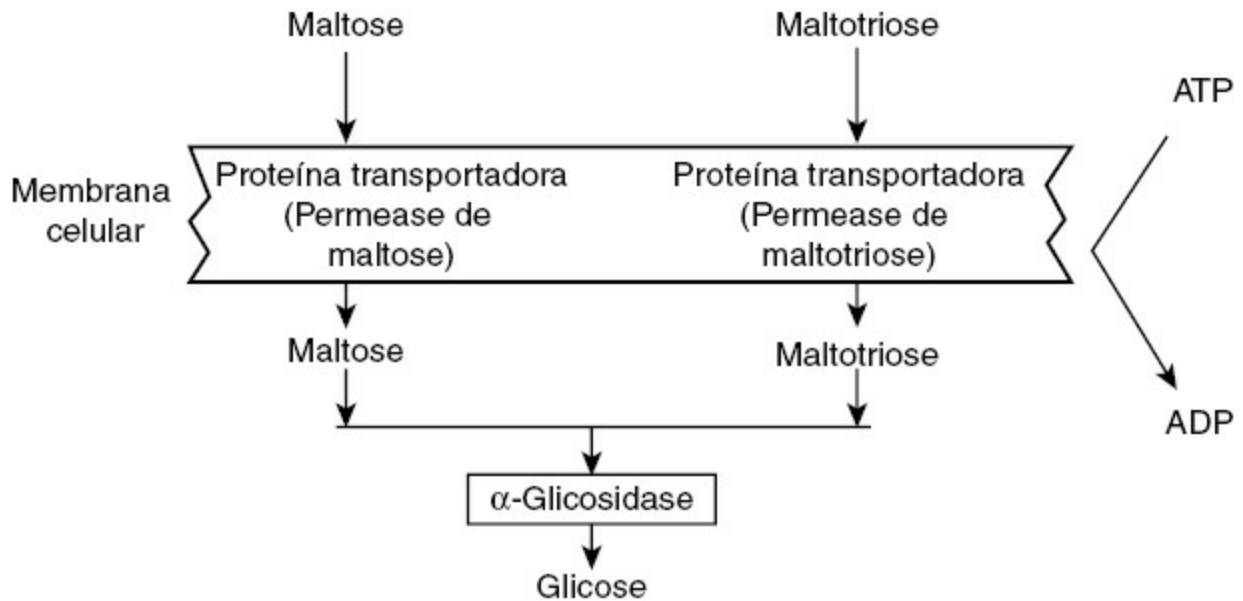


FIGURA 7.10 Utilização e metabolismo de maltose e maltotriose pela célula de levedura. Stewart (2006).

B. Efeito da pressão osmótica e do etanol na absorção da glicose, maltose e maltotriose do mosto

Mosto com alta concentração ($> 16^\circ$ Plato, em que 1° Plato \equiv 1 g sacarose dissolvida em 100 mL de água destilada a 20°C) demonstrou exercer efeito negativo no desempenho da fermentação (Casey *et al.*, 1984). O preparo da cerveja em alta concentração utiliza o mosto em concentrações mais elevadas do que o normal e, portanto, requer diluição com água (em geral, a água recebe um tratamento especial, às vezes, com a remoção do oxigênio). Ele é feito durante os últimos estágios do processamento, assegurando que um aumento da produção pode ser obtido sem expansão do processo, da fermentação e de instalações para embalagem. Tal processo também reforça a sustentabilidade, pois reduz a quantidade de água e a de energia utilizada em uma fábrica de cerveja, calculada por unidade, na relação venda-concentração da cerveja produzida. Além disso, emprego de mosto com alta concentração pode significar redução da mão de obra, limpeza e custos com efluentes (Stewart, 1999).

Apesar do processo com mosto de alta concentração ter várias vantagens, é inevitável haver também desvantagens. Uma vez que o produto macerado fica mais concentrado (razão maior de carboidratos, de acordo com a água para produzir mosto de alta concentração), ocorre queda na eficiência do material utilizado na fábrica. Este problema pode ser solucionado com o uso de filtros modernos para produtos macerados (Andrews *et al.*, 2011), em vez dos tradicionais ou dos caldeirões de xaropes, nos quais a adição de carboidratos ultrapassa o processo pelo qual o mosto não fervido é separado dos grãos já utilizados. O mosto mais concentrado durante a fervura produz uma isomerização reduzida do lúpulo, o que diminui a quantidade a ser utilizada. A desvantagem

pode ser amenizada pelo uso de um caldeirão e de extratos de lúpulo já fermentados. Outra grande desvantagem do processo com o mosto de alta concentração na fabricação da cerveja é a redução da estabilidade da espuma (retenção do colarinho) na cerveja finalizada e já diluída. Este aspecto não será discutido em detalhes aqui, tornando-se suficiente esclarecer que a razão principal é a perda maior dos peptídeos hidrofóbicos durante o processo de fabricação, em função da extração reduzida dos polipeptídeos durante a maceração e sua hidrólise por intermédio das proteases da levedura durante a fermentação (Cooper *et al.*, 1998).

Outro efeito negativo de mosto de alta concentração é o resultado na atividade e no desempenho geral na levedura. Uma das influências negativas é a pressão osmótica elevada (Pratt *et al.*, 2003), que foi simulada pelo uso de açúcar sorbitol não metabolizado em um meio sintético. Fermentações foram efetuadas com extrato de levedura-peptona contendo 25% (w/v) de sorbitol ao qual foi adicionado 2,5% (w/v) de glicose, maltose ou maltotriose. O efeito da pressão osmótica elevada no transporte dos três açúcares é mostrado na Figura 7.11, como uma porcentagem do controle não tratado sem a adição de sorbitol, com cepas de levedura de cerveja tipo ale e pilsen. A taxa de absorção dos três açúcares foi inibida nas duas cepas pela presença do sorbitol, porém em quantidade muito maior com a maltose e a maltotriose do que com a glicose. Efeitos similares foram obtidos com a absorção de glicose, maltose e maltotriose após tratamento com 10% (v/v) de etanol (Stewart, 2006) (Figura 7.12). São, provavelmente, reflexo dos diferentes mecanismos de transporte da glicose, quando comparados com os da maltose e da maltotriose.

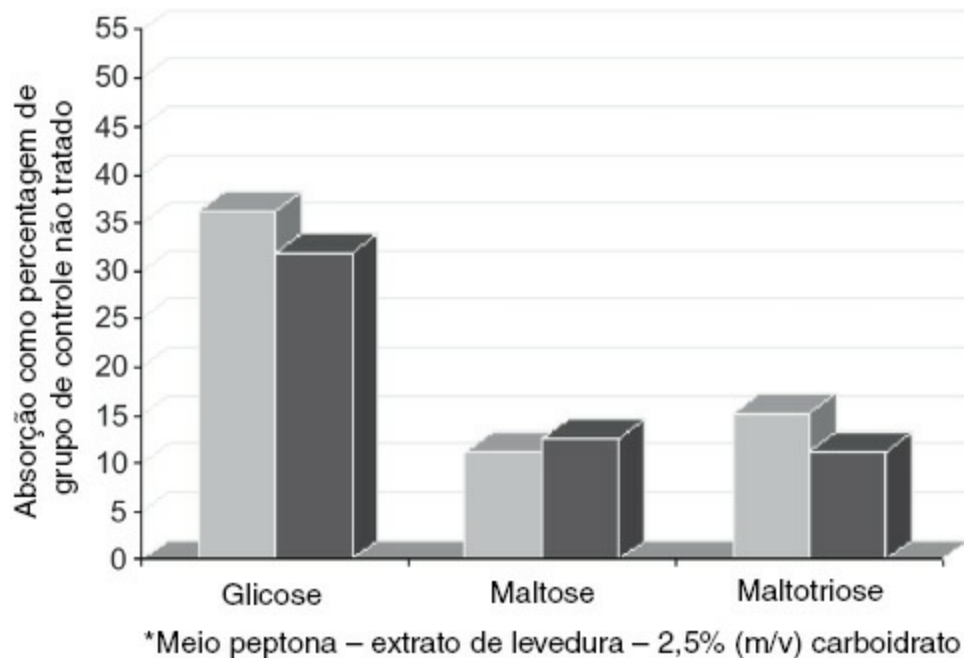
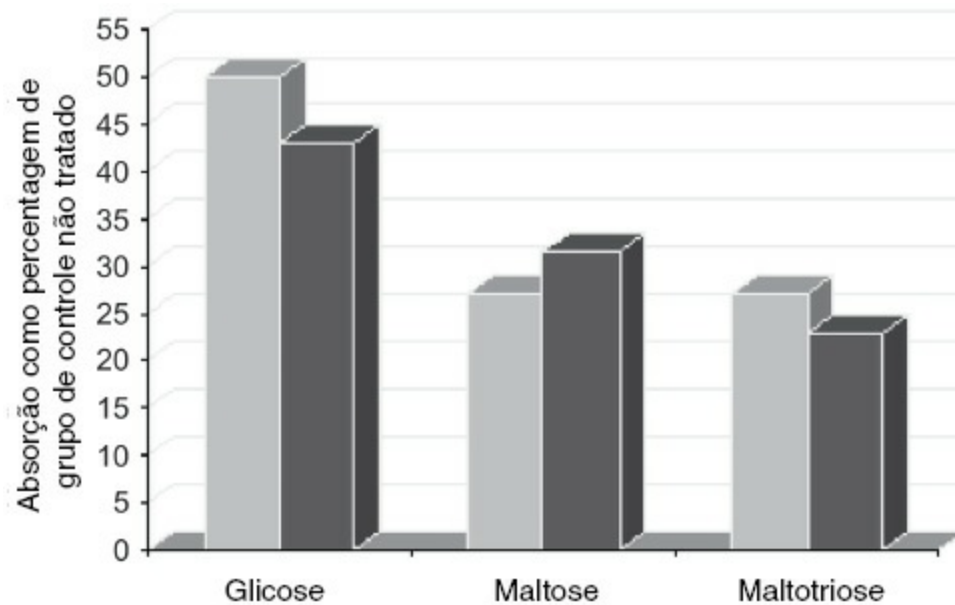


FIGURA 7.11 Efeito da pressão osmótica [25% (m/v) de sorbitol*] na absorção de glicose, maltose e maltotriose por uma cerveja tipo pilsen (barras cinzas) e por uma cerveja tipo ale (barras pretas). Stewart (2006).



*Meio peptona – extrato de levedura – 2,5% (m/v) carboidrato.

FIGURA 7.12 Efeito do etanol [10% (v/v) de etanol*] na absorção de glicose, maltose e maltotriose por uma cerveja tipo pilsen (barras cinzentas) e por uma cerveja tipo ale (barras pretas). Stewart (2006).

Outra desvantagem do processo de fabricação com mosto concentrado é que o sabor da cerveja diluída muitas vezes não é comparável ao da cerveja produzida pelo processo tradicional. Este fato ocorre principalmente em função dos teores desproporcionais dos compostos de acetato, como acetato de etila e acetato de isoamila (Tabela 7.3). Uma variação da fonte de açúcar do mosto demonstrou modificar os teores de muitos metabólitos, incluindo os ésteres, embora as razões das diferenças ainda não terem sido esclarecidas. Inicialmente, 4% (v/v) da glicose e da maltose em um meio sintético (extrato de levedura e peptona) foram fermentados separadamente com agitação a 21°C e a produção de acetato de etila e a de acetato de isoamila foram monitoradas (Tabela 7.4). O desempenho da fermentação das três cepas tipo ale e das três cepas tipo lager para a fabricação da cerveja foi similar. Nas seis cepas estudadas, as cultivadas em maltose produziram, de modo consistente, níveis mais baixos de ésteres em meios de glicose.

TABELA 7.3 Influência da alta concentração do mosto nos teores de esteres da cerveja

	12° Plato	20° Plato
Etanol (v/v)	5,1	5,0
Acetato de etila (mg/l)	14,2	21,2
Acetato de isoamila (mg/l)	0,5	0,7

Fonte: Younis e Stewart (1999).

TABELA 7.4 Produção de acetato de etila e de acetato de isoamila nos tipos de levedura da fabricação de cerveja durante a fermentação em meio sintético^a

Tipo	Acetato de etila (mg/l)		Acetato de isoamila (mg/l)	
	Glicose	Maltose	Glicose	Maltose
Ale 1	4,13	2,79	0,14	0,14
Ale 2	2,97	2,59	0,06	0,04
Ale 3	3,13	2,71	0,05	0,03
Lager 1	6,00	5,22	0,22	0,21
Lager 2	3,75	3,28	0,26	0,22
Lager 3	4,13	3,51	0,23	0,17

^a Peptona – extrato de levedura – 4% açúcar médio.

Fonte: Younis e Stewart (1999).

TABELA 7.5 Composição de carboidratos dos xaropes na fabricação de cerveja

	MS	VHMS
Glicose	15 ^a	5
Maltose	55	70
Maltotriose	10	10
Dextrinas	20	15

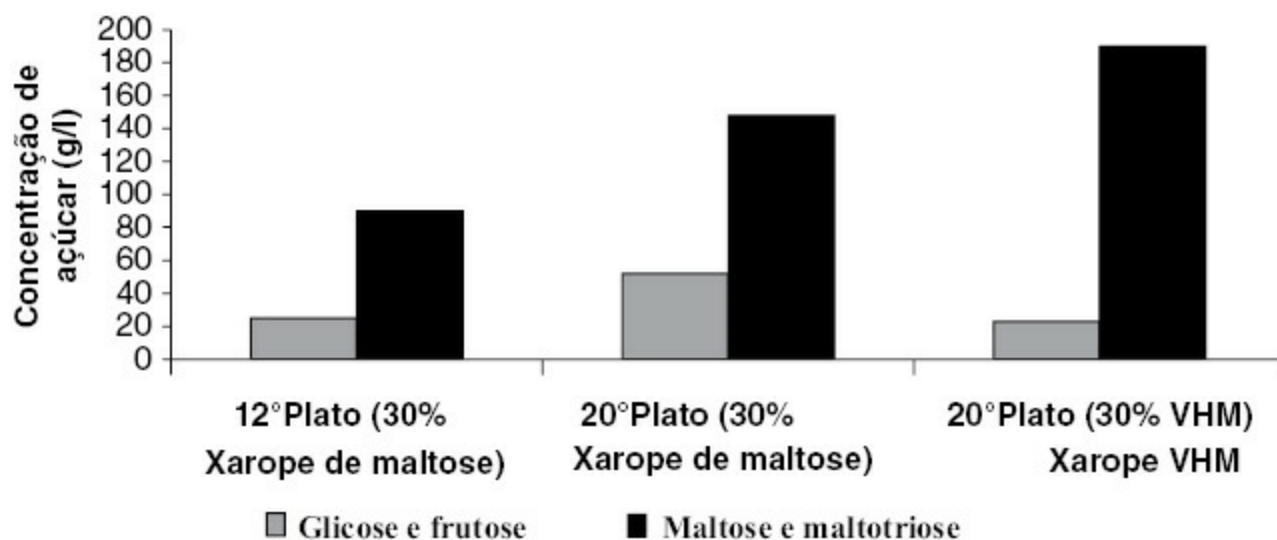
MS: xarope (55) de maltose; VHMS: xarope com concentração muito alta de maltose (7).

^a Percentual na composição.

Fonte: Priest e Stewart (2006).

Os teores baixos de ésteres produzidos com maltose como substrato, quando comparados com os de glicose, podem ter várias causas. É possível que a fermentação com maltose iniba o transporte de ésteres para fora das células, talvez pela modificação da membrana plasmática, dando, assim, a impressão de que um número menor de ésteres é produzido. Outra possibilidade é a de que o metabolismo da maltose produza teores menores de acetil-coenzima A que, como já foi sugerido, resulta em menos ésteres em razão da falta de substrato. Estudiosos já propuseram que a produção de ésteres está relacionada com o metabolismo de lipídeos (Stewart, 2005). Caso seja verdadeiro, ou se, por alguma razão, o metabolismo da maltose produz menos ácidos graxos tóxicos, seria razoável supor também que um número menor de ácidos graxos fosse produzido.

Costuma-se aceitar que uma redução nos teores de ésteres da cerveja, em especial, acetato de etila e acetato de isoamila, em cervejas produzidas com mostos de alta concentração, seria bem-vinda. Para estudar a influência dos níveis de maltose e de glicose em mostos de alta concentração, dois mostos a 20°Plato foram preparados, contendo 30% de xarope de maltose (MS), e outro contendo 30% de xarope com concentração muito alta de maltose (VHMS). A composição dos açúcares dos dois xaropes usados no preparo de cerveja está ilustrada na Tabela 7.5. Além disso, o mosto com adição de 12°Plato contendo 30% de xarope de maltose (MS) foi preparado e utilizado como controle. Os perfis de açúcares dos três mostos estão ilustrados na Figura 7.13. A concentração de maltose e maltotriose no mosto com 20°Plato VHMS aumentou, quando comparada ao mosto com 20°Plato MS, com um decréscimo correspondente na concentração de glicose e de frutose.

**FIGURA 7.13 Perfil de açúcar do mosto.** Younis e Stewart (1998).

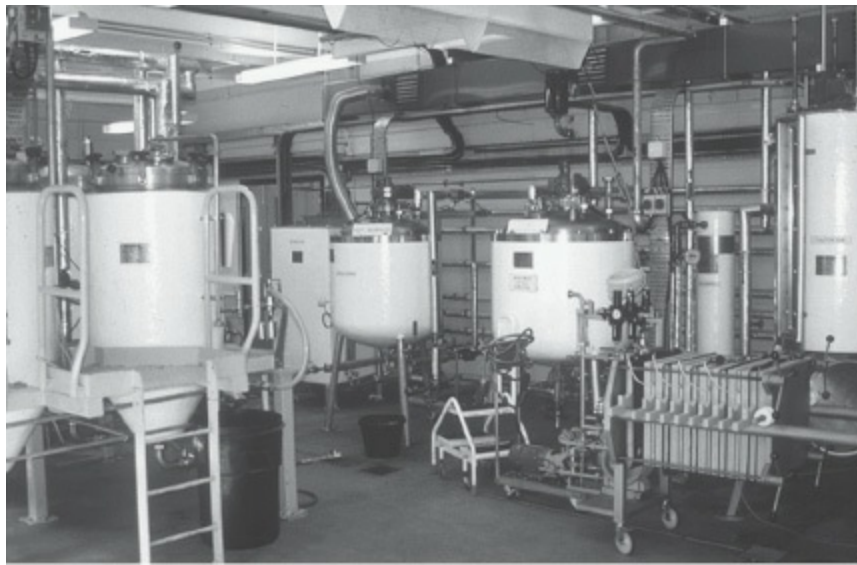


FIGURA 7.14 Cervejaria-piloto da Universidade Heriot-Watt International, Reino Unido. *Fonte:* Fotografia do autor.

Os três mostos foram fermentados na cervejaria-piloto 2 hL, do Centro Internacional para Fabricação de Cerveja e Destilação, da Universidade Heriot-Watt International (Centre for Brewing and Distilling at Heriot-Watt University), Escócia, Reino Unido (Figura 7.14). Uma cepa de cerveja tipo lager foi utilizada a 13°C e a concentração de acetato de etila e a de acetato de isoamila determinadas ao longo do processo de fermentação (Figuras 7.15 e 7.16), respectivamente. Os perfis foram similares para os dois ésteres. A concentração de ambos os ésteres no mosto fermentado contendo 20°Plato MS foi o dobro daquela do mosto fermentado com 12°Plato MS, como era esperado. No entanto, a concentração de ésteres no mosto 20°Plato VHMS foi reduzida em aproximadamente 25%, comparada com o mosto de 20°Plato MS (Younis e Stewart, 1999). Estes resultados confirmam as descobertas feitas com o uso de meios sintéticos com açúcares simples, de que as fermentações com maltose produzem menos acetato de etila e acetato de isoamila do que fermentações com glicose (Younis e Stewart, 1998).

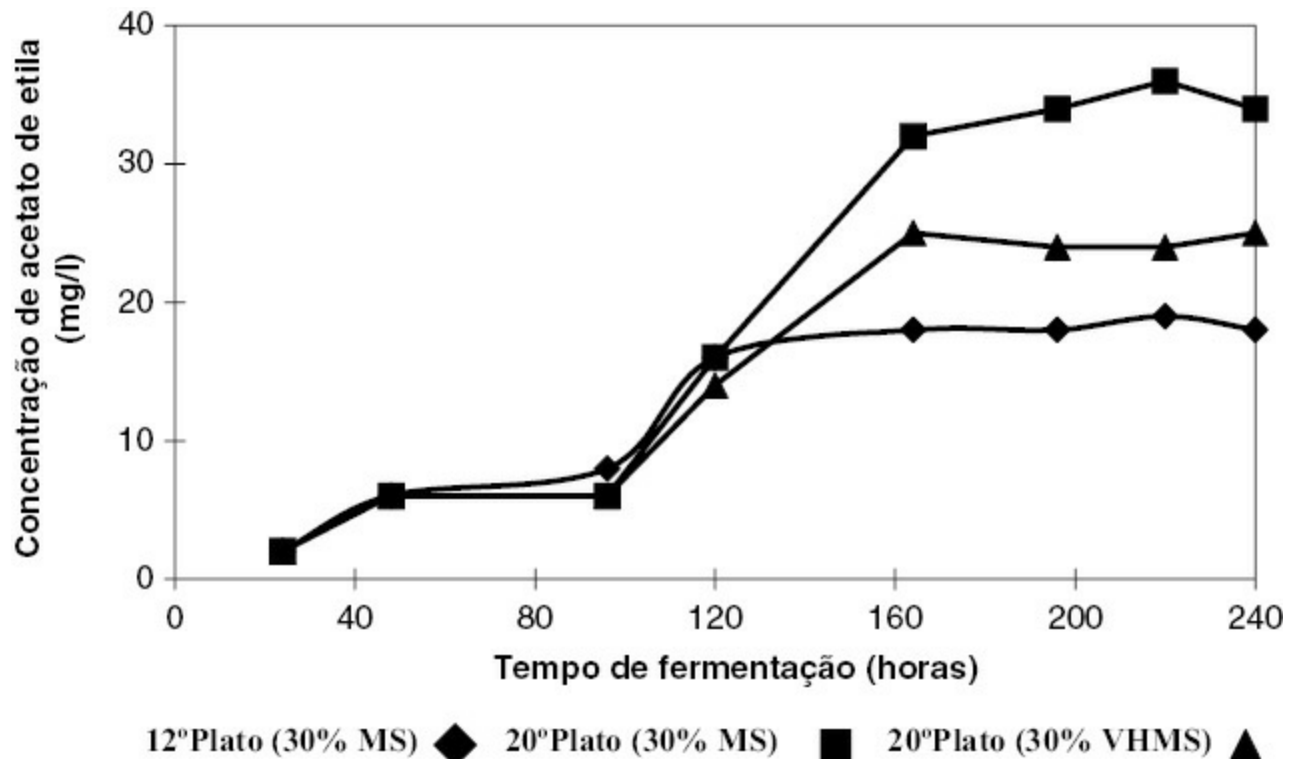


FIGURA 7.15 Concentração de acetato de etila no mosto fermentado de diferentes gravidades e composição de açúcar. (u) 12°Plato (30% xarope de maltose); (v) 20°Plato (30% xarope de maltose); (σ) 20°Plato (30% xarope de concentração muito alta de maltose). Younis e Stewart (1998).

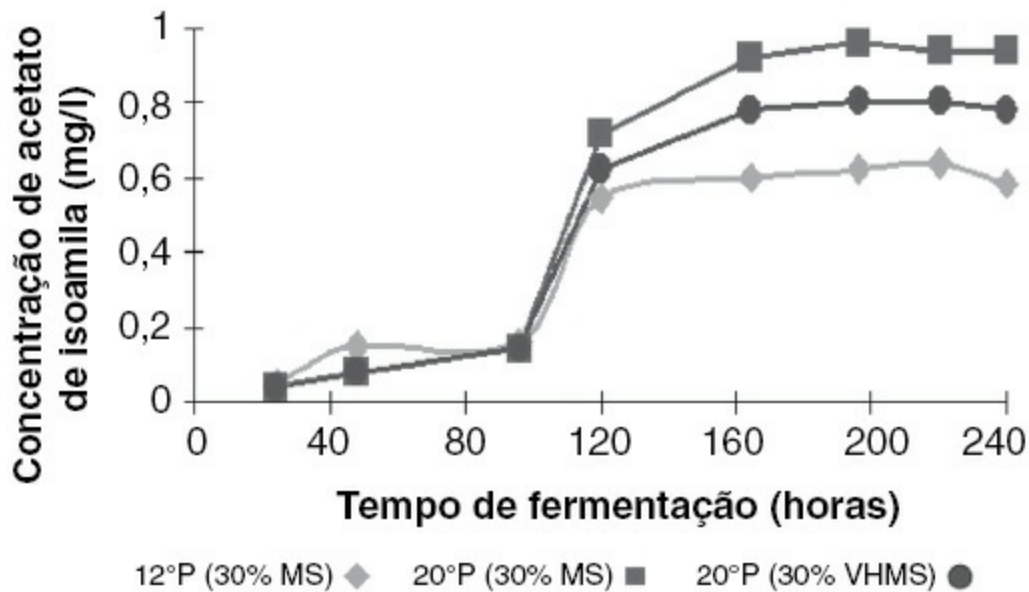


FIGURA 7.16 Concentração de acetato de isoamila no mosto fermentado de diferentes gravidades e composição de açúcar. Younis e Stewart (1998).

C. Absorção de mosto com maltose e maltotriose: diferenças entre cepas de leveduras para cervejas tipo Ale e Lager

A produção comercial de cerveja ale em todo o mundo tem sido muito mais baixa do que a da cerveja lager e, ao longo dos anos, tal diferença tem se acentuado. As tendências de consumo de ale, comparadas com o consumo maior de lager, em Ontário, Canadá, e no Reino Unido podem ser consultadas nas Tabelas 7.6 e 7.7, respectivamente. Hoje, nos Estados Unidos, 4,4% da cerveja produzida é do tipo ale, e isto se deve principalmente às capacitações técnicas do setor.

Há muitas diferenças na produção dos dois tipos de cerveja, sendo uma das principais as diferentes características das cepas de levedura de tipo ale e de lager. Muitas pesquisas enfocando tal aspecto foram feitas por fabricantes de cerveja e instituições (Barnett, 1992; Pederson, 1995; Pulvirenti *et al.*, 2000; Rainieri *et al.*, 2003) e as diferenças mais significativas entre as cepas de levedura ale e lager já foram estabelecidas (Tabela 7.8).

Com o advento de metodologias baseadas em biologia molecular, o sequenciamento dos genes das cepas de levedura demonstrou que elas são interespécies híbridas com relações homólogas entre si e também com a *Saccharomyces bayanus*, uma espécie de levedura utilizada na fermentação do vinho e identificada como nativa na fermentação da cerveja (Figura 7.17). A homologia do gene entre cepas de *Saccharomyces pastorianus* e de *S. bayanus* é alta, atingindo 72%, enquanto a homologia entre *S. pastorianus* e *S. cerevisiae* é muito mais baixa, atingindo apenas 50% (Pederson, 1995).

TABELA 7.6 Comparação entre a tendência de consumo (%) de ale versus lager em Ontário, Canadá (1970-2007)

Ano	Ale	Lager
1970	60	40
1980	20	80
1990	10	90
2000	10	90
2005	15	85
2007	15	85

Fonte: Steiner (2009).

TABELA 7.7 Comparação entre a tendência de consumo (%) de ale versus lager no Reino Unido (1970-2007)

Ano	Ale	Lager
1970	90	10
1980	70	30
1990	50	50
2000	40	60
2007	35	65

Fonte: Steiner (2009).

Há pouco tempo, um grupo de pesquisadores da Argentina, Portugal e Estados Unidos publicou uma pesquisa com o título “Domesticação de micróbios e a identificação de cepas genéticas nativas de leveduras para o preparo de lager” (Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast) (Libkinda *et al.*, 2011). Este estudo confirma o fato de que a *S. pastorianus* é uma espécie de levedura domesticada, criada por meio da fusão de *S. cerevisiae* com uma espécie até então desconhecida, e que agora tem o nome de *Saccharomyces eubayanus*, por causa de sua relação muito próxima com a *S. bayanus*. Eles também informaram que a *S. eubayanus* existe nas florestas da Patagônia e que não era encontrada na Europa antes do advento do comércio transatlântico entre Argentina e Europa. Esta publicação (Libkinda *et al.*, 2011) contém um esboço da sequência do genoma da *S. eubayanus*; que é 99,5% idêntico à porção, a qual não é a de *S. cerevisiae* da sequência do genoma de *S. Pastorianus*, e que sugere alterações específicas no metabolismo de açúcar do mosto e no metabolismo do sulfato, quando comparado a cepas de cerveja ale fundamentais na determinação das características da cerveja lager.

TABELA 7.8 Diferenças entre as cepas de levedura ale e lager

Cepa ale	Cepa lager
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (tipo ale)	<i>Saccharomyces uvarium</i> (<i>carlsbergensis</i>)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (tipo lager)
	<i>Saccharomyces pastorianus</i> : taxonomia atual
Temperatura de fermentação de 18-22°C	Temperatura de fermentação de 8-15°C
Células podem crescer a 37°C ou mais	Células não podem crescer a 37°C ou mais
Não pode fermentar o dissacarídeo melibiose	Fermenta o dissacarídeo melibiose
“Alta” fermentação	“Baixa” fermentação

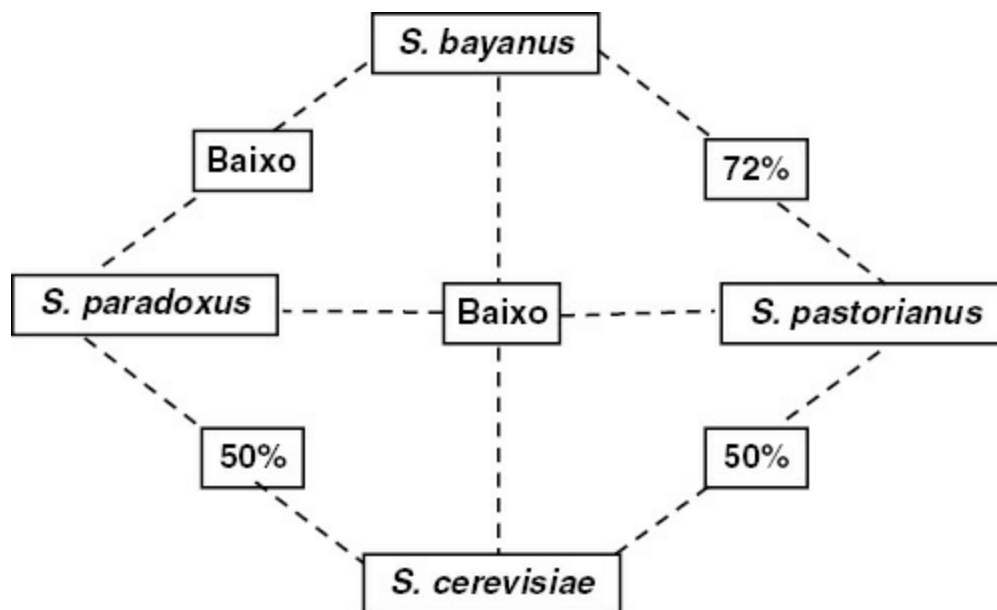


FIGURA 7.17 O grupo *Saccharomyces sensu stricto* para cepas ale e lager. Adaptado de Pederson (1995).

Muitas cepas das leveduras para cervejas tipo ale e lager foram utilizadas para explorar os mecanismos da

absorção de maltose e de maltotriose no mosto. Mosto com 100% de malte e a 16°Plato foi utilizado em fermentador estático de 30 litros a 15°C (Figura 7.18). Nestas condições, cepas de lager usaram maltotriose de modo mais eficiente do que as cepas de ale, enquanto a eficiência da utilização da maltose não depende do tipo de cepa usado no preparo da cerveja (Zheng *et al.*, 1994). Tal aspecto corrobora a hipótese de que a maltotriose e a maltose possuem sistemas de absorção (permeases) independentes, embora muito próximos (Russell e Stewart, 1980a). Além disso, a diferença consistente entre cepas de ale e lager confirma a observação de que as cepas de ale apresentam maior dificuldade do que as de lager para fermentar completamente o mosto, em especial o de alta concentração (Stewart *et al.*, 1995).

Para investigar com maior profundidade as sequências de genes MAL, uma cepa com duas cópias do gene *MAL2* e duas cópias do gene *MAL4* foi preparada, utilizando técnicas de hibridização. A taxa de fermentação do mosto foi comparada com a de uma cepa que continha só uma cópia do gene *MAL2*. Como esperado, a taxa de fermentação geral com a cepa contendo múltiplos genes de *MAL* agiu muito mais rapidamente do que a cepa com apenas uma única cópia do *MAL2* (Figura 7.19). A razão principal da fermentação mais rápida ocorrer é a taxa de absorção muito mais ágil da maltose e sua subsequente metabolização, se comparada com a cepa de levedura contendo uma cópia única do *MAL2* (Figura 7.20).

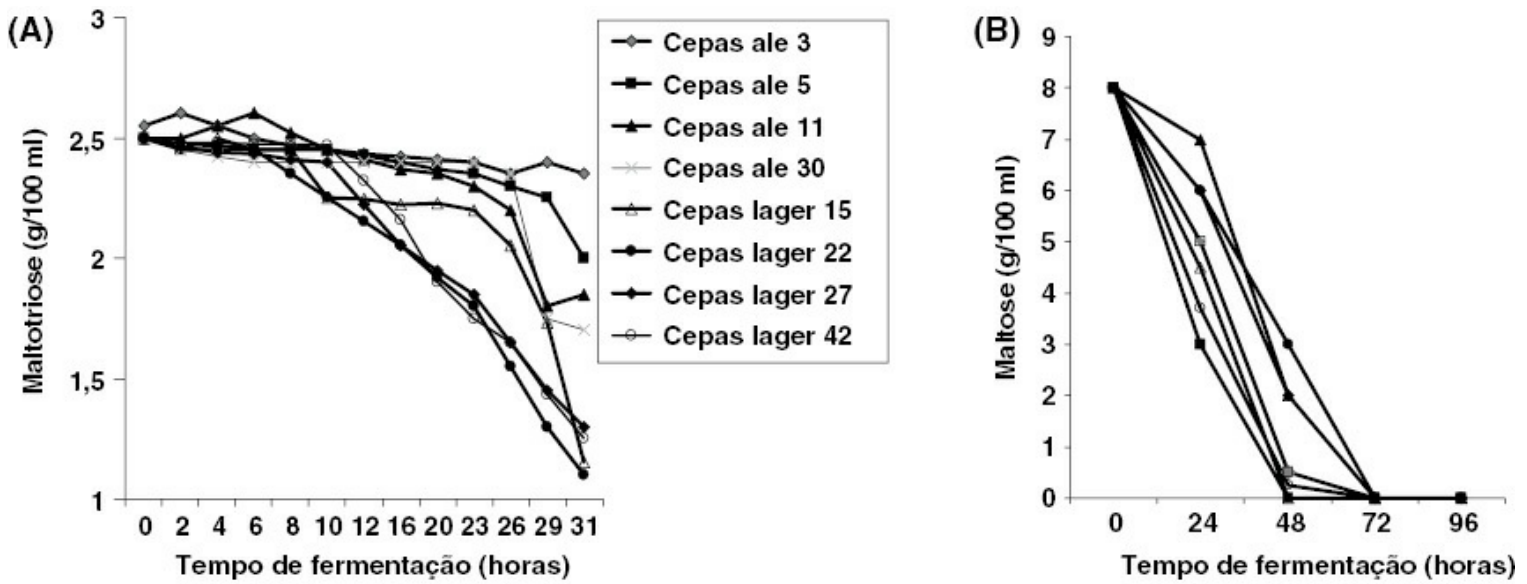


FIGURA 7.18 Perfis de utilização de (A) maltotriose e (B) maltose por mosto a 16°Plato. Zheng *et al.* (1994).

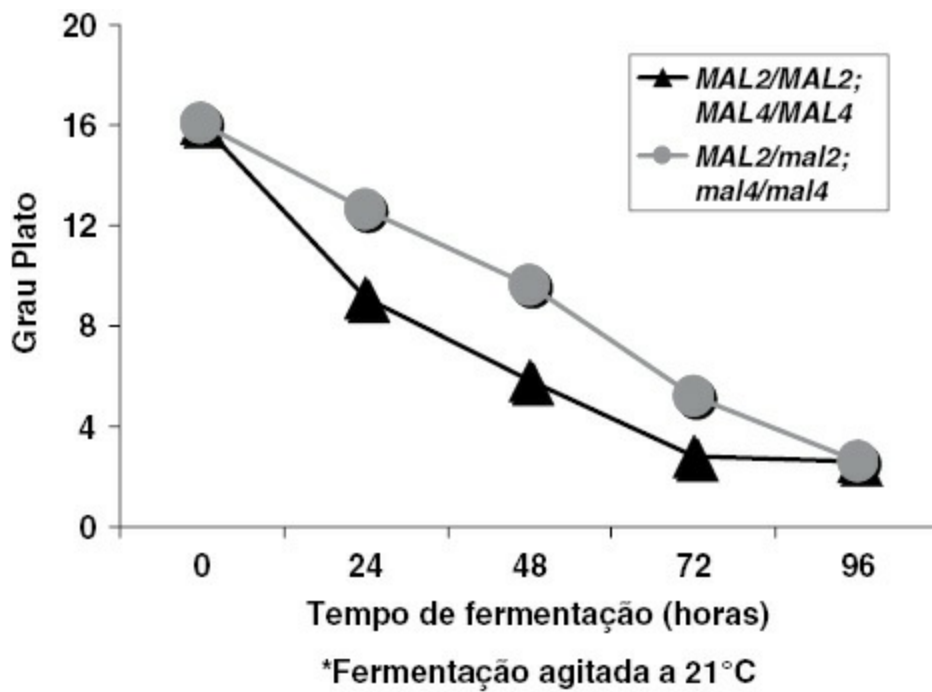


FIGURA 7.19 Perfil de fermentação de um mosto a 16°Plato com uma cepa de levedura diploide contendo múltiplos genes de maltose (*MAL*). Stewart (2006).

Com já foi esclarecido, o mosto contém dextrinas não fermentáveis (Tabela 7.2). Estas dextrinas permanecem na cerveja quando pronta e contribuem para a sensação de corpo na bebida, ou de boca cheia ao ser bebida, além de aumentarem seu valor calórico (Brenner, 1980). Para produzir cerveja de baixo valor calórico, a quantidade de dextrinas deve ser reduzida, por meio de várias técnicas disponíveis. Um dos métodos é a utilização de uma cepa de levedura com capacidade de metabolizar as dextrinas do mosto. A existência de uma classe de levedura *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, que é, em termos taxonômicos, muito próxima das cepas de levedura para a produção de cerveja já foi discutida neste capítulo. Essas cepas possuem a capacidade genética de produzir uma glicoamilase extracelular, que pode hidrolisar as dextrinas em glicose, a qual é absorvida pela levedura durante a fermentação do mosto. Foram identificadas como um grupo polimérico de três genes: *STA1/DEX1*, *STA2/DEX2* e *STA3/DEX3* (Erratt e Stewart, 1978). Uma cepa de levedura que os incorpora foi preparada e suas características de fermentação foram avaliadas durante uma fermentação de mosto. A levedura amilolítica mostrou uma taxa de fermentação mais rápida e 1°Plato mais baixo no mosto final do que a levedura de controle, que não foi capaz de metabolizar as dextrinas do mosto (Figura 7.21) (Erratt e Stewart, 1981).

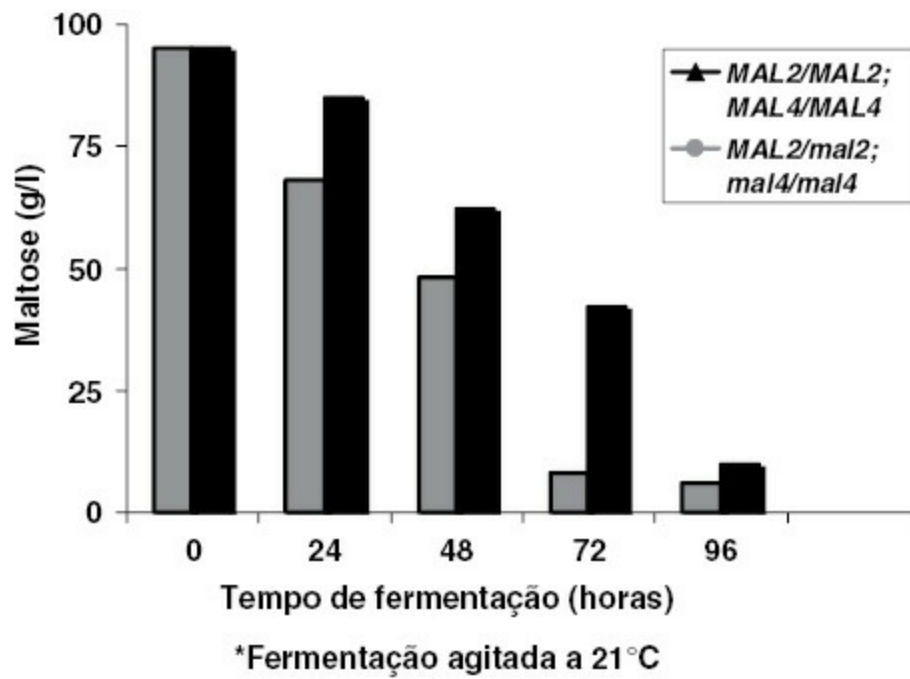


FIGURA 7.20 Absorção de maltose por um mosto a 16°Plato com uma cepa de levedura diploide contendo múltiplos genes de maltose (*MAL*). Stewart (2006).

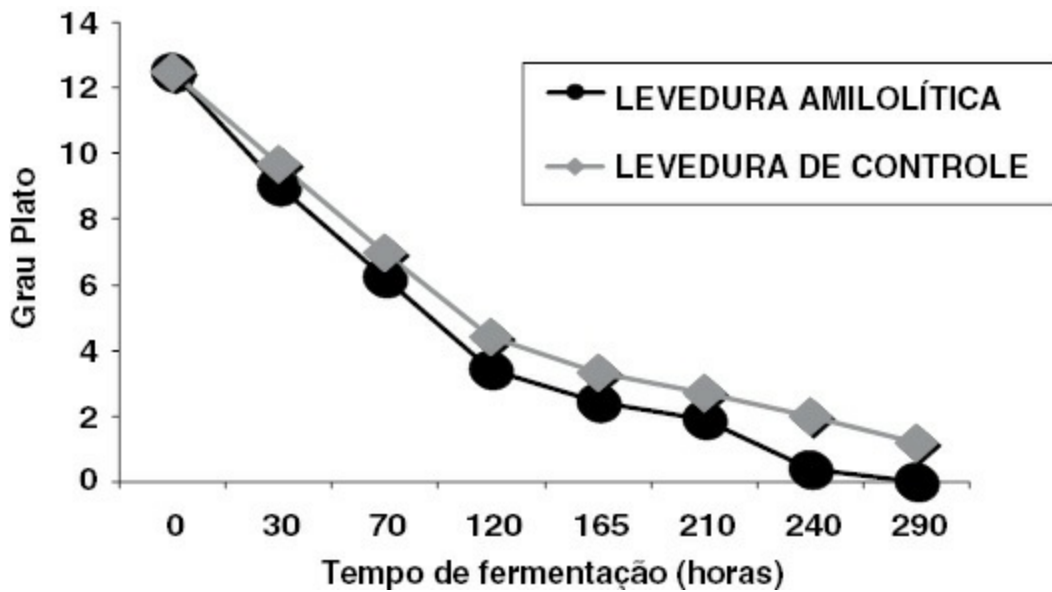


FIGURA 7.21 Efeito da glicoamilase em uma cepa de levedura durante a fermentação do mosto. Erratt e Stewart (1978).

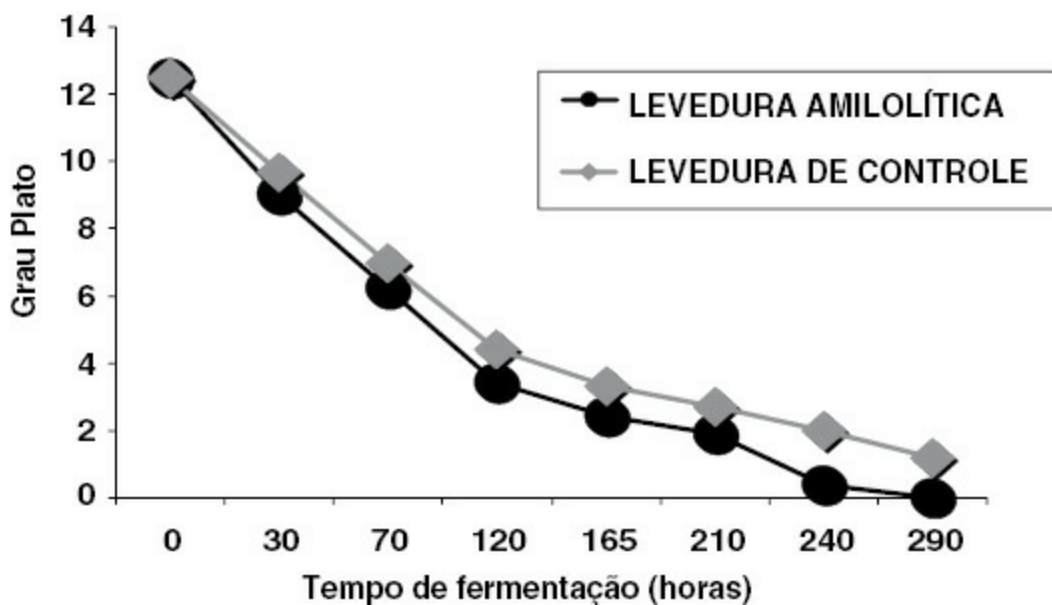


FIGURA 7.22 Produção de glicose em cerveja pasteurizada durante o armazenamento a 21°C. Erratt e Stewart (1978).

A glicoamilase extracelular produzida por tal grupo de leveduras é tolerante termicamente, por ser potencialmente glicosilada (trata-se de uma manoproteína). Portanto, a glicoamilase da cerveja com baixa quantidade de dextrinas não foi inativada durante a pasteurização (12 PU \equiv 12 minutos a 60°C). A cerveja produzida com levedura amilolítica contém concentrações crescentes de glicose tornando-se mais doce (Figura 7.22). Apesar disso, a cerveja com baixo teor de dextrinas, a Nutfield Lyte, produzida com levedura contendo glicoamilase, tem sido produzida em escala de semiprodução em um projeto em colaboração entre a Brewing Research Foundation (que agora faz parte da Campden BRI, Brewing Division) e a Universidade Heriot-Watt (Figura 7.23). Esta cepa foi aprovada para uso na produção de cerveja pelo Comitê UK Novel Food Products and Processes (Baxter, 1995). No entanto, ainda não está sendo empregada comercialmente no processo de fabricação de cervejas. Na verdade, os fabricantes de cerveja ainda estão relutantes em utilizar cepas de levedura geneticamente manipuladas (Sofie *et al.*, 2010).



FIGURA 7.23 Brewing Research Foundation International: Nutfield Lyte. Fonte: Fotografia do autor.

Um segundo método de produção de cerveja com baixo teor de dextrinas é o uso de amilases de bactérias (exoenzimas), adicionadas à tina de mostura ou ao fermentador. Mais detalhes sobre o uso destas exoenzimas

serão fornecidos na seção V. Vários fatores no metabolismo de açúcares do mosto durante o processo de fabricação da cerveja e mostura devem ser considerados. Os efeitos do processo de fabricação de cervejas com mostos de alta concentração são especialmente importantes e alguns aspectos serão estudados a seguir.

D. Mosto com nitrogênio livre aminado

Dois aspectos de destaque referentes ao mosto já foram aqui discutidos: sua composição complexa, e a existência de muitos ingredientes importantes. Assim como o espectro de açúcares, o teor de FAN é importante. O FAN do mosto possui três componentes: aminoácidos, peptídeos pequenos e amônia. O FAN é uma medida geral do nitrogênio assimilável por culturas de levedura. É um bom índice do crescimento da levedura e, portanto, da eficiência da fermentação e da absorção de açúcar (Inoue, 1992; Inoue e Kashihara, 1995). O FAN do mosto é essencial para a formação de novos aminoácidos da levedura, para a síntese de novas estruturas e de proteínas enzimáticas, para a proliferação de células e para a viabilidade e vitalidade das células. Por fim, os teores de FAN têm influência direta nos compostos de sabor da cerveja (por exemplo, maiores teores de álcool e de ésteres).

Há diferenças entre cepas de levedura ale e de lager quanto às características de assimilação de nitrogênio do mosto (O'Connor-Cox e Ingledew, 1989). No entanto, em todas as cepas utilizadas no preparo da cerveja o conteúdo necessário de FAN do mosto para a levedura em condições normais de fermentação para o preparo de cerveja é diretamente proporcional ao crescimento da levedura, e também afeta determinados aspectos da maturação da cerveja, por exemplo, a formação do diacetil (Barton e Slaughter, 1992) (os detalhes deste aspecto estão descritos na próxima subseção). Há muita polêmica quanto à quantidade mínima de FAN necessária para obter um crescimento satisfatório da levedura e para o desempenho da fermentação do mosto em concentração convencional (10-12°Plato); 130 mg FAN/L é considerada a quantidade correta. Para uma atenuação rápida do mosto de alta concentração

(> 16°Plato), teores mais altos de FAN são necessários (Casey *et al.*, 1984). No entanto, teores ótimos de FAN são diferentes para cada fermentação e para cada cepa de levedura. Além do mais, os valores ótimos de FAN mudam conforme os teores e os tipos de açúcar em mostos diferentes (Lekkas *et al.*, 2005).

Durante os anos 1960, Margaret Jones e John Pierce, que trabalhavam no Departamento de Pesquisas da Guinness Brewery, em Park Royal, Londres, realizaram estudos importantes sobre o metabolismo do nitrogênio durante o processo de fabricação da cerveja, maceração e fermentação. Esses pesquisadores relataram que a absorção e a utilização de compostos de nitrogênio exógenos do mosto e suas sínteses intracelulares são controladas por três fatores principais: (1) a concentração total de nitrogênio assimilável no mosto; (2) a concentração de compostos de nitrogênio individuais e suas razões; e (3) a inibição competitiva da absorção destes componentes (especialmente de aminoácidos) por meio de vários sistemas de permease (Jones e Pierce, 1964).

Jones e Pierce (1964) estabeleceram uma classificação única dos aminoácidos, de acordo com suas taxas de consumo durante a fermentação do mosto no preparo da cerveja (Tabela 7.9). Existem quatro grupos de aminoácidos. Três grupos de aminoácidos do mosto são absorvidos em etapas diferentes da fermentação, e o quarto consiste em um só aminoácido, a prolina (a maior concentração de aminoácidos no mosto), que não é absorvido durante a fermentação para o preparo da cerveja (Figura 7.24), em função das condições anaeróbicas que prevalecem na última etapa da fermentação. Quando a classificação foi feita, a metodologia utilizada (cromatografia líquida para medir aminoácidos individuais etc.) foi icônica. Atualmente, em determinações similares, utiliza-se cromatografia líquida de alto desempenho computadorizada e automática (HPLC), e é difícil imaginar os desafios que os pesquisadores enfrentaram 50 anos atrás. A classificação de aminoácidos de Jones e Pierce (1964) é a base do conhecimento que temos sobre a importância relativa individual dos aminoácidos no mosto durante a fermentação e a manipulação de níveis de nitrogênio mediante a adição de extratos de levedura ou de aminoácidos específicos durante o preparo da cerveja no sistema de alta concentração. No entanto, o padrão de

assimilação é, em geral, específico, e depende das condições utilizadas. As preferências nutricionais das cepas de levedura são, talvez, os fatores mais importantes. Em decorrência das variedades da cevada para malteação, das condições de processo de fabricação da cerveja e das cepas utilizadas em todo o mundo, nesta indústria, uma revisão mais detalhada é desejável.

TABELA 7.9 Ordem da utilização de aminoácidos e amônia durante a fermentação do mosto

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Absorção rápida	Absorção intermediária	Absorção lenta	Pequena ou nenhuma absorção
Ácido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amônia	
Lisina			
Arginina			

Fonte: Jones e Pierce (1964).

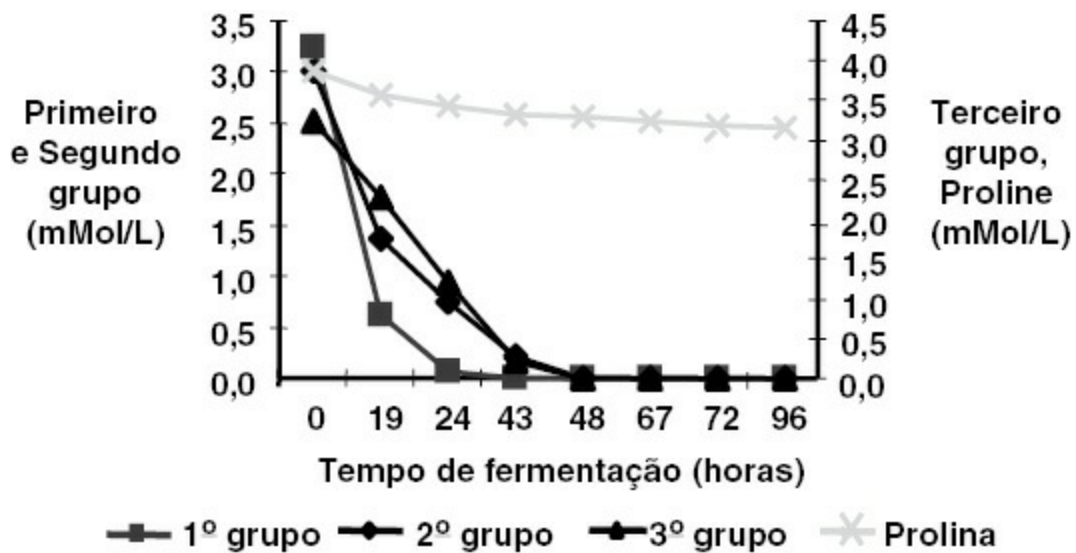


FIGURA 7.24 Padrão de absorção de aminoácidos durante fermentação do mosto. Lekkas *et al.* (2007).

Muitas pesquisas (Lekkas *et al.*, 2007) examinaram a absorção e a utilização dos aminoácidos do mosto e, atualmente, temos uma clara ideia de suas funções durante a fermentação. Aproximadamente 30% dos compostos de nitrogênio incorporados, no entanto, advêm de outras fontes e não dos aminoácidos. Apesar da utilização de peptídeos pequenos pelas leveduras de cervejaria ter sido confirmado nos anos 1950, um entendimento do seu papel nas necessidades de nitrogênio na levedura ainda é limitado. Peptídeos pequenos podem ser usados como fontes nutricionais de aminoácidos, como fontes de carbono e nitrogênio, e precursores de peptídeos das paredes das células durante o crescimento da levedura, apesar do crescimento ser muito mais lento por ser a única fonte de nitrogênio (Ingledeew e Patterson, 1999). Polipeptídeos também são utilizados como substrato, pois a levedura pode gerar enzimas proteolíticas extracelulares para fornecer nitrogênio assimilável adicional para as células.

A maioria das cepas para o processo de fabricação de cerveja transporta peptídeos que não contêm mais do que três resíduos de aminoácidos, embora o limite dependa da cepa (Marder *et al.*, 1977; Nisbet e Payne, 1979). Apesar disso, alguns peptídeos pequenos do mosto são fonte importante de nitrogênio assimilável e 20-40% dos oligopeptídeos do mosto são usados durante a fermentação. De maneira similar aos aminoácidos individuais, os

peptídeos provavelmente contribuem para a característica e o sabor da cerveja. Os peptídeos do mosto são absorvidos em uma ordem específica, que depende da composição do aminoácido. A determinação de peptídeos pequenos (duas ou três unidades de aminoácidos) tem impedido o aprofundamento das pesquisas. Recentemente, um método para quantificar os pequenos oligopeptídeos foi desenvolvido (Lekkas *et al.*, 2009). Em resumo, as proteínas são retiradas de uma amostra e o sobrenadante é ultrafiltrado por intermédio de uma membrana com limite de exclusão de 500 Da, o material filtrado é hidrolisado com ácido e alcali e submetido à análise em HPLC.

Durante a fermentação, a levedura libera várias proteinases no mosto fermentado (em especial, proteinase A). A hidrólise de peptídeos de tamanho médio, portanto, ocorre e continua durante toda a fermentação (Lekkas *et al.*, 2007). Este fato chama a atenção para a diferença entre a absorção de açúcares pelo mosto e o FAN durante o processo de fabricação da cerveja. O perfil de açúcares do mosto no início da fermentação é fixo, pois depois do mosto ser fervido, todas as amilases do malte são inativadas. Por outro lado, em função da secreção de proteinase pela levedura, o perfil dos compostos de nitrogênio torna-se dinâmico. É importante notar que efeitos do estresse na levedura podem aumentar a secreção de proteinase, fator que ocorre com frequência, por exemplo, na fermentação de mostos de alta concentração (Cooper *et al.*, 2000).

E. Fermentação do mosto

Como discutido, o mosto é um meio extremamente complexo e a fermentação ocorre, muitas vezes, em sistemas estáticos (exceção feita à agitação que surge em consequência da evolução do dióxido de carbono, que faz parte da via glicolítica), em geral, em grandes recipientes cônico-cilíndricos. O metabolismo dos açúcares do mosto e do FAN já foi analisado, embora muitas outras reações metabólicas também aconteçam. Na realidade, elas são tantas que é impossível discuti-las em detalhes. Consequentemente, só consideraremos três reações: (1) o controle da levedura, incluindo os estágios iniciais da fermentação, quando o glicogênio intracelular da levedura é usado na presença de oxigênio para a síntese de ácidos graxos insaturados (UFAs) e esteróis, que são incorporados à membrana celular da levedura; (2) os últimos estágios da fermentação, que se sobrepõem à maturação e envolvem o controle do diacetil e de outras dicetonas similares (VDK); e (3) a recuperação da cultura de levedura para reutilização por floculação e/ou centrifugação.

O controle da levedura, no contexto do processo de fabricação da cerveja, refere-se ao manuseio da levedura entre fermentações e para uma fermentação subsequente. O parâmetro crítico para todos os estágios de controle da levedura (recuperação, armazenamento, lavagem ácida, propagação e nova inoculação) é o de manter a viabilidade e a vitalidade das culturas, de modo a garantir que quando ela for novamente inoculada no mosto, a fase lag será mantida em nível mínimo. No início da fermentação, uma síntese dos UFAs e dos esteróis – essenciais para os componentes das membranas da célula – ocorre à custa do glicogênio, que é o carboidrato do armazenamento intracelular da cultura da levedura (Figura 7.25) (Quain *et al.*, 1981). Isto precisa acontecer para que um padrão normal de crescimento da população de leveduras durante o processo de fermentação do mosto seja assegurado. Durante muitos anos, sabia-se que as células da levedura não são capazes de sintetizar UFAs e esteróis em condições estritamente anaeróbicas (Andreason e Stier, 1953). Em consequência, o oxigênio (por aeração ou, cada vez mais, com o uso de oxigênio estéril gasoso) é suprido ao mosto nos estágios iniciais da fermentação, o que tem sido objeto de considerável polêmica (Kirsop, 1974). Na verdade, com o advento do processo de fabricação de cerveja com mosto concentrado, o meio requer, no início da fermentação, concentrações cada vez maiores de oxigênio dissolvido.

O diacetil VDK (2,3-butanodiona) e o 2,3-pentanodiona conferem um aroma indesejado de leite rançoso ou amanteigado à cerveja. Quantitativamente, o diacetil é a substância de maior destaque, uma vez que seu limiar de sabor (*threshold*) é de cerca de 0,1 mg/L, e é 10 vezes menor do que o do 2,3-pentanodiona. As propriedades sensoriais das dicetonas similares contribuem para o paladar e o aroma de algumas cervejas do tipo ale; entretanto,

na maioria das cervejas do tipo lager, eles dão uma característica indesejável. Há exceção em alguns lagers fabricados na República Checa, quando os VDKs podem ocorrer acima do limiar. Um aspecto fundamental do controle da fermentação da cerveja do tipo lager e seu processamento subsequente (maturação, envelhecimento ou “lagerização”) é o de assegurar que a cerveja maturada contenha uma concentração de VDKs mais baixa do que seu limiar, que fornece sabor.

Ambos os VDKs surgem na cerveja como subprodutos das vias que conduzem à formação de valina e de isoleucina (Wainwright, 1973). Os ácidos α -acetohidroxi, que são intermediários nas biossínteses, são excretados, em parte, para o meio de fermentação, e, em seguida, sofrem uma decarboxilação oxidativa espontânea (Figura 7.26), criando os VDKs. O diacetil é reabsorvido pela levedura em suspensão e reduzido a acetoína e, por fim, a 2,3-butanediol (Figura 7.27) (Inoue, 1992). A concentração do limiar de sabor (*threshold*) dos dióis é relativamente alto e, portanto, os estágios redutores finais do metabolismo dos VDKs são fundamentais para a obtenção de uma cerveja aceitável em termos de suas propriedades sensoriais.

A redução dos VDKs nos estágios posteriores da fermentação e durante a maturação requer a presença de levedura adequada em suspensão no mosto, que está em fermentação. Quando a levedura estiver bastante floculenta (este fenômeno será discutido mais tarde), uma separação prematura refletirá em baixas taxas de redução de diacetil e, portanto, em níveis potencialmente elevados dele na cerveja finalizada. A remoção do diacetil também é afetada pela condição fisiológica da levedura. Quando o repique da levedura não está em boas condições, e, por consequência, o desempenho da fermentação primária está abaixo do nível ótimo, a levedura que está presente nos últimos estágios da fermentação ficará estressada e o período de remoção do diacetil será prolongado.

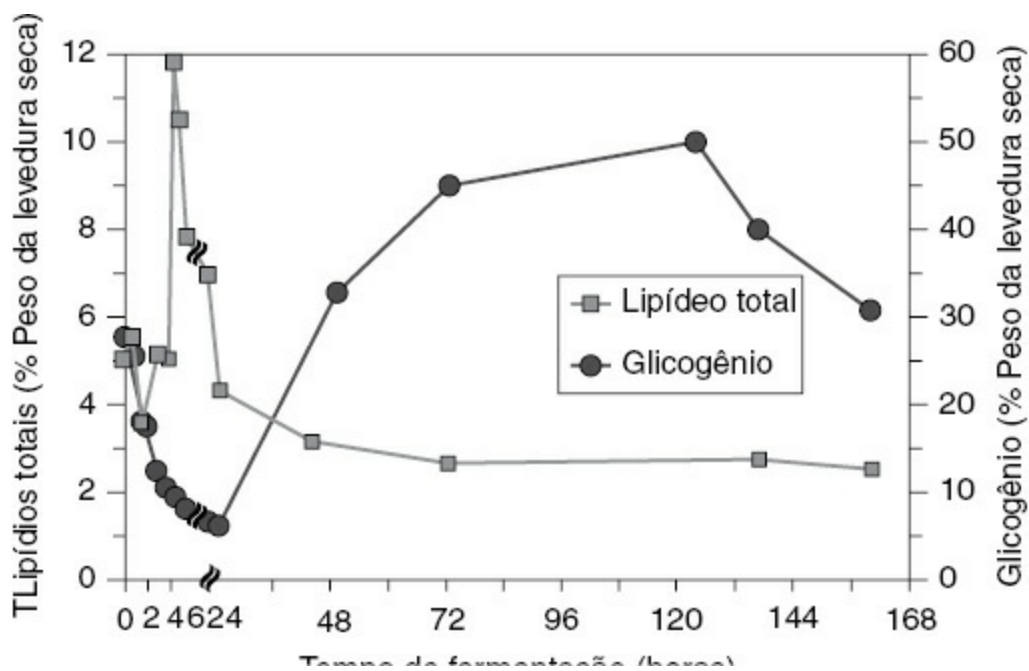


FIGURA 7.25 Concentração intracelular de glicogênio e lipídeos em uma cepa de levedura lager durante fermentação de mosto a 15° Plato. Quain *et al.* (1981).

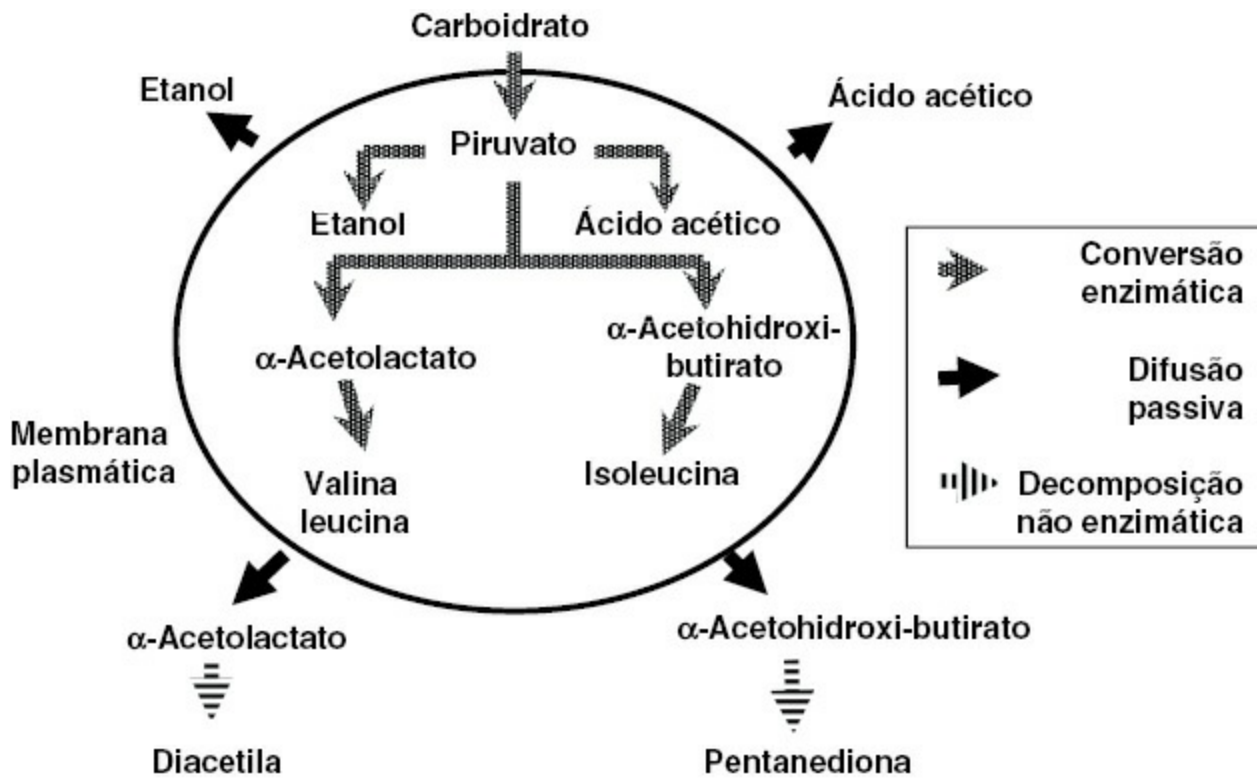


FIGURA 7.26 Fermentação de diacetila e 2,3-pentanodiona como subprodutos das vias que conduzem à formação de valina e de isoleucina. Wainwright (1973).

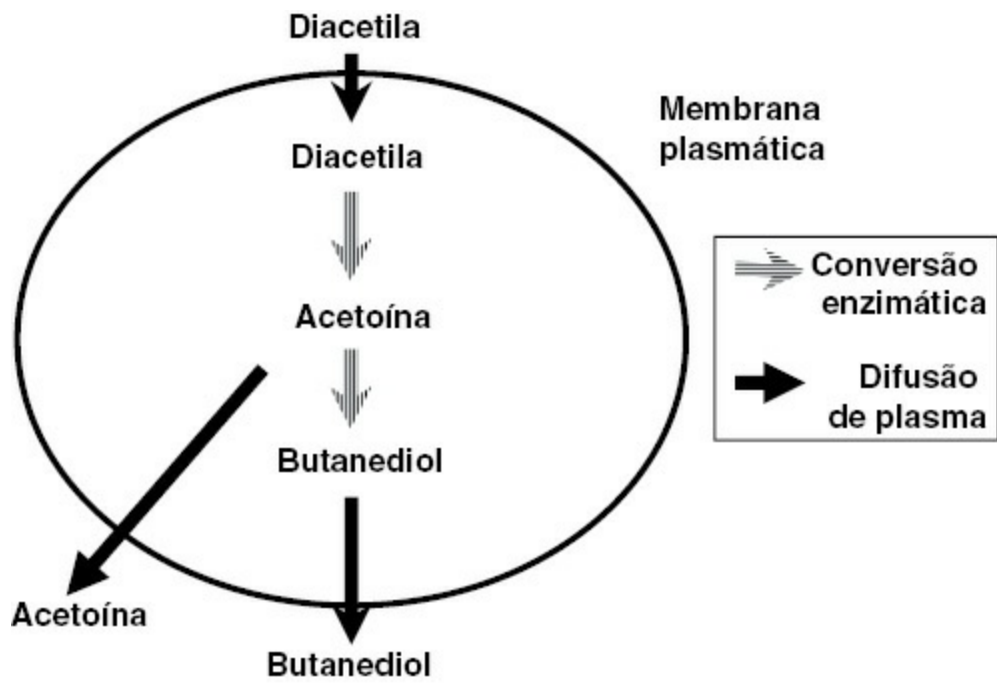


FIGURA 7.27 Redução de diacetil para acetoína e 2,3 butanediol. Wainwright (1973).

As propriedades de floculação das cepas de levedura utilizadas no processo de fabricação da cerveja já foram discutidas. A floculação caracteriza um dos principais fatores, quando se considera aspectos importantes na fermentação da cerveja (Stewart, 1973). Ela possui muitas definições (Stewart *et al.*, 1974). No entanto, a mais utilizada por muitos anos é: “o fenômeno pelo qual as células da levedura se aderem em aglomerados e/ou sedimentam-se do meio do qual estavam suspensas ou sobem para sua superfície” (Stewart *et al.*, 1974). Esta definição exclui as formas de “crescimento de aglomerados” e “formação de cadeias” (Stewart *et al.*, 1973; 1974), as quais não serão debatidas.

A importância da floculação para a recuperação do cultivo da levedura ao final da fermentação primária para que possa ser reutilizado em uma próxima fermentação não pode ser enfatizado.

Por tratar-se de um fenômeno que ocorre na superfície das células, a estrutura da parede celular é fundamental. Descobertas interessantes sobre a estrutura da parede celular, portanto, serão discutidas. Estudos genéticos sobre a floculação da levedura tiveram início há mais de 50 anos. Thorne (1951) e Gilliland (1951) confirmaram que o fenômeno é uma característica herdada com a floculência dominante relacionada com a não floculência. O primeiro gene da floculação (*FLO* gene), que foi estudado em detalhes, foi o *FLO1*. Utilizando técnicas tradicionais de mapeamento genético (cruzamento, esporulação, micromanipulação, análise de tétrade etc.) foi demonstrado que o *FLO1* está localizado no cromossomo I, a 33 cM do centrômero, no lado direito do cromossomo (Russell e Stewart, 1980a).

Novas técnicas genéticas foram desenvolvidas, tendo por base o princípio de sequenciamento do genoma de *Saccharomyces* (Goffeau *et al.*, 1996). Esta cepa sequenciada em laboratório contém cinco genes *FLO*, quatro dos quais localizados perto dos telômeros do cromossomo – *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* e *FLO10* – e um não localizado nem no centrômero nem no telômero, o *FLO11* (Querol e Bond, 2009). Estes genes codificam proteínas similares à lectina, que também são conhecidas como adesinas, zimolectinas ou floculinas. O modelo amplamente aceito para a floculação da levedura descreve o fenômeno como o resultado da interação entre adesinas e mananas, polissacarídeos formados de resíduos de manose, presentes em manoproteínas encontradas na parede celular (Klis *et al.*, 2006). Na maioria das cepas de laboratório (haploides e diploides), a adição de manose bloqueará os locais de ligação de adesinas, e inibirá, assim, a floculação pela prevenção da adesão por ligação da manose presente nas células vizinhas (Stratford, 1989). Uma adesão similar, de considerável importância comercial, é responsável pela sensibilidade da manose-, glicose-, e maltose- ao tipo “novo flo” das cepas de levedura de lager (Teunissen e Steensma, 1995). Em tal caso, uma ligação competitiva de carboidratos do mesmo tipo, mediante adesão, ocorre e garante que a floculação aconteça apenas no estágio apropriado durante a fermentação do mosto, isto é, quando todos os carboidratos fermentáveis já tiverem sido esgotados, ou seja, quando os níveis de VDK (em especial, de diacetil) estiverem sob controle.

Já foi relatado que as cepas de levedura que exibem propriedades ideais no primeiro dia de fermentação podem modificar-se rapidamente e flocular cedo demais ou tarde demais ou podem perder por completo tal capacidade. Muitos estudos descrevem a presença de sequências alteradas do gene *FLO1* (Ogata *et al.*, 2008). São frequentes eventos de recombinação intragênica que resultam, em geral, na perda ou no ganho, paralelamente, de unidades repetidas. Uma expansão simultânea do *FLO1* em domínios repetidos resulta em maior capacidade de floculação.

A variabilidade genética dos genes da floculação tem consequências marcantes para os estudos e as aplicações que os buscam no processo de fabricação da cerveja, e de cepas que possuem genomas desconhecidos por causa de suas características poliploides e aneuploides.

Sabe-se que há uma considerável variação genética nas regiões dos cromossomos em que os genes da floculação estão localizados. No futuro, o conhecimento dos mecanismos de controle da floculação das leveduras, em especial no contexto da fabricação de cervejas, em pesquisas e aplicações industriais, será adaptado às famílias dos genes da floculação que surgem nas cepas das leveduras durante a fabricação das cervejas.

Outro modo de cultivar leveduras para reutilização e clarificação do mosto primário fermentado é o uso de uma centrífuga de discos. Contudo, por não ser considerado um procedimento bioquímico, ele está fora do escopo deste capítulo. O uso de centrífugas na fabricação de cervejas foi pesquisado recentemente (Chlup e Stewart, 2011). No entanto, quando a levedura passa por centrifugação, ela sofre estresses mecânicos e de cisalhamento hidrodinâmico. O estresse de cisalhamento pode causar diminuição da viabilidade das células e da floculação, dano às paredes das células, aumento do teor da proteinase A extracelular, cervejas mais turvas e redução da estabilidade da espuma.

V. EXOENZIMAS NA FABRICAÇÃO DA CERVEJA

Este capítulo busca discutir muitas (porém, não todas) endoenzimas importantes envolvidas no processo de fabricação da cerveja. Como já foi descrito, várias enzimas de origem microbiana (exoenzimas) estão sendo aplicadas no processo da fabricação da cerveja, muitas das quais desenvolvidas por manipulação genética. O uso de exoenzimas pode ser considerado em função de seus usos no processo de fabricação da cerveja: liquefação dos adjuntos, aumento do malte e do cereal (fabricação de cervejas com alto teor de adjuntos), operações brandas de fabricação de cerveja, controle de atenuação, maturação, aumento da estabilidade, resolução de problemas e inovações. Muitas exoenzimas são usadas no processo de fabricação da cerveja como paliativos para superar problemas. Não é nossa intenção discutir cada detalhe de todas as enzimas disponíveis comercialmente, pois são protegidas por direito de propriedade intelectual.

A. Adjuntos

Comumente, adjuntos (amidos não malteados) são convertidos em açúcares fermentáveis, utilizando-se enzimas do malte. No entanto, o uso de α -amilase bacteriana com alta estabilidade térmica no lugar do malte pode oferecer ao fabricante a possibilidade de utilizar um processo simples e barato. Há muitos fabricantes de cerveja que acreditam que com malte de alta qualidade contendo bom nível de enzimas e alto poder diastático (DP) não importa a perda de alguma atividade durante o processo de liquefação do adjunto a 100°C. Ao usar outros cereais maltados, como o sorgo (ou como adjunto), em que o DP é consideravelmente mais baixo do que na cevada malteada, altas doses de α -amilase e de pentosanase podem ser usadas como exoenzimas.

Fabricação de cervejas com altos teores de adjuntos requer estágios separados de cozimento e de liquefação, e a proporção de malte na mistura de cereais (*grist*) pode não ser alta o suficiente para fornecer a necessária atividade de amilase para a obtenção de uma conversão eficiente de amido em açúcares fermentáveis. Este problema pode ser superado com a adição de enzimas fúngicas que sacarificam ou de α -amilase bacteriana na tina de mostura ou no início da fermentação. Além disso, quando pequenas proporções de malte são utilizadas, existe a possibilidade de a quantidade de FAN dissolvida no mosto ser insuficiente para fornecer bom nível nutricional à levedura. Para driblar tal contratempo, pode-se utilizar uma protease para aumentar o teor de FAN no mosto, porém, é preciso assegurar-se de que haja teor de proteínas suficiente para ser hidrolisada.

B. Fabricação de cerveja com cevada

Tal fabricação é utilizada quando altas concentrações de adjuntos, sem nenhum uso de cevada maltada, é a opção escolhida. Ela foi analisada em função das vantagens econômicas que oferece. Quando a proibição da importação de malte de cevada foi adotada pela Nigéria, para conservar a moeda do país forte, os fabricantes nigerianos viram-se obrigados a desenvolver métodos para produzir cerveja lager utilizando apenas matérias-primas locais, como sorgo, milho e malte de sorgo, apesar da pouca disponibilidade deste malte naquele momento. A fabricação de cerveja com tais matérias-primas traz muitos problemas, por exemplo, falta das enzimas do malte, baixo teor de nitrogênio com o uso de proteases, separação do mosto (aumentado com um filtro de maceração) e temperatura de gelatinização, que envolve a necessidade de cozimento de grandes proporções de cereais a temperaturas muito mais altas do que a considerada ótima para a sacarificação. Uma das formas de resolver o problema é utilizar uma razão muito baixa de água em relação aos cereais no recipiente do cozimento (maceração espessa), e utilizar água com baixa temperatura e altas razões de água em relação aos cereais (maceração fina) para macerar a parte da mistura de cereais que não necessita de cozimento.

VI. SEPARAÇÃO DO MOSTO E FILTRAÇÃO DA CERVEJA

A separação do mosto e a filtração da cerveja são dois gargalos comuns na fabricação de cerveja. Drenagem ineficiente do mosto não significa apenas uma perda da capacidade de produção, como também pode causar perdas na produção do extrato. Além disso, um processo lento de drenagem do mosto afeta de modo negativo sua qualidade, o que pode levar a problemas com a filtração da cerveja, seu sabor e sua estabilidade.

Um fator muito importante que influencia as taxas de filtração é a viscosidade do mosto. A hidrólise total de β -glucanas durante a maceração é um dos métodos que leva à separação mais rápida do mosto. β -glucanas não degradadas e solubilizadas causam alta viscosidade nos mostos, fato que resulta em difusão mais lenta por causa dos grãos esgotados e uma extração menos eficiente de açúcares fermentáveis. As β -glucanas não degradadas, que são carregadas para o interior do fermentador, também influenciam negativamente a filtração da cerveja, reduzem a capacidade do filtro e aumentam o uso de agentes filtrantes (terra diatomácea). Quando levamos em conta a qualidade e a composição da matéria-prima utilizada, assim como os procedimentos de moagem, a solução de tais problemas é aumentar o nível de maceração ou de mostura.

Níveis suficientes de β -glucanase e de pentosanase devem existir na maceração e as condições de maceração deveriam permitir que estas enzimas atuem de modo eficiente. Uma ampla gama de preparações de β -glucanase/pentosanase está disponível para reduzir a viscosidade do mosto causada por glucanas e pentosanas. Um método pouco convencional de aumentar a velocidade do processo de drenagem do mosto reduzindo sua viscosidade é macerar e drenar a 95°C. No entanto, altas temperaturas na maceração podem influenciar negativamente o sabor e a estabilidade da cerveja. A disponibilidade de amilases produzidas industrialmente proporciona ao fabricante o controle do grau de fermentação. Mostos produzidos em condições normais de fabricação suprem, em geral, uma atenuação aparente de 80-85% e aproximadamente 25% do extrato residual permanece na cerveja. Como já foi visto, este extrato residual, que é, em sua maioria, composto por dextrinas de cadeias curtas não fermentáveis, contribui para a sensação que a cerveja proporciona na boca, ou corpo da cerveja ao ser ingerida, e para seu valor calórico (Brenner, 1980). Às vezes, as especificações do extrato residual não são atingidas em função das deficiências na qualidade do malte e/ou problemas no processo de maceração, de modo que correções precisam ser feitas. Infelizmente, quando matérias-primas não tradicionais são utilizadas, pode haver, também, a necessidade do uso de amilases de sacarificação externa para obter o grau correto para a fermentação. Outra possibilidade é criar novos produtos, aumentando ainda mais o grau de fermentação e diminuindo as dextrinas residuais não fermentáveis; as cervejas diet e light (leves) e secas fazem parte desta categoria.

O objetivo pode ser o de fazer pequenos ajustes ou remover completamente todas as dextrinas residuais, obtendo, assim, o que é conhecido como cerveja leve ou atenuada. Uma cerveja com tais características teria poucas calorias e menor corpo ou sensação na boca ao ser ingerida, comparando-a com uma cerveja com uma atenuação normal (assumindo que tenha um conteúdo alcoólico similar).

Há disponibilidade de métodos tradicionais de fabricação para a obtenção dos ajustes necessários, que, em geral, são feitos com a modificação do sistema de maceração e com a utilização de maltes com alto conteúdo de DP. No entanto, existe grande gama de exoenzimas que têm o mesmo objetivo e que incluem as enzimas que sacarificam, dentre elas, a α -amilase, a glicoamilase e a pululanase (enzima desramificante), ferramentas práticas quando é preciso ajuste da atenuação por alguma razão.

O controle do diacetil e de outros VDKs durante os últimos estágios da fermentação e durante a maturação já foi abordado neste capítulo. Uma maneira alternativa de controlar o diacetil e os compostos a ele relacionados é mediante a utilização da enzima α -acetolactato descarboxilase (ALDC). Esta enzima pode descarboxilar o α -acetolactato em acetoína, que não possui sabor e não leva à formação de diacetil. O ALDC é obtido do microorganismo gram-negativo *Acetobacter aceti*, que, de maneira geral, é considerado seguro (GRAS), e também é utilizado para metabolizar etanol em ácido acético na fabricação de vinagre. A disponibilidade de ALDC (encontrado no mercado com o nome de marca Maturex) oferece a possibilidade, para o fabricante de cerveja, de

evitar a conversão de α -acetolactato em diacetil, uma reação lenta. O ALDC, no entanto, deve ser adicionado ao mosto no início da fermentação.

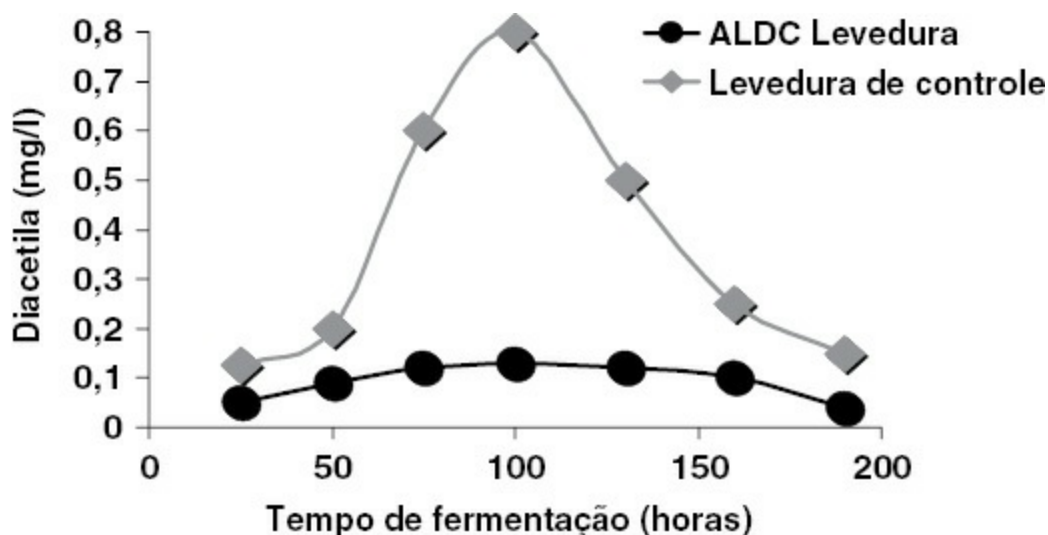


FIGURA 7.28 Efeito da expressão do alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC) em uma cepa de levedura sobre o metabolismo de diacetil durante a fermentação. Diagrama plotado a partir de dados de Yamano *et al.* (1994).

Uma nova abordagem foi clonar o gene do ALDC para uma cepa de levedura adequada para a fabricação da cerveja. O gene do ALDC foi obtido de uma cepa de *A. acetii*. Experimentos de fermentação de mostos com levedura ALDC foram feitos e comparados com cepas não clonadas como controle. A produção de diacetil e a redução do perfil foram muito diferentes, quando comparadas com a cultura não clonada usada como controle (Yamano *et al.*, 1994) (Figura 7.28). Em decorrência da presença do ALDC, o ácido α -acetoláctico não se converteu espontaneamente em diacetil, e, sim, em acetoína. O desempenho geral da fermentação de algumas cepas de levedura clonadas pode ser afetado de maneira adversa, se comparada com a cepa de controle não clonada, o que não ocorreu com a levedura de ALDC (Figura 7.29).

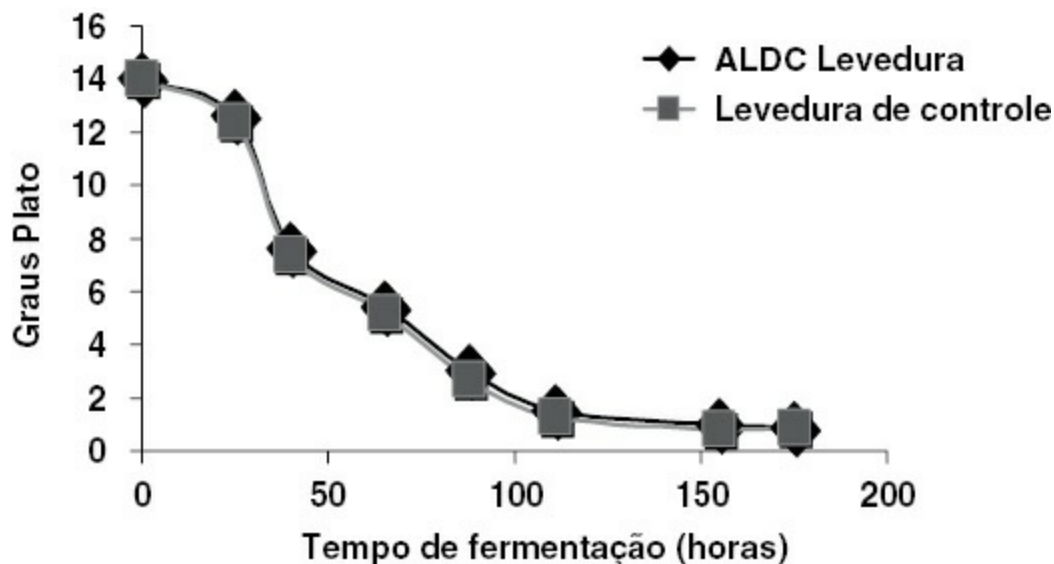


FIGURA 7.29 Efeito da expressão do alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC) em uma cepa de levedura sobre a taxa global de fermentação durante a fermentação do mosto. Diagrama plotado a partir de dados de Yamano *et al.* (1994).

A estabilidade da cerveja pode ser aumentada com o uso de exoenzimas, o que ocorre principalmente em relação à estabilidade física, também denominada formação de turbidez ou turvação. Com algumas notáveis exceções, os consumidores têm preferência por cervejas claras e sem partículas. Cervejas que foram estocadas, especialmente se ficaram em temperatura ambiente, têm o potencial para produzir turvação e sua coloração clara fica comprometida. Esta turbidez surge de uma associação de pequenos polifenóis polimerizados com

polipeptídeos que possuem alta quantidade do aminoácido prolina (Siebert e Lynn, 1997). Esta turbidez permanente não se dissolve, mesmo quando a cerveja é aquecida a 30°C ou a temperaturas mais altas. O equilíbrio entre os polifenóis flavonoides e as proteínas hidrofílicas ricas em prolinas (proteínas sensíveis) é o principal responsável pela estabilidade física (coloidal) da cerveja. A turvação não é formada, ou é retardada, quando um dos dois componentes é removido ou os fatores que promovem a interação são, na maioria, excluídos. Vários procedimentos podem ser usados para retardar e/ou evitar a formação de turbidez nas cervejas:

- Evitar a formação de grandes quantidades de produtos de degradação de complexos de proteína durante a produção da cerveja, especialmente na maceração.
- Remover parte dos polifenóis ou proteínas sensíveis durante a fabricação com absorventes específicos (polivinilpirrolidona ou sílica gel).
- Estocar a cerveja que está sendo maturada a frio (0°C ou menos) para precipitar os precursores da turvação – este é um processo muito longo.
- Estocar cerveja enlatada a frio (2-4°C) para retardar a formação de turvação.
- Hidrolisar, usando exoenzimas, os complexos de polipeptar sensíveis. Algumas proteases não específicas de amplo espectro, por exemplo, papaína (do mamão), ficina (do figo) e bromelina (do abacaxi) têm sido usadas por muitos anos para melhorar a estabilidade da cerveja. Estas enzimas, no entanto, por não serem específicas, além de hidrolisar polipeptídeos sensíveis, também o farão com outros polipeptídeos hidrofóbicos, que estabilizam a espuma da cerveja, e agentes que aumentam a espuma, como o alginato de poliglicol, devem ser adicionados para formar um colarinho de espuma no copo da cerveja. Há pouco tempo, uma endopeptidase específica para prolina foi desenvolvida. Esta enzima hidrolisa especificamente polipeptídeos sensíveis por causa de seu conteúdo aumentado de prolina e promove a estabilidade física da cerveja sem afetar a clareza e a estabilidade da espuma (Lopez e Edens, 2005).

VII. CONCLUSÕES

A fabricação de cerveja é, em geral, mas não somente, um processo bioquímico/enzimático. No entanto, os processos atuais também incluem ciência dos vegetais, microbiologia (muito próxima da bioquímica), química, física, engenharia, controle de processos e avaliação e ciência sensorial. É, normalmente, um processo multienzimático que envolve várias etapas, já definidas, que se sobrepõem. Este processo moderno de fabricação de cerveja tem dois objetivos. O primeiro é a eficiência, utilizando ao máximo os recursos disponíveis, tanto os fixos quanto os variáveis. O segundo objetivo é o de produzir cervejas de boa qualidade para serem ingeridas e que possuam uma estabilidade aumentada. A fabricação de cerveja é tradicional, possui uma longa história e enfoca quatro matérias-primas principais: malte de cevada, lúpulo, água e levedura. A descoberta de enzimas microbianas de alta qualidade, algumas das quais desenvolvidas com manipulação genética, permitiu o uso de matérias-primas não malteadas no processo de fabricação de cerveja, que ajudarão, em circunstâncias específicas, a aumentar a eficiência do processo, a qualidade e a estabilidade do produto. Alguns fabricantes, porém, ainda relutam em utilizá-las.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece Anne Anstruther por seu inestimável apoio no preparo do manuscrito.

A revisora técnica da edição brasileira agradece a contribuição e os conhecimentos do mestre cervejeiro Gabriel Galembeck, na edição deste capítulo.

REFERÊNCIAS

- Andreason, A.A., Stier, T.J.B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Ergosterol requirements for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 41, 23-26.
- Andrews, J.M.H., Hancock, J.C., Ludford-Brooks, J., Murfin, I.J., Houldsworth, L., Phillips, M., 2011. 125th anniversary review: Some recent engineering advances in brewing and distilling. *J. Inst. Brew.* 117, 23-32.
- Bamforth, C.W., 2009. *Beer: A Quality Perspective*. Academic Press, New York.
- Barnett, J.A., 1992. The taxonomy of the genus *Saccharomyces Meyen ex Reese*: a short review for non-taxonomists. *Yeast* 8, 1-23.
- Barton, S., Slaughter, J.C., 1992. Amino acids and vicinyl diketone concentration during fermentation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 29, 60-63.
- Baxter, E.D., 1995. The application of genetics in brewing. *Fermentation* 8, 307-311.
- Bisson, L.F., Coors, D.M., Frankel, A.L., Lewis, D.A., 1993. Yeast sugar transporters. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 284, 269-308.
- Brenner, M.W., 1980. Beers of the future. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 17, 185-195.
- Briggs, D.E., 1998. The principles of mashing. *Malts and Malting*, Blackie Academic & Professional, London, p. 229-244.
- Briggs, D.E., 1998. An introduction to malts and their uses. *Malts and Malting*, Blackie Academic & Professional, London, p. 1-34.
- Briggs, D.E., 1998. Grains and pulses. *Malts and Malting*, Blackie Academic & Professional, London, p. 35-78.
- Casey, G.P., Magnus, C.A., Ingledew, W.M., 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 639-646.
- Chlup, P.H., Stewart, G.G., 2011. Centrifuges in brewing. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 48, 46-50.
- Cooper, D.J., Stewart, G.G., Bryce, J.H., 1998. Hydrophobic polypeptide extraction during high gravity mashing – experimental approaches for its improvement. *J. Inst. Brew.* 104, 283-287.
- Cooper, D.J., Stewart, G.G., Bryce, J.H., 2000. Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentation and its effect on head retention. *J. Inst. Brew.* 106, 197-201.
- Erratt, J.A., Stewart, G.G., 1978. Genetic and biochemical studies on yeast strains able to utilize dextrans. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36, 151-161.
- Erratt, J.A., Stewart, G.G., 1981. Fermentation studies using *Saccharomyces diastaticus* yeast strains. *Dev. Ind. Microbiol.* 22, 577-586.
- Flannigan, B., 1996. The microflora of barley and malt. In: Priest, F.G., Campbell, I. (Eds.), *Brewing Microbiology*. Chapman & Hall, London, p. 83-126.
- Gilliland, R.B., 1951. The flocculation characteristics of brewing yeasts during fermentation. *Proceedings of the European Brewing Convention*. Elsevier, Amsterdam, p. 35-58.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 563-567.
- Ingledew, W.M., Patterson, C.A., 1999. Effect of nitrogen source and concentration on the uptake of peptides by a lager yeast in continuous culture. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47, 102-108.
- Inoue, T., 1992. A review of diacetyl control technology. *Proceedings of the Institute of Brewers*, p. 109-113. Australia/New Zealand Section, 23rd Convention, Melbourne.
- Inoue, T., Kashiara, T., 1995. The importance of indices related to nitrogen metabolism in fermentation control. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 32, 109-113.
- Jones, M., Pierce, J., 1964. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70, 307-315.
- Jones, M., Pierce, J., 1965. Nitrogen requirements in wort – practical applications. *Proceedings of the European Brewery Convention 10th Congress*, p. 182-194. Stockholm.
- Kirsop, B., 1974. Oxygen in brewery fermentations. *J. Inst. Brew.* 80, 252-259.
- Klis, F.M., Boersma, A., De Groot, P.W., 2006. Cell wall construction of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.
- Leiper, K.A., Stewart, G.G., McKeown, I.P., 2003. Beer polypeptides and silica gel. *J. Inst. Brew.* 109, 57-79.
- Lekkas, C., Stewart, G.G., Hill, A., Taidi, B., Hodgson, J., 2005. The importance of free amino nitrogen in wort and beer. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 42, 113-116.
- Lekkas, C., Stewart, G.G., Hill, A.E., Taidi, B., Hodgson, J., 2007. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* 113, 183-191.
- Lekkas, C., Hill, A.G., Taidi, B., Hodgson, J., Stewart, G.G., 2009. The role of small peptides in brewing fermentations. *J. Inst. Brew.* 115, 134-138.
- Libkinda, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1105430108.
- Lopez, M., Edens, L., 2005. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7944-7949.
- Marder, R., Becker, J.M., Naider, F., 1977. Peptide transport in yeast: utilization of leucine and lysine containing peptides by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 131, 906-916.
- Nisbet, T.M., Payne, J.W., 1979. Peptide uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Characteristics of transport systems shared by di- and tri-peptides. *J. Gen. Microbiol.* 105, 127-133.
- O'Connor-Cox, E.S.C., Ingledew, W.M., 1989. Wort nitrogenous sources – their use in brewing yeasts: a review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47, 102-108.
- Ogata, T., Isumikawa, M., Kohno, K., Shibata, K., 2008. Chromosomal location of Lg-FL01 in bottom-fermenting yeasts at the FL05 locus of industrial yeast. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1186-1198.
- Pederson, M.B., 1995. Recent views and methods for the classification of yeasts. *Cerevisia – Belg. J. Brew. Biotechnol.* 20, 28-33.
- Pratt, P.L., Bryce, J.H., Stewart, G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew.* 109, 218-228.
- Priest, F.G., Stewart, G.G., 2006. *Handbook of Brewing*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H.-V., Caggie, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C., 2000. *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 192, 191-196.
- Quain, D.E., Thurston, P.A., Tubb, R.S., 1981. The structural and storage carbohydrates of *Saccharomyces cerevisiae* changes during fermentation of wort and a role for glycogen catabolism in lipid biosynthesis. *J. Inst. Brew.* 87, 108-111.
- Querol, A., Bond, U., 2009. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 1-10.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003. Review *Saccharomyces sensu stricto* systematics, genetic diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 1-9.
- Russell, I., Stewart, G.G., 1980a. Revised nomenclature of genes that control flocculation. *J. Inst. Brew.* 86, 120-121.
- Russell, I., Stewart, G.G., 1980b. Transformation of maltotriose uptake ability into a haploid strain of *Saccharomyces* spp. *J. Inst. Brew.* 86, 55-59.
- Sandgren, E., Beling, H., 1959. Gibberellic acid in malting and brewing. *Proceedings of the European Brewery Convention 7th Congress*, p. 278-289. Rome.
- Siebert, K.J., Lynn, P.Y., 1997. Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55, 73-78.
- Singer, C., Holmyard, E.J., Hall, A.R. (Eds.), 1954. *A History of Technology*. Clarendon Press, Oxford, p. 229-244.

- Sofie, M.G., Saerens, C., Duong, T., Nevoigt, E., 2010. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1195-1212.
- Steiner, S.H., 2009. Guidelines for Hop Buying. Hopsteiner, Mainburg.
- Stewart, G.G., 1973. Recent developments in the characterization of brewery yeast strains. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 9, 183-191.
- Stewart, G.G., 1999. High gravity brewing. *Brewers' Guardian* 128, 31-37.
- Stewart, G.G., 2004. The chemistry of beer instability. *J. Chem. Educ.* 81, 963-968.
- Stewart, G.G., 2005. Esters – the most important group of flavour-active beer components. *Proceedings of the European Brewery Convention 30th Congress.* Prague, CD Paper No. 100.
- Stewart, G.G., 2006. Studies on the uptake and metabolism of wort sugars during brewing fermentations. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 43, 264-269.
- Stewart, G.G., Russell, I., 1986. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J. Inst. Brew.* 92, 537-558.
- Stewart, G.G., Russell, I., Garrison, I.F., 1973. Further studies on flocculation and co-flocculation in brewer's yeast strains. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 31, 100-106.
- Stewart, G.G., Russell, I., Garrison, I.F., 1974. Factors influencing the flocculation of brewer's yeast strains. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 11, 155-163.
- Stewart, G.G., Zheng, X., Russell, I., 1995. Wort sugar uptake and metabolism – the influence of genetic and environmental factors. *Proceedings of the European Brewery Convention 25th Congress*, p. 403-410. Brussels.
- Stratford, M., 1989. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5, 441-445.
- Teunissen, A.W., Steensma, A.Y., 1995. Review: The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11, 1001-1013.
- Thorne, R.S.W., 1951. Some aspects of yeast flocculence. *Proceedings of the European Brewery Convention 3rd Congress*, Brighton. Elsevier, Amsterdam, p. 21-34.
- Wainwright, T., 1973. Diacetyl – a review. *J. Inst. Brew.* 79, 451-470.
- Yamano, G., Tanaka, J., Inoue, T., 1994. Cloning and expression of the gene encoding alpha-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* ssp. in brewer's yeast. *J. Biotechnol.* 32, 165-171.
- Younis, O.S., Stewart, G.G., 1998. Sugar uptake and subsequent ester and alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 104, 255-264.
- Younis, O., Stewart, G.G., 1999. The effect of malt wort, very high gravity malt wort and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 38-45.
- Zheng, X., D'Amore, T., Russell, I., Stewart, G.G., 1994. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 41-47.

Produtos lácteos: Queijos e iogurtes

Arthur R. Hill, Prashanti Kethireddipalli[#]

I. INTRODUÇÃO

A produção de queijo teve início há milhares de anos no Oriente Médio (Scott *et al.*, 1998). A manufatura de queijo foi subsequentemente introduzida na Europa no período do Império Romano, quando era produzido em mosteiros ou em fazendas. A produção de queijos em fábricas teve início em meados do século dezenove na Europa e no Novo Mundo e, a partir de 1930 muitas variedades de queijo começaram a ser definidas por padrões nacionais de identidade, por exemplo, o sistema de Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) na França e o Denominazione di Origine Controllata (DOC) na Itália, além do padrão internacional European Community Protected Designation of Origin (PDO). Os padrões de identidade foram reforçados internacionalmente pela Convenção de Stresa em 1951 e mais tarde adaptados por regras de Comunidade Europeia (Echols, 2008). O Center for Dairy Research (Centro de Pesquisas de Produtos Lácteos), de Wisconsin, elaborou uma lista de queijos, disponível online, onde são encontradas mais de 1.400 variedades de queijos, muitos dos quais diferem entre si apenas na forma, tamanho, grau de maturação, tipo de leite, condimentos utilizados, empacotamento e/ou região onde foi produzido. O queijo mais popular em todo o mundo é a muçarela, principalmente por ser utilizada em pizzas.

Além dos queijos, há grande número de produtos de leite fermentados cujas diferenças são, basicamente, os processos de manufatura e os micro-organismos utilizados no início da produção. O principal produto fermentado consumido na Austrália, Canadá, Reino Unido e nos Estados Unidos é o iogurte, enquanto outras variedades de leite processado e produtos com cremes são mais populares na Escandinávia e países do Leste Europeu. A Figura 8.1 mostra as variedades mais consumidas entre os produtos de leite fermentado. Este capítulo vai abordar os procedimentos utilizados em sua fabricação, as culturas utilizadas e as alterações bioquímicas que ocorrem na produção de iogurtes e de queijos. A Figura 8.2 ilustra os principais ingredientes e processos utilizados

na produção de queijos.

II. COMPOSIÇÃO DO LEITE

Queijos e iogurtes dependem do crescimento de bactérias que produzam acidez, compostos de sabor e enzimas para a maturação. O leite é uma boa fonte de nutrientes, que inclui carbono, nitrogênio e macrominerais. Muitos micronutrientes como vitaminas e minerais também são encontrados no leite (Jenness, 1988).

No entanto, o leite é único em relação ao açúcar que contém a lactose, só encontrada em sua forma natural no leite. A maioria dos micro-organismos não possui lactase, uma enzima, que é necessária para hidrolisar a lactose em seus monômeros de açúcar, a glicose e a galactose. As bactérias lácticas que produzem lactase hidrolisam rapidamente a lactose e usam a glicose como fonte de energia. Além disso, alguns LAB são capazes de converter a galactose em glicose. Os LAB possuem, portanto, vantagens competitivas a favor do leite.

Dados sobre a composição do leite dos tipos mais consumidos de produtos lácteos podem ser consultados na Tabela 8.1. Os princípios de produção de queijos e de iogurtes são similares para todos os tipos de leite, com algumas modificações necessárias para a obtenção de maior quantidade de sólidos em leites de espécies como búfalo e ovelha e pelas diferenças nas propriedades das caseínas e enzimas, entre outros fatores. O leite de cabra, por exemplo, tem glóbulos de gordura menores, o que permite recuperação maior de gordura (McSweeney *et al.*, 1993b) e, se comparamos com o leite de vaca, o leite de cabra, na maioria das espécies, tem teor mais baixo de α_{s1} -caseína (Moatsou *et al.*, 2004). O resultado prático é que o leite de cabra é mais adequado do que o de vaca para algumas variedades de queijo, como o feta, mas menos adequado para o cheddar, para o qual o desenvolvimento de sabor depende significativamente da hidrólise da α_{s1} -caseína pela renina.

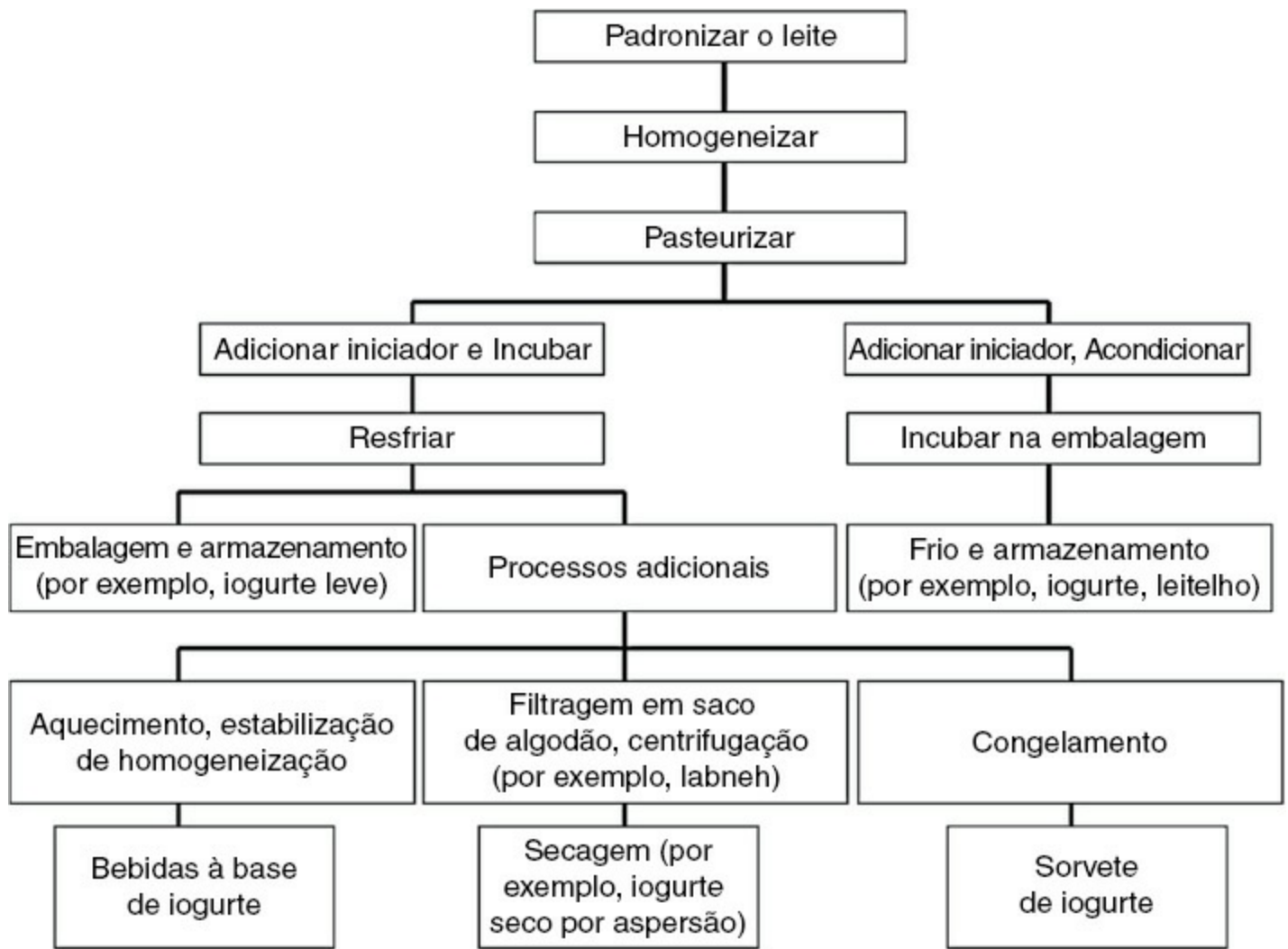


FIGURA 8.1 Principais processos utilizados para diferenciar o leite em produtos lácteos fermentados. Adaptado de Robinson *et al.* (2002).

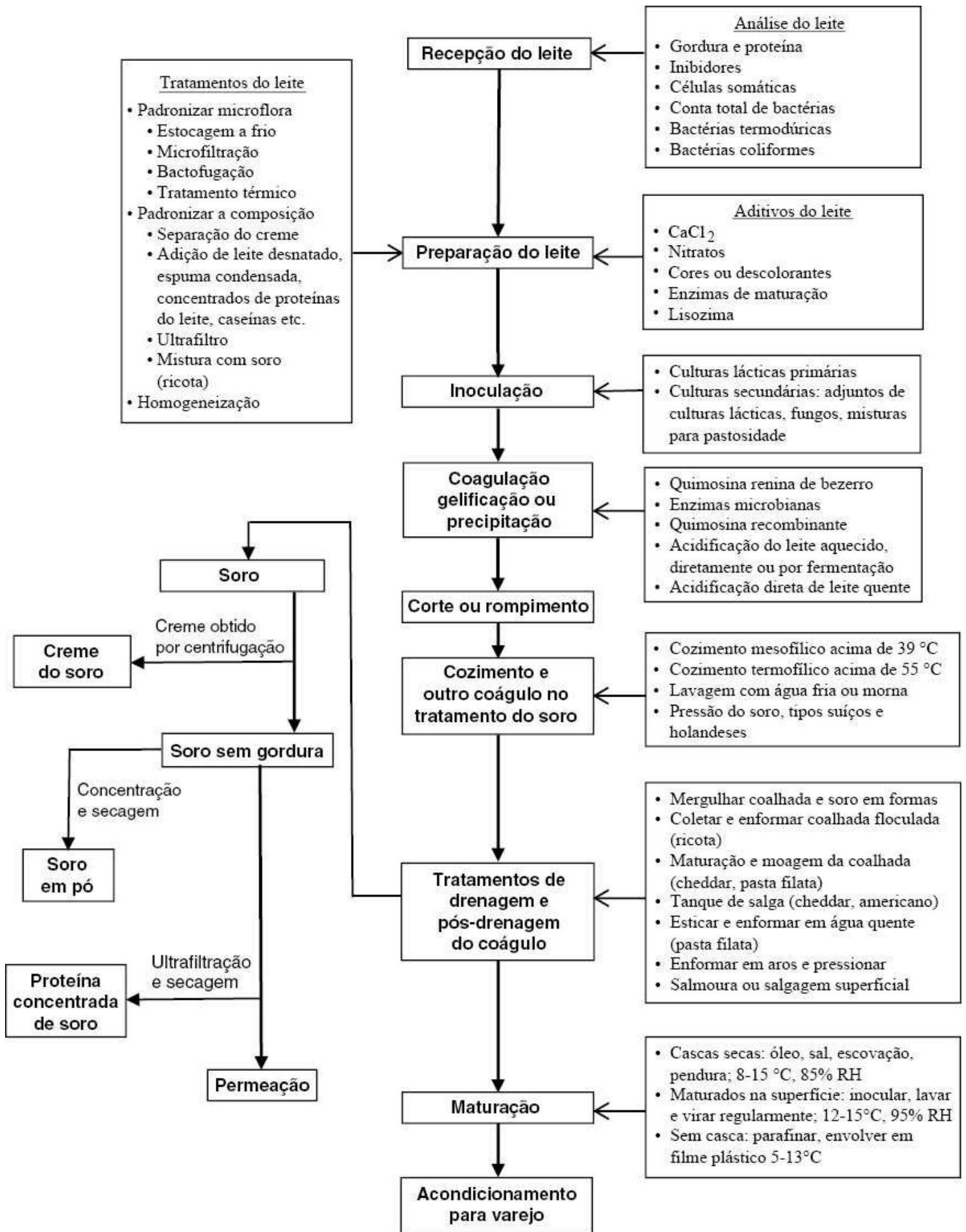


FIGURE 8.2 Fluxograma da fabricação de queijo.

O leite de búfala tem uma maior capacidade de tamponamento do que o de vaca, o que significa que seu processo de acidificação precisa ser adequadamente modificado (Ahmad *et al.*, 2008). Em consequência das diferenças na composição do leite de búfala e de vaca, as alterações na micela da caseína e na reologia do coágulo durante a acidificação são consideradas similares qualitativamente, mas quantitativamente diferentes (Ahmad *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2011).

Há ainda grandes diferenças em uma mesma espécie. Em toda a história moderna, os fazendeiros têm criado o gado leiteiro de modo seletivo para aumentar a produção de leite, ou o conteúdo de gordura, ou com ambos os objetivos.

TABELA 8.1 Composição bruta característica (kg/100) de leite de vaca, ovelha, búfala e cabra

	Vaca	Ovelha leiteira	Búfala	Cabra
Gordura	3,9	7,2	7,4	4,5
Proteína total	3,2	4,6	3,8	3,2
Caseína	2,6	3,9	3,2	2,6
Soro	0,6	0,7	0,6	0,6
Lactose	4,6	4,8	4,8	4,3
Cinza	0,7	0,9	0,8	0,8
Sólidos totais	12,4	17,5	16,83	12,8

Adaptado de Wong *et al.* (1988).

Mais recentemente, a seleção genética possibilitou alterações de outras propriedades do leite, por exemplo, aumentar a proporção de proteínas do leite e gordura (razão entre Proteína e Gordura – razão PG). Com relação a outros sólidos, o conteúdo de minerais (especialmente de cálcio, magnésio e fósforo) varia, em geral, na proporção do conteúdo de proteínas e o conteúdo de lactose é relativamente estável. Desde que a lactose é um componente, em grande parte, não utilizado, aumentar a proteína e a gordura pela alimentação ou seleção genética traz vantagens econômicas em termos de conversão dos alimentos, custos de transporte do leite e disposição dos resíduos.

A estação do ano é outro fator que afeta a composição do leite (Hill, 2011). Em geral, no Hemisfério Norte, o conteúdo de gordura atinge seu nível mínimo em agosto e o nível máximo em outubro. O conteúdo de proteínas se altera, *grosso modo*, em paralelo com o conteúdo da gordura, mas, como as variações sazonais influem menos nas proteínas, o resultado é uma razão PG maior no verão e menor no inverno. O conteúdo de caseína (porcentagem de caseínas do total de proteínas) é relativamente constante em todas as estações. Isto é, a caseína varia, nas diferentes estações do ano, mas principalmente em proporção ao total de proteínas. No entanto, há uma correlação significativa importante entre o total de proteínas e de caseína. O valor médio do conteúdo de caseína em Ontario, onde Holstein Friesian é a espécie dominante, foi determinado como 77% ($N = 1.067$, SD 1,07%, para uma faixa de 70,31-81,06%). Com base nestes dados, a caseína pode atingir, de um total de proteínas, ($N \times 6,38$) a seguinte proporção (Hill, dados não publicados):

$$\text{Caseína} = (0,833 \times \text{proteína total}) - 0,208$$

A gordura do leite é única em relação à diversidade de seus ácidos graxos. Como mostra a Tabela 8.2, alguns componentes importantes dos lipídeos incluem quantidades substanciais de ácidos graxos de cadeias curtas e ácido rumênico (ácido linoleico conjugado); C18:2, c9, t11). Em seu estado natural, a gordura do leite é encontrada como glóbulos envolvidos por membranas ativas de fosfolipídeos na superfície. As membranas permitem que as partículas de gordura se mantenham dispersas no meio aquoso de leite. Durante a formação dos géis de leite, como foi descrito na seção IV, os glóbulos de gordura ficam obstruídos no interior da estrutura de gel das proteínas e funcionam, principalmente, como agentes que amaciam a textura do queijo. Ácidos graxos de cadeias curtas tendem a se localizar na posição *sn1* ou *sn3* (Villeneuve *et al.*, 1996) e por isso ficam mais sujeitos à lipólise com

associação a um sabor rançoso. (Veja também revisão feita por Collins *et al.*, 2003a.)

Os aspectos gerais das proteínas do leite, que estão descritos rapidamente a seguir, foram revistos por Fox (2003a). Além das enzimas e de proteínas minoritárias, o grupo principal de proteínas do leite são as caseínas e proteínas do soro, que respondem por cerca de 80% e 20% do total de lactoproteínas, respectivamente. Além dos glóbulos dispersos de gordura (1-10 μm de diâmetro), o sistema coloidal do leite contém partículas de fosfato de caseína-cálcio denominadas de micelas de caseína (de cerca de 80-500 nm de diâmetro) dispersas em uma solução (soro) de lactose, proteínas do soro e minerais. As micelas de caseína bovinas são formadas por quatro frações diferentes de caseínas α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas, em uma razão aproximada de 4:1:3,5:1,5, respectivamente. O tamanho das micelas de caseína, o conteúdo de caseínas e as proporções relativas das caseínas individuais diferem entre as espécies. As proteínas principais do leite bovino são β -lactoglobulinas ($\approx 50\%$), α -lactalbuminas ($\approx 20\%$) imunoglobulinas ($\approx 3\%$; até 10% no colostro), albumina do soro bovino (0,3-1%) e pequena quantidade de lactoferrinas ($< 0,1\%$). As β -lactoglobulinas são as proteínas mais abundantes do soro do leite na maioria dos mamíferos, com exceção dos seres humanos, ratos, ratazanas, porquinhos-da-índia e camelos, nos quais essa proteína não existe. A α -lactalbumina está presente no leite de todos os mamíferos. Cada molécula de β -lactoglobulina contém duas ligações intramoleculares de dissulfetos e um resíduo de cisteína.

TABELA 8.2 Composição de ácidos graxos em leite de vaca, cabra e ovelha

Ácido graxo	Nome comum	Composição (% w/w)					
		Vaca ^a		Cabra ^b		Ovelha ^c	
		Característico	Variação	Característico	Variação	Característico	Variação
C4:0	Butírico	3,9	3,1-4,4	2,2	2,0-2,4	3,5	3,1-3,9
C6:0	Caproico	2,5	1,8-2,7	2,4	2,0-2,7	2,9	2,7-3,4
C8:0	Caprílico	1,5	1,0-1,7	2,7	2,3-3,0	2,6	2,1-3,3
C10:0	Cáprico	3,2	2,2-3,8	10,0	8,9-11,0	7,8	5,5-9,7
C12:0	Láurico	3,6	2,6-4,2	5,0	3,9-6,2	4,4	3,5-4,9
C14:0	Mirístico	11,1	9,1-11,9	9,8	7,7-11,2	10,4	9,9-10,7
C14:1	Miristoleico	0,8	0,5-1,1	0,18	0,17-0,2	0,3	0,2-0,5
C15:0		1,2	0,9-1,4	0,7	0,5-0,9	1,0	0,9-1,1
C16:0	Palmitico	27,9	23,6-31,4	28,2	23,2-34,8	26,0	22,5-28,2
C16:1	Palmitoleico	1,5	1,4-2,0	1,6	1,0-2,7	1,0	0,7-1,3
C18:0	Esteárico	12,2	10,4-14,6	8,9	5,8-13,2	9,6	8,5-11,0
C18:1 <i>cis</i>	Oleico	17,2	14,9-22,0	-	-	-	-
C18:1 <i>trans</i>		3,9	-	-	-	-	-
C18:1 total		21,1	-	19,3	15,4-27,7	21,1	17,8-23,0
C18:2	Linoleico	1,4	1,2-1,7	3,2	2,5-4,3	3,2	2,9-3,6
C18:2 conj	Linoleico conjugado	1,1	0,8-1,5	0,7	0,3-1,2	0,7	0,6-1,0
C18:3	α -Linolênico	1,0	0,9-1,2	0,4	0,2-0,9	0,8	0,5-1,0
	Ácidos minoritários	6,0	4,8-7,5	3,2	2,2-4,6	3,6	3,1-4,3

^a Creamer e MacGibbon (1996); MacGibbon (1996).

^b Alonso *et al.* (1999).

^c Goudjil *et al.* (2004).

O grupo sulfidrila é muito importante na química do leite aquecido; depois da desnaturação térmica, esse grupo participa nas reações de troca de tióis/dissulfetos com o dissulfeto intermolecular da κ -caseína. Como visto na seção IV, essa reação danifica muito o processo de coagulação do leite pela renina e as propriedades de produção do queijo que utiliza leite fervido, mas é fundamental para a produção de iogurte. Algumas das propriedades da caseína e das proteínas do soro estão descritas nas Tabelas 8.3 e 8.4, respectivamente, e serão

discutidas nas seções relevantes. Os aspectos estruturais da micela de caseína e os mecanismos de sua desestabilização em queijos e iogurtes estão descritos brevemente na seção IV.

III. QUALIDADE DO LEITE

A qualidade do leite possui grande importância na qualidade final do queijo e do iogurte. Alguns dos atributos bioquímicos da qualidade do leite que estão associados com a qualidade e segurança dos queijos e iogurtes serão descritos.

A. Tipos de micro-organismos e sua atividade no leite

Por um período de 1-4 dias, o leite cru morno (25-40°C) é, inicialmente, fermentado por LAB até um pH de 4,8-4,2 dependendo da tolerância do ácido do LAB presente e da taxa de crescimento das outras espécies (Figura 8.3). À medida que o LAB se aproxima da fase em que seu crescimento se estabiliza, leveduras e fungos tolerantes ao ácido começam a utilizar o ácido láctico que é produzido e também a metabolizar proteínas, causando aumento do pH. Os peptídeos e aminoácidos liberados promovem ainda mais o crescimento do LAB, até utilizarem quase toda a lactose.

TABELA 8.3 Principais caseínas e algumas propriedades importantes na confecção de queijos

Nome	Símbolo	% de caseína	Propriedades
Alfa-s1 caseína	α_{s1}	40	Liga-se fortemente ao Ca^{2+} Prontamente hidrolisada pela quimosina durante a maturação do queijo Menos susceptível à protease do leite natural, plasmina
Alfa-s2 caseína	α_{s2}	10	Liga-se fortemente ao Ca^{2+} Susceptibilidade limitada à ação da quimosina Oito ligações peptídicas são susceptíveis à plasmina
Beta-caseína	β	35	Liga-se fracamente ao Ca^{2+} Parcialmente solúvel em leite frio Degradada pela plasmina, mas não pela quimosina Peptídeos β -CN (f193-209) e fragmentos relacionados são muito amargos
Capa-caseína	κ	15	Não se liga ao cálcio Estabiliza as micelas de caseína; sua hidrólise pela quimosina inicia a coagulação do leite Liga-se covalentemente às proteínas do soro quando o leite é aquecido Para- κ -caseína não é degradada por quimosina ou plasmina

Quando não há mais lactose, o pH começa a subir, o que faz proliferar bactérias proteolíticas e, em conjunto com as leveduras e fungos, elevam o pH para valores neutros ou levemente alcalinos. Transformações físicas nesses respectivos estágios incluem a coagulação (pH de 5,0-4,6) e um aumento da translucidez em função da dissolução proteolítica e a resultante dissociação das micelas de caseína. Na manufatura de produtos lácteos esses processos bioquímicos/físicos naturais são direcionados a objetivos específicos. As subseções seguintes descrevem vários tipos de bactérias que, em geral, estão presentes no leite cru, relacionadas de acordo com as alterações que causam nas propriedades do leite. Muitas vezes tais mudanças são negativas (deterioração), porém muitas dessas bactérias, assim como os contaminantes transferidos para o leite e/ou queijo durante seu processamento são também

adjuntos importantes para as culturas primárias ou secundárias, principalmente em variedades de queijos maturados.

TABELA 8.4 As principais proteínas do soro: algumas propriedades importantes na confecção de queijos

Nome	% de proteína do soro	Propriedades
β -Lactoglobulina	40	Sua ligação induzida por calor (> 70°C) com κ -caseína interfere com a coagulação com a renina Principal componente do queijo tipo ricota
α -Lactalbumina	15	Principal proteína do leite materno Utilizada em fórmulas infantis
Imunoglobulinas	6	Presentes em altas proporções no colostro
Outras proteínas do soro sensíveis ao calor	4.0	Incluem predominantemente soro albumina bovina
Proteínas do soro estáveis ao calor	14	Não podem ser recuperadas pela precipitação ácido-calor como no queijo tipo ricota
Nitrogênio não proteico	21	Consiste em aminoácidos, amônia, ureia e pequenos peptídeos

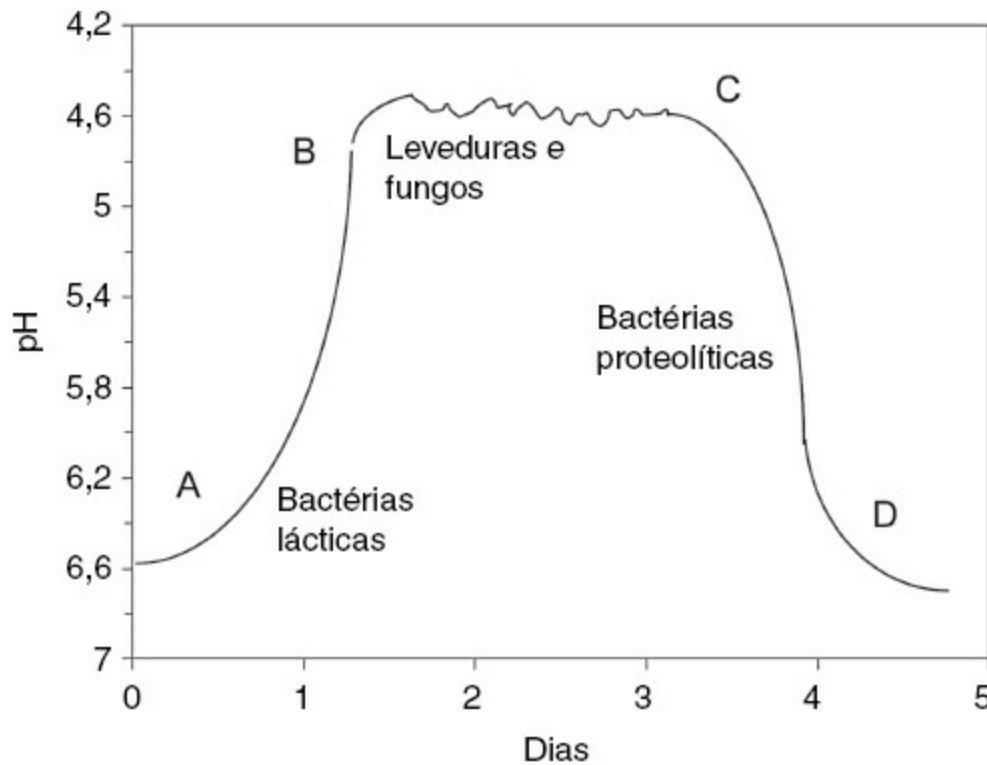


FIGURA 8.3 Fermentação natural do leite cru. A—B: No pH natural do leite (6,6-6,8) e a temperaturas > 20 °C, as bactérias do ácido láctico (LAB) fermentam rapidamente a lactose em ácido láctico. O ácido láctico que é produzido abaixa o pH e inibe a maioria das bactérias, às vezes até mesmo as LAB. B—C: Leveduras e fungos tolerantes ao ácido começam a crescer e utilizam ácido láctico, o qual permite crescimento posterior de LAB. Essa relação sinérgica prossegue até que toda a lactose seja esgotada. C—D: Eventualmente leveduras e fungos se associam com bactérias proteolíticas. Juntos, consomem ácido láctico e/ou o neutralizam com produtos de degradação de proteínas. Observa-se que todos os queijos maturados seguem esse padrão em maior ou menor grau, dependendo do pH mínimo alcançado durante a fabricação e o pH máximo durante a maturação. O caso clássico desse padrão é o queijo camembert, que tem pH mínimo de < 4,7 cerca de 24 horas após a inoculação e um pH de maturação de cerca de 7,5.

1. Bactérias do ácido láctico

As LAB (bactérias do ácido láctico) são: (1) sem motilidade, Gram-positivas e catalase negativa, de modo que testes simples de atividade da catalase podem ser utilizados para identificar bactérias contaminantes em culturas lácticas, microaerofílicas ou anaeróbicas facultativas, o que significa que podem ser cultivadas em condições anaeróbicas tais como em produtos lácteos fermentados; (2) mesofílicas ou termofílicas, que significa que a estocagem a frio diminui a quantidade deles e promove o crescimento das bactérias psicotróficas contaminantes; e

(3) quanto à morfologia são cocos (células esféricas) de 1 μm de diâmetro ou células em formato de bastonete com 1 μm de largura e 2-3 μm de comprimento. Como descrito anteriormente, as LAB possuem vantagens competitivas no leite uma vez que são produtoras de lactase e, portanto, capazes de converter, rapidamente, lactose em glicose e galactose. No entanto, as LAB preferem temperaturas maiores que 30°C, de modo que, dependendo da contagem inicial de bactérias psicotróficas, incluindo alguns coliformes e espécies de família pseudomonadaceae, podem crescer com LAB em temperatura ambiente. As culturas lácticas serão abordadas na seção V, mais adiante.

2. Bactérias psicotróficas

As bactérias psicotróficas crescem em temperaturas menores que 7°C. As espécies mais comuns encontradas em leite armazenado, de acordo com as normas da maioria das jurisdições, são as seguintes: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e coliformes. As *Pseudomonas* spp. são as mais comuns e possuem, portanto, o maior impacto na qualidade do leite. A *Pseudomonas fluorescens* consegue crescer lentamente a uma temperatura próxima de 2°C e, como outras espécies psicotróficas do mesmo gênero, produzem lipases e proteases termoestáveis e que permanecem ativas mesmo depois de as células das bactérias terem sido eliminadas pela pasteurização (Lelievre *et al.*, 1978; Law *et al.*, 1979; Hicks *et al.*, 1982; Ellis e Marth, 1984; Cromie, 1992). A produção de enzimas termoestáveis atinge o máximo na fase estacionária, que ocorre geralmente durante o crescimento das *Pseudomonas* spp. em equipamentos não suficientemente higienizados.

3. Formadores de gases

Micro-organismos que produzem gases como leveduras e propionibactérias (Todesco *et al.*, 2000) e LAB heterofermentivas (Laleye *et al.*, 1987) causam rachaduras indesejáveis no queijo. O defeito do coágulo flutuante no queijo cottage também resulta de LAB gasoso. Os defeitos iniciais de formação de gás e sabor estranho no queijo podem ser causados por bactérias coliformes como a *Enterobacter aerogenes* (Abo-Elnaga, 1971; Nieuwoudt e Bester, 1975; Bester, 1976; Melilli *et al.*, 2004) e os defeitos que surgem mais tarde nos queijos de tipo suíço em geral decorrem da presença de *Clostridium tyrobutyricum* (Nieuwoudt e Bester, 1975).

As leveduras ocorrem espontaneamente no leite e são contaminantes comuns durante o processo de fabricação do queijo. As leveduras comumente associadas a produtos lácteos incluem a *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala* e a *Debaryomyces hansenii* (Klein *et al.*, 2002). Entre os efeitos indesejáveis estão a formação de rachaduras ou buracos em decorrência das leveduras, o desenvolvimento de aroma frutal em muitas variedades de queijo e escurecimento na parte superior e inferior da casca de queijos brancos e azuis em queijos muito maturados (Nichol *et al.*, 1996). Quanto aos aspectos positivos, as leveduras contribuem com peptidases (Klein *et al.*, 2002), que auxiliam na maturação da parte interna dos queijos. Em queijos com fungos, as leveduras reduzem significativamente a acidez, favorecendo o crescimento do fungo branco *Penicillium candidum* ou *P. camemberti*. Em queijos de casca lavada ou maturada, as leveduras, além de reduzir a acidez, promovem o crescimento

da *Brevibacterium linens*, que também contribui com as peptidases no processo de maturação (Bockelmann e Hoppe, 2001). Elas também influenciam a tonalidade e a intensidade de desenvolvimento da cor pelo *B. linens*. Além disso, as leveduras são a flora dominante em alguns dos queijos com casca lavada como o português serra (Macedo *et al.*, 1993).

As bactérias coliformes também aparecem em geral em leite cru e são utilizadas tradicionalmente como indicadores de higienização e de boas práticas de fabricação (GMP). Marcadores GMP alternativos também são indicadores do número total das bactérias da família Enterobacteriaceae, que inclui patógenos entéricos

comumente associados com o leite como sorotipos patogênicos como a *Escherichia coli* O157:H7 e várias espécies de *Salmonella* spp. com a importante exceção da *E. coli* O157:H7, que é capaz de sobreviver em produtos de leite ácidos. A maioria das bactérias deste grupo não tolera valores de pH baixo e compete de modo desvantajoso com o LAB, de modo que diminuem significativamente na presença de culturas lácticas em crescimento (Bestler, 1976). Pouca higienização associada a pouco desenvolvimento ácido, no entanto, pode causar gases em excesso (queijo esponjoso), associado com sabores estranhos. Gases iniciais também podem ser causados por *Propionibacterium* spp. (Todesco *et al.*, 2000) e por LAB heterofermentativa.

O *Clostridium tyrobutyricum* é um organismo termodúrico (sobrevive à pasteurização) que forma esporos, muito conhecido entre os fabricantes de queijo. Ele causa a formação de gases (dióxido de carbono) durante os últimos estágios de maturação dos queijos de tipo suíço e holandês e alguns queijos mais duros dentre as variedades italianas. As rachaduras dos queijos são denominadas de “defeitos de gases tardios”. Fabricantes de queijos europeus verificam com frequência a existência de bactérias termodúricas e/ou formadores de esporos em leite cru. Quinhentos esporos por litro são suficientes para causar defeitos de gases tardios. As estratégias de controle incluem (1) adição de lisozima de ovos, que requer uma declaração, dependendo da jurisdição, quanto à presença de ovo que pode causar alergia (consultar resumo em Fox, 1993); (2) culturas adjuntas que inibem, ao menos em parte, a *Clostridium* spp.; essas culturas estão disponíveis no comércio, além de pesquisas nesta área estarem sendo desenvolvidas. (Christiansen *et al.*, 2005; Martínez-Cuesta *et al.*, 2010); (3) remoção de esporos por bactofugação ou microfiltração; (4) adição de sais de nitrato, o inibidor tradicional, que está entrando em desuso por causa da formação de nitrosaminas quando o queijo é aquecido e pela rejeição, dos consumidores, a aditivos; e (5) pré-maturação a temperaturas baixas para queijos duros italianos (Spolaor e Marangon, 1997).

4. Bactérias patogênicas

Este resumo de bactérias patogênicas associadas a produtos lácteos fermentados foi adaptado do trabalho de Hill e Warriner (2011a; 2011b). *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* species e *E. coli* enteropatogênica, são a maior preocupação dos fabricantes de queijo (Johnson *et al.*, 1990a-c). Quanto ao iogurte e a maioria das bebidas fermentadas, como o leite integral fermentado (*buttermilk*), o risco associado a bactérias patogênicas é muito reduzido graças ao tratamento a altas temperaturas, que normalmente é muito maior do que aquele necessário para os níveis de pasteurização além dos sistemas de processamento fechados, que mitigam muito o risco associado de contaminação pós-pasteurização. As fontes de contaminação do leite cru podem ser consultadas na Figura 8.4.

A *Listeria monocytogenes* provavelmente representa o maior risco associado ao queijo pela gravidade e pela probabilidade de contaminação por listeriose serem altas se comparadas com outras doenças relacionadas com os queijos.

Quanto à gravidade da doença, a porcentagem de morte de pessoas associada com a listeriose é de cerca de 30% e entre os que sobrevivem podem ocorrer graves complicações, por exemplo, aborto espontâneo. Quanto à probabilidade, a taxa de incidência da *L. monocytogenes* em leite cru é relativamente alta. Sua tolerância térmica é próxima da temperatura de pasteurização (72°C, 16 segundos); ela sobrevive, quando não se multiplica, nas condições de fabricação de queijos e é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração (isto é, temperaturas para a maturação do queijo e de estocagem). De modo semelhante, as espécies *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 representam um risco relativamente alto em queijos porque estão presentes com frequência em leite cru ou, ao menos, crescem e toleram as temperaturas baixas e a acidez do queijo e de outros produtos fermentados de leite e podem sobreviver durante vários meses durante a maturação.

O *Staphylococcus aureus* é um contaminante biológico frequente em queijos e tem origem no leite cru ou nos funcionários que manipulam o queijo, mas é considerado de baixo risco uma vez que seu crescimento e produção de toxinas são rapidamente suprimidos por outras culturas lácticas competidoras e também pela acidez do queijo

(Johnson *et al.*, 1990a; 1990b). De modo semelhante, a *Campylobacter jejuni* é muito difundida no ambiente e ocorre no leite cru, mas em geral não sobrevive às condições de fabricação do queijo. Ela é considerada de baixo risco na fabricação de queijos sempre que são utilizados tratamentos a calor ou fermentação (pH reduzido) no processo de produção. A *Yersinia enterocolitica* aparentemente tolera as condições de fabricação, porém estudos recentes sugerem que as linhagens virulentas, especialmente nos Estados Unidos, não são encontradas com frequência no leite (Kushal e Anand, 2001; 2006).

O *Bacillus cereus* é prejudicial porque produz filmes difíceis de serem removidos nos equipamentos de processamento do leite, sobrevive à pasteurização e também prolifera com facilidade em temperaturas de refrigeração. É considerado, no entanto, de baixo risco porque a produção da toxina que causa diarreia, no leite, é associada a condições de existência de contaminantes e concentração de células em geral mais altas do que 10 milhões/ml (Griffiths, 1990; Sutherland e Limond, 1993; Sutherland, 1993). É interessante, também, o fato de que a pasteurização do leite favoreça o crescimento de esporos de *B. cereus* a ponto de poder existir em quantidades mais altas no leite pasteurizado do que no leite cru (Stewart, 1975; Ahmed *et al.*, 1983).

Em resumo, é importante abordar o processamento do leite cru assumindo a existência de bactérias patogênicas e que elas devem ser eliminadas ou reduzidas a níveis seguros. Considerando as taxas médias de incidência contidas em vários relatórios, parece provável que mais de 10% do leite de vaca esteja contaminado por uma ou mais bactérias patogênicas antes de deixar a fazenda. Um estudo feito em Dakota do Sul concluiu que 26% das amostras de todo o volume de leite contido nos tonéis estavam contaminados com uma ou mais espécies de bactérias *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. ou *C. jejuni* (Jayarao e Henning, 2001). No Tennessee, 25% do volume de leite contido nos tonéis estavam contaminados com uma ou mais espécies de bactérias *L. monocytogenes*, *C.jejuni*, *Y. enterocolitica* ou *Salmonella* spp. (Rohrbach *et al.*, 1992). O processo de mistura que ocorre durante o transporte do leite e sua estocagem faz que a proporção de leite contaminado que chega ao tanque para o processamento do queijo atinja níveis muito mais altos e uma detecção molecular mais precisa e rápida, assim como técnicas de quantificação vão, com certeza, elevar as estimativas das taxas de incidência. Além do mais, alguns patógenos tradicionais que motivaram a pasteurização inicial do leite, como a *Corynebacterium diphtheriae* e a *Coxiella burnetii* ainda ocorrem em leite cru [EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010].

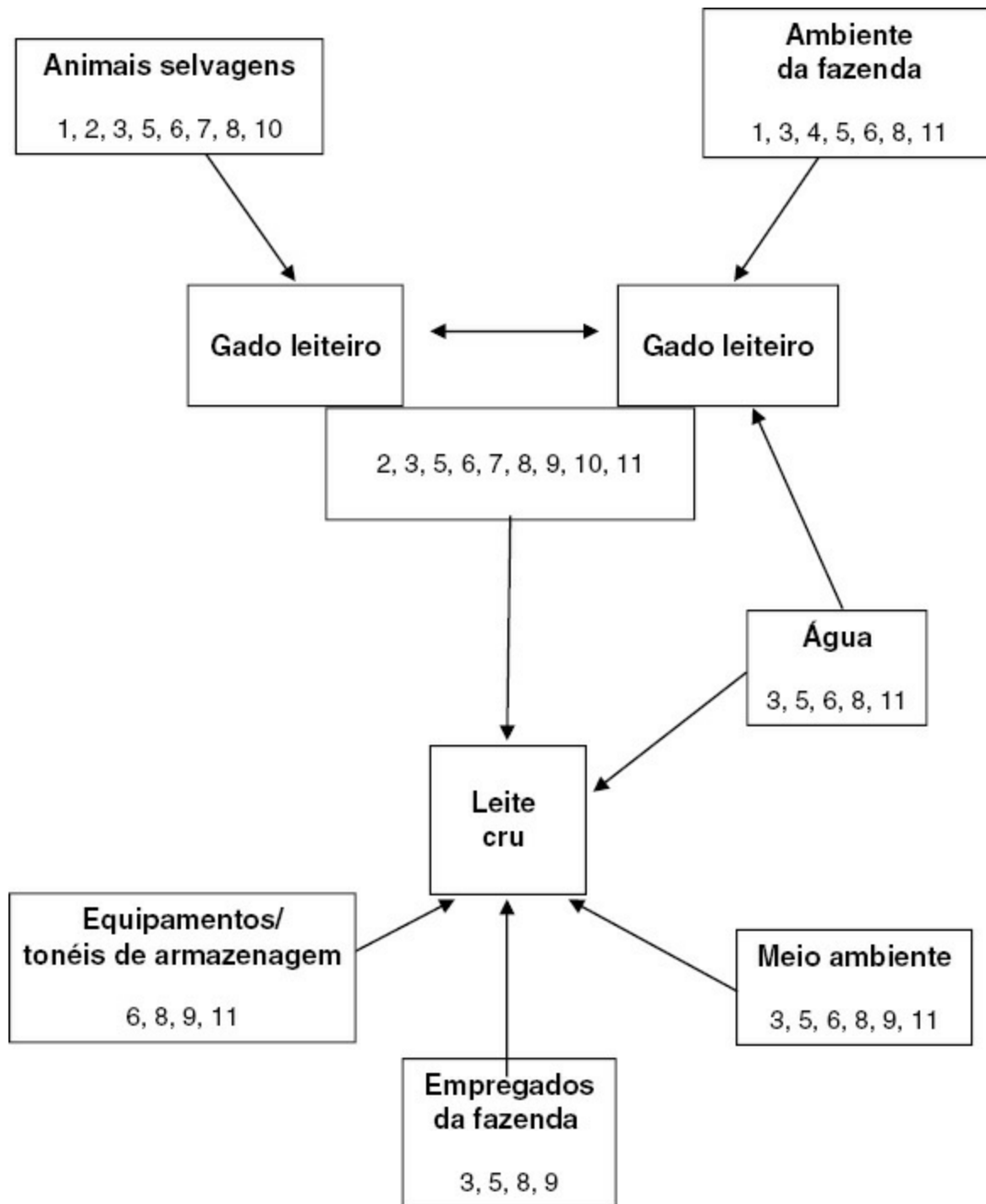


FIGURA 8.4 Fontes de contaminação no leite cru. 1: *Bacillus spp.*; 2: *Brucella*; 3: *Campylobacter jejuni*; 4: *Clostridium botulinum*; 5: *Escherichia coli* O157:H7; 6: *Listeria monocytogenes*; 7: *Mycobacterium tuberculosis*; 8: *Salmonella*; 9: *Staphylococcus aureus*; 10: *Coxiella burnetii* (Q fever); 11: *Yersinia enterocolitica*. Cortesia de K. Warriner, University of Guelph, Canada.

B. Antibióticos

Culturas lácticas são muito sensíveis aos antibióticos utilizados diariamente nas fazendas de produção de leite, em tratamentos profiláticos e terapêuticos, em especial contra a mastite. Os antibióticos geralmente utilizados em fazendas de produção de leite incluem β -lactâmicos (penicilina), sulfonamidas, estreptomicinas, tetraciclina e amfenicóis. Na maioria das jurisdições dos Estados Unidos, penalidades cada vez maiores têm reduzido muito os resíduos de antibióticos no leite. No entanto, testes para determinar antibióticos em leite cru que será utilizado na fabricação de queijos antes do descarregamento do leite cru dos caminhões-tanque ainda são realizados com regularidade. Em muitas jurisdições um dos diversos testes de inibição do crescimento disponíveis é usado como

teste oficial, normalmente baseado na inibição de *Bacillus stearothermophilus*. Esses testes possuem a vantagem de cobrir uma grande faixa de detecção, mas não são específicos, além de serem lentos e pouco sensíveis. Os kits de testes rápidos e sensíveis comumente usados incluem: (1) Kit para Testes Penzyme para antibióticos β -lactâmicos, que são baseados na ligação da penicilina utilizando dd-carboxipeptidase; (2) Testes Charm II, que testam uma vasta gama de antibióticos e são baseados em *B. stearothermophilus*, que contém sítios receptores naturais para antibióticos em ou no interior de suas células; os antibióticos radioativos marcados (^{14}C ou ^3H) que são deslocados por antibióticos presentes no leite; e (3) imunoenaios, ensaios ligados à enzima ou ensaios de imunoabsorventes ligados à enzima. Cromatografia líquida de alta eficiência é usada, em geral, como método de referência para outros ensaios. Várias revisões recentes sobre testes de antibióticos estão disponíveis e enfocam sulfonamidas (Wang *et al.*, 2006; Zhang e Wang, 2009), β -lactâmicos (Cui *et al.*, 2007; Samanidou *et al.*, 2007), tetraciclinas (Pastor-Navarro *et al.*, 2009), clorafenicóis (Santos e Ramos, 2006) e também descrevem uma revisão geral sobre resíduos veterinários no leite (Nag, 2010).

C. Leite mastítico

A mastite é uma infecção do úbere da vaca, que tem impactos negativos na qualidade do leite. A mistura de leite de diversas procedências dilui o efeito do leite de uma única vaca infectada ou de um mesmo rebanho, mas na maioria das jurisdições o efeito de acúmulo da mastite, especialmente da mastite subclínica, é significativo. Olson, conforme citação feita por Eck e Gillis (2000), estima em 1% a perda na produção de queijo quando 10% do leite é proveniente de vacas com mastite subclínica. Além do mais, os efeitos do leite mastítico na qualidade do produto têm, provavelmente, uma importância maior do que os efeitos quanto à produtividade. Os organismos que causam a doença são patógenos humanos, como *E. coli* e *S. aureus*. Infecções não bacterianas como as causadas por *Prototheca* também resultam em contagens mais altas de células somáticas (SCCs) e são associadas a altas contagens de bactérias; consultar relatório de extensão da Universidade da Califórnia (Kirk e Mellenberger, 2011).

A mastite é identificada quando há um aumento do número de células somáticas no leite. Uma SCC maior que 100.000/ml em vacas e cerca de um milhão em cabras (Rupp *et al.*, 2011) indica a presença de mastite clínica ou subclínica. A associação de SCC com a qualidade de leite de cabra ainda não foi suficientemente esclarecida. Em leite de vaca, uma SCC de menos de 500.000 células/ml, talvez mesmo um número bem mais baixo, de 100.000 células/ml, foi associada à redução da produção de queijo e qualidade reduzida de leite fluido e outros produtos lácteos (Barbano *et al.*, 1991; Klei *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003). Quando a contagem excede 1.000.000 células/ml, obviamente ocorre uma alteração na composição do leite e uma redução na produção do queijo. As principais alterações consistem em um aumento da atividade da plasmina (uma protease alcalina nativa do leite) e do plasminogênio, uma hidrólise acelerada das proteínas, um aumento do pH, aumento do conteúdo mineral, redução do conteúdo de caseína e teores mais elevados de imunoglobulinas.

IV. QUÍMICA DA COAGULAÇÃO DO LEITE

O mecanismo essencial na fabricação de queijos e iogurtes é induzir uma reação de coagulação do leite, envolvendo, principalmente, as proteínas da caseína. Na maioria dos queijos, a coagulação do leite ocorre por um método enzimático, isto é, pela adição de renina (coalho). Durante milhares de anos a quimosina ou renina eram extraídas do revestimento do estômago de bezerras jovens. A quimosina, protease aspártica contida em extratos brutos de renina, é produzida atualmente, na maior parte, com métodos de fermentação que utilizam micro-organismos geneticamente modificados (GM). Os iogurtes e algumas das variedades de queijo são unicamente, ou predominantemente produtos de coagulação ácida nos quais a gelificação das caseínas, às vezes em conjunto com

proteínas do soro desnaturadas, é induzida por uma lenta acidificação do leite por culturas lácticas. Os métodos de coagulação enzimática e de coagulação ácida do leite serão discutidos em seções separadas a seguir.

A. Coagulação enzimática do leite

As proteínas caseínas existem naturalmente no leite na forma de agregados supramoleculares coloidais altamente hidratados, as micelas de caseína, que possuem um diâmetro médio de cerca de 200 nm. A estrutura e função das micelas da caseína já foram estudadas extensivamente e revisadas (Dalglish, 1998; 2007; 2011; Horne, 1998; 2002; 2006; Walstra, 1999; Holt *et al.*, 2003; de Kruif e Holt, 2003; Dalglish *et al.*, 2004; Farrell *et al.*, 2006; Fox e Brodkorb, 2008). A micela da caseína é formada por vários milhares de moléculas individuais de caseína organizadas em torno de nanodomínios de fosfato de cálcio inorgânico. Dois terços do cálcio encontrado no leite encontram-se nessas nanoaglomerações de fosfato de caseína e cálcio. Enquanto as caseínas sensíveis ao cálcio α_1 - e β -caseínas agregam-se no interior da micela, as caseínas insensíveis ao cálcio da κ -caseína permanecem, em sua maioria, na superfície da micela. A integridade da micela deve-se às interações entre a caseína e o cálcio, às ligações com o hidrogênio e às interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A proteína κ -caseína é a chave da estabilidade do sistema coloidal no leite; é carregada negativamente e extremidades C-terminal flexíveis (106-169) ficam salientes na superfície da micela, como “cabelos” formando uma camada altamente hidratada que fornece estabilidade eletrostática e (principalmente) estabilidade estérica à micela (Holt e Dalglish, 1986; Horne, 1986; 2002; Walstra, 1990; de Kruif, 1992). Em temperaturas baixas, a extremidade N-terminal hidrofílica da β -caseína também pode contribuir para a estabilidade da micela e evitar a agregação (Roefs *et al.*, 1990).

Quando a renina é adicionada ao leite, depois de algum período de retardamento, o leite começa a coagular de modo um tanto abrupto e transforma-se em um gel tridimensional. A primeira fase é inteiramente proteolítica, durante a qual a quimosina hidrolisa a extremidade C-terminal da κ -caseína. O peptídeo hidrofílico, conhecido como caseinomacropéptido (CMP), se difunde para fora da micela (paracaseína) para a fase do soro do leite. A perda da camada com extremidades C-terminal da κ -caseína ou “cabelos” torna a micela instável e então tem início a fase de coagulação secundária, isto é, a agregação das micelas de paracaseína formando um gel tridimensional. A química da coagulação enzimática do queijo termina nesse momento, isto é, com a formação do coágulo de caseína. No entanto, em uma fase subsequente, às vezes denominada de fase terciária, o gel recém-formado vai se tornando mais firme e finalmente começa a liberar soro (sinérese) (consultar revisões de Dalglish, 1992; 1993; Hyslop, 2003; Horne e Banks, 2004).

A fase primária da coagulação do leite pela renina pode ser vista como uma reação de primeira ordem (Dalglish, 1992). A velocidade da reação aumenta à medida que a concentração de enzimas e a temperatura também aumentam (se a enzima estiver estável). A reação inicial, isto é, até cerca de três quartos da κ -caseína ter sofrido a proteólise, varia de modo linear com a concentração da renina (van Hooydonk e Walstra, 1987; Fox *et al.*, 2000).

Na fase secundária, as micelas desestabilizadas se agregam em consequência da perda do impedimento estérico e da redução da repulsão eletrostática ($\approx 50\%$ de decréscimo do potencial zeta). O início da coagulação requer que, pelo menos 85% a 90% da caseína κ tenham sofrido a proteólise (Dalglish, 1979; Chaplin e Green, 1980). Com a utilização de um espectroscópio de difusão de ondas, Sandra *et al.* (2007) monitoraram a gelificação do leite não diluído em seu pH natural, tratado com renina. A pesquisa sugeriu que as micelas parcialmente hidrolisadas com renina continuaram a se difundir livremente até ocorrer uma hidrólise significativa das extremidades C-terminal da κ -caseína ou “cabelos” e somente com $> 70\%$ dos “cabelos” hidrolisados é que as micelas tornam-se restritas em seus movimentos (pela diminuição da repulsão eletrostática), embora ainda não ocorra a agregação. O início real da agregação requer uma proteólise mais extensiva ($\approx 90\%$ CMP liberado) e um gel firme só é formado quando

cerca de 95% das κ -caseínas já estiverem hidrolisadas. Muitos modelos já foram propostos para explicar o mecanismo de agregação das micelas (Horne e Banks, 2004), mas ainda não há um consenso claro quanto à natureza das forças de atração que conduzem à reação de agregação. Pontes de cálcio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals estão, muito provavelmente, envolvidas. A agregação de micelas desestabilizadas é fortemente inibida pela ausência de Ca^{2+} livre e a temperaturas abaixo de 15°C , embora a renina possa permanecer ativa (apesar de atividade muito reduzida) até mesmo em temperaturas tão baixas quanto 0°C . Essa dependência da temperatura da reação de coagulação sugere qual é a função das interações hidrofóbicas na agregação das paracaseínas.

A coagulação do leite pela renina e a força do gel resultante são influenciadas por diversos fatores. A temperatura ótima e o pH ótimo para a ação da renina e agregação das micelas estão em torno de 30°C e pH 6,5, respectivamente. O Ca^{2+} livre é essencial para que o leite coagule e produza um gel firme; o cálcio iônico (como CaCl_2) é adicionado rotineiramente ao queijo até 1 mM. Concentrações de íons, por exemplo, Na^+ (como NaCl), a concentração de caseína, a presença de gordura homogeneizada e de proteínas do soro desnaturadas também são importantes para o processo de coagulação e influenciam a textura final do gel. Esses fatores já foram descritos previamente por vários autores (Dalglish, 1993; Green e Grandison, 1993; Hyslop, 2003; Horne e Banks, 2004; Janhøj e Qvist, 2010).

Tratamento térmico é uma prática muito utilizada na indústria de produtos lácteos e é um processo fundamental na fabricação de iogurtes e de alguns queijos macios. A clássica interação de proteínas do soro e caseína que ocorre quando o leite é aquecido acima de 75°C é a ligação covalente (por meio de reações de troca de tiol/dissulfeto) de proteínas do soro desnaturadas com κ -caseína nas superfícies das micelas e a formação de complexos de κ -caseína e proteínas do soro (O'Connell e Fox, 2003). As alterações induzidas pelo calor das estruturas das micelas de caseína transformam a sua funcionalidade de modo desfavorável. Queijos produzidos com leite termicamente tratado têm uma textura ruim além de propriedades organolépticas inaceitáveis. Os coágulos formados ficam encharcados e com uma aparência irregular, além de suas propriedades de elasticidade e derretimento ficarem comprometidas (Singh e Waungana, 2001). Leite com tratamento térmico, portanto, é raramente usado na fabricação do queijo. Hoje, é conhecido o fato de que a ação proteolítica da renina (taxa de liberação do CMP) é semelhante tanto no leite tratado termicamente como no não tratado (Vasbinder *et al.*, 2003; Anema *et al.*, 2007; Sandra e Dalglish, 2007; Kethireddipalli *et al.*, 2010) e essa, portanto, não é a razão da coagulação imperfeita do leite aquecido, com renina. No entanto, o fato de tratar termicamente o leite danifica significativamente a agregação das micelas tratadas com renina e isto é em geral atribuído à agregação de proteínas desnaturadas do soro às micelas de caseína e às perdas de cálcio iônico induzidas pelo calor. Kethireddipalli *et al.* (2010; 2011) demonstraram que a coagulação irregular do leite tratado termicamente pode ser atribuída não apenas à agregação pelo calor das proteínas do soro desnaturadas na superfície das micelas, mas também à ligação posterior que ocorre durante a coagulação, da fração solúvel dos complexos de proteína do soro/ κ -caseína com as micelas. Também foi levantada a hipótese de que a agregação das proteínas desnaturadas do soro induzida pelo calor prejudica a coagulação em maior extensão do que índice similar de ligação dos complexos de proteína do soro às micelas induzida pela ação da renina, possivelmente por causa das diferentes maneiras de agregação das proteínas, isto é, através de ligações covalentes das micelas e a grande interação hidrofóbica dos complexos de proteína do soro. Além da formação de complexos de proteína do soro induzidas pelo aquecimento, alguns componentes desconhecidos presentes no soro também estão envolvidos na inibição da coagulação. Também foi demonstrado por esses autores que teores mais baixos de cálcio iônico no leite tratado termicamente não possuem efeito significativo na inibição da coagulação. Amostras de leite aquecido, com ou sem restauração do equilíbrio iônico, levam um tempo longo para coagular e produzem gel fraco e de baixa elasticidade. Essas descobertas sobre as interações de proteínas do leite induzidas pelo calor podem auxiliar os pesquisadores a desenvolver novas variedades de queijo a partir de leite tratado termicamente.

B. Coagulação ácida do leite

Os iogurtes, assim como queijos frescos ácidos e bebidas lácticas acidificadas são alimentos fermentados populares produzidos em todo o mundo. A produção comercial do iogurte envolve acidificação gradual a 40-45°C de leite previamente tratado por calor (85°C, 10 minutos) por culturas lácticas. A fermentação da lactose em ácido láctico com a bactéria iniciadora termofílica *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, faz com que o pH do leite diminua gradualmente de 6,7 para menos de 5,0. A titulação das cargas negativas na superfície das micelas de caseína faz com que a camada de “cabelos” de κ -caseína entre em colapso, o que desestabiliza as micelas e induz à coagulação assim que o pH se aproxima do ponto isoelétrico (pH \approx 4,6). Como o pH foi reduzido, o fosfato de cálcio coloidal (CCP) é dissolvido e este fato enfraquece/altera a estrutura interna da micela. A acidificação progressiva do leite pode ser observada em três regiões distintas do pH, partindo do pH de 6,7 para 4,6 (Lucey, 2004a): (1) à medida que o pH abaixa de 6,7 para 6,0, ocorre também um decréscimo da carga negativa líquida de repulsão eletrostática; a integridade do CCP e da micela ficam preservadas; (2) uma diminuição do pH de 6,0 para 5,0 neutraliza ainda mais a superfície da micela e com o encolhimento/colapso dos “cabelos” de κ -caseína, as micelas ficam desestabilizadas estérica e eletrostaticamente; o CCP é completamente dissolvido quando o pH de 5,0 é atingido e isso aumenta a flexibilidade interna das micelas (Donato *et al.*, 2007); e (3) com um pH menor que 5,0, à medida que as micelas desestabilizadas se aproximam, interações hidrofóbicas têm início (Horne, 1998; 2001); a gelificação ocorre com o pH em 4,9 no leite não aquecido mas com um pH mais alto (\approx 5,2) em leite tratado por calor. As interações hidrofóbicas são importantes no início da coagulação, mas refrigeração ou esfriamento posterior fazem o gel inchar, aumentando a área de contato da partícula e também a firmeza/força do gel (módulo de armazenamento). Uma vez que as interações hidrofóbicas se enfraquecem em temperaturas mais baixas, a sugestão é de que a integridade do gel pode ser consequência de outras forças como as interações eletrostáticas e de van der Waals. Para mais informações sobre a gelificação ácida do leite, o leitor pode consultar Dalglish *et al.* (2005), de Kruif *et al.* (1995), Lee e Lucey (2010), Lucey (2002, 2004a; 2002b), Lucey *et al.* (1997) e van Vliet *et al.* (2004).

O aquecimento do leite (e esfriamento subsequente) antes da acidificação é o caminho para a produção de iogurtes que tenham a textura e consistência desejadas. O leite cru forma gel ácido muito fraco, provavelmente porque a interface entre a agregação das micelas ainda está dominada pelas extremidades C-terminal da κ -caseína, que, apesar de estar em colapso, pode evitar interações através de atração devido às suas tendências hidrofílicas (Li e Dalglish, 2006). No leite tratado termicamente, a agregação das proteínas do soro desnaturadas pelo calor à superfície das micelas, além da presença de partículas dispersas no soro de proteínas do soro/ κ -caseína facilita a formação de ligações cruzadas nos géis, aumentando muito a força do gel e a rigidez além de reduzir a sinérese (Lucey *et al.*, 1998; Donato *et al.*, 2007). Leite ácido tratado a calor também forma gel em pH mais alto, cerca de 5,2 comparado a géis de leite não aquecido (com pH \approx 4.9), principalmente por causa do ponto isoelétrico mais alto (\approx 5.3) da β -lactoglobulina em relação ao das caseínas (Lucey *et al.*, 1997; Guyomarc'h *et al.*, 2003).

Em alguns queijos frescos ácidos como cottage, quark e os queijos frescos franceses, uma pequena quantidade de renina também pode ser utilizada como coagulante. Estudos sobre a gelificação do leite pela acidificação e uso da renina simultaneamente têm sido objeto de muita atenção nos últimos anos (Lucey *et al.*, 2000; Gastaldi *et al.*, 2003; Li e Dalglish, 2006; Cooper *et al.*, 2010; Tranchant *et al.*, 2001). Esse método produz géis que ficam mais firmes e também se formam mais rapidamente (com um pH mais alto) do que géis acidificados. A remoção enzimática de menos de 25% da camada de “cabelos” da micela tem um efeito sinérgico na desestabilização por ácidos ou por enzimas. À medida que o pH diminui, a carga na superfície da micela decresce e a camada de CMP entra em colapso, de modo que a extensão da quebra da κ -caseína necessária para induzir a agregação fica menor em contraste com a necessidade de mais de 90% de proteólise em géis obtidos com renina pura. Senão, a κ -caseína que precisa ser hidrolisada para produzir agregação será menor (Li e Dalglish, 2006). Com menores

impedimentos estéricos pelo colapso das extremidades C-terminal da K-caseína, mesmo uma pequena fenda na camada da superfície pode permitir uma interação entre as superfícies internas das micelas. Os agregados de caseína que se formam são maiores e possuem maior conectividade (Cooper *et al.*, 2010) e dessa forma os géis combinados são mais fortes. Dependendo da concentração de renina utilizada (10-25% de proteólise), géis combinados se formam em valores de pH entre 5,0 e 5,3, em contraste com a gelificação valores de pH mais baixos (4,8-4,9) de géis ácidos (Li e Dalgleish, 2006; Cooper *et al.*, 2010). A adição de pequenas quantidades de renina durante o processo de acidificação do leite preaquecido ($\geq 85^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos) também melhora a firmeza do gel e aumenta o pH de gelificação. As ligações ou interações cruzadas entre as micelas destes géis não são totalmente formadas por proteínas desnaturadas do soro (como ocorre com o leite acidificado e aquecido), mas as superfícies internas das micelas tratadas com renina também podem estar envolvidas (Li e Dalgleish, 2006). Esse princípio é explorado na fabricação comercial do queijo tipo termo quark (Schulz-Collins e Senge, 2004).

A coagulação que usa calor e acidificação, um terceiro tipo de coagulação, inicia-se com a adição de ácido, mas sem o uso de fermentação, e o ácido é adicionado ao leite quente a temperaturas que variam de $75\text{-}100^{\circ}\text{C}$. Algumas das proteínas do soro que são lábeis termicamente coagulam-se em paralelo às caseínas e são recuperadas no queijo. Apesar de o total de proteínas recuperadas aumentar pouco (cerca de 2-5%, comparado com a coagulação pela renina), o aumento do rendimento ocorre, em grande parte, pela capacidade maior das proteínas do soro desnaturadas de reter água. O aumento da concentração de proteínas no leite também aumenta a proporção (porcentagem de recuperação) das proteínas no queijo (Hill *et al.*, 1982). A coagulação ácida a altas temperaturas requer acidificação menor de modo que o pH do queijo pronto varie entre 5,2-6,0. Em decorrência da interação das proteínas do soro desnaturadas e caseínas, o queijo não pode ser derretido, mas possui excelentes propriedades de cozimento e fritura. Exemplos destes produtos são a ricota e o panir indiano.

V. CULTURAS PARA QUEIJOS E IOGURTES

A. Funções das culturas para o queijo

O termo cultura refere-se a inóculos de bactérias, leveduras e/ou fungos preparados e inoculados, que são adicionados diretamente ao leite e/ou incorporados aos produtos lácteos fermentados em um estágio posterior durante a fabricação. LAB específicas são selecionadas como formadoras primárias de ácidos; outras culturas, que incluem leveduras, fungos, algumas bactérias específicas e outras LABs podem ser adicionadas como culturas secundárias ou adjuntas para determinados propósitos (consultar Cogan *et al.*, 2007, para uma revisão). Em termos gerais, as culturas possuem cinco objetivos quando utilizadas em produtos de leite fermentados: (1) para desenvolver acidez; (2) para desenvolver aromas/sabores típicos, por exemplo, o sabor dado pelo diacetil e acetaldeído a leite fermentado e a determinados queijos; (3) para promover a maturação do queijo (seção VII); (4) para mitigar qualidades específicas ou preocupações com a segurança como defeitos dos gases tardios em queijos causados por *Clostridium tyrobutyricum* ou um risco alimentar como a listeriose; e (5) para promover propriedades saudáveis como as fornecidas por probióticos.

McKay e Baldwin (1975) foram os primeiros a demonstrar que muitas propriedades que são de alta importância tecnológica para a fabricação de queijo estão codificadas nos plasmídeos dos lactococos. Como mencionado por Callanan e Ross (2004), em seu trabalho sobre genéticas de culturas iniciadoras, propriedades codificadas em plasmídeos incluem a capacidade de contribuir com enzimas necessárias para a hidrólise da caseína e para o transporte e metabolismo da lactose e do citrato, a capacidade de produzir bacteriocinas e a capacidade de combater fagos. A grande expansão da área de genética das LAB fica além do escopo deste capítulo; uma busca por *Food Science and Technology Abstracts* em genética ou genômica dos LABs mostrou que mais de 1.500 trabalhos

foram publicados entre 2006 e 2010. Por exemplo, uma revisão feita por Broadbent e Steele (2007a) ilustra a importância da pesquisa genômica no entendimento e direção do desenvolvimento de sabor em queijos.

B. Classificação das culturas ácido lácticas

A Tabela 8.5 traz uma lista dos nomes latinos de algumas das culturas lácticas mais comuns. Tanto as culturas homofermentativas como as heterofermentativas produzem ácido láctico como seu principal metabólito. No entanto, as culturas heterofermentativas também produzem outras substâncias tais como dióxido de carbono (CO₂) e compostos com um sabor típico como o diacetil (o composto de sabor principal em creme azedo e leite coalhado). A formação de gases nas culturas heterofermentativas cria a textura aberta desejada para alguns queijos como o gouda e o havarti.

O outro grande divisor são as culturas mesofílicas *versus* termofílicas. A faixa ótima para o crescimento de culturas mesofílicas é de 30-35°C; a produção de ácido é lenta ou ausente em temperaturas menores de 20°C e o crescimento é inibido em temperaturas acima de 39°C. Para queijos, que em geral não utilizam temperaturas altas (> 40°C) na etapa de cozimento são usadas culturas mesofílicas. Essas variedades incluem o cheddar, queijos macios maturados, a maioria dos queijos frescos e a maioria daqueles que são lavados.

As culturas termofílicas preferem temperaturas entre 40-45°C, mas são capazes de sobreviver a temperaturas iguais ou mais altas de 55°C, necessárias nas variedades de queijos processados como algumas variedades suíças e italianas. Esses tipos de queijos são geralmente cozidos a temperaturas acima de 45°C antes da separação dos coágulos e do soro. A contagem de células diminui rapidamente em temperaturas mais baixas do que 20°C, de modo que grandes volumes de culturas termofílicas não podem ser resfriadas para aumentar seu tempo de estocagem. As duas culturas mistas termofílicas mais comuns são o *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* com *Lb. helveticus* (Tabela 8.5).

TABELA 8.5 Propriedades e funções de algumas culturas lácticas

Cultura	Propriedades e funções
Culturas mesofílicas	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Como uma composição, formam a cultura mesofílica e homofermentativa mais comum, usada em muitas variedades de queijo de baixa temperatura, incluindo queijo fresco, cheddar, tipos american colby, holandeses, macios maturados e outros.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>	Com frequência são misturadas com fermento citrate <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris/lactis</i> para a produção de manteiga e leitelho e para queijos com pequenos buracos, como havarti e gouda
Culturas termofílicas	
<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ou <i>Lactobacillus helveticus</i> ou <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Em geral usam-se cocos/bastonetes para variedades de queijos de alta temperatura. <i>Lb. helveticus</i> é galactose-positivo e ajuda a reduzir o escurecimento em queijos de pizza; por ser proteolítico, pode também acelerar a maturação do queijo cheddar. <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> é uma alternativa para <i>L. helveticus</i> e <i>L. bulgaricus</i> quando menos ácido é preferível, como em queijo "estabilizado" Brie e certos iogurtes leves e probióticos.

Culturas iniciadoras termofílicas crescem juntas, em uma relação associativa ou simbiótica, na qual a taxa de crescimento e a produção de ácido de culturas mistas ficam mais rápidas do que cada uma das culturas crescendo sozinhas (Carrasco *et al.*, 2005).

A atividade proteolítica dos bastonetes produz aminoácidos e peptídeos que estimulam o crescimento dos cocos e estes últimos produzem ácido fórmico, que é necessário para os bastonetes (Galesloot *et al.*, 1968; Veringa *et al.*, 1968; Higashio *et al.*, 1977; Kikuchi *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1986). Os cocos possuem maior tolerância a

altas temperaturas e menor tolerância a ácidos, de modo que o equilíbrio dos bastonetes/cocos também é influenciado pela temperatura e pH. Em queijos cozidos, por exemplo, os cocos dominam o crescimento inicial, quando a temperatura e o pH estão altos após a separação dos coágulos, em seguida, à medida que a temperatura e o pH decrescem, são bastonetes que passam a dominar o processo. As diferenças na fermentação da galactose também são importantes do ponto de vista tecnológico: A *Lb. helveticus* metaboliza a galactose rapidamente, enquanto a *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* não o faz (Turner e Martley, 1983; Matzdorf *et al.*, 1994; Mukherjee e Hutkins, 1994; Hassan, 2000; Baskaran e Sivakumar, 2003). Esse dado é importante, pois uma metabolização rápida da galactose reduz o escurecimento pela reação de Maillard de modo que a cor da pizza, por exemplo, pode ser modificada por uma seleção de culturas.

C. Culturas secundárias e adjuntas

Há duas abordagens gerais quanto aos resultados tecnológicos específicos na utilização de culturas. A primeira é a seleção ou engenharia genética de culturas primárias a serem usadas, não somente para a acidificação, mas também para funcionalidades específicas adicionais. Por exemplo, uma cultura mesofílica heterofermentativa pode funcionar como formadora primária de ácido, assim como produzir uma estrutura de queijo aberta e com sabores característicos. A segunda abordagem é selecionar e/ou criar outros bioagentes com funcionalidades específicas. Alguns desses agentes funcionais estão descritos adiante.

A formação de grandes olhaduras em queijos suíços e em similares mais próximos é causada por *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii*. O crescimento e a produção de gás dessas bactérias são induzidos pelo aquecimento de queijos jovens a 20-25°C durante uma ou duas semanas. A permeabilidade e elasticidade do queijo são importantes e ocorrem em função de muitos fatores, por exemplo, a composição do queijo e o alcance da proteólise (Grappin *et al.*, 1993; Ekinici e Gurel, 2008). A formação de olhaduras no queijo ocorre quando a taxa da produção de gás excede o seu ritmo de permeação pelo queijo. Caso o queijo não seja suficientemente elástico, ele racha e as olhaduras não se formam.

As cascas fungadas (brancas) são em geral produzidas pelo *Penicillium camemberti* Thom, que é um híbrido de duas formas fenotópicas muito próximas entre si, a *P. album* (cor cinza-esverdeada) e *P. caseiocolum* ou *P. candidum* (branca) (consultar revisão de Chamba e Irlinger, 2004). Segundo esses autores, outros fungos brancos encontrados em queijos incluem *P. thonii*, *P. nalglovensis* e *P. verrucosum*. O sabor de cogumelos característico das variedades fungadas deve-se à produção de 1-octeno-3-ol (Spinnler e Gripon, 2004).

Com a exceção do queijo brie, considerado estabilizado, os queijos macios maturados como o camembert, brie, azul e feta são inicialmente ácidos, atingindo um pH mínimo menor que 4,8 (Tabela 8.6). O brie estabilizado atinge, em geral, um pH mínimo de 5,2. A fase de retardamento para que a casca branca se forme é reduzida pela “contaminação” ou adição de leveduras que consomem ácido láctico e reduzem a acidez. A proteólise de fungos brancos reduz ainda mais a acidez, de modo que o pH da superfície e porções maturadas internas do queijo fungado aumenta rapidamente para 6,8-8,0.

Combinado com um baixo conteúdo de cálcio e umidade alta (Tabela 8.6), o aumento do pH amacia a matriz da caseína criando, assim, a textura cremosa característica dos queijos fungados (Vassal *et al.*, 1986; Spinnler e Gripon, 2004). Um pH aumentado também explica a incidência relativamente alta de doenças decorrentes de alimentos associados aos queijos de cascas brancas, especialmente por *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*; estes organismos sobrevivem a valores de pH iniciais baixos e em seguida se multiplicam quando o pH aumenta durante a maturação (Griffiths, 1989; El-Gazzar e Marth, 1991a; Ramsaran *et al.*, 1998).

O queijo azul é produzido por fungos azuis/verdes que produzem veios em seu interior, principalmente o *Penicillium roqueforti*, e é do tipo em que foi utilizada renina para a coagulação. No entanto, há algumas

variedades coaguladas por ácidos, principalmente os queijos de cabra, os *chèvre*, que são maturados na superfície com fungo azul. Os fungos azuis produzem um efeito similar ao descrito anteriormente para fungos brancos (mas em dose menor), isto é, eles aumentam o pH e amaciam a textura. Para queijos tipo *chèvre*, maturados pela superfície, a proteólise e um pH aumentado na superfície tendem a criar uma camada gelatinosa sob a casca.

TABELA 8.6 Algumas propriedades do queijo classificadas de acordo com o tipo de coagulação e procedimentos utilizados para controle de pH e umidade^a (Hill, 2007)

Categoria	Exemplos	Coagulação^b	MNFS^c	pH^d	Cálcio^e	Maturação
1. Coagulado por ácido	Frescos: cottage, quark, creme. Maturados: Valençay, Harzer	Coagulação predominantemente ácida a pH 4,6-4,9; coalho: -1.200 IMCU/1.000 litros de leite	72-80%; a_w 0,980-0,997; controlado pelos tratamentos de cozimento e lavagem	4,3-4,9; inibição da cultura por pH baixo, alta temperatura de cozimento, resfriamento e/ou lavagem rápidos	50-350	Em geral consumido fresco; ou fungados e de consistência macia
2. Coagulado por ácido e calor	Queijos de massa cozida: panir e Channa, ricota, requeijão; cremosos: mascarpone	Proteínas do soro coprecipitam com caseínas e inibem o derretimento	75-84%; a_w 0,975-0,997; aumenta com o conteúdo da proteína do soro, diminui com o cozimento após acidificação	5,0-5,8; quantia de acidulante adicionado; 3-6% da lactose no queijo decorre da ausência de fermentação		Consumido fresco, salvo quando embalado a quente, em salmoura, ou conservado em calda
3. Fresco: coagulação por coalho	Queijo branco hispânico para fritar; queijo fresco italiano	Coalho+; pouca ou nenhuma cultura; pH de corte 6,4-6,6; o leite pode ser salgado antes de coalhado	60-80%; controlado pelo cozimento, misturação, moer antes da drenagem, salgamento do tanque; sinérese ocorre frequentemente no acondicionamento	5,8-6,6; pouca ou nenhuma cultura; pH alto previne o derretimento		consumido fresco; pH alto limita o prazo de validade; variedades hispânicas podem desenvolver aroma fermentado
4. Maturados macios	Feta, Camembert, azul	Coalho+++; cultura+++; tempo de maturação+++; pH de corte 6,5-6,4	60-70%; a_w 0,940-0,980; sinérese induzida pelo desenvolvimento ácido e pelo salgamento	4,5-4,8; inibição ácida da cultura, salgamento e resfriamento	400-600	2-8 semanas
5. Mesofílicos lavados	Gouda, edam, colby, havarti, montasio e muitos outros	Coalho++; cultura++; tempo de maturação++; pH de corte 6,6-6,5	55-65%; a_w 0,950-0,970; controlado pelo cozimento, temperatura da água de lavagem, taxa de desenvolvimento ácido, manejo da coalhada, tratamentos de salga	4,8-5,2; etapa de lavagem para remover lactose	500-700	2 semanas-12+ meses
6. Mesofílicos não lavados	Cheddar, Provolone	Coalho++; cultura++; tempo de maturação++; pH de corte 6,6-6,5	52-60%; a_w 0,940-0,960; controlado por cozimento, maturação da coalhada, taxa de desenvolvimento e salgamento	5,0-5,3; taxa de desenvolvimento de ácido e umidade determinam a lactose residual; pH de drenagem é fundamental	500-700	1-24+ meses
7. Termofílico	Tipos suíços e italianos duros	Coalho+; cultura+; tempo de maturação+ ou nenhum; pH de corte > 6,6	39-52%; a_w 0,900-0,960; controlado por cozimento em alta temperatura (52-55 °C)	5,1-5,3; acidez e umidade determinam a lactose residual; pH de drenagem é fundamental	600-800	1-24+ meses

^a a_w = atividade de água.

^b Dados representativos de várias fontes são fornecidos para definir amplas extensões e tendências unicamente.

^c Os símbolos + indicam quantias de coalho e cultura e tempo de maturação relativo a outras categorias.

^d Umidade em substância não graxa.

^e pH mínimo alcançado durante produção ou nos primeiros dias de maturação 5 mM/kg sólidos não graxos.

^f Conteúdo de cálcio em mM por kg de queijos sólidos não graxos.

Linhagens disponíveis comercialmente de *P. camemberti* e de *P. roqueforti* variam em suas propriedades lipolíticas e proteolíticas. A β -oxidação de ácidos graxos livres durante a lipólise produz metil cetonas e seus álcoois secundários, alguns deles possuindo importantes perfis de sabor (Collins *et al.*, 2004). A proteólise inclui todas as caseínas principais. Algumas linhagens de *P. roqueforti* são mais lipolíticas e produzem os perfis de sabor rançoso típico dos queijos azuis dinamarqueses; outras linhagens proteolíticas, que são menos lipolíticas,

produzem sabores mais adocicados, como no queijo Stilton.

As *cascas maturadas/lavadas/mistas* são formadas por misturas complexas de leveduras, várias bactérias corineformes, por exemplo, a *Brevibacterium linens*, várias espécies de *Micrococcus* e *Staphylococcus*, algumas vezes com o uso de fungos e outros (consultar revisão de Chamba e Irlinger, 2004). Semelhante às variedades de queijo com casca branca, o pH da superfície da variedade de queijos com cascas maturada/ lavada ou mistas aumenta durante a maturação, mas, em geral, com extensões diferentes. Há evidências que a *Listeria monocytogenes* consegue crescer em alguns queijos com casca lavada ou maturada (El-Gazzar e Marth, 1991b; Farrag e Marth, 1992; Rudolf e Scherer, 2001). Em uma pesquisa desafiadora que estudou 24 queijos disponíveis comercialmente (Genigeorgis *et al.*, 1991), a *L. monocytogenes* demonstrou sobreviver, mas não crescer, em queijos com superfícies com pH mais baixo do que 5,5.

Os *adjuntos de maturação* incluem culturas de bactérias ou de leveduras adicionadas junto com culturas ácidas lácticas comuns, culturas atenuadas que não devem crescer, mas somente contribuir com suas enzimas e culturas de bactérias adjuntas, como os *Lactobacillus* e *Pediococcus*, as quais se espera que cresçam durante a maturação do queijo e também contribuam com enzimas. Em variedades de queijos cozidos, por exemplo, o *Lb. bulgaricus* é o principal formador de ácido assim como agente de maturação proteolítico, mas em queijos envelhecidos mesofílicos como o cheddar, o *Lb. bulgaricus* e às vezes outros lactobacilos como o *Lb. casei* são utilizados, principalmente, como adjuntos de sabor que contribuem com as aminopeptidases (Simova e Beshkova, 2007; Slattery *et al.*, 2010). A busca por adjuntos que ajudem na maturação é atualmente uma área de pesquisa ativa, muitas vezes utilizando bactérias não iniciadoras e leveduras de queijos tradicionais (consultar seção VII e revisões: Laleye *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 2002; Broadbent e Steele, 2007b; Nieto-Arribas *et al.*, 2009; Law, 2010a; Milesi *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010).

As *bacteriocinas das LAB* são classificadas como lantibióticas, não lantibióticas pequenas e estáveis ao calor, e bacteriocinas grandes e estáveis ao calor (consultar resumo de Parente e Cogan, 2004). Muitos lactococos produzem bacteriocinas que, quando combinadas com outros fatores de controle, podem auxiliar no controle do crescimento de não iniciadoras (Rea *et al.*, 2003) e de bactérias patogênicas como a *L. monocytogenes* (Dal Bello *et al.*, 2010). Recentemente, esta tem sido uma área de investigação muito ativa e muitos esforços têm sido feitos para identificar novas fontes de bacteriocinas associadas às LAB e suas aplicações potenciais em vários produtos alimentares, como carnes prontas para o consumo. Exemplos incluem: (1) identificação das espécies produtoras de bacteriocinas de *Lactobacilos*, *Pediococcus* e *Enterococcus* de várias fontes (Todorov, 2008; 2010; Tome *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2010; 2011a-c); (2) uso de espécies de lactococos produtores de nisina para melhorar a segurança de queijos com baixo teor de sal Domiati (Ayad, 2009); (3) descrição do lantibiótico mutacina 1140 produzido pelo *Streptococcus mutans* (Smith, 2002); (4) descrição da pentocina 31-1, uma bacteriocina antilistéria produzida pelo *Lactobacillus pentosus* (Zhang *et al.*, 2009); (5) descrição das bacteriocinas produzidas pelo *Lb. acidophilus* e sua dependência do pH (Soomro e Masud, 2008); (6) produção de enterocina por *Enterococcus faecium* em queijos Cheddar (Rea *et al.*, 2003); (7) descrição da macedocina produzida por *Streptococcus gallolyticus* subesp. *macedonicus* (Leroy e De Vuyst, 2010); (8) Martin-Visscher (2010) verificou na tese de doutorado que cada uma das quatro bacteriocinas de LAB (nisina, galidermina, CclA e enterocina 710C) matou uma linhagem ou mais de *E. coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207 e *Salmonella typhimurium* ATCC 23564; e (9) inibição do defeito de gás tardio (*Clostridium beijerinckii* INIA 63) em queijos Manchego pela nisina e lacticina 481 produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415 (Garde *et al.*, 2011). As culturas que colaboram com a funcionalidade da saúde serão discutidas na seção VIII, B.

Exopolissacarídeos produzidos por algumas bactérias não iniciadoras e iniciadoras podem ser importantes para a promoção da saúde e como agentes de corpo ou textura em produtos de leite fermentados e melhorando, especialmente, a textura de queijos com baixo teor de gordura (consultar revisões de Vlahopoulou *et al.*, 2001; Zisu e Shah, 2005; Hassan, 2008; Robitaille *et al.*, 2009; Welman, 2009; Costa *et al.*, 2010; Badel *et al.*, 2011).

D. Gerenciamento das culturas

Sem o uso de resfriamento do leite, e se o fabricante tiver muita paciência, é possível produzir produtos lácteos fermentados sem culturas adicionais, mas a prática mais utilizada é a de adicionar culturas domesticadas para a fabricação de queijos, sejam eles pasteurizados ou crus. Em termos gerais, por definição de padrões, as culturas são selecionadas e mantidas, em geral, de três maneiras: iniciadoras naturais, linhagens iniciadoras mistas e linhagens iniciadoras definidas.

1. Culturas naturais

A prática de utilizar culturas naturais baseadas em técnicas de manipulação tradicionais das culturas foi preservada, especialmente entre os fabricantes de queijo artesanais, e em alguns casos seguindo padrões de identidade de queijos nacionais e/ou internacionais, por exemplo, a AOC. Para culturas primárias ou secundárias de LAB, a maneira mais simples de técnicas de manipulação é a “back-slopping”, na qual uma pequena porção de produto fermentado é utilizada para inocular uma nova quantidade. Por exemplo, o iogurte pronto pode ser usado como inóculo para nova batelada. Assim como queijos com superfície branca podem ser inoculados ao colocar o queijo jovem na área de cura ao lado de queijos mais velhos. Da mesma maneira, culturas para queijos de casca lavada podem ser transferidas por meio de prateleiras de madeira ou aros, ou lavando os queijos jovens em salmouras que já foram utilizadas previamente para lavar queijos mais velhos. Outro exemplo do tipo “back-slopping” é o do queijo siciliano Ragusano, no qual o PDO requer que o leite seja fermentado em recipientes de madeira denominados tina. Lortal *et al.* (2009) descobriram que a maior parte da superfície interna do recipiente fica coberta por um filme biológico, uma matriz de exopolissacarídeo, que é a fonte da cultura iniciadora primária.

As culturas iniciadoras naturais primárias são preparadas a partir do leite ou do soro. As várias técnicas foram revistas por Limsowtin *et al.* (1996) e resumidas por Parente e Cogan (2004). Tanto em leite quanto em soro, pressão seletiva é aplicada às linhagens iniciadoras naturais mediante tratamento por calor, temperatura de incubação e tempo de incubação. Por exemplo, Parente e Cogan (2004) relataram que uma cultura de leite tradicional composta principalmente de *S. thermophilus*, mas que também contém certo número de outras LAB pode ser preparada por tratamento térmico (62-65°C) seguida de incubação a 37-45°C. De modo semelhante, a cultura natural baseada em soro para a produção de parmigiano reggiano (parmesão) e grana padano, compostos principalmente por *Lb. Helveticus* acidúrico com baixa quantidade de outras LAB termofílicas (*S. thermophilus*) é preparado por incubação do soro fresco a 45°C até alcançar um pH baixo ou igual a 3,3. Outro exemplo, prescrito pelo AOC, é o iniciador de soro (denominado Recuite) para queijos comté. Segundo o Dr. Sébastien Roustel (comunicação pessoal), intestinos secos de bezerros podem ser aquecidos em soro fresco a 54-55°C por 34 minutos e fermentados a 42°C por uma noite. Vinagre pode ser adicionado para promover crescimento de LAB acidúricas. A contagem do número de LAB em soro é, em geral, 10^{6-7} /ml depois da fabricação do queijo e de 10^{9-10} /ml em Recuite após fermentação.

Culturas naturais possuem a desvantagem de ter um desempenho inconsistente e a vantagem inerente de resistir ao fago, apesar de os fagos ainda terem capacidade de causar um retardamento no tanque ao se ligar a linhagens dominantes. Culturas iniciadoras naturais, incluindo as espontâneas (iniciadoras que crescem espontaneamente em leite cru não esfriado) também são usadas como coiniciadoras ou iniciadoras adjuntas. Um dos exemplos é o AOC para o queijo gruyère, que é feito a partir de uma mistura de leite coletado de manhã e de noite e que não são resfriados para menos de 15°C. A cultura espontânea é suplementada, em seguida, com culturas mistas. Outro exemplo é a prática comum de tratamento térmico de subpasteurização de leite para queijo Cheddar para reduzir patógenos e selecionar pediococos termofílicos e lactobacilos que contribuem com aminopeptidases e outras enzimas.

Culturas naturais também são fontes genéticas ricas em LAB. Técnicas de identificação rápida, por exemplo, a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) torna possível analisar grande número de amostras. Uma pesquisa feita em 2011 de produtos lácteos com leite de iaques, cabras, ovelhas e vacas na Mongólia, com base na análise de 16s RNA identificou um total de 664 linhagens e 10 espécies de LAB, dos quais o *S. thermophilus* e o *Lb. helveticus* foram as espécies mais abundantes (Yu *et al.*, 2011). De modo semelhante, Morales *et al.* (2010) identificaram e caracterizaram as propriedades lipolíticas e proteolíticas de 10 LAB halotolerantes/halofílicos nos queijos mexicano cotija e duplo creme. Consulte também a caracterização do LAB em queijos artesanais feitos com leite de cabra (Colombo *et al.*, 2010) e um queijo artesanal da Córsega (Casalta *et al.*, 2009).

2. Culturas iniciadoras mistas e definidas

Culturas iniciadoras primárias preparadas em condições controladas são culturas iniciadoras mistas (MSS) ou cultura iniciadora definida (DSS) (consultar Limsowtin *et al.*, 1996; 1997; Parente e Cogan, 2004). Em resumo, as culturas MSS são preparadas com culturas de fontes naturais que mantêm, porém, linhagens indefinidas que são diferentes quanto a propriedades como metabolismo do açúcar, metabolismo de citrato e produção de bacteriocina. Quanto à resistência a fagos, as MSS podem conter linhagens que são resistentes e linhagens líticas e podem abrigar seus fagos próprios (Lodics e Steenson, 1993). A diversidade pode, portanto, fornecer alguma proteção embora, como nas culturas naturais, as linhagens principais tornam-se susceptíveis. Quanto ao desempenho, a proporção das linhagens evolui constantemente, de modo semelhante às culturas naturais, de modo que propriedades como a taxa de desenvolvimento da acidez e as atividades das enzimas durante a maturação podem deixar de ser consistentes.

As DSS são selecionados de culturas mistas através de um intensivo crescimento de subculturas à fim de obter desempenhos que podem ser repetidos e que atinjam diretamente os objetivos quanto ao desenvolvimento do sabor e da textura. As culturas iniciadoras DSS originais na Nova Zelândia foram baseados em uma linhagem única resistente a fagos com rotações diárias da cultura para evitar que os fagos se desenvolvessem. No entanto, os fagos continuavam a surgir e as rotações diárias das culturas eram muito tediosas. Linhagens múltiplas foram, então, introduzidas. As práticas atuais para culturas DSS se baseiam cada vez menos em rotações e mais na melhoria da resistência a fagos. Uma rotação diminuída também melhora a consistência do desempenho.

Em resumo, parece que a diferença entre culturas naturais, MSS e DSS deve tornar-se menos importante com a aplicação de técnicas rápidas que isolam, identificam com precisão e caracterizam propriedades funcionais de muitas espécies e linhagens de micro-organismos além da oportunidade de utilizar essas informações para criar misturas, embora complexas, mas de culturas definidas que mimetizam as culturas naturais e são responsáveis por um entendimento mais preciso de outros micro-organismos que são agentes de fermentação e de maturação. Em outras palavras, com capacidade cada vez maior para atingir, inteligentemente, um equilíbrio geral das atividades de fermentação e de maturação, as estratégias de culturas podem tornar-se mais holísticas. Um bom exemplo disso é o desenvolvimento recente de culturas para queijos de cascas lavadas e maturadas. É bem conhecido que queijos de cascas lavadas podem abrigar *L. monocytogenes* (Rudolf e Scherer, 2001; Wagner *et al.*, 2006) e esse fato foi exacerbado pela prática comum de utilizar diferentes tipos de “back-slopping” para transferir culturas de queijos velhos para queijos jovens. Isso levou à criação de culturas comerciais e pesquisas para o preparo de culturas de linhagens mistas ou definidas para substituir o “back-slopping” (Bockelmann e Hoppe, 2001; Hannon *et al.*, 2004) ou para mitigar o risco. Uma pesquisa de 2011 relatou que linhagens antilistéria foram isoladas da casca lavada de queijo raclette (Roth *et al.*, 2011) e sugeriu ser possível melhorar a segurança ao suplementar as culturas naturais de queijos com casca maturada com culturas antilistéria. Isso pode ser um fato importante se levarmos em consideração o grande número de queijos com PDO ou outros específicos com casca maturada natural e o

crescimento da indústria de queijos artesanais em muitos países.

3. Manipulação das culturas nas fábricas

As culturas são especialmente preparadas para inocular o leite para o processamento de queijos e iogurtes para preparação de volumes maiores (uma transferência e uma ampliação da cultura comercial) ou culturas que são inoculadas diretamente nos tanques (e não requerem uma ampliação na fábrica de queijos). Alta contagem de células para culturas de volumes maiores pode ser obtida mediante pH, utilizando soluções tampões ou por controle externo do pH titulando com hidróxido de sódio ou amônio. A inclusão de sais de fosfato no meio da cultura evita, efetivamente, a proliferação de bacteriófagos em culturas de grande volume (Suarez *et al.*, 2007). A experiência industrial sugere que as culturas mesofílicas de grande volume podem ser resfriadas para perto de 4°C e armazenadas por até 7 dias. Culturas termofílicas não devem ser resfriadas para temperaturas menores de 20 °C e têm vida útil de apenas 24 horas.

4. Bacteriófagos

A experiência industrial sugere que os bacteriófagos continuam a ser uma barreira significativa para os fabricantes de queijo, especialmente em culturas mesofílicas e para processamento em tanques abertos que ficam expostos ao ambiente. Os fagos comuns associados a produtos lácteos são os c2, 936 E p335 (Ahn *et al.*, 2009). Ciclos de vida lisogênicos e líticos acontecem. Com um período latente curto de 30-50 minutos e uma grande capacidade de explosão de 50-175, os fagos líticos podem se multiplicar rapidamente e destruir uma cultura em algumas horas. O crescimento de culturas é interrompido quando o nível de fagos atinge 10^3 - 10^7 /ml. Falhas na cultura por causa de fagos podem ser reconhecidas por uma formação normal de ácido no início, seguido por uma diminuição ou término do crescimento da cultura em uma etapa mais tardia. Esse é um processo diferente da inibição em consequência de antibióticos, que é caracterizada por nenhum ou crescimento inicial lento. Se a inibição por antibióticos não for radical, o crescimento da cultura e o desenvolvimento da acidez causado por linhagens resistentes ou mutantes pode recomeçar algum tempo depois.

Modos de evitar a infecção de culturas utilizando bacteriófagos incluem: (1) rotação da cultura, um método eficiente pois bacteriófagos são altamente (embora não de todo) dirigidos a linhagens específicas; (2) uma boa higiene geral, em especial quanto à separação de soro imediatamente depois da sua separação dos coágulos (removendo ou pasteurizando o soro logo após sua separação dos coágulos); (3) testes rotineiros para avaliar o desenvolvimento da acidez normal, quando a cultura que está sendo utilizada foi cultivada em leite desnatado que contém pouco soro do tanque que foi utilizado por último; e (4) seleção do LAB com resistência inerente a fagos. Há um grande número de trabalhos sendo feitos visando a caracterização de fagos do LAB (consultar textos de Limsowtin *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2008; Suarez *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2009; Powell, 2010; Quiberoni *et al.*, 2010; Zinno *et al.*, 2010).

VI. MANUFATURA DE QUEIJOS

Os ingredientes essenciais para a fabricação de queijo são o leite, um coagulante de proteína como a renina e/ou ácido que é normalmente produzido pelo LAB. Apenas renina e ácido, sozinhos ou juntos, fazem que as proteínas do leite se agreguem e, finalmente, transformem o leite fluido em um gel mais ou menos firme (seção IV). Quando esse gel é cortado em pequenos pedaços (coágulos), o soro (composto principalmente por água e lactose) começa a separar-se dos coágulos. Os coágulos são, em seguida, tratados com procedimentos diferentes de fabricação de queijo para produzir todas as diferentes variedades. As exceções da gelificação são as variedades coaguladas por

ácido e calor (Tabela 8.6, Categoria 2) na qual os coágulos são recuperados como agregados (precipitados) que decantam ou flutuam.

As propriedades de alguns dos representantes das variedades de queijo estão listadas na Tabela 8.6 e agrupadas em famílias de acordo com procedimentos básicos de processamento. Descrições detalhadas dessas famílias de queijos podem ser encontradas no trabalho de Hill (2007). Receitas de queijos representando cada uma das famílias que constam da Tabela 8.6 também podem ser encontradas em Hill (2011). Utilizando essas categorias, a maioria dos queijos pode ser classificada em grupos tecnológicos, mas elas não podem, porém, ser aplicadas de maneira rígida. Por exemplo: (1) as variedades de pasta filata variam muito em composições, técnicas de processamento e grau de maturação, de modo que não se ajustam perfeitamente em uma só categoria; e (2) a manufatura dos queijos tipos Cheshire é semelhante à do cheddar até o momento da drenagem, mas após essa fase seu alto grau de desenvolvimento de acidez é semelhante ao do feta.

Sobre a qualidade, o objetivo do processador de queijo era: (1) conseguir obter uma composição ótima quanto à umidade, acidez (pH), gordura, proteínas e minerais (especialmente cálcio); (2) estabelecer uma ultraestrutura correta da queijo a nível microscópico; e (3) maturar o queijo até atingir o sabor e a textura desejados. Os objetivos (1) e (2) são atingidos ao variar os procedimentos iniciais de processo e, assim, atingir os objetivos (3) (Adda *et al.*, 1982; Green e Manning, 1982; Lawrence *et al.*, 1983, 1984). Essas variações nos procedimentos iniciais da preparação são, em geral, maneiras diferentes de controlar a taxa e extensão do desenvolvimento do ácido e a taxa e extensão da liberação de umidade. A Figura 8.2 é um fluxograma que ilustra as principais operações unitárias que podem ser aplicadas no processamento do queijo, dependendo da variedade a ser produzida. Uma discussão detalhada dessas operações alternativas encontra-se além do objetivo deste capítulo e os próximos parágrafos descrevem os princípios que podem ser aplicados para controlar os mais importantes parâmetros da fabricação do queijo, isto é, a variação do pH, umidade, cálcio, textura e sabor. Muitas informações que serão apresentadas nesta seção são discutidas com detalhes no trabalho de Hill (2007).

A. Controle da umidade

A fabricação do queijo é um processo de remoção da umidade de um coágulo obtido do tratamento do leite com renina ou ácido, que é feito de glóbulos de gordura (a não ser quando se utiliza leite desnatado) e de gotas de água presas em uma matriz de micelas de caseína. O queijo é, antes de tudo, um concentrado de proteínas do leite (caseínas) e gordura. As muitas operações para o processamento do queijo têm por objetivo o processo de remover a água do gel do leite pela indução de sinérese. A sinérese refere-se à contração das redes de proteína que resultam na expulsão da água (soro) do coágulo. A contração ocorre, principalmente, em razão de interações hidrofóbicas que são reforçadas por uma temperatura máxima de cerca de 80°C. Isto significa, por exemplo, que as variedades de queijo termofílicas (cozidas) possuem tempo de processamento curto porque as temperaturas de tratamento mais altas (de até 52°C) seca os coágulos rapidamente. A contração também é ajudada pela redução da repulsão eletrostática causada por uma diminuição do pH na direção do ponto isoelétrico das caseínas (pH de 4,6). O soro contém lactose, proteínas do soro, ácido láctico e alguns minerais do leite. O conteúdo de umidade, portanto, influencia o pH final do queijo porque determina a quantidade de lactose residual/fermentável do queijo. A taxa de redução do pH, por sua vez, influencia a umidade do queijo ao afetar a taxa e extensão da sinérese. A umidade final do queijo também é fortemente influenciada pelas condições de embalagem e de maturação (seção VII).

B. Controle do pH

O desenvolvimento correto da acidez, como indicado pela taxa de variação do pH, é a ferramenta de controle do processo mais importante e determina a segurança e a qualidade do queijo. Pontos críticos de controle do processo são valor de pH na drenagem, o pH quando o queijo é salgado em variedades que são salgadas antes da sua formação, o pH quando da desmoldagem, ou até 24 depois do processamento, o pH mínimo de 1 a 14 dias depois de ser fabricado e o pH do queijo maturado. Alguns perfis típicos de pH estão reproduzidos na Tabela 8.7. Quanto ao pH mínimo, que é, geralmente, alcançado sete dias depois da maturação, a maioria das variedades coaguladas usando renina podem ser classificadas em três grupos: (1) variedades frescas com pouco ou nenhum desenvolvimento de ácido e pH mínimo > 5,8-6,5 (Tabela 8.6, Categoria 3); (2) variedades maturadas macia com pH mínimo de < 5,0 (Tabela 8.6, Categoria 4); e (3) variedades com pH mínimo > 5.0 (Tabela 8.6, Categorias 5-7).

Uma acidez aumentada induz a sinérese (pela baixa carga de repulsão entre as micelas de caseína), que causa solubilização do CCP e rompimento das micelas de caseína (seção IV). Isso altera a textura dos coágulos e resulta em teores reduzidos de lactose nos coágulos devido à fermentação (conversão em ácido láctico) e sinérese (lactose removida do soro). O desenvolvimento do ácido ocorre principalmente no interior do coágulo, pois a maioria das bactérias, depois da coagulação, fica presa na matriz do gel. O valor mínimo do pH é atingido, geralmente, de 3 a 14 dias depois da manufatura e depende: (1) da extensão inicial do desenvolvimento do ácido; (2) da quantidade de lactose fermentável que permanece durante o início da coagulação; e (3) da atividade e concentração dos agentes da maturação que utilizam ácido láctico e/ou causam a proteólise. Para o controle do pH também é importante a adição de sal, que reduz a taxa de desenvolvimento do ácido e a capacidade da cultura de fermentar a galactose.

C. Controle do cálcio

Maior quantidade de cálcio é retida quanto maior for o pH na etapa de drenagem. Por exemplo, o conteúdo de cálcio do queijo suíço (drenagem em pH de 6,3-6,5) é maior do que o do cheddar (drenagem em pH de 6,0-6,2). O parâmetro importante é a razão do cálcio total em relação à caseína ou do cálcio a sólidos não gordura (NFS), que é mais fácil de ser medida (ver Tabela 8.6). Pouco cálcio fica retido no queijo feta, algo que ainda precisa ser explicado. Os coágulos do feta são colocados em formas mais cedo, enquanto o pH ainda está bem alto. No entanto, a umidade também está alta neste momento porque não houve cozimento. A diminuição do pH enquanto o queijo está nas formas além dos altos níveis de sal usados no feta aumentam muito a sinérese e a remoção da umidade associada. O resultado final é que uma grande parte da umidade (soro) é removida com o pH baixo e alta concentração de sal e a maioria do fosfato de cálcio também é removida ao mesmo tempo. Isso também ocorre com outros queijos maturados macios como o azul e o camembert. Além do mais, os procedimentos de fabricação de queijos maturados macios demandam um longo tempo de fermentação antes da adição da renina e um tempo longo para que atinja o ponto desejado. O desenvolvimento do ácido antes do corte facilita a liberação dos minerais para o soro. O grau de solubilidade do fosfato de cálcio das micelas determina a extensão da quebra da micela de caseína que, por sua vez, determina a estrutura básica do queijo.

TABELA 8.7 Perfis de pH versus tempo para diversas variedades de queijo (Hill, 2007)

Operação	Tipo suíço		Gouda		Cheddar MNFS 53%		Cheddar MNFS 57%		Feta		Cottage	
	Tempo	pH	Tempo	pH	Tempo	pH	Tempo	pH	Tempo	pH	Tempo	pH
Adição de iniciador	0	6,60	0	6,60	0	6,60	0	6,60	0	6,60	0	6,60
Adição de coalho	15 min	6,60	35 min		60 min	6,55	30 min	6,55	75 min	6,50	60 min	6,50
Corte	45 min	6,55	70 min	6,45	90 min	6,50	75 min	6,50	115 min		300 min	4,80
Drenagem ou imersão em formas	150 min	6,35	100 min		210 min	6,20	195 min	6,3	130 min	NA	360 min	

Moagem	NA	NA	NA	NA	360 min	5,40	315 min	5,45	NA	NA	NA	NA
Pressão	165 min	6,35	130 min		420 min	5,35	390 min	5,40	NA	NA	NA	NA
Demoldagem	16 h	5,30	8 h	5,40	24 h	5,20	10	5,20	24 h		NA	NA
pH mínimo	1 semana	5,20	1 semana	5,20	1 semana	5,10	1 semana	5,10	1 semana		NA	NA
Varejo	6 meses	5,6	6 meses	5,6	24 meses	5,50	4 meses	5,3	6 semanas	4,4	2-14 dias	5,2

MNFS: umidade como percentual de sólidos não gordurosos no queijo.

D. Textura (corpo do queijo)

Quando os classificadores de queijos referem-se à textura querem dizer, na maioria das vezes, a quantidade e tipo de aberturas ou olhaduras existentes no produto. Aqui, textura se refere aos atributos sensoriais de firmeza, elasticidade, fragilidade etc. Uma textura típica em queijos jovens em geral indica defeitos no sabor depois de algum tempo. Um importante objetivo na fabricação de queijos é, portanto, o de desenvolver uma ultraestrutura correta que conduzirá à textura desejada para o queijo (consultar textos de Olson *et al.*, 1996; Gunasekaran e Mehmet Ak, 2003; Lucey *et al.*, 2003). Os principais elementos que determinam a textura são os que seguem.

A *porcentagem de gordura no extratoseco* (FDM) varia de 60% para variedades duplo creme, passando por 50% para aquelas variedades denominadas gordo e 30% para variedades semigordo que são parcialmente desnatadas, como o queijo para pizzas. Os glóbulos de gordura quebram e enfraquecem a matriz de caseína, de modo que alto conteúdo de gordura amacia a textura do queijo. O FDM é determinado, principalmente, pelas proporções relativas da gordura e das proteínas do leite.

A *porcentagem de umidade em sólidos não gordura* (MNFS), que varia de 40% a 80% em variedades coaguladas por renina (Tabela 8.6), também enfraquece a matriz da caseína e deixa o queijo mais macio.

O *perfil do pH* é extremamente importante para a textura do queijo. Queijos coagulados por renina com pouco desenvolvimento de ácido (pH > 5,8; Tabela 8.6, Categoria 3) é mastigável e quebradiço, não derrete nem estica quando aquecido. Pode ser usado, portanto, em pratos salteados, por exemplo. Queijos coagulados com renina com um pH mínimo que varia de 5,3-5,0 (Tabela 8.6, Categorias 5 e 6) pode ser esticado ou derretido ao ser aquecido conforme seu grau de maturação. À medida que o queijo envelhece, a matriz de proteína sofre uma quebra de modo que as caseínas tornam-se mais fáceis de derreter e mais difíceis de esticar. Por fim, queijos coagulados através de renina com pH mínimo < 5,0 (Tabela 8.6, Categoria 4) é quebradiço (por exemplo, feta e cheshire). Apesar de um pH baixo tornar solúvel o fosfato de cálcio e romper as micelas de caseína, as proteínas de caseína permanecem intactas e fortemente comprimidas devido à reduzida repulsão de carga. Portanto, enquanto o feta permanece quebradiço, o camembert amolece e fica suave pelo teor alcalino da amônia liberada durante a maturação.

O *conteúdo de cálcio* e as proporções relativas do cálcio solúvel e insolúvel/coloidal combinado com seus efeitos interativos com o pH são fatores determinantes para a textura do queijo (Lee *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2006a; 2006b). A taxa de queda do pH até o momento da drenagem, além da sinérese pós-drenagem determinam o conteúdo de cálcio do coágulo, e o pH mínimo do coágulo determina a distribuição do cálcio solúvel e do insolúvel no queijo. Assim o pH, junto com o cálcio, influenciam a força da matriz de caseína e, portanto, a textura. Em queijos salgados em salmouras é importante que a concentração de Ca²⁺ e o pH da salmoura fiquem em níveis similares àqueles do queijo. Um pH alto e/ou um Ca²⁺ baixo levam a uma maior troca de íons (Ca²⁺ na salmoura e Na⁺ no queijo) para produzir mais caseinato de sódio. O resultado são cascas de queijo úmidas e sem consistência (Genigeorgis *et al.*, 1991).

Os *aspectos físicos e temporais da manipulação dos coágulos* são diversos e têm muita influência na textura e sabor. Alguns dos muitos exemplos que poderiam ser citados são os seguintes:

- Queijos com olhaduras (suíços) requerem uma textura fundida e suave que é obtida ao formatar e/ou comprimir o coágulo com o soro morno.
- A salga no tanque na qual o coágulo é salgado antes de ser formatado ou comprimido (cheddar, cheshire e variedades do tipo norte-americano) cria uma estrutura granular específica que não se funde tão suavemente ou completamente como as variedades salgadas na salmoura. Salgar no tanque em vez de usar salmoura ou salgar a superfície é talvez a diferença mais importante entre as variedades europeias e suas imitações americanas como o havarti americano e a muçarela americana.
- Um dos mais interessantes processos na manipulação dos coágulos é a operação de esticar feita na manufatura dos queijos pasta filata e seus vários tipos étnicos em todo o mundo. A pasta filata tradicional é um queijo mesofílico similar ao cheddar nas etapas iniciais do processamento. Depois de “cheddaring”, o cheddar é moído, salgado, formatado e comprimido enquanto os tipos pasta filata tradicionais são moídos, imersos em água quente e esticados. A estrutura e textura do queijo que foi esticado dependem de todos os fatores citados e também de outros: umidade, conteúdo de gordura, atividade da plasmina, variação do pH, cálcio total e insolúvel, temperatura e tempo de aquecimento antes de ser esticado, além do tempo de maturação (Walsh *et al.*, 1998; Guinee *et al.*, 2001; Feeney *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2002; O’Mahony *et al.*, 2006b; Tunick e Van Hekken, 2006).

E. Controle do sabor

Em termos amplos, o desenvolvimento de sabor envolve a retenção e/ou adição de agentes de maturação e o controle de suas atividades ao longo do tempo. Consultar o texto recente de Weimer (2007) sobre este assunto. O aquecimento do leite e a clarificação do leite determinam o número e os tipos de bactérias não iniciadoras presentes no leite. O desenvolvimento de compostos de sabor pode ser direcionado utilizando-se seleção das culturas, coagulantes e outros aditivos, como as lipases. Culturas que diminuem o sabor amargo, por exemplo, reduzem os fragmentos de proteínas amargas para peptídeos mais curtos e sem amargor e são uma ferramenta importante para reduzir o gosto amargo assim como aumentar a vida útil do produto para variedades que possuem alto teor de umidade, por exemplo, o Monterey Jack, e variedades com baixo teor de gordura. Veja o texto sobre agentes de maturação na seção VII.

Todos os procedimentos de cozimento e manipulação dos coágulos provocam efeitos específicos nos vários agentes de maturação (bactérias e enzimas) e determinam os tipos e quantidades/níveis desses agentes biológicos que permanecem no coágulo para maturar o queijo. Por exemplo, as plasminas, enzimas do leite, preferem um pH neutro ou levemente alcalino e são inativadas em pH baixo. As variedades nas quais a maturação ocorre em pH alto, portanto, têm maior retenção e maior atividade de plasminas. A atividade das plasminas é aumentada quando aquecida a temperaturas mais altas pela ativação da plasminogênio como nas variedades dos queijos tradicionais suíços e alguns italianos (Bastian e Brown, 1996; Bastian *et al.*, 1997). Por outro lado, a renina de bezerras é mais solúvel com um pH mais alto, porém mais ativo com pH mais baixo. A retenção de renina, portanto, é maior em variedades que são escoadas com um pH mais baixo e é ainda maior em variedades que são cortadas com pH mais baixo. A atividade da renina é também drasticamente diminuída quando as temperaturas de cozimento são muito altas, como nos queijos tradicionais suíços e italianos. A renina é, portanto, mais ativa em variedades mesofílicas.

Por fim, grande parte do desenvolvimento do sabor e da textura e a diferença entre as variedades surgem durante a maturação do queijo. Veja o texto que aborda as culturas (seção V) e maturação (seção VII).

VII. BIOQUÍMICA DA MATURAÇÃO DO QUEIJO

Algumas variedades de queijos, na maioria tipos coagulados por ácidos ou por aquecimento são consumidos quando estão frescos, isto é, logo depois de os coágulos terem sido processados. A maioria dos outros tipos de queijos, nos quais a renina foi utilizada, precisam ser maturados até atingir a textura e o sabor desejados por um período que varia de duas semanas (por exemplo, muçarela) até mais de dois anos (por exemplo, cheddar extra maduro e o parmigiano reggiano). O queijo é um sistema de alimento biologicamente e quimicamente dinâmico no qual as proteínas, a lactose e a gordura do leite passam por alterações fisioquímicas que facilitam a conversão do coágulo “verde” em queijo maduro com suas características de microestruturas, texturas, sabores e funcionalidade desejada (Guinee, 2003). Os processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação do queijo foram revisados várias vezes (Fox *et al.*, 1995; 1996; 2000; 2004; Fox e Wallace, 1997; McSweeney e Sousa, 2000; Fox e McSweeney, 2006). O processo complexo de maturação do queijo será estudado em três abordagens principais:

- Metabolismo da lactose residual e o catabolismo do lactato e do citrato.
- Lipólise e o catabolismo dos ácidos graxos.
- Proteólise e catabolismo dos aminoácidos.

Os produtos dessas vias metabólicas também sofrem outras modificações bioquímicas e químicas. A textura e o sabor do queijo se devem, principalmente, às reações primárias descritas anteriormente, enquanto o sabor também é resultado da modificação dos produtos das reações primárias (Povolo *et al.*, 1999).

A. Metabolismo da lactose residual e o catabolismo do lactato e do citrato

O queijo é um produto lácteo fermentado e o metabolismo da lactose e do ácido láctico é essencial na produção de todas as variedades. Essas reações foram estudadas por Fox *et al.* (1990), McSweeney e Sousa (2000) e McSweeney e Fox (2004). Os micro-organismos do queijo (iniciadores/ou não iniciadores) são os principais responsáveis pela fermentação da lactose (no tanque de fabricação do queijo) e pela hidrólise do lactato e do citrato. Coágulos frescos de queijo contêm apenas cerca de 1-2% de lactose dependendo de os coágulos serem lavados (queijos do tipo holandês; \approx 1% de ácido láctico) ou não (emmental e parmigiano reggiano; \approx 1,5% de ácido) e serem secados e salgados (tipo cheddar; \approx 1,5% em cheddars jovens). Cerca de 98% da lactose é perdida na drenagem do soro (Huffman e Kristoffersen, 1984). A fermentação da lactose remanescente é fundamental para a manufatura do coágulo de queijo. A não ser que esteja completamente metabolizado, o açúcar residual pode levar a fermentações secundárias indesejáveis durante a maturação (Fox *et al.*, 1990; 2000; McSweeney e Fox, 2004). A lactose que fica presa na matriz do coágulo é fermentada rápida e completamente pelas bactérias iniciadoras antes que a razão sal/umidade atinja um nível que iniba as atividades das culturas iniciadoras (Fox e Kelly, 2003; McSweeney, 2007); isto é, quando o pH do coágulo está cerca de 6,2-6,4 na moldagem e antes de ser salgado (McSweeney, 2011); em cerca de 12 horas o pH atinge \approx 5,0-5,3 (Fox *et al.*, 2000). Na produção do queijo cheddar, o pH baixo do coágulo de cerca de 5,4 e a secagem e salgamento antes da moldagem retardam o metabolismo da lactose (Povolo *et al.*, 1999; McSweeney, 2011) e a lactose é lentamente fermentada, durante cerca de um mês, por atividade residual das bactérias iniciadoras [ou por bactérias de ácido láctico não iniciadoras (NSLAB)], para l(+) ácido láctico (McSweeney, 2004).

A via catabólica do ácido láctico é característica da variedade do queijo e a gama de reações que acontecem pode ter um impacto positivo ou negativo na maturação do queijo e em sua qualidade. Em queijos do tipo suíço, a fermentação secundária do lactato pelo *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii* é muito importante. Os ácidos orgânicos (propionato, acetato) que são produzidos contribuem para dar ao produto um sabor de nozes e o CO₂ liberado acumula em pontos mais fracos dos coágulos e forma grandes olhaduras características dessa variedade de queijo (Martley e Crow, 1996; McSweeney, 2004). O catabolismo do lactato também é importante em superfícies de queijos maturados por fungos (por exemplo, camembert e brie) e de casca lavada ou maturada (por

exemplo, queijos tilsit ou limburguer). A oxidação do lactato para CO_2 e água por *Penicillium camemberti* aumenta significativamente o pH da superfície desse tipo de queijo e causa um gradiente de pH a partir da sua superfície (pH \approx 7,5) até o centro (pH \approx 6,5) e a difusão do lactato na direção da superfície (Bonaiti *et al.*, 2004; Spinnler e Gripon, 2004). A característica de textura macia desse queijo é decorrente da precipitação de fosfato de cálcio na superfície com pH alto e uma migração concomitante de cálcio solúvel e de fosfato para a superfície (Vassal *et al.*, 1986; Walstra *et al.*, 2006). Na superfície de queijos de casca lavada maturados, a atividade da levedura diminui a acidez da superfície e esse fato favorece o crescimento de bactérias corineiformes. Em queijos do tipo cheddar e holandês uma fermentação excessiva de d/l-lactato (mistura racêmica de l(+) e d(-) lactato) pela atividade acidental de NSLAB produz manchas brancas indesejáveis de cristais de d-lactato de cálcio na superfície dos queijos maduros (Chou *et al.*, 2003; McSweeney e Fox, 2004; Swearingen *et al.*, 2004). Outra reação indesejável nos queijos, porém de menores consequências (quando o material utilizado no empacotamento torna-se mais permeável ao oxigênio), é a oxidação do ácido láctico por algumas espécies de NSLAB para ácido acético ou fórmico e CO_2 (McSweeney e Fox, 2004). Jatos de gás tardios e sabores estranhos ocorrem às vezes em variedades de queijo duros e semiduros pelo catabolismo anaeróbico do lactato para butirato, CO_2 e hidrogênio pela ação do *Clostridium tyrobutyricum*. Esse defeito pode ser evitado ao minimizar a quantidade de esporos no leite mediante uma boa higiene e remoção dos esporos por bactofugação ou microfiltração. Teores aumentados de NaCl em queijos e temperaturas mais baixas para maturação também podem diminuir o problema (McSweeney, 2007).

A maior parte (\approx 94%) do citrato no leite é solúvel e é perdida no soro. Sobretudo, o citrato coloidal é metabolizado por linhagens citratopositivas de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* e/ou *Leuconostoc* ssp. para diacetil, acetato/2,3-butanediol, acetoína e CO_2 . O diacetil e às vezes o acetato contribuem para o sabor do queijo. O CO_2 produzido é responsável pela formação de olhadura no queijo de tipo holandês, mas possibilita uma textura aberta, indesejável, no queijo cheddar e o defeito de coágulos flutuantes no queijo cottage (McSweeney e Fox, 2004).

B. Lipólise e catabolismo dos ácidos graxos

A gordura do leite é um componente fundamental que determina a qualidade do queijo. Os lipídeos do leite afetam a reologia e a textura do queijo (Yoshida, 1989), influenciam o sabor ao atuar como fonte de ácidos graxos e de seus derivados e atuam também como solventes para compostos com bom paladar produzidos pelos lipídeos e outros precursores. Eles também formam a interface gordura-água onde muitas reações acontecem (Collins *et al.*, 2004).

A lipólise que ocorre durante a maturação do queijo foi revisada inúmeras vezes (Fox e Wallace, 1997; Fox *et al.*, 2000; McSweeney e Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003a; Collins *et al.*, 2004; McSweeney *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2009). A hidrólise da gordura do leite por lipases/esterases no queijo libera ácidos graxos (C_4 - C_{10}) de cadeias curtas, com sabor. Baixos teores desses ácidos graxos são importantes contribuintes para o sabor em muitas variedades de queijo. A lipólise é limitada na maioria dos queijos; mesmo um pequeno excesso de degradação da gordura pode causar ranço ou sabor desbalanceado. As lipases no queijo se originam, possivelmente, do leite, da preparação da renina, de LAB iniciadoras e não iniciadoras, micro-organismos iniciadores secundários e preparações exógenas de lipase (Fox e Wallace, 1997; McSweeney e Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2004; Deeth e Fitzgerald, 2006). Em variedades como o cheddar e o gouda, o iniciador lipolítico fraco e, às vezes as bactérias não iniciadoras contribuem para produção lenta e limitada de ácidos graxos livres (Fox *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2003b) e em queijos suíços, o *Propionibacterium freudenreichii*, junto com o iniciador termofílico fazem esse papel (McSweeney, 2004; Thierry *et al.*, 2005). Uma lipólise extensiva é a via principal para a geração de sabor em queijos maturados com fungos (azul e camembert), queijos maturados por bactérias em sua superfície (por exemplo, limburguer) e alguns queijos italianos duros feitos com leite cru (por exemplo, parmigiano reggiano,

grana padano e provolone). Lipases extracelulares potentes são produzidas por *Penicillium roqueforti* e *P. camemberti* (Spinner e Gripon, 2004) além da microflora superficial complexa Gram-positiva, especialmente *Brevibacterium linens* dos queijos com casca lavada (Brennan *et al.*, 2004) também produzem lipases extracelulares. A esterase pré-gástrica contida na preparação da renina (por exemplo, nas variedades pecorino, provolone e alguns queijos gregos tradicionais) (Hamosh, 1990; Fox, 2003a) e as lipoproteínas lipases naturais de leite cru (Olivecrona *et al.*, 2003) também possuem forte atividade lipolítica.

Além de seu impacto direto no sabor do queijo, os ácidos graxos de cadeias curtas voláteis são importantes precursores em uma série de reações que conduzem à produção de diferentes compostos de sabor derivados de ácidos graxos (Collins *et al.*, 2003a): etil ésteres (sabores aromáticos frutados, florais, que lembram leite de cabra), tioésteres (sabores de queijo, de vegetais cozidos), cetoácidos de cadeias ramificadas (sabor de queijo pungente) e álcoois e cetonas insaturadas (sabor de cogumelos) (Collomb *et al.*, 1998). *N*-Metil cetonas, produzidas por b-oxidação parcial de ácidos graxos são particularmente importantes para o sabor do queijo azul.

C. Proteólise e catabolismo de aminoácidos

A proteólise é, talvez, o mais importante dos três eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação da maioria das variedades de queijos (em especial daqueles maturados internamente por bactérias, como cheddar, suíço, ou gouda) e é definitivamente o evento mais complexo. O tema foi extensivamente estudado (Grappin *et al.*, 1985; Rank *et al.*, 1985; Fox, 1989; Fox e Law, 1991; Fox *et al.*, 1994; Fox e McSweeney, 1996; 2006; Fox e Wallace, 1997; Upadhyay *et al.*, 2004a; Mikulec *et al.*, 2010). A proteólise contribui para: (1) o desenvolvimento da textura do queijo através da hidrólise da matriz da para-caseína ao aumentar a capacidade de ligação da água ao coágulo (os novos grupos α -carboxil e α -amino liberados e ionizados podem ligar água) e, indiretamente, pelo aumento do pH por causa da liberação de amônia durante o catabolismo de aminoácidos; e (2) o sabor do queijo pela produção de peptídeos curtos e médios (que contribuem para o gosto de sopas em queijos; alguns peptídeos hidrofóbicos têm gosto amargo) e aminoácidos livres, mas o mais importante é que quando esses aminoácidos são catabolizados geram muitos sabores voláteis fundamentais, além de liberarem compostos de sabor agradável ao paladar a partir da matriz do queijo durante a mastigação. As caseínas são hidrolisadas extensivamente pela ação de uma ampla gama de proteases e peptidases que, em queijos, têm seis fontes de origem: o coagulante, enzimas nativas do leite (principalmente plasmina), culturas iniciadoras LAB, NSLAB, iniciador secundário, e as proteases e peptidases exógenas.

1. Coagulantes

Em queijos cozidos a uma temperatura inferior a 40°C, de 5-30% da atividade da renina é retida, dependendo do tipo de enzima, do pH de drenagem e do conteúdo de umidade do queijo (McSweeney, 2011; Upadhyay *et al.*, 2004a). Por exemplo, os coágulos do cheddar retêm \approx 6% da quimosina adicionada; essa quantidade aumenta à medida que o pH é reduzido durante a drenagem do soro (Holmes *et al.*, 1977; Creamer *et al.*, 1985). A renina é extensivamente ou completamente desnaturada, em variedades nas quais os coágulos são cozidos a temperaturas acima de 55°C, como no caso dos queijos emmental, parmigiano-reggiano e muçarela (Singh e Creamer, 1990; Boudjellab *et al.*, 1994; McSweeney, 2011). O coagulante é o principal responsável pela proteólise primária que gera peptídeos grandes e de tamanho intermediário, que são, em seguida, hidrolisados pelas enzimas da microflora iniciadora e não iniciadora do queijo (McSweeney, 2004). Independentemente de sua especificidade, para a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ na κ -caseína, a quimosina é fracamente proteolítica; as α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseínas não são hidrolisadas durante a coagulação do leite, mas podem sofrer a sua ação lentamente, na maturação do queijo (Upadhyay *et al.*,

2004a). O sítio principal de ação da quimosina sobre a α_{s1} -caseína é a ligação peptídica entre Phe₂₃-Met₂₄, que é completamente hidrolisada em quatro meses nos queijos cheddar e similares (Carles e Dumas, 1985; McSweeney *et al.*, 1993a; McSweeney, 2011). Duas outras ligações suscetíveis à quimosina nessa proteína são Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ e Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, ambas extensivamente hidrolisadas em queijos cheddar maturados. A quimosina parece ter uma ação limitada na α_{s2} -caseína; não há muitos estudos nessa área. Apesar de a ligação Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ da β -caseína ser muito susceptível à ação da quimosina, sua hidrólise é fortemente inibida por 5% de NaCl. Esse fato pode ser muito significativo para o sabor do queijo, uma vez que o peptídeo β -CN (f193-209) e seus fragmentos relacionados são muito amargos.

A ação proteolítica dos substitutos da renina e da pepsina (encontrada, em geral, em preparações de renina disponíveis comercialmente) difere daquela da quimosina e tem sido muito pesquisada e revisada (Hassan *et al.*, 1988; Broome *et al.*, 2006; Dervisolgu *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2011). Por exemplo, os substitutos da renina como a protease fúngica possuem especificidade muito diferente da quimosina. Os sítios de hidrólise principais da protease do *Rhizomucor miehei* na α_{s1} -caseína em solução são Phe₂₃-Phe₂₄, Met₁₂₃-Lys₁₂₄ e Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆ e os da β -caseína-são Glu₃₁-Lys₃₂, Val₅₈-Val₅₉, Met₉₃-Gly₉₄ e Phe₁₉₀-Leu₁₉₁. A pepsina apresenta especificidade similar à da quimosina, mas ainda não foram definidas com precisão. A pepsina bovina tem uma ação rápida na ligação Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ da α_{s2} -caseína, a qual é hidrolisada lentamente pela quimosina.

2. Proteases nativas do leite

Entre as várias enzimas nativas do leite, a plasmina é a mais importante para a proteólise durante a maturação do queijo. Ismail e Nielsen (2010) revisaram o conhecimento atual sobre essa protease e sua relevância para a indústria de produtos lácteos. Bastian e Brown (1996) também relataram uma revisão sobre a plasmina. A plasmina é uma serina protease, derivada do sangue, com atividade ótima em pH 7,5 e a 37°C (Upadhyay *et al.*, 2004a). O plasminogênio, o precursor, a plasmina e o ativador do plasminogênio (PA) são todos associados às micelas da caseína e são incorporados à caseína coagulada pela enzima. Os inibidores de ambos, da plasmina e da PA são encontrados no soro do leite e são, portanto, perdidos no soro (Bastian e Brown, 1996). A plasmina hidrolisa rapidamente a β -caseína e produz γ -caseínas [(γ^1 -CN (β -CN f29-209), γ^2 -CN (β -CN f106-209), γ^3 -CN (β -CN f108-209)] e algumas proteoses peptonas [PP5 (β -CN f105/107), PP8 lento (β -CN f29105/107) e PP8 rápido (β -CN f1-28)]. Na α_{s2} -caseína oito ligações peptídicas são rapidamente hidrolisadas pela ação da plasmina, mas a α_{s1} -caseína é menos susceptível à plasmina e a κ -caseína é imune a sua ação (Bastian e Brown, 1996). A plasmina é responsável, em especial, pela proteólise limitada da β -caseína em queijos maturados internamente por bactérias; peptídeos grandes e de tamanho intermediário são o principal produto dessa ação. Uma vez que é estável ao calor, a plasmina tem uma função particularmente importante em queijos tipo pasta filata e cozidos em altas temperaturas, nos quais o coagulante é bastante desnaturado pelo calor (Gobbetti, 2004). Sua contribuição também é vital em queijos nos quais o pH aumenta durante a maturação, por exemplo, o tipo camembert (Spinnler e Gripon, 2004) e queijos de casca lavada maturados (O'Farrell *et al.*, 2002).

Os ativadores exógenos do plasminogênio, a uroquinase e a estreptoquinase, foram utilizados com sucesso para acelerar a proteólise nos queijos ao aumentar a atividade da plasmina. A uroquinase, por exemplo, foi utilizada na manufatura dos queijos cheddar (Bastian *et al.*, 1997; Barrett *et al.*, 1999), havarti ultrafiltrado e Saint Paulin (Bastian *et al.*, 1991). Além da adição da estreptoquinase exógena, Upadhyay *et al.* (2004b; 2006) usaram com êxito uma linhagem de *Lactococcus* produtora de estreptoquinase para acelerar a proteólise do queijo cheddar.

3. Bactérias de ácido láctico

As LAB auxotróficas são fracamente proteolíticas, mas possuem um sistema proteolítico amplo, que é essencial para suprir o requerimento complexo de aminoácidos (Beresford e Williams, 2004; Upadhyay *et al.*, 2004a). O leite contém concentrações muito baixas desses peptídeos e aminoácidos. Enquanto suas enzimas degradam as caseínas em peptídeos pequenos e aminoácidos, as LAB crescem e atingem alta concentração celular [10^9 - 10^{10} unidades formadas de colônias (cfu)/ml] e, inadvertidamente, contribuem para o sabor de produtos lácteos fermentados (Law e Mulholland, 1995; Steele, 1995; 1996).

Lactococcus e *Lactobacillus* spp. termofílicos são bactérias iniciadoras economicamente importantes e seus sistemas proteolíticos, em especial o primeiro, já foram bem caracterizados e extensivamente revisados (Mulholland, 1995; Steele, 1995; 1996; Kunji *et al.*, 1996; Law e Haandrikman, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006). Seus sistemas proteolíticos consistem em uma serina protease ou protease do envelope celular (CEP) ancoradas na membrana celular e se estende para fora da parede celular, garantindo assim um acesso fácil aos substratos extracelulares, aos sistemas de transporte de peptídeos e aminoácidos, às proteinases intracelulares e a várias peptidases intracelulares (Upadhyay *et al.*, 2004a; McSweeney, 2011). A protease CEP é a principal responsável pela hidrólise dos peptídeos maiores produzidos a partir da α_{s1} -caseína e β -caseína pela quimosina e plasmina, respectivamente. As peptidases intracelulares (aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases) são responsáveis pela liberação de aminoácidos livres após a lise celular. Pesquisas (Farkye *et al.*, 1990; Lane e Fox, 1997; Broadbent *et al.*, 2002) utilizando linhagens iniciadoras CEP negativa (Prt^-) e CEP positiva (Prt^+) demonstraram que, apesar de as CEP serem ativas durante a maturação do queijo, elas não são essenciais; algumas diferenças de qualidade foram encontradas entre queijos Prt^- e Prt^+ , mas queijos Prt^- também foram considerados bons. Outras enzimas de *Lactococcus* ou as do NSLAB também atuam nessa função. Ambas LAB iniciadoras, *Lactococcus* e *Lactobacillus* termofílicos, sucumbem rapidamente; depois da preparação do coágulo, após a lise, as células mortas liberam suas enzimas intracelulares.

O gosto amargo é um problema comum nos queijos, especialmente no cheddar, gouda e em outros queijos maturados utilizando-se bactérias. Os peptídeos hidrofóbicos (massa molecular < 6 kDa e hidrofobicidade média > 1.400 cal por resíduo) derivados das caseínas, em especial da região C-terminal da β -caseína (β -CN f193-209), são muito amargos (Singh *et al.*, 2005; McSweeney, 2007, 2011). O sabor amargo nos queijos surge por causa do perfil de proteólise incorreto que leva a uma produção excessiva de peptídeos amargos ou pela atividade da peptidase, que pode ser insuficiente para degradar os peptídeos hidrofóbicos para os aminoácidos livres (Lemieux e Simard, 1991; HabibiNajafi e Lee, 1996; McSweeney, 1997; Frister *et al.*, 2000). Pesquisas recentes (Broadbent *et al.*, 1998, 2002; Pillidge *et al.*, 2003; Broadbent e Steele, 2007b) sugerem que a CEP de *Lactococcus* e os sistemas de peptidase possuem um papel importante quanto ao sabor amargo e à qualidade do queijo em geral. Além disso, uma atividade excessiva da quimosina também pode causar o gosto amargo, mas parece que a plasmina não produz peptídeos amargos. Substituir o coagulante do leite por um tipo mais adequado, utilizar uma cultura iniciadora ou adjunta com alta atividade de peptidase, misturar linhagens que causam a formação de peptídeos de sabor amargo e não amargo, usar uma cultura adjunta de *Lactobacillus* com uma linhagem que forma peptídeos de sabor amargo e assegurar-se que haja um nível adequado de NaCl no queijo são algumas das estratégias que podem ser usadas para melhorar o sabor amargo nos queijos (McSweeney, 2007; 2011).

A atividade do NSLAB parece suplementar a atividade proteolítica da cultura iniciadora LAB. Muitos estudos feitos com microfloras controladas (McSweeney *et al.*, 1994; Rehman *et al.*, 2000) sugerem que o NSLAB é menos importante do que a cultura iniciadora no desenvolvimento do sabor no queijo cheddar e em outras variedades similares. A quantidade inicial de NSLAB nos coágulos de cheddar recém-produzidos é muito baixa (< 100 cfu/g); dependendo da temperatura da maturação eles podem crescer e atingir 10^7 - 10^8 cfu/g em cerca de 3 meses (Beresford e Williams, 2004; McSweeney, 2011) e em seguida seus números permanecem mais ou menos constantes, como no cheddar (Fox *et al.*, 1998; Peterson e Marshall, 1990), ou podem declinar como nos queijos suíços (Beuvier *et al.*, 1997). Assim a microflora viável de queijos maturados por longo período é dominada por

lactobacilos mesofílicos durante a maior parte de sua maturação. Os NSLAB são mais numerosos e mais diversificados no leite cru do que nos queijos feitos com leite pasteurizado (McSweeney *et al.*, 1993b; Grappin e Beuvier, 1997; Albenzio *et al.*, 2001; de Angelis *et al.*, 2001; Mannu e Paba, 2002; Dasen *et al.*, 2003) e contribuem para a formação de peptídeos pequenos e aminoácidos (Beresford e Williams, 2004). Em geral, queijos feitos com leite cru, como se sabe, amadurecem mais rapidamente e desenvolvem sabor mais intenso do que os feitos com leite pasteurizado (Beuvier e Buchin, 2004; McSweeney, 2011). Isso ocorre principalmente pela presença de NSLAB nativos no leite cru, que são incorporados ao queijo; a inativação induzida pelo calor da lipoproteína lipase nativa também tem importância. Por motivos de segurança e de saúde, assim como para a produção de queijos com consistência em sua qualidade, não é provável que grandes empresas de fabricação de queijos revertam para o uso de leite cru. Culturas iniciadoras e adjuntas de NSLAB selecionadas em geral entre linhagens de *Lactobacillus* estão sendo utilizadas para simular as características de sabor dos queijos feitos com leite cru no produto fabricado com leite pasteurizado (Law, 2010b). Adjuntos, no entanto, que são adicionados ao leite pasteurizado não simulam de modo convincente os sabores do leite cru, provavelmente porque contêm apenas algumas linhagens de lactobacilos, enquanto as NSLAB dos queijos feitos com leite cru são muito heterogêneas. O desenvolvimento de culturas adjuntas aprimoradas já está previsto para o futuro, pois muito trabalho está sendo desenvolvido enfocando os NSLAB.

A microflora secundária que está sendo adicionada ou encorajada a crescer em vários tipos de queijos tem funções específicas e possui sistemas proteolíticos similares ao LAB. Por exemplo, várias linhagens de *Lactobacillus* são adicionadas ao cheddar para melhorar seu sabor ou apressar sua maturação. A proteólise por *Brevibacterium linens* na superfície de queijos de casca lavada maturados ocorre pela proteinase e aminopeptidase extracelular e várias peptidases intracelulares secretadas pelas bactérias (Ratray e Fox, 1999). Tanto o *Penicillium roqueforti* como o *P. camemberti* produzem potentes partilproteinase e metaloproteinases extracelulares além de várias peptidases que contribuem para a extensa proteólise nos queijos do tipo azul, camembert e brie, respectivamente (Cantor *et al.*, 2004; Spinnler e Gripon, 2004).

4. Catabolismo de aminoácidos

Aminoácidos são os produtos finais da proteólise e, junto com os peptídeos pequenos, contribuem diretamente para o sabor dos queijos e para seu gosto; aminoácidos podem ser doces, amargos ou ácidos. Pesquisas já revelaram que a produção de aminoácidos não é a etapa limitante do desenvolvimento de sabor, uma vez que a aceleração da proteólise não acelera, necessariamente, o desenvolvimento do sabor (Upadhyay e McSweeney, 2003). Hoje todos concordam que os aminoácidos, em princípio, servem como precursores de uma complexa série de reações que produzem uma vasta gama de compostos saborosos e aromáticos como aminas, ácidos, carbonilas, amônia e compostos sulfurados. O catabolismo dos aminoácidos foi revisto por Ardo (2006), Curtin e McSweeney (2004), Ganesan e Weimer (2007) e Yvon e Rijnen (2001) e acredita-se que ocorram por duas vias principais:

- Ação da transaminase catalizada por aminotransferases, nas quais o grupo amina de um aminoácido (em geral aminoácidos aromático e cadeia ramificada e metionina) é transferido para uma molécula aceptora (normalmente α -cetoglutarato) para produzir o correspondente α -cetoácido. Os α -cetoácidos são instáveis e se degradam para aldeídos, ácidos carboxílicos, hidroxíácidos e outros compostos.
- Reação de eliminação pelas aminoácidos liases (cadeias laterais de aminoácidos são clivadas), o que é muito importante na produção de compostos de enxofre voláteis da cadeia-lateral da metionina.

Além disso, a decarboxilase de determinadas linhagens de LAB remove o grupo carbolíxico de aminoácidos e produz aminas. As aminas biogênicas são de interesse particular (aminas do His, Trp e Tyr), que, em teores muito

altos, podem causar reações fisiológicas adversas em consumidores mais suscetíveis. A ação das deaminases, por exemplo, na superfície de queijos maturados remove o grupo de α -amino de aminoácidos e conduz à formação de ácidos carboxílicos e amônia.

D. Maturação controlada/acelerada do queijo e tecnologia do sabor do queijo

Há um aumento crescente na demanda por queijos com características diferentes e sabores interessantes por parte dos consumidores. O fato de uma proporção cada vez maior dos queijos serem feitos a partir de leite pasteurizado não oferece muitas possibilidades aos fabricantes para diversificar os sabores. Mas com o progresso das tecnologias de maturação dos queijos, no entanto, é possível fabricar queijos saborosos e seguros. Queijos com muito sabor e atributos de consistência característicos custam muito mais caro e precisam ser maturados a baixas temperaturas por meses ou anos, assim há um interesse industrial considerável em tecnologias que acelerem o processo de maturação. Algumas das opções disponíveis estão descritas a seguir (Farkye, 2004):

- Temperaturas para maturação elevadas.
- Processamento a alta pressão.
- Adição de enzimas exógenas.
- Culturas iniciadoras atenuadas.
- Uso de adjuntos de culturas.
- Culturas iniciadoras GM.

É óbvio que qualquer tecnologia que possa acelerar a maturação e encurtar o tempo de armazenamento aumentará a margem de lucro e/ou oferecerá preços mais competitivos ao fabricante de queijos. O controle da temperatura e a tecnologia de enzimas são métodos de escolha para apressar os processos de maturação; tecnologias baseadas em cultura não tiveram grande êxito (Law, 2010b). Tratamento de alta pressão nos queijos, como se sabe, acelera a proteólise e tem o potencial de encurtar o tempo de maturação. Essas técnicas estão descritas a seguir.

1. Temperaturas elevadas na estocagem

É uma tecnologia relativamente simples e de baixo custo que é com frequência aplicada para acelerar a maturação do queijo. No entanto, o uso de temperaturas elevadas traz o risco de estimular o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos (Fox *et al.*, 1996) e deveria ser aplicado somente em queijos feitos com leite pasteurizado em que foram usados GMP. As escolhas mais práticas para uma maturação forçada são os queijos duros e semiduros como cheddar, gouda e edam, que são muito estáveis e possuem uma microflora LAB relativamente simples (Law, 2010b). Temperaturas relativamente baixas de menos de 10°C são usadas, em geral, em lojas que vendem queijos. Aumentos de temperaturas de até 12°C diminuem o tempo de maturação do queijo cheddar em cerca de 60% sem afetar adversamente sua consistência e textura (Law, 2001). Hannon *et al.* (2002, 2004) usaram combinações e sucessões de temperaturas para maturação (20°C por 1 semana/12°C para 6 semanas, seguidas da temperatura normal de 8°C por 8 meses) e economizaram 2 meses de maturação no queijo cheddar sem nenhuma perda no equilíbrio do sabor.

2. Processamento a alta pressão

Há evidências crescentes (Yokoyoma *et al.*, 1992; Messens *et al.*, 2000; 2001; Saldo *et al.*, 2000, 2002; O'Reilly *et al.*, 2001; 2002) de que o uso de tecnologia de alta pressão em queijos jovens apressa a maturação. Pressões muito altas

variando entre 100-1.000 MPa são aplicadas por um período curto de tempo. A alta pressão rompe as células da cultura iniciadora liberando enzimas intracelulares, ativando essas enzimas e, portanto, aumentando rapidamente a proteólise e, talvez, outras reações que geram compostos de sabor (Stewart *et al.*, 2006; Law, 2010b). Essa opção tecnológica ainda está limitada a pesquisas de laboratórios, mas a indústria de alimentos já possui interesse nesse ramo de atividade. Com maiores pesquisas nesse ramo de grande relevância industrial e com o desenvolvimento de equipamentos necessários, o processamento de alta pressão pode ser ampliado para uso em fábricas (Stewart *et al.*, 2006; Law, 2010b).

3. *Maturação de queijos baseada em enzimas e tecnologia do sabor*

O uso de enzimas para modificação de queijos (EMC) como ingredientes em queijos processados e como geradores de compostos de sabor é bem conhecido. No entanto a aplicação de enzimas para a maturação controlada e desenvolvimento de sabor em queijos produzidos para o consumo direto é um conceito relativamente novo (Collomb *et al.*, 1998; Law, 2010b). O maior desafio para tal método é a distribuição de quantidades de enzimas medidas em gramas em toneladas de queijo; a adição ao leite não é uma opção, uma vez que 95% das enzimas que auxiliam na maturação são perdidas no soro. Além disso, há uma disponibilidade limitada das enzimas comerciais aprovadas. O desenvolvimento de tecnologias de micro encapsulação torna possível aprisionar fisicamente as enzimas lipossoma microencapsuladas na matriz do coágulo enquanto ele está sendo formado (Kirby *et al.*, 1987). Por causa do alto custo dos fosfolípidos esse método não é economicamente viável para aplicações industriais, mas é adequado para aplicações em pequena escala (Law, 2010b). Existem opções alternativas em relação à encapsulação da proteinase, por exemplo, o uso de gomas alimentares (Kailasapathy e Lam, 2005). Em queijos secos e salgados como o cheddar, as enzimas podem ser misturadas ao sal, em formato granulado, e distribuídas nos coágulos triturados (Law e Wigmore, 1982; 1983). Com base nos resultados de pesquisas sobre o papel das culturas iniciadoras de lactococos e proteinases comerciais na maturação do queijo cheddar (Law e Wigmore, 1982; 1983), diversas preparações de enzima Accelase™ foram desenvolvidas para uso comercial pela Imperial Biotechnology Limited (IBT, que atualmente pertence à Danisco).

Além da facilidade de incorporação e eficiência na distribuição de enzimas no interior do coágulo, uma grande gama de opções de sabor também está disponível nos produtos da Accelase. A Accelase contém uma mistura de endopeptidases e exopeptidases (e também de lipases) que promovem uma hidrólise equilibrada de caseínas em peptídeos não amargos e aminoácidos geradores de sabor. As enzimas da Accelase são produzidas com uma formulação especial baseada no tipo de queijo e de coagulante, o tipo de cultura iniciadora utilizada e o mercado de destino do queijo (Law, 2010b). Ao contrário das variedades secas e salgadas, queijos feitos com coágulos lavados como o gouda e o edam são especialmente difíceis de maturar utilizando enzimas. Apesar de as enzimas poderem ser introduzidas na matriz do queijo com a água em que será lavado, ou na etapa em que os coágulos ainda estão macios, ambos os métodos resultam em coágulos macios, redução do rendimento e perda de enzimas na água de lavagem (Collomb *et al.*, 1998; Law, 2010b). A injeção mecânica de enzimas no queijo já pronto pode ser uma opção (Wilkinson e Kilcawley, 2005), mas a técnica ainda precisa ser desenvolvida em nível comercial. Aplicações visando à diversificação do sabor são, em geral, baseadas nas culturas e envolvem a adição de substâncias aos perfis de sabor tradicionais utilizando linhagens selecionadas de lactobacilos (*Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum* e *Lb. helveticus*). Os métodos que estão sendo utilizados serão discutidos nas próximas seções.

4. *Culturas starter atenuadas*

Culturas iniciadoras LAB funcionam bem como agentes de maturação do queijo, mas por seu papel de acidificação primária não é possível apenas adicionar um pouco mais de cultura para aumentar o sabor. Uma atenuação ou

enfraquecimento das culturas iniciadoras mediante vários métodos evita ou reduz sua função na acidificação ao mesmo tempo em que retém suas enzimas intracelulares que são, em seguida, liberadas na matriz do queijo durante a maturação através da lise (Upadhyay e McSweeney, 2003). Petterson e Sjöström (1975) foram os pioneiros no uso de culturas iniciadoras atenuadas para acelerar a maturação de um queijo semiduro sueco, o Svecia; a atenuação foi feita com tratamento das células por aquecimento. Células atenuadas de bactérias também podem ser preparadas por choque de congelamento, secagem por spray, tratamento com liozimas em condições subletais e por seleção de mutantes de lactose negativa (Lac^{-ve}) (Klein e Lortal, 1999; Azarnia *et al.*, 2006; Law, 2010a; 2010b). Madkor *et al.* (2000) descobriram que o queijo cheddar feito com a linhagem *Lb. helveticus* tratada com choques de calor ou de congelamento (HS ou FS) tiveram taxas mais altas de formação de grupos de aminoácidos livres e de lipólise e ainda obtiveram ótimos resultados quanto ao sabor e aroma nos queijos tratados com FS *Lb. helveticus*. Com base no trabalho de Ardo e Pettersson (1988), uma linhagem *Lb. Helveticus* tratada a choques de calor, foi preparada pela Medipharm (Suécia) e é vendida comercialmente na Suécia e Finlândia com o nome EnzobactTM. Originalmente, o Enzobact foi desenvolvido para acelerar a maturação de queijos gordos duros e semiduros, mas hoje é usado principalmente em variedades dos queijos duros tradicionais suecos com gordura reduzida (Azarnia *et al.*, 2006; Law, 2010b).

A liozima é extraída comercialmente da clara de ovos de galinha e é uma enzima relativamente barata. Apesar de ser uma ferramenta promissora para culturas iniciadoras atenuadas, sua aplicação é limitada pelo fato de seu tratamento prévio ser muito trabalhoso e pouco prático para a rotina da produção de queijos (Law, 2010b). Os mutantes Lac^{-ve} ocorrem espontaneamente em todas as culturas iniciadoras e essas variantes naturais do LAB representam a fonte mais prática e economicamente factível de culturas atenuadas (Law, 2010a; 2010b). Vindfeldt (1993) descreveu o desenvolvimento técnico e o escopo da aplicação comercial dessas culturas. Primeiro, elas são selecionadas de acordo com seus perfis de sabor, em seguida isoladas facilmente e crescem em um meio de glicose, depois são empacotadas e vendidas em concentrados congelados em quantidades que correspondem ao seu poder de maturação dos queijos por litro de leite para a fabricação de queijos ou quilo de queijo.

Em 2007, Upadhyay *et al.* demonstraram que o tratamento de alta pressão (≈ 200 MPa) pode prejudicar a produção de ácido em linhagens de lactococos sem causar lise nas células e oferece, portanto, um potencial para a atenuação de culturas LAB. Smith (2005) desenvolveu um método para acelerar a maturação de queijos utilizando um agente biológico (não uma cultura iniciadora atenuada; por exemplo, as *Brevibacterium linens*, *Kluyveromyces lactis*, *Staphylococcus xylosum*, *Arthrobacter nicotianae* e *Geotrichum candidum*) que foi tratado com um agente ativo de superfície como o dodecil sulfato de sódio para eliminar, incapacitar ou reduzir a viabilidade das células (ao atuar nas membranas das células), mas permitindo as enzimas intracelulares acessarem o substrato, assim como permitir a liberação dos produtos da reação. O agente biológico tratado é adicionado ao leite junto com uma cultura iniciadora que possua uma atividade de aminopeptidase significativa.

Flavor Control CRTM é uma mistura de culturas naturais de *Lactococcus* que não acidificam (selecionadas de culturas iniciadoras) desenvolvidas por Chr. Hansen A/S na Dinamarca para aplicação comercial como um sistema de potencialização de sabor. Essa cultura aumenta a intensidade do sabor do queijo pelo aumento de todos os compostos de sabor importantes. Ela aumenta os sabores equilibrados, maduros, redondos e limpos e suprime os indesejados, como os amargos, azedos e insípidos. As misturas de culturas das séries CR 500 e CR 213 têm combinações harmônicas especialmente adequadas para o queijo cheddar com baixo teor de gordura, mas também são capazes de gerar um perfil de sabor especial em queijo gordo (Chr. Hansen, 2008; Law, 2010b). A eficiência dessas culturas CR é mais pronunciada em queijos com menos gordura e com concentrações de sal quase normais ($\approx 1,75$ g/100 g). As culturas CR têm preços similares a combinações de enzimas de qualidade, mas são muito mais fáceis de serem aplicadas. Elas podem ser usadas diretamente, descongeladas (são vendidas na forma de concentrados congelados) e adicionadas diretamente ao leite que será utilizado no preparo dos queijos junto com a cultura iniciadora primária (Law, 2010b). Além do mais, não há restrições regulatórias para o seu uso como com

5. Culturas adjuntas não iniciadoras

Os adjuntos são as microfloras secundárias não iniciadoras que são adicionados deliberadamente ao leite para o preparo do queijo (em níveis < 0,01%) para gerar sabores desejados no queijo e em sua funcionalidade (Crow *et al.*, 2002). Exemplos de alguns adjuntos tradicionais são a *Penicillium*, *Brevibacterium*, *Geotrichum*, leveduras, *Propionibacterium* e *Leuconostoc*. A opção de controle do sabor fornecida pela microflora secundária em queijos do tipo cheddar é baseada na adição de sabores e aromas especiais (por exemplo, cozido, fermentado, adocicado, sabor de nozes) a perfis de sabores básicos. Seu uso como culturas de sabor adjuntas comerciais, sozinhas ou em conjunto com iniciadores atenuados fornece, portanto, um controle completo sobre a intensidade do sabor e seu caráter (Law, 2010b). Ao contrário de culturas atenuadas, a tecnologia de adjuntos também possui o potencial de utilizar vias metabólicas de compostos de sabor de células viáveis (Broome, 2007). Empresas selecionam cuidadosamente as linhagens desejadas, eliminando muitas peculiaridades que são potenciais geradoras de defeitos e, com base em sua capacidade de competir com microfloras eventuais, produzem as culturas em quantidades e as combinam para que possam ser reproduzidas para serem vendidas e utilizadas em fábricas de queijos (Crow *et al.*, 2002; Law, 2010b). Adjuntos de culturas muito populares são, principalmente, NSLAB (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*), apesar de microfloras de superfícies (*Brevibacterium linens*, stafilococo, leveduras) também estarem disponíveis para fornecer sabores adicionais. O queijo cheddar, que possui um pH relativamente alto e uma matriz mais sólida, tem o potencial de gerar probióticos (Playne, 2002). Linhagens selecionadas de culturas probióticas de *Bifidobacterium* (McBrearty *et al.*, 2001), *Enterococcus* (Gardiner *et al.*, 1999) e *Lactobacillus* (Gardiner *et al.*, 1998) também podem melhorar o sabor dos queijos (McBrearty *et al.*, 2001). Inner-Balance é uma marca de queijo cheddar comercializada na Austrália (Mainland Dairies) e no Reino Unido e contém a cultura probiótica adjunta *Lb. rhamnosus* DR20TM, que acelera, aumenta a formação de compostos de sabor e melhora sua qualidade (Crow *et al.*, 2002). Os enterococos, apesar de exercerem alguns aspectos negativos no sabor do queijo e alguns problemas quanto à segurança de seus consumidores, possuem grande potencial como adjuntos de sabor em queijos e culturas probióticas e estão sendo experimentados em produtos lácticos (Crow *et al.*, 2002; El-din *et al.*, 2002; Bulajic e Mijacevic, 2003; Abeijon *et al.*, 2006; Bhardwaj *et al.*, 2008).

No caso de culturas de fungos, o desafio é conseguir manter um equilíbrio entre o crescimento de fungos e o desenvolvimento de notas de sabor por meio do metabolismo de organismos vivos; há menor oportunidade para controlar o sabor e o aroma em queijos maturados com fungos (Law, 2010b). Apesar disso, a Chr. Hansen desenvolveu comercialmente uma gama de culturas de fungos selecionando a partir da variabilidade inerente de produção de enzimas e de pigmentos e razões entre taxa de crescimento/metabólica entre as culturas disponíveis.

6. Bactérias ácido-láticas geneticamente modificadas

Durante as duas últimas décadas muito conhecimento foi acumulado em pesquisas sobre a base bioquímica das funções vitais do LAB dos produtos lácteos, incluindo a produção de ácido, de sabor/aroma, utilização de proteínas, secreção extracelular de polissacarídeos e resistência a bacteriófagos. Esse progresso de conhecimentos básicos forma uma base a respeito de muitas culturas de LAB GM que as empresas produtoras de culturas fornecem atualmente para testes industriais (Law, 2010b). Os Estados Unidos e a União Europeia exigem que as linhagens GM cumpram totalmente todos os regulamentos federais/nacionais de competência para organismos GM que serão aplicados em alimentos. As culturas de LAB GM são obtidas com sistemas clonados de grau alimentício.

Três estratégias gerais são utilizadas em modificações genéticas de LAB que serão aplicados à maturação de

queijos e na tecnologia de seu sabor (Law, 2010b): (1) metabolismo de lactose alterado; (2) aumento da capacidade de produção de peptidase; e (3) aumento da lise das células iniciadoras na matriz de queijos jovens.

Linhagens mutantes de *Lactococcus lactis* podem ser obtidas com vias metabólicas alteradas a partir da lactose para os intermediários-chave, α -acetolactato (precursor do diacetil, que contribui com o aroma amanteigado) e acetato; o resultado é um acúmulo dos compostos aromáticos em concentrações mais altas do que a normal (de Vos, 1996; Swindell *et al.*, 1996). Estas culturas de lactococos GM já estão disponíveis comercialmente. Linhagens comerciais de *L. lactis* spp. com produção geneticamente aumentada de duas aminopeptidases comuns foram desenvolvidas e tais culturas estão sendo utilizadas para ampliar a qualidade e a intensidade do sabor em queijos do tipo cheddar e holandeses (Law, 2010b). As peptidases evitam o acúmulo de peptídeos amargos que possam causar defeitos no sabor. Por fim, culturas iniciadoras podem ser geneticamente alteradas para lisar com rapidez em queijos. Sabe-se que a qualidade e o ritmo do desenvolvimento do sabor em queijos são correlacionados, de modo positivo, com o ritmo e a extensão da lise das células iniciadoras e a consequente liberação de enzimas em queijos jovens (Crow *et al.*, 1995). Com base no trabalho original do grupo de Gasson no Reino Unido, as culturas iniciadoras de lactococos variantes comerciais que contêm o gene bacteriófago lisina, são obtidos de modo que a expressão do gene pode ser controlada por estímulos externos, por exemplo, alterações de pH, concentração de sal e temperatura (Law, 2010b). A empresa de pesquisas em alimentos NIZO, na Holanda, adotou uma abordagem similar, que foi desenvolvida e patenteada com o nome de sistema NICE, na qual microgramas de Nisina são adicionados para desencadear o fago clonado de lisina. Esta última tecnologia é baseada nos resultados das pesquisas de Ruyter *et al* (1997).

VIII. IOGURTES

A. Introdução a produtos lácteos fermentados

Queijos e iogurtes são os produtos lácteos derivados de leite fermentado mais populares. Além desses, o leitelho (usado como ingrediente em alimentos que vão ao forno, que usa *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* ou *diacetilactis*), leite acidófilo (que traz benefícios terapêuticos ao trato intestinal e usa *Lactobacillus acidophilus*) e creme azedo (creme cultivado que usa *L. lactis* subesp. *cremoris* ou *diacetilactis*) também são consumidos nos Estados Unidos e na Europa. Outros produtos lácteos fermentados possuem popularidades regionais em algumas partes do mundo, como o *kefir* (uma bebida alcoólica fermentada que usa grãos de kefir que contém uma combinação de bactérias e leveduras capaz de produzir kefiran, um polissacarídeo viscoso), *kumiss* (produzido com leite de égua e que usa uma cultura líquida de bactérias e levedura, filmjölkk (um produto lácteo nórdico similar ao leitelho com cultura que usa *L. lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*), *långfil* (uma variante elástica do *filmjölkk* que contém LAB viscoso que produz exopolissacarídeos) e *viili* (também similar ao filmjölkk, mas que inclui *Geotrichum candidum* e, às vezes, LAB viscoso). Para mais informações, o leitor pode consultar Robinson e Tamime (1990) e Tamime e Robinson (1999b).

As formas de iogurtes de consistência firme, misturado e os de consistência de bebida são as mais comuns. O primeiro tipo é incubado e esfriado na embalagem final e é caracterizado por uma estrutura com consistência de um gel firme, enquanto nos dois últimos formatos o coágulo final é quebrado ao ser misturado (tipo misturado) ou pela homogeneização transformando a substância em uma bebida de baixa viscosidade (iogurte que pode ser bebido) antes de ser resfriado e embalado. Outra bebida muito popular nos Estados Unidos é o iogurte congelado que é original da Nova Inglaterra. Fisicamente, ele se parece com um sorvete, mas sua característica é ter um forte gosto ácido e ser comercializado em três categorias: macio, muito consistente e em forma de creme. O iogurte congelado contém altos teores de açúcar e estabilizantes que lhe permitem manter a estrutura de bolhas de ar ao ser

congelado. Iogurte concentrado/coado (por exemplo, o *labneh*, do mediterrâneo do leste, o *laban* egípcio, o *skyr* da Islândia, o *chakka* indiano e o *shrikhand* feito com leite de búfala) é produzido ao coar iogurte resfriado/não adoçado através da aplicação de pressão em uma bolsa de tecido (sistema Berge), centrifugação ou ultrafiltração. Por fim, o iogurte seco em pó também é produzido e possui várias aplicações diferentes na indústria de alimentos (por exemplo, produtos de panificação e de confeitaria) (consultar Tamine e Robinson, 1999b).

B. Manufatura do iogurte

A manufatura do iogurte data de milhares de anos e é uma técnica antiga, mas até hoje sua produção comercial é um processo complexo que mistura arte e ciência. O processo de manufatura do iogurte tem uma ótima descrição feita por Tamine e Robinson (1999a) e também é descrito de maneira breve por Goff, no site da University of Guelph's Dairy Science and Technology Education. Quando o leite refrigerado chega ao local de produção, o primeiro passo é modificar sua composição para adequá-lo às especificações do iogurte. Esse processo envolve a clarificação do leite para creme e leite desnatado, seguido pela estandardização da gordura desejada e conteúdo de sólidos não gordura (SNF). Enquanto a gordura média do leite varia de 3,7% a 4,2% (w/w), o conteúdo de gordura do iogurte comercial pode variar entre 0,1% e 10%. O método quadrado de Pearson (Tamine e Robinson, 1999a) é um modo muito conveniente para calcular os componentes necessários para estandardizar o leite. Para aumentar o conteúdo do SNF, a indústria, em geral, adiciona leite em pó (integral ou desnatado, a recomendação é de 3-4%) à mistura do iogurte, mas um ou mais ingredientes podem ser utilizados: leite concentrado, leite em pó com alto teor de proteínas, leite em pó, soro em pó ou concentrado, caseína em pó e até proteínas não provenientes do leite (proteínas da soja, de legumes ou de batata doce). Os sólidos adicionados aumentam a viscosidade e consistência do iogurte, reduzem a sinérese e geram uma consistência mais saborosa, além de contribuírem com funcionalidades específicas que dependem do material adicionado (por exemplo, fosfolipídeos do leite possuem propriedades emulsificantes).

A base do leite para o preparo do iogurte em geral é fortificada com sólidos não provenientes do leite como agentes estabilizantes/emulsificantes e adoçantes. Os estabilizantes são, em geral, gomas ou hidrocoloides que são adicionados (em teores de 0,1-0,5%) como compostos simples ou mistura de compostos naturais (gelatina, pectina e gomas de feijão locusta, amidos de cereais, alginatos e carragenanas) ou gomas naturais modificadas ou semissintéticas (carboximetil celulose, xantana, pectina com baixo teor de metoxila e amidos modificados). O papel dos hidrocoloides nos iogurtes funciona como agente gelificante ou espessante e estabilizante para ligar água como água de hidratação e para reagir com e estabilizar as moléculas de proteínas do leite na forma de uma rede que retarda o movimento da água livre (Tamine e Robinson, 1999a). Adoçantes são normalmente adicionados aos iogurtes com frutas e com sabores e podem ser açúcares como sacarose, açúcar invertido, glicose e frutose ou adoçantes não calóricos de alta intensidade como o aspartame e a sacarina.

Depois da padronização e fortificação da base do leite com um coquetel de leite e de sólidos não provenientes do leite, a mistura é pasteurizada ou tratada por calor com a utilização de um trocador de calor de placa contínuo durante 30 minutos a 85°C ou 10 minutos a 95°C. Os tratamentos em altas temperaturas que são utilizados destroem ou eliminam os patógenos e micro-organismos como também estimulam a produção de fatores capazes de estimular ou de inibir a atividade de culturas iniciadoras e, o que é mais importante, permitem alterações muito favoráveis nas propriedades físico-químicas do leite pela desnaturação das proteínas do soro e sua ligação às superfícies das micelas de caseínas (consultar seção IV).

A mistura pasteurizada (a 65-70°C) é, em seguida, homogeneizada, em geral por um homogeneizador de estágio único com pressões que variam de 15 a 20 MPa. Além de combinar de modo uniforme todos os ingredientes, esse processo reduz com eficiência o tamanho do glóbulo de gordura, aumenta a área da superfície da gordura e recobre a superfície com proteínas; as micelas de caseína cobrem cerca de 25% da superfície. Na verdade,

os glóbulos de gordura homogeneizados agem como se fossem grandes micelas de caseína e participam das reações de precipitação dos ácidos. Os iogurtes feitos com leite homogeneizado ficam mais firmes, cremosos e mais estáveis (com redução do creme e do soro) durante a estocagem.

A mistura homogeneizada é resfriada para a temperatura de incubação (40-45°C) e bombeada para o interior de tanques de fermentação encamisados. A cultura iniciadora (\approx 3% p/p de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* em uma razão de 1:1) é medida diretamente na mistura enquanto ela está sendo bombeada ou adicionada em tanques de fermentação. A fermentação pode ocorrer em recipientes (iogurtes de textura consistente) ou em tanques para grandes quantidades (iogurtes misturados). A temperatura, em geral de 42°C, é mantida durante 2 a 2,5 horas em condições de descanso. O pH e/ou a acidez titulável (TA) são monitorados cuidadosamente durante esse período. Quando o pH atinge 4,6 (TA de 0,85-0,90%), isto é, quando uma massa sólida e contínua de gel é formada, o iogurte é imediatamente resfriado para cerca de 5°C e é armazenado ou sofre outros processos para que sejam produzidas outras formas. A velocidade é controlada minuciosamente para que o produto final tenha o nível de acidez desejado assim como a estrutura do gel. Uma vez que o resfriamento lento pode aumentar a acidez do iogurte, um resfriamento demasiado rápido pode causar a separação do soro, possivelmente em consequência da excessiva concentração da matriz de proteínas (Rasic e Kurmann, 1978).

Iogurtes com frutas e/ou diferentes sabores, disponíveis em uma grande variedade de formas, são os tipos mais populares, especialmente nos Estados Unidos, Europa e Austrália. Antes de 1950, o iogurte era virtualmente desconhecido fora do Oriente Médio e da região dos Bálcãs, mas a adição de agentes adoçantes e de frutas aumentou muito a sua popularidade e aceitação em todo o mundo. Vários agentes flavorizantes (frutas, compostos naturais e sintéticos) são adicionados ao iogurte. Em iogurte de consistência firme eles são normalmente adicionados à mistura antes da incubação, mas no tipo misturado são, em geral, incorporados depois de o gel ter sido formado.

C. Culturas iniciadoras dos iogurtes

O iogurte é feito com culturas vivas e ativas de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* e nos Estados Unidos, o órgão regulador, US Food and Drug Administration (FDA), exige que essas duas LAB específicas estejam presentes no produto para que ele seja chamado iogurte (Van de Water e Naiyanetr, 2008). Apesar de outras culturas poderem ser adicionadas aos iogurtes, elas não são uma exigência. No leite, o *Lb. bulgaricus* e o *S. thermophilus* coexistem e interagem de modo benéfico em uma relação associativa estável também conhecida como protocooperação (Liu *et al.*, 2009). A protocooperação, definida antes como simbiose bioquímica, envolve a troca de metabólitos e/ou de fatores de estímulo (Pette e Lolkema, 1950). A maioria das linhagens de *S. thermophilus* tem necessidades nutricionais menores e portanto cresce, preferencialmente, no leite. De fato, durante o crescimento exponencial inicial de *S. thermophilus*, não é observado crescimento de *Lb. bulgaricus*. Na segunda fase, quando o pH do leite começa a diminuir, o crescimento do *S. thermophilus* (menos tolerante ao ácido) se torna mais lento e gera vários fatores de crescimento, por exemplo, formiato, piruvato, folato, CO₂ e mesmo alguns ácidos de cadeias longas que estimulam o *Lb. bulgaricus* (mais tolerante ao ácido) a crescer exponencialmente. Este último, por sua vez, libera proteases da parede celular e peptidases de citoplasmas que hidrolisam caseínas em peptídeos que, em seguida, são hidrolisadas em aminoácidos. Uma vez que as linhagens de *S. thermophilus* não produzem proteases extracelulares, o seu crescimento é fortemente estimulado em coculturas com linhagens de *Lb. bulgaricus* que servem como fonte de aminoácidos capazes de suportar uma segunda fase de crescimento exponencial para *S. thermophilus*. O crescimento de *Lb. bulgaricus* continua na terceira fase de crescimento. (Consulte o trabalho de Sieuwerts *et al.*, 2008.)

D. Bioiogurte

O setor de produtos lácteos é o maior (33%) mercado de alimento funcional e os produtos lácteos são os maiores veículos para suplementação de probióticos (Leatherhead Food International, 2006). Isso, além do fato de que muitos consumidores associam os iogurtes à boa saúde, a suplementação com probióticos aumentou drasticamente seu consumo nos últimos anos (Hekmat e Reid, 2006). Como definido pela FAO/WHO (2001), os probióticos são “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do consumidor”. Alguns utilizados como probióticos em laticínios incluem linhagens específicas de LAB como *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. infantis* (Granato *et al.*, 2010). Outras LAB como os *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* que também possuem propriedades probióticas e os *Propionibacterium freudenreichii* e *Saccharomyces boulardii*, são probióticos não lácteos (Granato *et al.*, 2010). Alguns exemplos de iogurtes probióticos que se encontram disponíveis nos mercados mundiais são o iogurte *acidophilus bifidus*/AB (A + B + cultura de iogurte; A = *L. acidophilus*, B = *Bifidobacteria*), iogurte Bifidus/Biobest (*B. bifidum* ou *B. longum* + culturas de iogurte), iogurte Bioghurt/ABT (A + B + *S. thermophilus*), Bifilak/Cultura/Biomild (A + B) e BA Bifidus ativo (*B. longum* + cultura de iogurte) (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001). Recentemente, os efeitos de melhora na saúde, relacionados com o consumo de produtos probióticos foram atribuídos à liberação metabólica de peptídeos ativos do leite durante a fermentação do leite. Os peptídeos bioativos podem ser liberados durante o processamento dos alimentos ou depois da degradação por enzimas digestivas e foi comprovado que possuem propriedades opiáceas, antitrombose, antihipertensão, imunomodulação, antibactericida, antigástricas e são transportadores de minerais (Vinderola *et al.*, 2008). Alguns benefícios fisiológicos e para a saúde graças ao consumo de probióticos que foram documentados (Van de Water e Naiyanetr, 2008; Granato *et al.*, 2010) são:

- Melhora do sistema imune (do trato gastrointestinal e, possivelmente, do trato respiratório).
- Tratamento de distúrbios gastrointestinais: má-digestão primária e secundária de lactose, diarreia causada por antibióticos, *Clostridium difficile*, ou alergias a alimentos, diarreia infantil causada por enterite por rotavírus, diarreia de viajantes e, talvez, diarreia em infecções por *Helicobacter pylori*, intestino irritável e câncer do cólon.
- Regulação da motilidade do intestino (constipação, síndrome do intestino irritável).
- Maior absorção de nutrientes, por exemplo, ferro, cálcio e vitamina B.
- Diminuição do colesterol do soro (prevenção de arteriosclerose) e de hipertensão.
- Desintoxicação de carcinógenos (prevenção de câncer e supressão de tumores) e redução de produtos catabólicos eliminados pelo fígado e rins (prevenção de infecções urogenitais).

O maior desafio para a produção de qualquer alimento probiótico é o de melhorar/manter a viabilidade da cultura no produto durante o processamento, estocagem e trânsito através do estômago e intestino delgado, além de encontrar maneiras economicamente viáveis para produzi-los (Prado *et al.*, 2008; Figueroa-Gonzalez *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos, a National Yogurt Association (NYA) especifica um mínimo terapêutico de 10^8 cfu/g de LAB (no momento do preparo) como pré-requisito para usar o logo do NYA “Live and Active Culture” nas embalagens do produto. Um probiótico lácteo deve conter um número mínimo de células para fornecer efeitos benéficos para a saúde, mas também precisa ter boas propriedades sensoriais para que seja aceito pelos consumidores. Muitos fatores influenciam a sobrevivência da bactéria probiótica em bioprodutos lácteos fermentados: as linhagens utilizadas, as condições das culturas, a concentração do inóculo e as interações entre espécies, a composição do meio de fermentação, a presença de promotores/inibidores de nutrientes/crescimento, pressão osmótica, níveis de oxigênio dissolvido e da temperatura e tempo de incubação e estocagem (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

Além de ter efeitos benéficos para a saúde humana, uma linhagem probiótica ideal consegue suportar as condições de processamento e de armazenamento, tem boas características de crescimento, é compatível com as

culturas iniciadoras, é resistente ao ácido e à bile, adere às células epiteliais do intestino humano, coloniza as vísceras humanas e produz substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (Granato *et al.*, 2010). Várias culturas de linhagens selecionadas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* já estão disponíveis comercialmente. O *Lactobacillus acidophilus* é mais tolerante ao ácido (é capaz de tolerar um pH de 4,6) do que a bifidobactéria (seu crescimento é retardado em pH < 5,0) (Lankaputhra *et al.*, 1996), de modo que, para aplicações práticas, o pH do produto final deve ser mantido acima de 4,6. O uso de culturas iniciadoras GMP como *L. bulgaricus* com comportamento de “superacidificação” reduzida ou o uso de culturas iniciadoras ABT para iogurte (*L. acidophilus*, *B. bifidum* e *S. thermophilus*) podem auxiliar no controle do pH (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001). Outros meios de evitar o estresse do ácido incluem exposição prévia de uma linhagem a um pH mais baixo por um curto período de tempo para induzir tolerância ao ácido (Sanz, 2007), a aplicação de choque de calor (58°C por 5 minutos) ao iogurte antes da adição da cultura probiótica (Marshall, 1992), temperaturas de armazenamento abaixo de 3-4°C, adição de proteínas do soro para aumentar a capacidade de tamponamento do iogurte (Kailasapathy e Rybka, 1997) e a adição de citrato de sódio ou de carbonato de cálcio para neutralizar o ácido láctico produzido durante a fermentação (Zhao e Li, 2008). As bactérias probióticas preferem um ambiente anaeróbico ou microaeróbico e o estresse da oxidação pode ser minimizado com empacotamento ativo (Miller *et al.*, 2003), adição de ácido ascórbico (Dave e Shah, 1998; Zhao e Li, 2008), eletrorredução do leite (Bolduc *et al.*, 2006), uso de glicose oxidase (Cruz *et al.*, 2010) e microencapsulação (Talwalkar e Kailasapathy, 2003). A adição de prebióticos (ingredientes fermentados seletivamente que permitem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal) (Roberfroid, 2007) como a inulina da chicória e oligossacarídeos (Figuerola-Gonzalez *et al.*, 2011) e substâncias que promovam o crescimento como a caseína hidrolisada, concentrados de proteínas do soro, cisteína e triptona podem melhorar o crescimento e a viabilidade das bactérias probióticas (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001). Uma quantidade de inóculo mais alta (recomendação é de 10-20%) e o uso de culturas liofilizadas que são adicionadas diretamente na dorna contendo um mínimo de 5×10^9 cfu/g (IDF, 1996) garantem uma alta contagem de células ao final da incubação, durante o armazenamento até o consumo (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001).

E. Sabor do iogurte

A popularidade do iogurte como alimento depende muito de suas características sensoriais, sendo que o aroma e o gosto são os aspectos mais importantes. O iogurte é apreciado pelo sabor ácido e delicado. Até hoje, mais de 90 compostos de sabor já foram identificados em iogurtes, incluindo carboidratos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácido, ésteres, lactonas, compostos sulfurados, pirazinas e derivados de furano (Ott *et al.*, 1997). O sabor do iogurte, no entanto, é atribuído, principalmente, ao grupo de compostos de carbonilas, acetaldeído, diacetil, acetoína e acetona, que estão presentes em concentrações relativamente altas (em ordem decrescente) (Imhof *et al.*, 1994; Kaminarides *et al.*, 2007). Entre eles, o acetaldeído é sugerido como um componente indispensável do sabor típico do iogurte. Iogurtes com sabores tipicamente agradáveis requerem cerca de 23-40 mg/kg (no mínimo 8-10 mg/kg) de acetaldeído (Gaafar, 1992; Kneifel *et al.*, 1992; Georgala *et al.*, 1995). O acetaldeído dá ao iogurte seu sabor característico de maçã verde ou de nozes (Bodyfelt *et al.*, 1988). A produção de acetaldeído ocorre por várias vias que usam compostos diferentes como precursores, por exemplo, glicose, catecol, gliceraldeídos, acetileno, treonina, glicina e até o DNA (Zourari e Desmazeaud, 1991; Chaves *et al.*, 2002; Tamime e Robinson, 2007). A transformação da treonina em acetaldeído e glicina é sugerida como a via mais importante e a reação é catalisada pela enzima treonina aldolase, presente tanto em *Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Em temperaturas mais altas (40-45°C) que são usadas no preparo do iogurte, o *Lb. bulgaricus* é a cultura que mais contribui com essa enzima (Zourari e Desmazeaud, 1991) já que a aldolase de *S. thermophilus* é inativada a 30-42°C (Wilkins *et al.*, 1986).

O diacetil é o outro composto volátil importante que contribui com a nota amanteigada no aroma do iogurte;

a concentração típica em iogurte varia de 0,2 a 3,0 mg/kg (Cheng, 2010). Quando está presente junto com o acetaldeído, os pesquisadores afirmam que ele contribui para o sabor redondo e delicado do produto. Uma superprodução de acetaldeído em relação ao diacetil pode resultar em sabor desagradável. Há abordagens diferentes quanto à razão ideal de acetaldeído em relação ao diacetil para a obtenção do sabor acentuado desejado para os iogurtes (Zourari e Desmazeaud, 1991; Panagiotidis e Tzia, 2001; Boelrijk *et al.*, 2003). A dicetona é derivada da fermentação do citrato no leite (Vedamuthu, 2006) ou, segundo Nilsson (2008), é derivado da lactose e do citrato. A acetoína é produzida facilmente a partir do diacetil pela enzima diacetil redutase (Collins, 1972); cerca de 1,2-28,2 mg/kg de acetoína está, em geral, presente no leite (Beshkova *et al.*, 1998; Alonso e Fraga, 2001). O diacetil e a acetoína, juntos, contribuem para um sabor amanteigado, agradável e suave e sua combinação é fundamental para a percepção do rico sabor do iogurte (Cheng, 2010). Dois outros componentes voláteis de importância menor são a acetona e a 2-butanona. Ambos contribuem com o aroma doce e frutado do iogurte (Carcoba *et al.*, 2000; Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005).

O acetaldeído, o diacetil e outras substâncias voláteis descritas anteriormente são os compostos voláteis de sabor presentes no iogurte, mas não são os seus únicos componentes. O sabor dominante do iogurte é causado pelo ácido láctico e de uma complexa e bem equilibrada combinação de componentes do sabor e do aroma, que incluem substâncias voláteis e não voláteis (por exemplo, ácidos láctico, pirúvico, acético e fórmico) já presentes no leite, além de compostos específicos produzidos durante a fermentação (Imhof *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 1997). Fatores tais como a fonte do leite (de vaca, de cabra ou de ovelha), técnicas de processamento, componentes adicionados (estabilizantes, frutas, flavorizantes, probióticos e prebióticos), materiais da embalagem e condições de estocagem também possuem impacto no sabor final e no aroma do iogurte (Routray e Mishra, 2011). Além do mais, odores indesejáveis podem ser produzidos durante o armazenamento do iogurte e, como outros produtos lácteos ricos em gorduras, a oxidação lipídica é o fator que mais contribui para o surgimento desses sabores estranhos.

REFERÊNCIAS

- Abeijon, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., Gonzalez, S.N., 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Can. J. Microbiol.*52, 237-245.
- Abo-Elnaga, I.G., 1971. Early blowing of white pickled cheese. *Milchwissenschaft*26, 747-750.
- Adda, J., Gripon, J.C., Vassal, I., 1982. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chem.*9, 115-129.
- Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., Grongnet, J.F., Gaucheron, F., 2008. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: a comparison with cow's milk. *Food Chem.*106, 11-17.
- Ahmed, A.A.H., Moustafa, M.K., Marth, E.H., 1983. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *J. Food Prot.*46, 126-128.
- Ahn, S., Azzouny, R.A., Huyen, T.T.T., Kwak, H., 2009. The characteristics, detection and control of bacteriophage in fermented dairy products. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*29, 1-14.
- Albenzio, M., Corbo, M., Rehman, S., Fox, P., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobbetti, M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food Microbiol.*67, 35-48.
- Alonso, L., Fraga, M.J., 2001. Simple and rapid analysis for quantitation of the most important volatile flavor compounds in yogurt by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*39, 297-300.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M.J., Juarez, M., 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched chain, and *trans* fatty acids. *J. Dairy Sci.*82, 878-884.
- Anema, S.G., Lee, S.K., Klostermeyer, H., 2007. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of kappa-casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT-Food Sci. Technol.*40, 99-106.
- de Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M., Gobbetti, M., 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*67, 2011-2020.
- Ardo, Y., 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol. Adv.*24, 238-242.
- Ardo, Y., Pettersson, H.E., 1988. Accelerated cheese ripening with heat-treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic-enzyme. *J. Dairy Res.*55, 239-245.
- Ayad, E.H.E., 2009. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiol.*26, 533-541.
- Azarnia, S., Robert, N., Lee, B., 2006. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. *Crit. Rev. Biotechnol.*26, 121-143.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.*29, 54-66.
- Barbano, D.M., Rasmussen, R.R., Lynch, J.M., 1991. Influence of milk somatic-cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.*74, 369-388.
- Barrett, F.M., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 1999. Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.*9, 421-427.
- Baskaran, D., Sivakumar, S., 2003. Galactose concentration in pizza cheese prepared by three different culture techniques. *Int. J. Dairy Technol.*56, 229-232.
- Bastian, E.D., Brown, R.J., 1996. Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy J.*6, 435-457.

- Bastian, E.D., Hansen, K.G., Brown, R.J., 1991. Activation of plasmin with urokinase in ultrafiltered milk for cheese manufacture. *J. Dairy Sci.*74, 3669-3676.
- Bastian, E.D., Lo, C.G., David, K.M.M., 1997. Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss cheese ripening. *J. Dairy Sci.*80, 245-251.
- Beresford, T., Williams, A., 2004. The microbiology of cheese ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 287-317.
- Beshkova, D., Simova, E., Frengova, G., Simov, Z., 1998. Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*20, 180-186.
- Bester, B.H., 1976. Some aspects of gas production by coliform bacteria in cheese. *S. Afr. J. Dairy Technol.*8, 51-55.
- Beuviel, E., Buchin, S., 2004. Raw milk cheeses. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 319-345.
- Beuviel, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G., 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.*7, 311-323.
- Bhardwaj, A., Malik, R.K., Chauhan, P., 2008. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian J. Microbiol.*48, 317-325.
- Bockelmann, W., Hoppe, S.T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int. Dairy J.*11, 307-314.
- Bodyfelt, F.W., Tobias, J., Trout, G.M., 1988. *Sensory Evaluation of Dairy Products*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Boelrijk, A.E.M., de Jong, C., Smit, G., 2003. Flavor generation in dairy products. In: Smit, G. (Ed.), *Dairy Processing – Improving Quality*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 130-154.
- Bolduc, M.P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.C., 2006. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Int. Dairy J.*16, 1038-1048.
- Bonaiti, C., Leclercq-Perlat, M.N., Latrille, E., Corrieu, G., 2004. Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences. *J. Dairy Sci.*87, 3976-3988.
- Boudjellab, N., Roletrepecaud, O., Collin, J., 1994. Detection of residual chymosin in cheese by an enzyme-linked-immunosorbent-assay. *J. Dairy Res.*61, 101-109.
- Brennan, N.M., Cogan, T.M., Loessner, M., Scherer, S., 2004. Bacterial-surface ripened cheeses. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 199-225.
- Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2007. Biochemistry of cheese flavor development: insights from genomic studies of lactic acid bacteria. In: Cadwallader, K.R., Drake, M.A., McGorin, R.J. (Eds.), *Flavor of Dairy Products*, ACS Symposium Series, 971. American Chemical Society, Washington, DC, p. 177-192.
- Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2007. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria and their influence on bitterness in bacterial-ripened cheeses. In: Cadwallader, K.R., Drake, M.A., McGorin, R.J. (Eds.), *Flavor of Dairy Products*, ACS Symposium Series, 971. American Chemical Society, Washington, DC, p. 193-203.
- Broadbent, J.R., Strickland, M., Weimer, B.C., Johnson, M.E., Steele, J.L., 1998. Peptide accumulation and bitterness in Cheddar cheese made using single strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. *J. Dairy Sci.*81, 327-337.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brennan, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M.E., Steele, J.L., 2002. Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*68, 1778-1785.
- Broome, M.C., 2007. Adjunct culture metabolism and cheese flavour. In: Weimer, B.C. (Ed.), *Improving the Flavor of Cheese*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 177-198.
- Broome, M.C., Xu, X., Mayes, J.J., 2006. Proteolysis in Cheddar cheese made with alternative coagulants. *Aust. J. Dairy Technol.*61, 85-87.
- Bulajic, S., Mijacevic, Z., 2003. The technological acceptability of enterococci isolated from cheeses. *FEMS Congress of European Microbiologists*, Abstract Book., Elsevier106.
- Callanan, M.J., Ross, R.P., 2004. Starter cultures: genetics. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 191-206.
- Cantor, M.D., van den Tempel, T., Hansen, T.K., Ardo, Y., 2004. Blue cheese. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 175-198.
- Carcoba, R., Delgado, T., Rodriguez, A., 2000. Comparative performance of a mixed strain starter in cow's milk, ewe's milk and mixtures of these milks. *Eur. Food Res. Technol.*211, 141-146.
- Carles, C., Dumas, B., 1985. Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide-bond of bovine alpha-S1-casein – comparison of the behavior of this substrate with that of beta-caseins and kappa-caseins. *FEBS Lett.*185, 282-286.
- Carrasco, M.S., Scarinci, H.E., Simonetta, A.C., 2005. Associative growth of lactic acid bacteria for cheese starters: acidifying and proteolytic activities and redox potential development. *J. Food Agric. Environ.*3, 116-119.
- Casalta, E., Sorba, J., Aigle, M., Ogier, J., 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int. J. Food Microbiol.*133, 243-251.
- Chamba, J., Irlinger, F., 2004. Secondary and adjunct cultures. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 191-206.
- Chaplin, B., Green, M.L., 1980. Determination of the proportion of kappa-casein hydrolyzed by rennet on coagulation of skim milk. *J. Dairy Res.*47, 351-358.
- Chaves, A.C.S.D., Fernandez, M., Lerayer, A.L.S., Mierau, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*68, 5656-5662.
- Cheng, H., 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*50, 938-950.
- Chou, Y.E., Edwards, C.G., Luedecke, L.O., Bates, M.P., Clark, S., 2003. Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*86, 2516-2524.
- Chr. Hansen, N.C., 2008. Improved low fat cheese with Chr. Hansen's FLAVOR CONTROL (TM) ripening cultures. Available at <http://newhope360.com/improved-low-fat-cheese-chr-hansen-s-flavor-controltm-ripening-cultures>.
- Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J., Steele, J., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J.G.*76, 217-246.
- Christiansen, P., Petersen, M.H., Kask, S., Moller, P.L., Petersen, M., Nielsen, E.W., Vogensen, F.K., Ardo, Y., 2005. Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *Int. Dairy J.*15, 901-909.
- Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z., 2007. Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.*90, 4005-4021.
- Collins, E.B., 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.*55, 1022-1028.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003a. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*13, 841-866.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003b. Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Res.*70, 105-113.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 373-389.
- Collomb, M., Spahni, M., Buehler, T., 1998. Analysis of triglycerides. II. Validation of a multilinear regression method for the determination of foreign fats in milk fat. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*89, 75-83.
- Colombo, E., Franzetti, L., Frusca, M., Scarpellini, M., 2010. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Italian goat

- cheese. *J. Food Prot.*73, 657-662.
- Cooper, C., Corredig, M., Alexander, M., 2010. Investigation of the colloidal interactions at play in combined acidification and rennet of different heat-treated milks. *J. Agric. Food Chem.*58, 4915-4922.
- Costa, N.E., Hannon, J.A., Guinee, T.P., Auty, M.A.E., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P., 2010. Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*93, 3469-3486.
- Creamer, L.K., MacGibbon, A.K.H., 1996. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.*6, 539-568.
- Creamer, L., Lawrence, R., Gilles, J., 1985. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *N.Z.J. Dairy Sci. Tech.*20, 185-203.
- Cromie, S., 1992. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Aust. J. Dairy Technol.*47, 96-100.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H., 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.*5, 855-875.
- Crow, V., Curry, B., Christison, M., Hellier, K., Holland, R., Liu, S.Q., 2002. Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Aust. J. Dairy Technol.*57, 99-105.
- Cruz, A.G., Fera, J.A.F., Walter, E.H.M., Andrade, R.R., Cavalcanti, R.N., Oliveira, C.A.F., Granato, D., 2010. Processing optimization of probiotic yogurt containing glucose oxidase using response surface methodology. *J. Dairy Sci.*93, 5059-5068.
- Cui, S., Li, J., Hu, C., Jin, S., Ma, Y., 2007. Development of a method for the detection of beta-lactamases in milk samples. *J. AOAC Int.*90, 1128-1132.
- Curtin, A.C., McSweeney, P.L.H., 2004. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 435-454.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., Coccolin, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from north west of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT-Food Sci. Technol.*43, 1151-1159.
- Dalgleish, D.G., 1979. Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *J. Dairy Res.*46, 653-661.
- Dalgleish, D.G., 1992. The enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1. Proteins, 2nd ed. Elsevier, Essex, p. 579-619.
- Dalgleish, D.G., 1993. The enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 2nd ed. Chapman and Hall, London, p. 69-100.
- Dalgleish, D.G., 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J. Dairy Sci.*81, 3013-3018.
- Dalgleish, D.G., 2007. The casein micelle and its reactivity. *Lait*87, 385-387.
- Dalgleish, D.G., 2011. On the structural models of bovine casein micelles – review and possible improvements. *Soft Matter*7, 2265-2272.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A., Goff, H.D., 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.*14, 1025-1031.
- Dalgleish, D.G., Alexander, M., Corredig, M., 2005. Mechanism of acid coagulation of milk studied by a multi-technique approach. In: Dickinson, E. (Ed.), *Royal Society of Chemistry Special Publications*, Vol. 298. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 16-25.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A., Banks, J., 2003. Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *J. Appl. Microbiol.*94, 595-607.
- Dave, R.I., Shah, N.P., 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.*81, 2804-2816.
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., 2006. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In: Fox, P.F. McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 2. Lipids, 3rd ed. Springer, New York, p. 481-556.
- Dervisolgu, M., Aydemir, O., Yazici, F., 2007. Coagulating enzymes utilized in cheesemaking and their effects on casein fractions. *Gida*32, 241-249.
- de Kruif, C.G., 1992. Casein micelles: diffusivity as a function of renneting time. *Langmuir* 8, 2932-2937.
- de Kruif, C.G., Holt, C., 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1. Proteins, 3rd ed. Part A. Kluwer/Plenum, New York, p. 233-276.
- de Kruif, K.G., Hoffmann, M.A.M., Van Marle, M.E., Van Mil, P.J.J.M., Roefs, S.P.F.M., Verheul, M., Zoon, N., 1995. Gelation of proteins from milk. *Faraday Discuss.* 101, 185-200.
- de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., Meijer, W.C., de Vos, W.M., 1997. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat. Biotechnol.* 15, 976-979.
- de Vos, W.M., 1996. Metabolic engineering of sugar metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 223-242.
- Donato, L., Alexander, M., Dalgleish, D.G., 2007. Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *J. Agric. Food Chem.*55, 4160-4168.
- Echols, M.A., 2008. Indications to the origin prior to the TRIPS agreement. *Geographical Indications for Food Products: International, Legal, and Regulatory Perspectives*, Kluwer Law International, The Netherlands, p. 33-60.
- Eck, A., Gillis, J.-C., 2000. *Cheesemaking from Science to Quality Assurance*, 2nd ed. Lavoisier, Paris.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific opinion on Q fever. *EFSA J.*8, 1595 (114 p.).
- Ekinci, F.Y., Gurel, M., 2008. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *J. Dairy Sci.*91, 892-899.
- El-din, B.B., El-Soda, M., Ezzat, N., 2002. Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products. *Lait*82, 289-304.
- El-Gazzar, F.E., Marth, E.H., 1991. *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients – a review. I. *Listeria monocytogenes*, listeriosis and responses of the pathogen to environmental conditions. *Milchwissenschaft*46, 14-19.
- El-Gazzar, F.E., Marth, E.H., 1991. *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: a review. II. *Listeria monocytogenes* and dairy technology. *Milchwissenschaft*46, 82-86.
- Ellis, B.R., Marth, E.H., 1984. Growth of *Pseudomonas* or *Flavobacterium* in milk – reduced yield of Cheddar cheese. *J. Food Prot.*47, 713-716.
- Farkye, N.Y., 2004. Cheese technology. *Int. J. Dairy. Technol.*57, 91-98.
- Farkye, N., Fox, P., Fitzgerald, G., Daly, C., 1990. Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase positive or proteinase negative starters. *J. Dairy Sci.*73, 874-880.
- Farrag, S.A., Marth, E.H., 1992. Interactions between *Listeria monocytogenes* and other psychrotrophic bacteria in dairy foods – a review. *Food Aust.*44, 281-286.
- Farrell Jr., H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., Qi, P.X., 2006. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*11, 135-147.
- Feeney, E.P., Guinee, T.P., Fox, P.F., 2002. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*85, 1646-1654.
- Figuerola-Gonzalez, I., Quijano, G., Ramirez, G., Cruz-Guerrero, A., 2011. Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. *J. Sci. Food Agric.*91, 1341-1348.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2001. *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Córdoba, Spain, 34 p.
- Fox, P.F., 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.*72, 1379-1400.
- Fox, P.F., 1993. Exogenous enzymes in dairy technology – a review. *J. Food Biochem.*17, 173-199.
- Fox, P.F., 2003. Milk proteins: general and historical aspects. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1. Proteins Part A, 3rd ed. Kluwer/Plenum, New York, p. 1-48.

- Fox, P.F., Brodtkorb, A., 2008. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *Int. Dairy J.*18, 677-684.
- Fox, P.F., Kelly, A.L., 2003. Developments in the chemistry and technology of milk proteins. 3. Product related aspects of milk proteins. *Food Aust.*55, 337-340.
- Fox, P.F., Law, J., 1991. Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*5, 239-262.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.*12, 457-509.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2006. Chemistry and biochemistry of cheese manufacture and ripening. *Food Sci. Technol. Today*20, 28-32.
- Fox, P.F., Wallace, J.M., 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.*45, 17-85.
- Fox, P.F., Lucey, J.A., Cogan, T.M., 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*29, 237-253.
- Fox, P.F., Singh, T.K., McSweeney, P.L.H., 1994. Proteolysis in cheese during ripening. In: Andrews, A.T., Varley, J. (Eds.), *Biochemistry of Milk Products*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 1-31.
- Fox, P.F., Singh, T.K., McSweeney, P.L.H., 1995. Biogenesis of flavor compounds in cheese. In: Malin, E.L., Tunick, M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*. Plenum Press, London, p. 59-98.
- Fox, P.F., O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., O'Brien, N.M., 1996. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. *Adv. Food Nutr. Res.*39, 163-328.
- Fox, P., McSweeney, P., Lynch, C., 1998. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*53, 83-89.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen, Gaithersburg, MD.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Frister, H., Michaelis, M., Schwerdtfeger, T., Folkenberg, D.M., Sorensen, N.K., 2000. Evaluation of bitterness in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*55, 691-695.
- Gaarfar, A.M., 1992. Volatile flavor compounds of yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.*27, 87-91.
- Galesloot, Th., E., Hassing, F., Veringa, H.A., 1968. Symbiosis in yoghurt. I. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*22, 50-63.
- Gallardo-Escamilla, F.J., Kelly, A.L., Delahunty, C.M., 2005. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.*88, 3745-3753.
- Ganesan, B., Weimer, B.C., 2007. Amino acid catabolism in relation to cheese flavor development. In: Weimer, B.C. (Ed.), *Improving the Flavour of Cheese*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 70-100.
- Garde, S.S., Avila, M.M., Arias, R.R., Gaya, P.P., Nuñez, M.M., 2011. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*150, 59-65.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Stanton, C., 1998. Development of a probiotic cheddar cheese containing human derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*64, 2192-2199.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C., 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.*47, 4907-4916.
- Gastaldi, E., Trial, N., Guillaume, C., Bourret, E., Gontard, N., Cuq, J.L., 2003. Effect of controlled kappa-casein hydrolysis on rheological properties of acid milk gels. *J. Dairy Sci.*86, 704-711.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T.B., 1991. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 C to 30°C. *J. Food Prot.*54, 662-668.
- Georgala, A.I.K., Tsakalidou, E., Kandarakis, I., Kalantzopoulos, G., 1995. Flavor production in ewe's milk and ewe's milk yogurt, by single strains and combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, isolated from traditional Greek yogurt. *Lait*75, 271-283.
- Gobbetti, M., 2004. Extra-hard varieties. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Physics, Chemistry and Microbiology*, Vol. 2. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 51-70.
- Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., de la Fuente, M.A., Alonso, L., Juarez, M., 2004. Quantitative characterization of unsaturated and *trans* fatty acids in ewe's milk fat. *Lait*84, 473-482.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Fonseca Faria, J.d. A., Shah, N.P., 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*9, 455-470.
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.*7, 751-761.
- Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F., 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: a review. *J. Dairy Sci.*68, 531-540.
- Grappin, R., Lefier, D., Dasen, A., Pochet, S., 1993. Characterizing ripening of Gruyere de Comte: influence of time × temperature and salting conditions on eye and slit formation. *Int. Dairy J.*3, 313-328.
- Green, M.L., Grandison, A.S., 1993. Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 2nd ed. Aspen, Gaithersburg, MD, p. 101-140.
- Green, M.L., Manning, D.J., 1982. Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.*49, 737-748.
- Griffiths, M.W., 1989. *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. *J. Sci. Food Agric.*47, 133-158.
- Griffiths, M.W., 1990. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Prot.*53, 790-792.
- Guinee, T.P., 2003. Role of protein in cheese and cheese products. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1. Proteins, Part B, 3rd ed. Kluwer/Plenum, New York, p. 1083-1174.
- Guinee, T.P., Feeney, E.P., Fox, P.F., 2001. Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese: 2. Texture and functionality. *Lait*81, 475-485.
- Gunasekaran, S., Mehmet Ak, M., 2003. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Guyomarc'h, F., Queguiner, C., Law, A.J.R., Horne, D.S., Dalgleish, D.G., 2003. Role of the soluble and micelle-bound heat-induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *J. Agric. Food Chem.*51, 7743-7750.
- HabibiNajafi, M.B., Lee, B.H., 1996. Bitterness in cheese: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*36, 397-411.
- Hamosh, M., 1990. *Lingual and Gastric Lipases: Their Role in Fat Digestion*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hannon, J.A., Wilkinson, M., Delahunty, C.M., Morrissey, P.A., Beresford, T.P., 2002. The use of novel starter systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *Farm Food*12, 48-51.
- Hannon, J.A., Sousa, M., Lillevang, S., Sepulchre, A., Bockelmann, W., McSweeney, P., 2004. Effect of defined-strain surface starters on the ripening of Tilsit cheese. *Int. Dairy J.*14, 871-880.
- Hassan, A.N., 2008. Possibilities and challenges of exopolysaccharide producing lactic cultures in dairy foods. *J. Dairy Sci.*91, 1282-1298.
- Hassan, F.A.M., 2000. Effect of mixed coccus to rod starter ratio on Mozzarella cheese quality. *Egypt. J. Dairy Sci.*28, 219-229.
- Hassan, H.N., El-Deeb, S.A., Mashaly, R.I., 1988. Action of rennet and rennet substitutes on casein fractions in polyacrylamide gel electrophoresis. *Indian J. Dairy Sci.*41, 485-490.
- Hekmat, S., Reid, G., 2006. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutr. Res.*26, 163-166.
- Hicks, C.L., Allauddin, M., Langlois, B.E., O'Leary, J., 1982. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Prot.*45, 331-334.
- Higashio, K., Yoshioka, Y., Kikuchi, T., 1977. Isolation and identification of growth factor of *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. 2. Studies on symbiosis in yogurt cultures. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn*51, 209-215.
- Hill, A.R., 2007. Physical factors affecting the flavor of cheese. In: Weimer, B.C. (Ed.), *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead, Cambridge, p. 252-283.

- Hill, A.R., 2011. Welcome to our cheese site. Available at <http://www.foodsci.uoguelph.ca/cheese/welcom.htm>.
- Hill, A.R., Warriner, K., 2011. Cheese safety 101. Part 2: I have seen the enemy and he speaks Latin. Ontario Cheese Soc. Newslett. 8 August 2011.
- Hill, A.R., Warriner, K., 2011. Cheese safety 101. Part 3: Where do they come from? Ontario Cheese Soc. Newslett. 8 August 2011.
- Hill, A.R., Bullock, D.H., Irvine, D.M., 1982. Manufacturing parameters of Queso Blanco made from milk and recombinant milk. Can. Inst. Food Sci. Technol. J.15, 47-53.
- Holmes, D., Duersch, J., Ernstrom, C., 1977. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. J. Dairy Sci.60, 862-869.
- Holt, C., Dalgleish, D.G., 1986. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. J. Colloid Interface Sci.114, 513-524.
- Holt, C., de Kruif, C.G., Tuinier, R., Timmins, P.A., 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. Colloid Surf. A.213, 275-284.
- Horne, D.S., 1986. Steric stabilization and casein micelle stability. J. Colloid Interface Sci.111, 250-260.
- Horne, D.S., 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. Int. Dairy J.8, 171-177.
- Horne, D.S., 2001. Factors influencing acid-induced gelation of skim milk. In: Dickinson, E., Miller, R. (Eds.), Food Hydrocolloids: Fundamentals of Formulation. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 345-351.
- Horne, D.S., 2002. Casein structure, self-assembly and gelation. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.7, 456-461.
- Horne, D.S., 2006. Casein micelle structure: models and muddles. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.11, 148-153.
- Horne, D.S., Banks, J.M., 2004. Rennet-induced coagulation of milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 47-70.
- Huffman, L.M., Kristoffersen, T., 1984. Role of lactose in Cheddar cheese manufacturing and ripening. N.Z.J. Dairy Sci. Technol.19, 151-162.
- Hussain, I., Bell, A.E., Grandison, A.S., 2011. Comparison of the rheology of Mozzarella type curd made from buffalo and cows' milk. Food Chem.128, 500-504.
- Hyslop, D.B., 2003. Enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1. Proteins, Part B, 3rd ed. Kluwer/Plenum, New York, p. 839-878.
- IDF, 1996. Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) – standard of identity. IDF International Standard 149. International Dairy Federation, Brussels.
- Imhof, R., Glattli, H., Bossset, J.O., 1994. Volatile organic aroma compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. Lebensm. Wiss. Technol.27, 442-449.
- Ismail, B., Nielsen, S.S., 2010. Invited review: plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. J. Dairy Sci.93, 4999-5009.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. Int. J. Dairy Technol.64, 14-33.
- Janhøj, T., Qvist, K.B., 2010. The formation of cheese curd. In: Law, B.A., Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of Cheesemaking, p. 130-165. Blackwell, Sussex.
- Jayarao, B.M., Henning, D.R., 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J. Dairy Sci.84, 2157-2162.
- Jenness, R., 1988. Composition of milk. In: Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E.M. (Eds.), Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, p. 779.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H., Johnson, M., 1990. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. I. Executive summary, introduction and history. J. Food Prot.53, 441-452.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H., Johnson, M., 1990. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. II. Microbiology. J. Food Prot.53, 519-540.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H., Johnson, M., 1990. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. III. Technology, discussion, recommendations, bibliography. J. Food Prot.53, 610-623.
- Kailasapathy, K., Lam, S.H., 2005. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. Int. Dairy J.15, 929-939.
- Kailasapathy, K., Rybka, S., 1997. L. acidophilus and Bifidobacterium spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. Aust. J. Dairy Technol.52, 28-35.
- Kaminarides, S., Stamou, P., Massouras, T., 2007. Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. Int. J. Food Sci. Technol.42, 1019-1028.
- Kethireddipalli, P., Hill, A.R., Dalgleish, D.G., 2010. Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. Int. Dairy J.20, 838-843.
- Kethireddipalli, P., Hill, A.R., Dalgleish, D.G., 2011. Interaction between casein micelles and whey protein/kappa-casein complexes during renneting of heat-treated reconstituted skim milk powder and casein micelle/serum mixtures. J. Agric. Food Chem.59, 1442-1448.
- Kikuchi, M., Yamaguchi, K., Matsui, Y., 1984. The influence of heating milk on the symbiotic relationships of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J. Coll. Dairy. (Ebetsu)10, 349-358.
- Kirby, C.J., Brooker, B.E., Law, B.A., 1987. Accelerated ripening of cheese using liposome encapsulated enzyme. Int. J. Food Sci. Technol.22, 355-375.
- Kirk, J., Mellenberger, R., 2011. Mastitis control program for *Prototheca* mastitis in dairy cows. Available at <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/prototheca.pdf>.
- Klei, L., Yun, J., Sapru, A., Lynch, J., Barbano, D., Sears, P., Galton, D., 1998. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. J. Dairy Sci.81, 1205-1213.
- Klein, N., Lortal, S., 1999. Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. Int. Dairy J.9, 751-762.
- Klein, N., Zourari, A., Lortal, S., 2002. Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products – comparison with several dairy bacteria. Int. Dairy J.12, 853-861.
- Kneifel, W., Ulberth, F., Erhard, F., Jaros, D., 1992. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. 1. Screening of commercially available starter cultures. Milchwissenschaft47, 362-365.
- Kunji, E., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Anton. Leeuw. Int. J.G.70, 187-221.
- Kushal, R., Anand, S.K., 2001. A comparison of different virulence markers of *Yersinia enterocolitica*. J. Food Sci. Technol. Mysore38, 254-256.
- Kushal, R., Anand, S.K., 2006. Evaluation of the virulence potential of *Yersinia enterocolitica* isolates from milk by cell invasion-inhibition assay. Lait86, 171-176.
- Laleye, L.C., Simard, R.E., Lee, B.H., Holley, R.A., Giroux, R.N., 1987. Involvement of heterofermentative lactobacilli in development of open texture in cheeses. J. Food Prot.50, 1009-1012.
- Laleye, L.C., Simard, R.E., Lee, B.H., Holley, R.A., 1990. Quality attributes of Cheddar cheese containing added lactobacilli. J. Food Sci.55, 114-118.
- Lane, C., Fox, P., 1997. Role of starter enzymes during ripening of cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. Int. Dairy J.7, 55-63.
- Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., Britz, M.L., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. Food Aust.48, 113-118.
- Law, B.A., 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. Int. Dairy J.11, 383-398.
- Law, B.A., 2010a. Cheese adjunct cultures. Aust. J. Dairy Technol.65, 45-49.
- Law, B.A., 2010b. Cheese ripening and cheese flavor technology. In: Law, B.A., Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of Cheesemaking, 2nd ed. Sussex, Blackwell, p. 231-259.
- Law, B.A., Mulholland, F., 1995. Enzymology of lactococci in relation to flavour development from milk proteins. Int. Dairy J.5, 833-854.

- Law, B.A., Wigmore, A., 1982. Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. *J. Dairy Res.*49, 137-146.
- Law, B.A., Wigmore, A.S., 1983. Accelerated ripening of Cheddar cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from starter streptococci. *J. Dairy Res.*50, 519-525.
- Law, B.A., Andrews, A.T., Cliffe, A.J., Sharpe, M.E., Chapman, H.R., 1979. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese making with stored milk. *J. Dairy Res.*46, 497-509.
- Law, J., Haandrikman, A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*7, 1-11.
- Lawrence, R.C., Gilles, J., Creamer, L.K., 1983. The relationship between cheese texture and flavour. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*18, 175-190.
- Lawrence, R.C., Heap, H.A., Gilles, J., 1984. A controlled approach to cheese technology. *J. Dairy Sci.*67, 1632-1645.
- Leatherhead Food International, 2006. The international market for functional foods. *Functional Food Market Report*, Leatherhead Food International, London.
- Lee, M.R., Johnson, M.E., Lucey, J.A., 2005. Impact of modifications in acid development on the insoluble calcium content and rheological properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*88, 3798-3909.
- Lee, W.J., Lucey, J.A., 2010. Formation and physical properties of yogurt [report]. *Asian Austral. J. Anim. Sci.*23, 1127-1136.
- Lelievre, J., Kelso, E.A., Stewart, D.B., 1978. Effects of *Pseudomonas* species on the syneresis of renneted milk gels. *Proceedings of the XX International Dairy Congress*, 760-762. Paris, Vol. E.
- Lemieux, L., Simard, R.E., 1991. Bitter flavor in dairy products. 1. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait*71, 599-636.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2010. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*65, 143-149.
- Li, J., Dagleish, D.G., 2006. Controlled proteolysis and the properties of milk gels. *J. Agric. Food Chem.*54, 4687-4695.
- Limsowtin, G.K.Y., Powell, I.B., Parente, E., 1996. Types of starters. In: Cogan, T.M., Accolas, J.-P. (Eds.), *Dairy Starter Cultures*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 101-129.
- Limsowtin, G.K.Y., Bruinenberg, P.G., Powell, I.B., 1997. A strategy for cheese starter culture management in Australia. *J. Microbiol. Biotechnol.*7, 1-7.
- Liu, M., Siezen, R.J., Nauta, A., 2009. *In silico* prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals proto-cooperation in yogurt manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.*75, 4120-4129.
- Lodics, T.A., Steenson, L.R., 1993. Phage-host interactions in commercial mixed-strain dairy starter cultures: practical significance – a review. *J. Dairy Sci.*76, 2380-2391.
- Lortal, S., Di Blasi, A., Pediliggieri, C., Tuminello, L., Fauquant, J., Lecuona, Y., Campo, P., Carpino, S., Licitra, G., 2009. Tina wooden vat biofilm: a safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *Int. J. Food Microbiol.*132, 1-8.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*11, 1-17.
- Lucey, J.A., 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.*85, 281-294.
- Lucey, J.A., 2004. Formation, structure, properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 105-122.
- Lucey, J.A., 2004. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *Int. J. Dairy Technol.*57, 77-84.
- Lucey, J.A., Teo, C.T., Munro, P.A., Singh, H., 1997. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *J. Dairy Res.*64, 591-600.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P.A., 1998. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J. Dairy Res.*65, 555-567.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P.A., 2000. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone. *J. Dairy Res.*67, 415-427.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E., Horne, D.S., 2003. Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*86, 2725-2745.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., Boor, K.J., 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*83, 264-274.
- Macedo, A.C., Xavier, M.F., Oliveira, J.C., 1993. The technology, chemistry, and microbiology of Serra cheese: a review. *J. Dairy Sci.*76, 1725-1739.
- MacGibbon, A.K.H., 1996. Herd-to-herd variations in the properties of milkfat. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 56, 224-227.
- Madkor, S.A., Tong, P.S., El Soda, M., 2000. Ripening of cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 83, 1684-1691.
- Mannu, L., Paba, A., 2002. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewe's milk cheese. *J. Appl. Microbiol.* 92, 55-62.
- Marshall, V.M., 1992. Inoculated ecosystems in a milk environment. *J. Appl. Bacteriol.* 73, S127-S135.
- Martin, M.C., del Rio, B., Martinez, N., Magadan, A.H., Alvarez, M.A., 2008. Fast real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* 25, 978-982.
- Martin-Visscher, L.A., 2010. Examining the structure, function and mode of action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *ProQuest Dissertations and Theses*.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C., 2010. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. Dairy J.* 20, 18-24.
- Martley, F.G., Crow, V.L., 1996. Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *J. Dairy Res.* 63, 489-507.
- Matzdorf, B., Cuppett, S.L., Keeler, L., Hutkins, R.W., 1994. Browning of Mozzarella cheese during high temperature pizza baking. *J. Dairy Sci.* 77, 2850-2853.
- McBrearty, S., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Wallace, J.M., Stanton, C., 2001. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. *Int. Dairy J.*11, 599-610.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A., 1975. Plasmid distribution and evidence for a proteinase plasmid in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Microbiol.*29, 546-548.
- McSweeney, P.L.H., 1997. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. *Int. J. Dairy Technol.*50, 123-128.
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 347-360.
- McSweeney, P.L.H., 2007. Flavor, texture, and flavor defects in hard and semi-hard cheeses. In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead, Cambridge, p. 189-201.
- McSweeney, P.L.H., 2011. Biochemistry of cheese ripening. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), 2nd ed. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, p. 667-674.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 361-371.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*80, 293-324.
- McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F., Healy, A., Hojrup, P., 1993. Proteolytic specificity of chymosin on bovine alpha-S1-casein. *J. Dairy Res.*60, 401-412.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., Cogan, T.M., 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*3, 613-634.

- McSweeney, P., Walsh, E., Fox, P., Cogan, T., Drinan, F., Castelogonzalez, M., 1994. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Ir. J. Agric. Food Res.*33, 183-192.
- McSweeney, P.L.H., Hayaloglu, A.A., O'Mahony, J.A., Bansal, N., 2006. Perspectives on cheese ripening. *Aust. J. Dairy Technol.*61, 69-77.
- Melilli, C., Barbano, D.M., Caccamo, M., Calvo, M.A., Schembari, G., Licitra, G., 2004. Influence of brine concentration, brine temperature, and presalting on early gas defects in raw milk pasta filata cheese. *J. Dairy Sci.*87, 3648-3657.
- Messens, W., Foubert, I., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., 2000. Proteolysis of a high pressure treated smear-ripened cheese. *Milchwissenschaft*55, 328-332.
- Messens, W., Foubert, I., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., 2001. Proteolysis of a high pressure treated mould-ripened cheese. *Milchwissenschaft*56, 201-204.
- Mikulec, N., Habus, I., Antunac, N., Vitale, L., Havranek, J., 2010. Influence of peptide and amino acids on the formation of cheese flavour. *Mljekarstvo*60, 219-227.
- Milesi, M.M., Wolf, I.V., Bergamini, C.V., Hynes, E.R., 2010. Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *J. Dairy Sci.*93, 5020-5031.
- Miller, C.W., Nguyen, M.H., Rooney, M., Kailasapathy, K., 2003. The control of dissolved oxygen content in probiotic yoghurts by alternative packaging materials. *Packag. Technol. Sci.*16, 61-67.
- Moatsou, G., Samolada, M., Panagiotou, P., Anifantakis, E., 2004. Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *Food Chem.*87, 75-81.
- Morales, P., Calzada, J., Juez, C., Nunez, M., 2010. Volatile compounds in cheeses made with *Micrococcus* sp. INIA 528 milk culture or high enzymatic activity curd. *Int. J. Dairy Technol.*63, 538-543.
- Mukherjee, K.K., Hutkins, R.W., 1994. Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*77, 2839-2849.
- Mulholland, F., 1995. The peptidases of lactic acid bacteria. *Food Technol. Int. Eur.*64, 61-62.
- Nag, S.K., 2010. Pesticides, veterinary residues and other contaminants in milk. In: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*, Vol. 1. Milk Production and Processing, Woodhead, Cambridge, p. 113.
- Nichol, A.W., Harden, T.J., Tuckett, H., 1996. Browning defects in mould ripened cheese. *Food Aust.*48, 136-138.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Sesena, S., Palop, L., Cabezas, L., 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*20, 1092-1098.
- Nieuwoudt, J.A., Bester, B.H., 1975. The effect of different methods of salting on gas development in Gouda cheese. *S. Afr. J. Dairy Technol.*7, 247-252.
- Nilsson, D., 2008. Metabolically engineered lactic acid bacteria and their use. US Patent No. US 7 465 575 B2.
- O'Connell, J.E., Fox, P.F., 2003. Heat-induced coagulation of milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Vol. 1. Proteins, 3rd ed., Part A. Kluwer/Plenum, New York, p. 879-945.
- O'Farrell, L., Sheehan, J., Wilkinson, M., Harrington, D., Kelly, A., 2002. Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. *Lait*82, 305-316.
- O'Mahony, J.A., McSweeney, P.L.H., Lucey, J.A., 2006. A model system for studying the effects of colloidal calcium phosphate concentration on the rheological properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*89, 892-904.
- O'Mahony, J.A., Mulholland, E.O., Guinee, T.P., 2006. Modifying the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese by reduction of calcium level or by the addition of emulsifying salts during curd plasticization. *J. Anim. Sci.*84, 313-314.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M., Beresford, T.P., 2001. High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends Food Sci. Technol.*12, 51-59.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Murphy, P.M., Kelly, A.L., Beresford, T.P., 2002. Effects of high pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*12, 915-922.
- Olivecrona, T., Vilaro, S., Olivecrona, G., 2003. Lipases in milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1. Proteins, 3rd ed., Part A. Kluwer/Plenum, New York, p. 473-488.
- Olson, N.F., Gunasekaran, S., Bogenrief, D.D., 1996. Chemical and physical properties of cheese and their interactions. *Neth. Milk Dairy J.*50, 279-294.
- Ott, A., Fay, L.B., Chaintreau, A., 1997. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *J. Agric. Food Chem.*45, 850-858.
- Panagiotidis, P., Tzia, C., 2001. Effect of milk composition and heating on flavor and aroma of yogurt. In: Spanier, A.M., Shahidi, F., Parliment, T.H., Mussinan, C., Ho, C.-T., Contis, E.T. (Eds.), *Food Flavors and Chemistry: Advances of the New Millennium*, RSC Special Publication No. 274. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 160-167.
- Parente, E., Cogan, T.M., 2004. Starter cultures: general aspects. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 123-147.
- Pastor-Navarro, N., Maquieira, A., Puchades, R., 2009. Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. *Anal. Bioanal. Chem.*395, 907-920.
- Peterson, S., Marshall, R., 1990. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese – a review. *J Dairy Sci.*73, 1395-1410.
- Pette, J.W., Lolkema, H., 1950. Yogurt. I. Symbiosis and antibiosis of mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*4, 197-208.
- Petterson, H.E., Sjöström, G., 1975. Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic starter bacteria in cheese without detrimental effect to the cheese-making process, and its effect on the cheese ripening. *J. Dairy Res.*42, 313-326.
- Pillidge, C.J., Crow, V.L., Coolbear, T., Reid, J.R., 2003. Exchanging lactocepain plasmids in lactococcal starters to study bitterness development in Gouda cheese: a preliminary investigation. *Int. Dairy J.*13, 345-354.
- Playne, M., 2002. Researching, developing and commercializing probiotic cheese. *Aust. Dairy Foods*, February, 28-30.
- Povolo, M., Bonfitto, E., Contarini, G., Toppino, P.M., 1999. Study on the performance of three different capillary gas chromatographic analyses in the evaluation of milk fat purity. *J. High Resolut. Chromatogr.*22, 97-102.
- Powell, I.B., 2010. Issues in cheese starter culture microbiology. *Aust. J. Dairy Technol.*65, 40-44.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.*41, 111-123.
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G.M., Reinheimer, J., Ackermann, H., 2010. *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Int. Dairy J.*20, 657-664.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W., 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.*81, 1810-1817.
- Rank, T.C., Grappin, R., Olson, N.F., 1985. Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review. *J. Dairy Sci.*68, 801-805.
- Rasic, J.L., Kurmann, J.A., 1978. *Yoghurt – Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen.
- Ratray, F., Fox, P., 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.*82, 891-909.
- Rea, M.C., Cogan, T.M., Vuyst, L.D., 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.*81, 73-84.
- Rehman, S., Banks, J., McSweeney, P., Fox, P., 2000. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.*10, 45-53.

- Roberfroid, M., 2007. Probiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*137, 830S-837S.
- Robinson, R.K., Tamime, A.Y., 1990. Microbiology of fermented milks. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology*, Vol. 2. The Microbiology of Milk Products, 2nd ed. Elsevier Applied Science, London, p. 291-344.
- Robinson, R.K., Tamime, A.Y., Wszolek, M., 2002. Microbiology of fermented milks. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology Handbook: the Microbiology of Milk and Milk products*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, New York, p. 367-421.
- Robitaille, G., Tremblay, A., Moineau, S., St-Gelais, D., Vadeboncoeur, C., Britten, M., 2009. Fat-free yogurt made using a galactose positive exopolysaccharide producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.*92, 477-482.
- Roefs, S.P.F.M., Vanvliet, T., Vandenbijgaart, H.J.C.M., Degrootmostert, A.E.A., Walstra, P., 1990. Structure of casein gels made by combined acidification and rennet action. *Neth. Milk Dairy J.*44, 159-188.
- Rohrbach, B.W., Draughon, F.A., Davidson, P.M., Oliver, S.P., 1992. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *J. Food Prot.*55, 93-97.
- Roth, E., Schwenninger, S.M., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., 2011. Facultative anaerobic halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from a natural smear ecosystem inhibit *Listeria* growth in early ripening stages. *Int. J. Food Microbiol.*147, 26-32.
- Routray, W., Mishra, H.N., 2011. Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F10*, 208-220.
- Rudolf, M., Scherer, S., 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European Red smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.*63, 91-98.
- Rupp, R., Clement, V., Piacere, A., Robert-Granie, C., Manfredi, E., 2011. Genetic parameters for milk somatic cell score and relationship with production and udder type traits in dairy Alpine and Saanen primiparous goats. *J. Dairy Sci.*94, 3629-3634.
- Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, E., Kelly, A.L., Guamis, B., 2000. Changes in curd acidification caused by high pressure treatment. *Ir. J. Agric. Food Res.*39, 169.
- Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, E., Kelly, A.L., Guamis, B., 2002. Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.*12, 35-44.
- Samanidou, V.F., Nisyriou, S.A., Papadoyannis, I.N., 2007. Residue analysis of Penicillins in food products of animal origin by HPLC: a review. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*30, 1145-1204.
- Sandra, S., Dalglish, D.G., 2007. The effect of ultra high pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *Int. Dairy J.*17, 1043-1052.
- Sandra, S., Alexander, M., Dalglish, D.G., 2007. The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.*308, 364-373.
- Santos, M.V., Ma, Y., Barbano, D.M., 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf life storage. *J. Dairy Sci.*86, 2491-2503.
- Santos, U., Ramos, F., 2006. Analytical methodologies for chloramphenicol residues determination in food matrixes: a brief review. *Curr. Pharmaceut. Anal.*2, 53-57.
- Sanz, Y., 2007. Ecological and functional implications of the acid adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *Int. Dairy J.*17, 1284-1289.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*71, 394-406.
- Schulz-Collins, D., Senge, B., 2004. Acid- and acid/rennet-curd cheeses – Part A: Quark, cream cheese and related varieties. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 301-328.
- Scott, R., Robinson, R.K., Wilbey, R.A., 1998. *Cheesemaking Practice*, 3rd ed. Aspen, Gaithersburg, MD.
- Siewerts, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., Vlieg, J.E.T.v.H., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*74, 4997-5007.
- Simova, E., Beshkova, D., 2007. Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria. *Lait*87, 555-573.
- Singh, H., Creamer, L., 1990. A sensitive quantitative assay for milk coagulants in cheese and whey products. *J. Dairy Sci.*73, 1158-1165.
- Singh, H., Waungana, A., 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.*11, 543-551.
- Singh, T.K., Young, N.D., Drake, M., Cadwallader, K.R., 2005. Production and sensory characterization of a bitter peptide from beta-casein. *J. Agric. Food Chem.*53, 1185-1189.
- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G.F., Beresford, T., Ross, R.P., 2010. Invited review: *Lactobacillus helveticus* – a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J. Dairy Sci.*93, 4435-4454.
- Smith, J.L., 2002. Structural and functional characterization of the lantibiotic mutacin 1140. ProQuest Dissertations and Theses.
- Smith, M.R., 2005. Cheese ripening process. Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents.
- Somers, J.M., Guinee, T.P., Kelly, A.L., 2002. The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of Mozzarella-type cheese. *Int. J. Dairy Technol.*55, 5-11.
- Soomro, A.H., Masud, T., 2008. Partial characterisation of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* J1 isolated from fermented milk product Dahi. *Aust. J. Dairy Technol.*63, 8-14.
- Spinnler, H., Gripon, J., 2004. Surface mould-ripened cheeses. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Physics, Chemistry and Microbiology*, Vol.2. Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 157-174.
- Spolaor, D., Marangon, M., 1997. Pre-ripening at low temperature of hard cheeses to prevent late blowing: effect on the ripening. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*48, 43-52.
- Steele, J.L., 1995. Contribution of lactic acid bacteria to cheese ripening. In: Malin, E.L., Tunick, M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese*. Plenum Press, New York, p. 209-220.
- Steele, J.L., 1996. Proteolytic enzyme systems of lactic acid bacteria and their importance in cheese flavor development. Book of Abstracts, IFT Annual Meeting 1996, New Orleans, USA. Institute of Food Technologists, Chicago, IL.
- Stewart, D.B., 1975. Factors influencing the incidence of *B. cereus* spores in milk. *J. Soc. Dairy Technol.*28, 80-85.
- Stewart, D.I., Kelly, A.L., Gulinee, T.P., Beresford, T.P., 2006. High pressure processing: review of application to cheese manufacture and ripening. *Aust. J. Dairy Technol.*61, 170-178.
- Suarez, V.B., Capra, M.L., Rivera, M., Reinheimer, J.A., 2007. Inactivation of calcium dependent lactic acid bacteria phages by phosphates. *J. Food Prot.*70, 1518-1522.
- Suarez, V.B., Zago, M., Quiberoni, A., Carminati, D., Giraffa, G., Reinheimer, J., 2008. Lysogeny in *Lactobacillus delbrueckii* strains and characterization of two new temperate prolate-headed bacteriophages. *J. Appl. Microbiol.*105, 1402-1411.
- Sutherland, A.D., 1993. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. *J. Dairy Res.*60, 569-574.
- Sutherland, A.D., Limond, A.M., 1993. Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. *J. Dairy Res.*60, 575-580.
- Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N., Morichi, T., 1986. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. *J. Dairy Sci.*69, 311-320.

- Swearingen, P.A., Adams, D.E., Lensmire, T.L., 2004. Factors affecting calcium lactate and liquid expulsion defects in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*87, 574-582.
- Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G., Renault, P., Ehrlich, S.D., Gasson, M.J., 1996. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*62, 2641-2643.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K., 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.*58, 36-39.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 1999a. Background to manufacturing practice. *Yoghurt Science and Technology*, 2nd ed. Woodhead, Cambridge, p. 11-128.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 1999b. Traditional and recent developments in yoghurt production and related products. *Yoghurt Science and Technology*, 2nd ed. Woodhead, Cambridge, p. 306-388.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 2007. Biochemistry of fermentation. *Yoghurt Science and Technology*, 3rd ed. Woodhead, Cambridge, p. 535-607.
- Thierry, A., Maillard, M.B., Richoux, R., Kerjean, J.R., Lortal, S., 2005. *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Lait*85, 57-74.
- Todesco, R., Carcano, M., Lodi, R., Crepaldi, P., 2000. Indirect conductimetry in the study of propionibacteria inhibition. *Lait*80, 337-346.
- Todorov, S.D., 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* spp. *Braz. J. Microbiol.*39, 178-187.
- Todorov, S.D., 2010. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal based fermented beverage from Bulgaria. *Food Control*21, 1011-1021.
- Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M., Dicks, L.M.T., 2010. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chourico, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci.*84, 334-343.
- Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S.M.I., Tome, E., Franco, B.D.G.M., 2011. Potential beneficial properties of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from smoked Salmon. *J. Appl. Microbiol.*110, 971-986.
- Todorov, S.D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G., Franco, B.D.G.M., 2011. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) from isolation to application: characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.*44, 1351-1363.
- Todorov, S.D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L.M.T., van Reenen, C.A., Prevost, N., Dousset, X., 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked Salmon. *Anaerobe*17, 23-31.
- Tome, E., Todorov, S.D., Gibbs, P.A., Teixeira, P.C., 2009. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.*23, 50-73.
- Tranchant, C.C., Dalgleish, D.G., Hill, A.R., 2001. Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine tuning acid production and rennet action. *Int. Dairy J.*11, 483-494.
- Tunick, M.H., van Hekken, D.L., 2006. Chemistry and rheology of cheese. In: Shahidi, F., Weenan, H. (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Flavor, and Texture*, 2nd ed. American Chemical Society, Washington, DC, p. 133-141.
- Turner, K.W., Martley, F.G., 1983. Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*45, 1932-1934.
- Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., 2003. Acceleration of cheese ripening. In: Smit, G. (Ed.), *Dairy Processing: Maximizing Quality*. Woodhead, Cambridge, p. 419-447.
- Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Fox, P.F., 2004. Proteolysis in cheese during ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. General Aspects, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p. 391-433.
- Upadhyay, V.K., Sousa, M.J., Ravn, P., Israelsen, H., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 2004. Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait*84, 527-538.
- Upadhyay, V.K., Ravn, P., Israelsen, H., Sousa, M.J., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 2006. Acceleration of proteolysis during ripening of Cheddar type cheese using a streptokinase-producing strain of *Lactococcus*. *J. Dairy Res.*73, 70-73.
- Upadhyay, V.K., Huppertz, T., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 2007. Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*8, 485-492.
- van de Water, J., Naiyanetr, P., 2008. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: Farnworth, E.R. (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 129-164.
- van Hooydonk, A.C.M., Walstra, P., 1987. Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 19-48.
- Vasbinder, A.J., Rollema, H.S., de Kruijff, C.G., 2003. Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *J. Dairy Sci.*86, 1548-1555.
- Vassal, L., Monnet, V., Lebars, D., Roux, C., Gripon, J.C., 1986. Relation between pH, chemical composition and texture of Camembert cheese. *Lait*66, 341-351.
- Vedamuthu, E.R., 2006. Starter cultures for yogurt and fermented milk. In: Chandan, R.C., White, C., Kilara, A., Hui, Y.H. (Eds.), *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, p. 89-116.
- Veringa, H.A., Galesloot, Th., E., Davelaar, H., 1968. Symbiosis in yoghurt. 2. Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*22, 114-120.
- Villeneuve, P., Pina, M., Graille, J., 1996. Determination of pregastric lipase specificity in young ruminants. *Chem. Phys. Lipids*83, 161-168.
- Vinderola, G., LeBlanc, A.M., Perdigon, G., Matar, C., 2008. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. In: Farnworth, E.R. (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 209-241.
- Vindfeldt, K., 1993. A new concept for improving the quality and flavour of cheese. *Scand. Dairy Inf.*7, 34-35.
- Vlahopoulou, I., Bell, A.E., Wilbey, R.A., 2001. Effects of starter culture and its exopolysaccharides on the gelation of glucono-delta-lactone acidified bovine and caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.*54, 135-140.
- van Vliet, T., Lakemond, C.M.M., Visschers, R.W., 2004. Rheology and structure of milk protein gels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*9, 298-304.
- Wagner, M., Eliskases-Lechner, F., Rieck, P., Hein, I., Allerberger, F., 2006. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small scale Austrian cheese factories. *J. Food Prot.*69, 1297-1303.
- Walsh, C.D., Guinee, T.P., Harrington, D., Mehra, R., Murphy, J., Fitzgerald, R.J., 1998. Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low moisture part skim Mozzarella cheese from bovine milks containing kappa-casein AA, AB or BB genetic variants. *J. Dairy Res.*65, 307-315.
- Walstra, P., 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*73, 1965-1979.
- Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles: do they exist?. *Int. Dairy J.*9, 189-192.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. Cheese ripening and properties. In: Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (Eds.), *Dairy Science and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 641-675.
- Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I., 2006. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Addit. Contam.*23, 362-384.
- Weimer, B.C., 2007. *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead, Cambridge.
- Welman, A.D., 2009. Exploitation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria: nutritional and functional benefits. In: Ullrich, M. (Ed.), *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, p. 331-344.
- Wilkins, D.W., Schmidt, R.H., Shireman, R.B., Smith, K.L., Jezeski, J.J., 1986. Evaluating acetaldehyde synthesis from [C-14 U]l-threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*69, 1219-1224.

- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N., 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.*15, 817-830.
- Wolf, V.I., Meinardi, A.C., Zalazar, A.C., 2009. Production of flavour compounds from fat during cheese ripening by action of lipases and esterases. *Protein Pept. Lett.*16, 1235-1243.
- Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E.H., 1988. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3rd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, p. 21.
- Yokoyama, H., Sawamura, N., Motobayashi, N., 1992. Method for accelerating cheese ripening. Patent Application, EP 0 469 857 A1. Fuji Oil Company, Japan.
- Yoshida, S., 1989. Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey. *J. Dairy Sci.*72, 1446-1450.
- Yu, J., Wang, W.H., Menghe, B.L.G., Jiri, M.T., Wang, H.M., Liu, W.J., Bao, Q.H., Lu, Q., Zhang, J.C., Wang, F., Xu, H.Y., Sun, T.S., Zhang, H.P., 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J. Dairy Sci.*94, 3229-3241.
- Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.*11, 185-201.
- Zhang, H., Wang, S., 2009. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *J. Immunol. Methods*350, 1-13.
- Zhang, J., Liu, G., Shang, N., Cheng, W., Chen, S., Li, P., 2009. Purification and partial amino acid sequence of Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1. *J. Food Prot.*72, 2524-2529.
- Zhao, X., Li, D., 2008. A new approach to eliminate stress for two probiotics with chemicals *in vitro*. *Eur. Food Res. Technol.*227, 1569-1574.
- Zinno, P., Janzen, T., Bennedsen, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2010. Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from Mozzarella cheese plants. *Int. J. Food Microbiol.*138, 137-144.
- Zisu, B., Shah, N.P., 2005. Low-fat Mozzarella as influenced by microbial exopolysaccharides, preacidification, and whey protein concentrate. *J. Dairy Sci.*88, 1973-1985.
- Zourari, A., Desmazeaud, M.J., 1991. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Greek yogurts. 2. Strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and mixed cultures with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Lait*71, 463-482.

Processamento de sementes oleaginosas e modificação de gorduras

Fereidoon Shahidi^{SS}

I. INTRODUÇÃO

Os óleos comestíveis têm origem em sementes (oleaginosas), tecidos animais (banha de porco, sebo ou peixe), frutos (por exemplo, palma), no processamento de subprodutos de cereais (por exemplo, óleo de farelo de arroz), na indústria da pesca (óleo de peixe, óleo de fígado de bacalhau etc.) e em outras fontes. Em geral, a limpeza seguida da recuperação do óleo são as primeiras etapas essenciais. Assim, o esmagamento das sementes e o refino são os principais processos para a obtenção de óleos comestíveis.

Quando o óleo provém de sementes, estas precisam ser limpas antes da extração do óleo para a remoção de partículas sólidas indesejadas. Depois, as sementes são submetidas a secagem e, em seguida, a um aquecimento (têmpera) que ajuda a desativar as enzimas, que podem levar à degradação do óleo e de outras substâncias da semente, e a liberar melhor o óleo dos compartimentos celulares nos quais está armazenado (Meshehdani *et al.*, 1990).

Nas sementes intactas, as enzimas estão separadas dos compartimentos intracelulares que contêm o óleo. No entanto, se as sementes forem danificadas, as enzimas presentes em seu interior poderão entrar em contato com o óleo ou com outro material sensível, como os glicosinolatos da canola. Isso provocaria reações adversas, em graus diferentes, dependendo da temperatura, da umidade e da extensão do dano. Em alguns casos, depois da têmpera, as sementes oleaginosas podem passar pela etapa de descascamento, como a soja. Dessa forma, além de se obter um óleo melhor após o descascamento, o farelo de soja desoleificado resultante contém um teor mais elevado de proteínas, como 48%, em vez de 44%. A obtenção de um óleo melhor também pode ocorrer nos casos em que as cascas contêm componentes menos desejáveis, como as ceras no girassol e no milho, que precisam ser removidos

em uma etapa posterior. No entanto, o descasque precisa ser realizado com cuidado para evitar a ruptura das células que contêm o óleo e sua adsorção pelas cascas.

Dependendo das sementes, elas poderão ser aquecidas antes do esmagamento e da prensagem em prensa de rosca, que geralmente libera cerca de um terço do óleo. A prensa de rosca possibilita uma ação contínua que permite a ejeção e a separação do óleo por drenagem. O material sólido que ainda contém dois terços do óleo normalmente é uma massa sólida viscosa, conhecida como “torta”. Os pedaços grandes da torta podem ser submetidos à laminação para a redução do tamanho antes da extração do óleo remanescente com a ajuda de solventes apropriados (Kemper, 2005).

Em geral, a extração do óleo é realizada com extratores tipo Crown, que utilizam um fluxo contracorrente que reduz a quantidade de solvente necessária. Nesse processo, o solvente flui sobre a superfície das partículas e difunde-se através da micela durante o processo de percolação (Kemper, 2005).

Os solventes utilizados para a extração do óleo são hexanos, na forma de mistura com cerca de 60% de *n*-hexano e outros isômeros do hexano. Como o hexano é inflamável, tem-se considerado o uso de outros solventes, mas, por enquanto, nenhum deles é comercializado, por causa da menor produção de óleo, entre outros fatores. Depois da extração por solvente, o óleo é separado e os sólidos resultantes passam pelo dessolventizador-tostador para a remoção dos hexanos remanescentes. Habitualmente, o farelo resultante contém menos de 1% de óleo residual. O processo de tostagem é necessário quando o farelo se destina ao consumo humano ou animal. Os flocos quase sem solvente são removidos do sistema com o uso de um ciclone ou por meio da dessolventização por arraste a vapor, resultando na produção de um farelo dessolventizado. Esse farelo poderá ser moído até a granulometria desejada, dependendo de seu uso final. O óleo bruto também é obtido após a remoção do hexano por destilação e a mistura do óleo prensado com o óleo extraído do solvente.

No caso dos óleos provenientes de frutos, como aquele oriundo da palma (dendezeiro), o óleo poderá ser obtido tanto do fruto quanto da amêndoa. O processamento dos frutos da oliveira e da palmeira difere um pouco, e os detalhes não serão discutidos aqui. Cachos de frutos de palmeira são colhidos no estágio de maturação desejado e transportados para a usina, onde são esterilizados por meio de aquecimento com vapor d’água sob pressão, por cerca de uma hora, para inativar as enzimas presentes, a fim de que o óleo não seja hidrolisado.

Depois da esterilização, os frutos são retirados dos caules e, em seguida, transferidos para um digestor, onde o material é reaquecido até cerca de 100°C, durante alguns minutos, para soltar o pericarpo da semente e romper as células que contêm o óleo e, assim, liberá-lo. Esse material é submetido à prensagem contínua com prensa de rosca. O líquido de prensagem contém quase dois terços de óleo, além de água e determinados sólidos, enquanto a torta de prensagem contém as sementes e a fibra fresca. A adição de água ao líquido de prensagem facilita a sedimentação dos sólidos submetidos à filtração e o óleo bruto resultante poderá ser separado por decantação ou centrifugação. O óleo é resfriado e armazenado, enquanto os sólidos (torta prensada) são transferidos para um aspirador que permite separar as sementes (amêndoas) da fibra. Com frequência, a fibra resultante é queimada na caldeira a vapor para fornecer energia. A semente poderá, então, ser submetida à secagem para que as amêndoas se soltem das cascas. Em seguida, as sementes são esfriadas e armazenadas ou quebradas, e as amêndoas, separadas das cascas, com base na diferença de densidades. Após isso, as amêndoas são enviadas para uma prensa de rosca ou submetidas à extração com solvente para a produção de óleo e farelo de palma (Fairhurst e Mutert, 1999).

A recuperação do óleo de origem animal pode ser realizada por meio de processamento seco ou úmido. No processamento úmido, o material é cozido por vapor, surgindo, no final do processo, três fases: uma com proteínas desnaturadas precipitadas como sólidos, uma aquosa e uma representada por uma camada de gordura no topo, que pode ser separada por decantação, com o uso de centrífugas (Henry, 2009). O óleo bruto assim obtido poderá ser submetido a um novo processamento, quando necessário. O assunto, porém, está além do escopo deste capítulo.

A prensagem a frio é outro método utilizado para a produção de óleos sensíveis à oxidação ou para a obtenção

de óleo de primeira qualidade, com frequência, utilizado na forma bruta. Nesse caso, o óleo é extraído por técnicas tradicionais ou, como é mais usual, por prensa de rosca, em geral com o uso de um processador de bateladas. O óleo prensado é liberado através de pequenos orifícios ou fendas. O óleo prensado a frio tem a vantagem de reter seus componentes minoritários sem muitas alterações. Depois da extração e do refino do óleo, é possível realizar outras etapas para a fabricação dos produtos. Por exemplo, os óleos podem ser esfriados lentamente até cerca de 4°C, em um processo conhecido como winterização, que remove as gorduras saturadas que precipitariam durante o armazenamento refrigerado. O óleo também pode ser submetido a um processo de adição de água para a fabricação de margarinas. Em todos esses casos, os óleos também podem ser parcialmente hidrogenados, técnica que gera preocupação pela produção de gorduras *trans*. Apesar disso, muitas vezes, esse processo se faz necessário para produzir gorduras com aspecto sólido que confirmam certa textura e sensação bucal aos produtos finais. No entanto, nos últimos tempos, pesquisadores concentram esforços na produção de formulações que empreguem óleo de palma e outros mais saturados para conferir tais texturas e sensações, sem a adição de gorduras *trans* aos produtos.

Por fim, a estabilidade dos óleos comestíveis é de grande interesse para a indústria e também para os consumidores, porque os produtos precisam ter uma vida de prateleira adequada, principalmente quando são utilizados em frituras ou em processos que ocorrem em temperaturas elevadas. Nesses casos, utilizam-se antioxidantes, em especial nos óleos mais insaturados. A indústria das sementes oleaginosas volta-se, aos poucos, para a fabricação de produtos com alto teor de ácido oleico, como o óleo de girassol alto oleico, a fim de obter óleos mais estáveis e com uma vida de prateleira maior.

II. PROCESSAMENTO DE ÓLEOS COMESTÍVEIS

O óleo bruto obtido após a prensagem e a extração pode ainda ser submetido a uma série de etapas de processamento, conhecidas como refino. Os óleos especiais, a banha de porco e o sebo geralmente são consumidos sem passar pela etapa de refino.

O processo de refino é realizado para produzir um óleo suave, principalmente triacilgliceróis (TAGs), mais conhecidos como triglicerídeos. Os componentes não TAGs presentes no óleo bruto podem incluir pequenas quantidades de vários produtos e outros sólidos, bem como fosfolipídeos, ácidos graxos (AGs) livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, pigmentos, tocoferóis e/ou tocotrienóis, fitosteróis, ceras e possíveis compostos com enxofre, além de hidroperóxidos, produtos da oxidação secundária e eventuais esqualenos e outros hidrocarbonetos, inclusive carotenoides. Compostos fenólicos diferentes dos tocóis também podem estar presentes em certos óleos, como o óleo de gergelim e o azeite de oliva (Pokorny, 1991).

Durante o refino, os óleos passam pelos processos de degomagem, refino, branqueamento, desodorização e, em alguns casos, winterização. Às vezes, adicionam-se antioxidantes ao óleo após a desodorização para garantir a estabilidade oxidativa do óleo. Algumas operações levam à remoção de alguns componentes benéficos do óleo, como os tocofenóis e os esteróis.

A. Remoção dos fosfolipídeos: o processo de degomagem

Os fosfolipídeos presentes nos óleos, em geral são mais insaturados e escurecem quando armazenados, como resultado da oxidação. Esses fosfolipídeos estão presentes tanto na forma hidratável (FLH) como não hidratável (FLNH). Os FLHs (fosfatídeos) podem ser removidos por meio de lavagem com água, à medida que se precipitam no óleo. O precipitado de fosfolipídeos é denominado “goma” e, por essa razão, o processo é conhecido como degomagem. Já a remoção dos FLNHs do óleo requer um processo de acidificação. Assim, industrialmente, o óleo

pode ser submetido a um processo de acidificação com 0,05%-0,2% de ácido fosfórico em uma temperatura de 70-80°C, durante um período entre 5 e 30 minutos, além de agitação (Zufarov *et al.*, 2008). Esse processo também pode ajudar a remover parte da clorofila do óleo, que pode agir como um fotossensibilizador, acelerando assim a deterioração do óleo, mediante foto-oxidação. Mais recentemente, considera-se o uso do ácido cítrico ou do ácido málico no processo de degomagem. Depois da acidificação, o óleo é submetido a uma lavagem com água e à remoção dos fosfolipídeos. Os fosfolipídeos removidos podem ter diferentes usos. Por exemplo, os fosfolipídeos resultantes do processamento do óleo de soja, conhecidos como lecitinas de soja, podem ser purificados e utilizados como suplemento alimentar ou ter outras funções (Ceci *et al.*, 2008).

A primeira etapa do refino envolve a remoção dos fosfolipídeos, por meio de processo de degomagem. A degomagem purifica os óleos oriundos de sementes, os quais costumam conter impurezas no estado coloidal ou em solução (Bernardini, 1985). O óleo vegetal bruto é degomado para produzir um óleo substancialmente livre de materiais que sedimentam durante o transporte ou armazenamento. Os óleos vegetais extraídos com solventes contêm quantidades consideráveis de fosfatídeos e outros materiais mucilaginosos, que formam depósitos nos tanques de armazenamento. A remoção dos fosfatídeos do óleo bruto é vital, porque sua presença confere sabor e cor indesejáveis ao óleo, além de encurtar sua vida de prateleira. Eles também aumentam as perdas no refino ao emulsificar quantidades consideráveis de óleo neutro, que é perdido na borra. Os fosfatídeos recuperados podem ser novamente processados para produzir lecitina para uso como emulsificante em produtos como a margarina, o chocolate, as tintas de emulsão (tinta látex) ou como suplemento alimentar.

As sementes oleaginosas mais comuns – como soja, algodão, girassol e colza – são grandes fontes de fosfolipídeos (Indira *et al.*, 2000; Willem e Mabel, 2008), hidratáveis (FLHs) ou não hidratáveis (FLNHs). A maioria dos fosfolipídeos dos óleos brutos de girassol e de colza é do tipo hidratável e pode ser removida por degomagem com água (Zufarov *et al.*, 2008). Os FLNHs não são capazes de se expandir e formar géis ou de precipitar no óleo (Szydłowska-Czerniak, 2007); por isso, sua remoção requer um processo mais complexo, em temperaturas maiores, e o uso de ácido fosfórico, cítrico, málico ou outros agentes degomantes.

Depois do tratamento ácido, a goma hidratada insolúvel resultante é separada na forma de sedimento, por ação centrífuga, e, quando seca, fornece lecitina bruta. O óleo degomado pode ser desidratado e bombeado para tanques de armazenamento ou seguir para a etapa de refino. Deve-se evitar o uso de quantidades excessivas de ácido fosfórico, já que ele pode aumentar o teor de fósforo do meio. Além de sua remoção ser difícil, o fósforo pode acarretar problemas no processo de refino. Processos de degomagem diferentes, como a degomagem seca, a degomagem com água, a degomagem ácida (Andersen, 1962) e a degomagem total (Dijkstra e Opstal, 1989) já foram descritos em detalhes. Mais recentemente, a degomagem enzimática, a degomagem e o desceramento simultâneos e a degomagem por membranas receberam bastante atenção, por seu papel na redução de perdas no refino e de intensidade da cor do óleo final.

O processo de degomagem seca envolve a remoção das gomas precipitadas (por condicionamento ácido), por meio de filtração durante o processo de branqueamento, e não de separação centrífuga. Esse processo é utilizado em óleos com baixos teores de fosfatídeos, como óleo de palma, óleos láuricos e sebo comestível, e é adequado para a preparação dos óleos que seguem para o subsequente refino físico. A degomagem com água consiste no tratamento do óleo natural com uma pequena quantidade de água, seguido de separação por centrifugação. Esse processo é aplicado a vários óleos que contêm quantidades significativas de fosfolipídeos. A fosfatidilcolina e o fosfatidilinositol são totalmente hidratáveis. A fosfatidiletanolamina e o ácido fosfatídico são parcialmente hidratáveis ou não hidratáveis, quando formam sais com cátions divalentes (em especial, cálcio e magnésio) ou não estão na forma dissociada. Os complexos fosfatídeo-metal podem ser decompostos pela adição de ácido ou de um agente complexante, seguida de hidratação com água. A neutralização parcial do ácido é utilizada para evitar a migração dos fosfatídeos de volta para a fase oleosa (Kovari, 2004).

Para o refino físico dos óleos vegetais, a degomagem com água não é suficiente. No processo de degomagem

ácida, as gomas são precipitadas por um processo de condicionamento ácido (utilizando-se ácido fosfórico, cítrico, málico ou tartárico, entre outros) e, depois, removidas por centrifugação. O processo de degomagem total, conhecido por sua sigla holandesa TOP, foi projetado para tratar ainda mais o óleo já degomado com água. O processo pode ser realizado de dois modos distintos, que atendem a diferentes necessidades (Dijkstra e Opstal, 1987). No primeiro deles, um ácido diluído é finamente disperso no óleo. Após um tempo de contato suficiente, uma base é adicionada e misturada à dispersão de ácido em óleo. A base pode ser o hidróxido de sódio, o carbonato de sódio ou o silicato de sódio. Durante o processo, inicialmente, o ácido decompõe os complexos metal-ácido fosfatídicos em sais insolúveis do metal e ácido fosfatídico (na forma ácida). Em seguida, o ácido fosfatídico é hidratado por neutralização parcial com a base adicionada e removido do óleo, por centrifugação. O segundo modo utiliza uma combinação de duas centrífugas para remover os fosfolipídeos hidratados com alta eficiência e perda mínima. A primeira remove a maior parte da goma ou cera. Evidentemente, a qualidade do óleo degomado com água é crucial para a degomagem total (TOP). Quando o óleo degomado com água tem um teor mais alto de cálcio e magnésio, o processo TOP torna-se menos eficaz (Cleenewerck e Dijkstra, 1992). A remoção dos fosfolipídeos dos óleos vegetais com o uso de tecnologias por membranas é um desenvolvimento relativamente novo (Ochoa *et al.*, 2001).

Os processos de degomagem tradicionais, que incluem a degomagem com água, a degomagem TOP, o tratamento com ácido e outros, não garantem os baixos teores de fósforo necessários para o refino físico e nem sempre são adequadas para todas as qualidades de óleo, por causa do alto teor de FLNH (Copeland e Belcher, 2005).

Os processos de degomagem mais recentes são a degomagem suave e a degomagem enzimática. O processo de degomagem suave envolve a eliminação completa dos fosfolipídeos por um agente quelante, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na presença de um agente emulsificante. Tipos diferentes de óleo bruto são degomados pelo método da degomagem suave; o teor de fosfolipídeos nas amostras de óleo tratado é reduzido a cerca de 5 ppm. No entanto, o custo elevado do EDTA torna esse processo pouco atrativo para as indústrias (Choukri *et al.*, 2001).

O primeiro processo de degomagem enzimática utilizado industrialmente foi o *EnzyMax 1*, lançado em 1992, e que utilizava fosfolipase A₂ suína. Na sequência, desenvolveram-se várias fosfolipases microbianas com diferentes especificidades. Elas têm a vantagem de ser *kosher* e *halal*, além de ter uma disponibilidade ilimitada e um baixo custo. É provável que a degomagem enzimática seja o melhor processo disponível para reduzir o teor de fósforo dos óleos brutos a teores abaixo de 5 ppm (Chakrabarti e Rao, 2004). A enzima fosfolipase A₂ catalisa os fosfatídeos não hidratáveis em lisofosfolipídeos hidratáveis, que são, em seguida, removidos por centrifugação; resultando em óleo com baixo teor de fósforo. Em razão da baixa temperatura empregada, esse processo não altera a cor do óleo degomado, diferentemente do que ocorre na degomagem convencional, com ácido fosfórico. Além disso, o teor de óleo nas gomas oriundas da degomagem enzimática é de apenas 25%-30%, comparado a 50%-60% utilizando o método convencional para óleo de farelo de arroz. O orizanol presente no óleo bruto do farelo de arroz permanece quase intacto durante o processo enzimático. Os processos para desceramento e degomagem simultâneos utilizam água e uma solução aquosa de cloreto de cálcio e, em seguida, centrifugação ou cristalização em baixa temperatura (20°C), facilitando a precipitação dos fosfatídeos hidratáveis e não hidratáveis junto com a cera, e a diminuição do teor de fósforo para menos de 5 ppm (Kaimal *et al.*, 2000; Rajam *et al.*, 2005).

A viabilidade econômica de tais processos é muito boa, em virtude da eliminação de uma de suas etapas. O processo com membranas é utilizado, geralmente, em usinas de extração. De acordo com Lin *et al.* (1997), a separação por membranas é, em resumo, um processo acionado por pressão que se baseia na exclusão por tamanho. Ele separa componentes diferentes de acordo com a massa molecular ou com o tamanho e a forma das partículas e depende das interações desses componentes com a superfície das membranas e com outros componentes da mistura. Os fosfolipídeos podem ser separados dos TAGs no estágio de micela, com o uso de

membranas apropriadas. A degomagem do óleo bruto por meio de membranas produz um permeado e um retentado que contêm, respectivamente, TAGs e fosfolipídeos. A maioria dos materiais coloridos e parte dos AGs livres e outras impurezas são incluídos nas micelas de fosfolipídeos e também removidos (Lin *et al.*, 1997).

B. Refino

A etapa de degomagem, anterior ao refino químico, nem sempre é necessária. O procedimento de refino químico mais conhecido e amplamente utilizado é o processo que utiliza a soda cáustica. O refino do óleo consiste em um tratamento de purificação concebido para remover os AGs livres. Em geral, os óleos refinados são neutros (isto é, nem ácidos, nem básicos), não têm materiais que se desagregam sob aquecimento, têm cor mais clara, são menos viscosos e mais susceptíveis à oxidação.

O processo de refino pode ser realizado em bateladas ou em sistema contínuo. No refino em bateladas, a emulsão aquosa de sabões formada a partir dos AGs livres, junto com outras impurezas (borra), sedimenta no fundo e é removida. No sistema contínuo, a emulsão é separada por centrifugação. Basicamente, todos os óleos de soja dos Estados Unidos são refinados com o processo contínuo. Com base no teor de AGs livres do óleo, um excesso de 0,10%-0,13% de soda é adicionado ao óleo bruto e a mistura segue para um misturador de alto cisalhamento em linha. A mistura sabão-óleo é aquecida a 75°C-80°C e enviada para um tipo de centrífuga com pressão ou hermética para separação em fases com densidade leve e pesada. A fase leve consiste no óleo refinado que contém traços de umidade e sabão; a fase pesada é composta, principalmente, de sabão, material insolúvel, soda livre, fosfatídeos e uma pequena quantidade de óleo neutro. O óleo refinado é lavado com água mole na concentração de 10%-20% em massa a 90°C. O método de lavagem com água remove cerca de 90% do teor de sabão do óleo refinado; o restante é removido pelo branqueamento (Mounts e Khym, 1980). A borra e a água de lavagem são combinadas e tratadas com ácido sulfúrico para converter o sabão em ácidos graxos brutos. A maior parte da borra acidificada é utilizada como ingrediente de alta energia na alimentação animal. Dependendo da demanda do mercado, a borra acidificada pode ser vendida para produtores de ácidos graxos, que recuperam os ácidos graxos brutos, por meio de destilação na forma de um subproduto valioso do refino de óleos (Mounts, 1981). O resíduo proveniente dessa destilação é uma boa fonte de esteróis.

O refino químico convencional consome tempo e tem várias desvantagens: requer uma quantidade substancial de energia e os subprodutos formados (a borra e o destilado da desodorização) são indesejáveis para o meio ambiente, além de não terem valor comercial. Além disso, o processo químico acarreta uma perda considerável de óleo; a borra pode reter até 50% de seu peso de óleo neutro. Apesar de ter várias desvantagens, ele ainda é utilizado em muitas indústrias, por causa da redução bem-sucedida do teor de AGs livres até um nível aceitável. O refino do óleo com alto teor de AGs livres é realizado por meio do refino da micela, já que este fornece três benefícios imediatos: menos perdas no refino; um óleo refinado de cor mais clara e sem branqueamento; e eliminação da necessidade de lavagem do óleo refinado ou da micela com água (Canavag, 1976). O processo de refino da micela é comercializado no Japão, há muitos anos. Trata-se de um processo simples que é realizado em um sistema à prova de explosões. No entanto, o custo do equipamento é um pouco mais elevado que o de uma usina de refino comum e seu controle é mais difícil. A desacidificação da micela envolve uma leve modificação no processo de refino químico, no qual o óleo é misturado com hexanos para criar a micela. O processo com solvente misto, que utiliza hexano como principal solvente e etanol ou isopropanol como segundo solvente, é empregado no refino do óleo de farelo de arroz com alto teor de AGs livres (Ghosh, 2007). Na etapa de neutralização, o hidróxido de sódio é misturado à micela que, em seguida, reage com os fosfatídeos. Esse processo também provoca descoloração. A borra é removida por centrifugação, levando a uma perda mínima de óleo neutro; contudo, o processo é muito caro e a remoção do solvente requer várias etapas. A desacidificação da micela é utilizada apenas no refino do óleo de semente de algodão, porque o produto final obtido tem uma cor mais clara, quando comparado com o produto

que resulta do uso dos métodos clássicos (Bhosle e Subramanian, 2005).

No refino físico, utiliza-se o tratamento do óleo com arraste de vapor d'água com vácuo para evitar a neutralização química. Essa é uma operação simplificada que remove AGs livres, matéria não saponificável e compostos com odor penetrante e, também, reduz a quantidade de óleo perdido. O refino físico também é conhecido como desacidificação (desodorização) por destilação a vapor – um processo no qual os AGs livres e outros componentes voláteis são destilados do óleo, utilizando-se um agente removedor eficaz, que geralmente é vaporizado em condições de processamento adequadas (Ceriani e Meirelles, 2006). O refino físico consome menos vapor, água e energia e requer um investimento de capital menor que o refino químico (Cvengros, 1995). O refino físico do óleo vegetal bruto tem várias vantagens em relação ao refino por álcali tradicional. Por exemplo, o procedimento é mais simples, o rendimento do produto é maior, o gasto de energia é menor e a geração de poluentes ambientais é menor. Há também muitos empecilhos, já que nem todos os óleos são adequados para esse processo. O uso de temperatura elevada e alto vácuo resulta, com frequência, na formação de produtos secundários, como polímeros e isômeros *trans* (Sengupta e Bhattacharyya, 1992). O refino com vapor de certos óleos ricos em AGs livres é utilizado na Europa, há muitos anos. Quando se compara a desacidificação por refino com vapor com a desacidificação por refino cáustico, os aspectos econômicos costumam favorecer o refino com vapor apenas quando se processam óleos ricos em AGs livres (Sullivan, 1976).

Desenvolveu-se um novo processo, baseado em fluidos supercríticos, que permite o refino (tratamento) contracorrente do óleo de soja extraído para a produção de uma matéria-prima refinada adequada para desodorização direta. O processo emprega um recipiente que facilita o contato interfacial entre o dióxido de carbono em alta pressão e o óleo de soja líquido que circula em contracorrente (List *et al.*, 1993).

C. Branqueamento

O branqueamento dos óleos refinados com álcali remove os sabões que foram arrastados e reduz os materiais coloridos do óleo, além de decompor os hidroperóxidos em produtos da oxidação secundária: “tratamento por adsorção” é a denominação mais apropriada. Carotenoides, clorofilas, sabão residual, fosfolipídeos, metais e produtos oxidados são removidos pelo branqueamento. Com frequência, o branqueamento diminui a resistência dos óleos à rancidez, porque alguns antioxidantes naturais também são removidos com as impurezas. Há três tipos de branqueamento que podem ser empregados na indústria dos óleos comestíveis: o branqueamento por adsorção, o branqueamento térmico e a oxidação química.

A gordura pode ser tratada com vários agentes branqueadores. Os óleos aquecidos são tratados com terra diatomácea (um material terroso natural que descolore os óleos), carbono ativado ou argilas ativadas. A adsorção eficaz requer uma superfície grande e uma área de superfície altamente específica, além do uso de um adsorvente muito poroso. Os canais por meio dos quais as moléculas alcançam essa superfície dependem do tipo de molécula envolvida. A natureza do processo deve possibilitar a formação de ligações fortes, químicas ou físicas, entre a argila de branqueamento e o adsorbato (Patterson, 1992). Portanto, para obter o máximo branqueamento possível, é necessário utilizar uma terra de branqueamento eficiente que tenha uma superfície com composição química correta e uma distribuição de poros que atraia de modo seletivo os componentes danosos presentes nos óleos brutos à base de TAGs. A indústria de óleos vegetais emprega alguns tipos de agentes branqueadores, como terra de branqueamento ativada por ácido, terra de branqueamento natural, carvão ativado, silicatos sintéticos e resinas sintéticas. Muitas impurezas, entre elas a clorofila e os pigmentos carotenoides, são adsorvidas nesses agentes e removidas por filtração. Complexos com traços de metais – como aqueles com ferro e cobre, fosfatídeos e produtos da oxidação – também são removidos pelo efeito adsorvente da terra de branqueamento, assim como quaisquer resíduos de ácido fosfórico. Em geral, a terra de branqueamento não remove todos os materiais coloridos; muitos desses são removidos por destruição térmica durante o subsequente processo de desodorização.

Embora o branqueamento em bateladas em pressão atmosférica ainda seja empregado – até certo ponto – nos Estados Unidos, o tipo mais utilizado é o branqueamento por bateladas ou contínuo a vácuo. O branqueamento em geral melhora a qualidade dos óleos com relação à cor, ao sabor inicial e envelhecido e à estabilidade oxidativa, mas o processo também tem outros efeitos menos evidentes, desejáveis ou indesejáveis. Vários fatores afetam o grau de branqueamento de um óleo. A adsorção de pigmentos pelo adsorvente e a redução da cor pela oxidação de certos pigmentos são dois fatores favoráveis. Os aumentos de cor provocados pela oxidação de outros pigmentos e a estabilização dos pigmentos oxidados contra a adsorção são fatores desfavoráveis. Foi constatado que a terra de branqueamento catalisa as reações de oxidação. O branqueamento a vácuo minimiza os eventos desfavoráveis. Essas reações e as alterações de cor são complexas; por exemplo, a oxidação e o calor podem branquear os carotenoides, e essas condições também podem estimular a formação de novos pigmentos (Mounts, 1981). As terras naturais e ativadas, que têm pouca ou nenhuma acidez, produzirão pouca ou nenhuma alteração no teor de AGs livres do óleo neutralizado. Algumas das terras ativadas mais ácidas poderão aumentar o teor de AGs livres em 0,05%-0,10%, principalmente se o tempo de contato for longo ou se houver umidade ou sabões.

Alguns pigmentos, como os carotenos, tornam-se incolores quando aquecidos de maneira suficiente. Muitos óleos, quando aquecidos a temperaturas acima de 175°C, sofrem um fenômeno conhecido como branqueamento térmico. Ao que tudo indica, o calor decompõe alguns pigmentos, como os carotenoides, convertendo-os em compostos incolores. No entanto, isso deixa as moléculas dos pigmentos no óleo e pode ter efeitos adversos sobre sua qualidade. De acordo com Gunstone e Norris (1983), se o óleo entrar em contato com o ar, poderá haver a formação de produtos de degradação coloridos, como as cromano-5,6-quinonas a partir do g-tocoferol, cuja remoção é difícil. Além disso, a oxidação dos carotenoides afeta invariavelmente os acilgliceróis e pode destruir os antioxidantes naturais presentes no óleo. Como consequência, o branqueamento mediado pela oxidação nunca é utilizado no processamento dos óleos comestíveis, e seu uso é restrito aos óleos para fins técnicos, como a fabricação de sabões.

Atualmente, as empresas De-Smet e Alfa-Laval oferecem equipamentos para branqueamento contracorrente e branqueamento agitado com vapor para o processamento do óleo bruto de farelo de arroz. O óleo de farelo de arroz para fins industriais costuma ser submetido ao branqueamento tradicional com clorato e empregado na produção de sabões.

Sabe-se que durante o branqueamento ocorre uma conjugação dos ácidos graxos poli-insaturados oxidados. A oxidação do óleo antes ou durante o branqueamento estimula a conjugação; portanto, procedimentos como a desaeração do óleo inicial e do adsorvente e o branqueamento a vácuo ajudam a eliminar a reação de conjugação; foi constatada a ocorrência de isomerização *trans* com o uso das terras ativadas com ácido, mas apenas em temperaturas de 150°C ou superiores, que excedem em muito as empregadas no processo de branqueamento (Mounts, 1981).

D. Desodorização

Nas refinarias de óleos comestíveis, a desodorização é a última etapa do processo utilizado para melhorar o sabor, o odor, a cor e a estabilidade do óleo, por meio da remoção de substâncias indesejáveis. Todos os processos de desodorização comerciais – sejam contínuos ou semicontínuos, ou em batelada – consistem, basicamente no arraste com vapor para a remoção dos AGs livres e de outros componentes voláteis.

Durante a desodorização, os produtos da decomposição dos peróxidos, os materiais coloridos e seus produtos de decomposição são eliminados, e as concentrações de esteróis, ésteres de esteróis e tocoferóis são reduzidas. O objetivo da desodorização é a produção de um óleo final que tenha sabor suave, teor de AGs livres inferior a 0,05% e índice de peróxido igual a zero. Os desodorizadores comerciais modernos são equipados com um sistema de controle de poluição composto de três etapas: um sistema de recuperação do destilado do desodorizador; um

sistema de condensação em circuito fechado; e um sistema de lavagem do vapor. O sistema de recuperação do destilado remove 80%-90% do destilado do fluxo de vapor, antes que ele alcance o condensador. As frações de ácidos graxos (AGs) de cadeia curta passam pela unidade de recuperação e são recuperadas do sistema de lavagem do vapor. O destilado do desodorizador consiste em um concentrado de tocoferóis e esteróis – materiais que são utilizados como componentes com valor agregado em diferentes aplicações.

A desodorização é, basicamente, um processo de destilação a vapor que ocorre em temperatura elevada e alto vácuo. Para obter um produto final de alta qualidade, o processo de desodorização deve desaerar o óleo, aquecê-lo, realizar a extração por arraste a vapor dos componentes indesejados e resfriar o óleo, sem que ocorra exposição ao ar. A desodorização com vapor é viável, porque os compostos responsáveis pelo sabor e odor que são removidos têm uma volatilidade consideravelmente maior que os TAGs presentes. As temperaturas elevadas utilizadas na operação aumentam a volatilidade dos compostos odoríferos e a introdução da extração por arraste a vapor no desodorizador eleva muito a velocidade na qual esses compostos são volatilizados. A pressão reduzida utilizada na operação auxilia ainda mais a remoção dos compostos odoríferos e protege o óleo da oxidação atmosférica. O processo de desodorização consiste em insuflar vapor através do óleo aquecido mantido sob alto vácuo. Pequenas quantidades de componentes voláteis, responsáveis pelo sabor e odor, são destiladas, restando um óleo neutro praticamente sem odor que é adequado para a fabricação de gorduras e margarinas com sabor suave. No início, a desodorização era realizada em batelada, porém, cada vez mais estão sendo empregados sistemas contínuos nos quais o óleo quente flui através de uma coluna sob vácuo em contracorrente em relação à passagem do vapor. Na Europa, é comum o emprego de temperaturas de desodorização entre 175°C-205°C; nos Estados Unidos, são utilizadas temperaturas mais altas, entre 235°C-250°C. Normalmente, adiciona-se cerca de 0,01% de ácido cítrico aos óleos desodorizados para inativar contaminantes metálicos, como os compostos solúveis com ferro ou cobre que estimulam a oxidação e o surgimento de rancidez. Para que ocorra a desodorização adequada e também a destruição dos pigmentos termolábeis, o óleo deve ter um tempo de residência adequado. O óleo desodorizado é resfriado contracorrente primeiro pelo óleo que entra no sistema e, em seguida, pela água a aproximadamente 50°C. O óleo desodorizado resfriado passa por um filtro de polimento para dar um aspecto transparente.

O azeite de oliva é sempre comercializado na forma não desodorizada. O sabor natural é uma qualidade importante, e o azeite de oliva tem um preço superior no mercado por causa do seu sabor característico. Os óleos comuns de cozinha, na Ásia – soja, colza, amendoim, gergelim e coco –, por serem extraídos das sementes oleaginosas, são consumidos na forma bruta. Por outro lado, os óleos desodorizados são os preferidos nos Estados Unidos e na Europa. Durante muitos anos, o único óleo vegetal importante consumido nos Estados Unidos foi o óleo de semente de algodão, que tem um sabor forte e desagradável na forma bruta e, por essa razão, precisa de processamento adicional para se tornar adequado para o consumo. Por causa da venda disseminada, durante muitos anos, de produtos à base de óleo de semente de algodão com sabor neutro, surgiu uma preferência geral pelos óleos sem sabor ou odor.

Outra razão para a prática da desodorização dos óleos comestíveis, na Europa e nos Estados Unidos, se relaciona com as diferenças na qualidade dos óleos obtidos com as técnicas de extração ocidental e oriental. Na China e no sudeste da Ásia, os óleos comestíveis são produzidos, em sua maioria, com o uso de equipamentos pequenos e um pouco rudimentares. A produção de óleo é relativamente baixa, e extrai-se das sementes uma quantidade mínima de substâncias não acilgliceróis; como consequência, o sabor do óleo é bastante suave. Na Europa e nos Estados Unidos, a extração do óleo é realizada em grandes usinas, que operam em um esquema extremamente competitivo. Utiliza-se a extração com pressão muito elevada ou com solvente e, para melhorar a produtividade, as sementes são tratadas com calor, antes da extração. Os óleos obtidos com alta produtividade, nessas condições, têm um sabor mais forte que os óleos obtidos por meio de extração com pressão baixa, e as etapas de refino e desodorização são necessárias para melhorar a palatabilidade. A melhora da produtividade mais do que compensa os custos adicionais do refino e da desodorização.

E. Winterização e hidrogenação

A formação de névoa ou turbidez durante o armazenamento a baixa temperatura é um problema que ocorre com muitos óleos comestíveis. O processo de winterização, normalmente, é empregado para separar a parte cristalizada (ceras ou triacilgliceróis) do óleo e, dessa forma, impedir a turbidez do óleo no inverno ou durante o armazenamento em temperaturas baixas. As ceras, em geral, são ésteres de alcoóis graxos alifáticos de cadeia longa e de ácidos graxos (AGs) de cadeia longa com 36-60 átomos de carbono. Elas podem ser divididas em ceras solúveis, cujas cadeias têm menos de 40C; ceras parcialmente solúveis, cujas cadeias têm entre 40C e 42C; e ceras cristalizáveis, que têm cadeias com mais de 44C e são responsáveis pela turbidez ou formação de sedimento que surge durante o armazenamento dos óleos e, por essa razão, precisam ser removidas por winterização. As operações de winterização do processamento dos óleos comestíveis consistem basicamente na separação dos óleos em duas ou mais frações com diferentes pontos de fusão. No processo de winterização, os óleos são resfriados de maneira simples e mantidos em baixa temperatura durante algum tempo. De hábito, as frações líquida e sólida são separadas por filtração. Para separar as ceras do óleo por filtração, é necessário misturar no óleo winterizado um auxiliar de filtração. Isso permite a formação de uma camada de material filtrante sobre as mantas filtrantes, criando um sistema de drenagem adequado. Em seguida, o óleo com ceras é bombeado através do filtro para a remoção das ceras e do auxiliar de filtração, como na winterização do óleo de girassol (Rab *et al.*, 2008). A winterização tem ampla aplicação na tecnologia dos óleos comestíveis, inclusive na produção de equivalentes da manteiga de cacau a partir do óleo de palma, do óleo de amêndoa de palma e da gordura de carité, e dos óleos de semente de algodão e de soja hidrogenados (Kreulen, 1976).

Pode ser difícil submeter certos óleos – como a oleína de palma – à winterização, por causa da alta concentração da parte cristalizada com ponto de fusão mais elevado e da alta viscosidade do óleo, que pode impedir a filtração (Leiboritz e Ruckenstein, 1984). Nesses casos, utiliza-se a winterização com solvente, hexano ou acetona, para reduzir a viscosidade e facilitar a cristalização das ceras. Aditivos também servem para ajudar a separar as ceras do óleo. Soluções de cloreto de cálcio e lauril sulfato de sódio são adotadas na winterização do óleo de farelo de arroz para facilitar a cristalização. Os cristais que se dispersam na fase aquosa são separados por centrifugação (Ghosh, 2007).

Quando são necessários graus diferentes de dureza, os óleos líquidos podem ser submetidos a um processo de hidrogenação para a produção de gorduras plásticas semissólidas estáveis, tais como a margarina e gordura. As condições do processo de hidrogenação podem ser modificadas para criar uma variedade de gorduras e óleos com diferentes pontos de fusão e outras características. Um exemplo é a hidrogenação do óleo de soja, na qual o ácido linolênico (C18:3) relativamente instável é convertido em ácidos graxos mais estáveis. O processo de hidrogenação converte ácidos graxos insaturados em suas contrapartes saturadas ou menos insaturadas por meio da adição de hidrogênio às duplas ligações. Há dois tipos de processos envolvidos na hidrogenação: a saturação e a isomerização. A saturação ocorre quando uma molécula de hidrogênio é adicionada diretamente em uma dupla ligação, na presença de catalisadores, para formar uma ligação simples saturada. A hidrogenação geralmente é acompanhada da formação de ácidos graxos *trans*, por meio da isomerização da ligação *cis*. O consumo de ácidos graxos *trans* formados durante a hidrogenação foi associado a um risco maior de doença arterial coronariana, obrigando consumidores, autoridades sanitárias e fabricantes a reconsiderar o processo. O processo também pode ser acompanhado de uma mudança na posição da dupla ligação, levando à formação de dienos e trienos conjugados.

A hidrogenação de óleos comestíveis é complexa. A hidrogenação convencional utiliza um catalisador com níquel e gás hidrogênio em temperaturas elevadas, que variam de 140°C a 230°C. Trata-se de um processo composto de três fases com o hidrogênio na forma de gás, o óleo líquido e o catalisador sólido, em geral o níquel. Para que a velocidade das reações seja alta, é necessário que haja um catalisador ativo, bem como boas condições

de transferência de massa entre o gás e o líquido e entre o líquido e o catalisador. A alta temperatura produz teores elevados de ácidos graxos *trans* nos óleos finais. A hidrogenação eletrocatalítica em baixa temperatura pode servir como um método alternativo para a produção de óleos comestíveis hidrogenados com baixas concentrações de ácidos graxos *trans*. A hidrogenação eletrocatalítica em baixa temperatura utiliza como cátodo um catalisador que conduz eletricidade, como o níquel de Raney ou a platina negra. A hidrogenação eletrocatalítica é utilizada na produção de vários compostos orgânicos, como compostos aromáticos, fenóis, cetonas, nitrocompostos, dinitrilas e glicose (Jang *et al.*, 2005). No entanto, na hidrogenação em baixa temperatura, é preciso usar catalisadores diferentes, uma vez que os catalisadores com níquel não são muito ativos abaixo de 120°C. O níquel pode ser substituído por catalisadores com metais preciosos, que são ativos na temperatura baixa de 70°C. O paládio, a platina e o rutênio seriam os catalisadores com metal precioso com maior potencial para a hidrogenação de óleos vegetais. Cada catalisador com metal tem características diferentes com relação à seletividade, à reatividade e à isomerização *cis-trans* durante a hidrogenação. Há uma aceitação geral de que os catalisadores com platina produzem a menor quantidade de ácidos graxos *trans* durante a hidrogenação (Jang *et al.*, 2005). Outro método usual é o da hidrogenação em estado fluido supercrítico, que melhora a transferência de massa dos sistemas multifásicos e reduz a formação de gordura *trans*. O estado fluido supercrítico melhora a transferência de hidrogênio para a superfície do catalisador durante a hidrogenação, ao fornecer uma boa fase homogênea. Já foi investigada a eficácia da hidrogenação das substâncias oleoquímicas e dos óleos vegetais com o uso de dióxido de carbono ou de propano supercríticos como solventes (Macher *et al.*, 1999; Macher e Holmqvist, 2001; King *et al.*, 2001).

III. MODIFICAÇÃO DE GORDURAS

Há muito tempo, os lipídeos são conhecidos pela qualidade sensorial que conferem aos alimentos e por seu valor de saciedade na dieta. Os lipídeos são componentes importantes da dieta, porque fornecem energia e ácidos graxos (AGs) essenciais. São sua fonte de energia mais concentrada, com um valor energético médio de 9 kcal/g; o valor energético dos carboidratos e das proteínas é de 4 kcal/g. Os lipídeos são constituintes essenciais das membranas de todas as células do corpo. Além de seu papel como componentes estruturais das células, os lipídeos desempenham outros papéis no corpo, entre eles: servir de reserva de energia, atuar como regulador de funções corporais e agir como isolante contra a perda de calor. O papel dos lipídeos da dieta na saúde e na doença (particularmente na doença arterial coronariana, na obesidade, na hiperlipidemia e no câncer) constitui uma das áreas de pesquisa mais ativas da ciência dos alimentos, da nutrição e da bioquímica moderna. Nesse sentido, o papel dos lipídeos estruturados também deve ser considerado.

Os lipídeos estruturados são TAGs ou fosfolipídeos que contêm ácidos graxos (AGs) de cadeia curta e/ou AGs de cadeia média junto com AGs de cadeia longa na mesma molécula de glicerol e são produzidos por meio de processo químico ou enzimático (Senanayake e Shahidi, 2000). Esses lipídeos especiais podem ser sintetizados por esterificação direta, acidólise, alcoólise ou reações de interesterificação. No entanto, os métodos comuns registrados na literatura para a síntese de lipídeos estruturados baseiam-se nas reações entre duas moléculas de TAG (interesterificação) ou entre um TAG e um ácido (acidólise). Esses lipídeos especiais foram desenvolvidos para otimizar totalmente o benefício de várias frações de ácidos graxos. Foi relatado que os lipídeos estruturados exercem efeitos benéficos sobre vários parâmetros metabólicos, entre eles a função imunológica, o equilíbrio do nitrogênio e a depuração (melhorada) dos lipídeos da corrente sanguínea (Quinlan e Moore, 1993). Os lipídeos estruturados também são produzidos para melhorar ou modificar as propriedades físicas e/ou químicas dos TAGs. A pesquisa sobre lipídeos estruturados é uma área interessante e promissora.

“Nutracêutico” é o termo utilizado para descrever os produtos obtidos de alimentos que são empregados de forma medicinal; eles proporcionam benefícios fisiológicos comprovados, além daqueles atribuídos a seu valor

nutricional (Scott e Lee, 1996). Podem ser incorporados a produtos que têm a aparência comum de alimento, a fim de proporcionar benefícios específicos à saúde (Scott e Lee, 1996). Os lipídeos estruturados podem ser concebidos para uso como ingredientes alimentares, nutracêuticos ou funcionais, dependendo da forma de uso.

Os lipídeos, principalmente os TAGs, podem ser modificados para incorporar ácidos graxos específicos de interesse e, dessa forma, adquirir funções desejadas. Os lipídeos estruturados podem ser sintetizados por meio da hidrólise de ácidos graxos de uma mistura de TAGs, seguida de reesterificação aleatória na estrutura do glicerol (Babayan, 1987). Vários ácidos graxos – inclusive diferentes classes de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (AGPI) *n*-3 e *n*-6, ou suas misturas – podem ser utilizados nesse processo, dependendo do efeito metabólico desejado. Os lipídeos estruturados que contêm AGs de cadeia média e AGs de cadeia longa exibem diferenças em suas velocidades de absorção, porque os AGs de cadeia média são rapidamente oxidados para a produção de energia, enquanto os AGs de cadeia longa são oxidados muito lentamente. Esses lipídeos especiais são estrutural e metabolicamente diferentes das misturas físicas simples de TAGs de cadeia média e TAGs de cadeia longa (Akoh e Moussata, 1998).

A. Lipídeos estruturados e seus ácidos graxos constituintes

Os ácidos graxos insaturados das famílias *n*-3, *n*-6 e *n*-9 podem ser incluídos em lipídeos estruturados para promover a saúde. As vantagens clínicas desses lipídeos especiais provêm do efeito combinado dos ácidos graxos de cadeia curta, média e longa e da singularidade da molécula do lipídeo estruturado. Muitos desses efeitos resultam das diferenças existentes no destino metabólico dos vários ácidos graxos envolvidos. Será apresentada aqui uma breve descrição dos AGs de cadeia curta, AGs de cadeia média e AGs essenciais ou AGs poli-insaturados que pertencem às famílias *n*-3 e *n*-6.

Os AGs de cadeia curta são ácidos graxos saturados com dois a quatro átomos de carbono e englobam o ácido acético (2:0), o ácido propiônico (3:0) e o ácido butírico (4:0). Esses ácidos graxos são voláteis e produzidos no trato gastrointestinal humano, por meio da fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta (Stein, 1999). Os AGs de cadeia curta estão presentes em pequenas quantidades na dieta; por exemplo, o ácido acético, no vinagre, e o ácido butírico, na manteiga e leite de bovinos. Eles também são encontrados em alimentos fermentados. Nos humanos, os AGs de cadeia curta são responsáveis por 3% do gasto total de energia (Hashim e Babayan, 1978); eles são mais facilmente absorvidos no estômago e fornecem menos calorias que os AGs de cadeia média e os AGs de cadeia longa. Assim, os ácidos acético, propiônico e butírico têm valores calóricos de 3,5, 5,0 e 6,0 kcal/g, respectivamente.

Em certas aplicações nutricionais, o uso de AGs de cadeia curta como alternativa às contrapartes de cadeia média e longa tem despertado interesse. Os AGs de cadeia curta são obtidos com facilidade pela hidrólise de TAGs e absorvidos com rapidez pela mucosa intestinal (Ruppin *et al.*, 1980). Eles seguem diretamente para a veia porta, que os transporta para o fígado, onde são decompostos por *b*-oxidação, formando acetato. Em seguida, o acetato pode ser metabolizado para a produção de energia ou utilizado na síntese de novos ácidos graxos. Os AGs de cadeia curta afetam o funcionamento gastrointestinal, ao estimular a secreção pancreática de enzimas (Harada e Kato, 1983) e aumentar a absorção de sódio e água no intestino (Roediger e Rae, 1982).

Os AGs de cadeia média são ácidos graxos saturados com 6 a 12 átomos de carbono (Senanayake e Shahidi, 2000) e, normalmente, encontrados nos óleos de frutos tropicais, como aqueles oriundos do coco e da amêndoa da palma (Bell *et al.*, 1991). Por exemplo, o óleo de coco contém naturalmente cerca de 65% de AGs de cadeia média (Young, 1983). Um dos primeiros alimentos médicos desenvolvidos como alternativa aos lipídeos convencionais tinha como base os triglicerídeos de cadeia média (TCMs). Esses TCMs atuam como uma excelente fonte de AGs de cadeia média para a produção de lipídeos estruturados e especiais. Os TCMs puros têm um valor energético de 8,3 kcal/g. No entanto, não fornecem AGs essenciais (Heird *et al.*, 1986; Lee e Hastilow, 1999). Os AGs de cadeia

média são mais hidrofílicos que suas contrapartes de cadeia longa e, portanto, a solubilização na forma de micelas não é um pré-requisito para sua absorção (Ikeda *et al.*, 1991). Os TCMs também podem ser incorporados diretamente nas células da mucosa sem hidrólise e prontamente oxidados na célula. Os TCMs passam diretamente para a veia porta e logo são oxidados no fígado para servir como fonte de energia. Assim, é pouco provável que se depositem nos tecidos adiposos (Megremis, 1991), sendo mais suscetíveis à oxidação nos tecidos (Mascioli *et al.*, 1987).

Os TCMs são produtos líquidos ou sólidos à temperatura ambiente. Eles têm tamanho molecular menor, ponto de fusão mais baixo e solubilidade maior que suas contrapartes de cadeia longa. Essas características são responsáveis pela facilidade de absorção, de transporte e de metabolismo, quando comparados aos triglicerídeos de cadeia longa (TCLs) (Babayán, 1987). Os TCMs são hidrolisados pela lipase pancreática de modo mais rápido e completo que os TCLs (Bell *et al.*, 1991). Eles podem ser absorvidos diretamente pela mucosa intestinal com funcionamento pancreático ou biliar mínimo. São transportados principalmente pela veia porta até o fígado, onde são oxidados (Heydinger e Nakhasi, 1996), em vez de serem levados pelos vasos linfáticos intestinais. Além disso, os AGs de cadeia média são oxidados com mais rapidez para produzir acetil coenzima A e corpos cetônicos, e não dependem da carnitina para entrar nas mitocôndrias.

Os TCMs precisam ser utilizados com TCLs a fim de proporcionar uma nutrição equilibrada com os produtos enterais e parenterais (Ulrich *et al.*, 1996; Haumann, 1997a). Em muitos alimentos para fins especiais, utiliza-se uma mistura de TCMs e TCLs para fornecer combustíveis rapidamente metabolizáveis e lentamente metabolizáveis, bem como AGs essenciais. Os nutricionistas clínicos têm tirado vantagem da digestão mais simples dos TCMs na alimentação de indivíduos que não conseguem utilizar TCLs como resultado de má absorção das gorduras. Assim, pacientes com certas doenças (doença de Crohn, fibrose cística, colite, enterite etc.) apresentam uma melhora quando TCMs são incluídos na dieta (Kennedy, 1991). Os TCMs são cada vez mais utilizados na alimentação de pacientes em estado crítico ou com septicemia que, aparentemente, são beneficiados quando há disfunção intestinal associada. Também podem ser usados em confeitaria e outros alimentos funcionais como transportadores de sabor, cor e vitaminas (Megremis, 1991). Os TCMs têm aplicações clínicas no tratamento de má absorção de lipídeos, má digestão, obesidade e deficiência do sistema da carnitina (Bach e Babayan, 1982).

Os AGs essenciais são ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) que pertencem às famílias de ácidos graxos $n-3$ ou $n-6$. A atividade biológica dos AGPIs depende da posição da dupla ligação que está mais próxima da extremidade metila da cadeia. O AG pertence à família $n-3$, quando a dupla ligação está entre o terceiro e o quarto átomos de carbono, e $n-6$, quando ela está entre o sexto e o sétimo átomos de carbono da molécula. Os compostos parentais dos grupos $n-3$ e $n-6$ dos ácidos graxos são o ácido linoleico e o ácido α -linolênico (AAL), respectivamente. No corpo, esses compostos parentais são metabolizados por uma série de dessaturações (nas quais uma dupla ligação extra é inserida, por meio da remoção de dois átomos de hidrogênio) e alongamentos (nos quais dois átomos de carbono são adicionados) (Figura 9.1), mas apenas até certo grau (até 4%-5%) para a produção de AGPIs de cadeia longa (Plourde e Cunnane, 2007). Acredita-se que as enzimas que metabolizam o ácido linoleico e o AAL sejam idênticas (Horrobin, 1990).

O papel dos AGs essenciais como precursores de uma ampla variedade de substâncias de vida curta, semelhantes a hormônios, denominadas eicosanoides tem recebido muita atenção. Esses mediadores biomédicos endógenos com 20 carbonos provêm de AGs essenciais, em particular do ácido araquidônico e do ácido di-homo- α -linolênico (DGLA), da família $n-6$, e do ácido eicosapentaenoico (EPA), da família $n-3$ (Branden e Carroll, 1986). Os eicosanoides englobam prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e ácidos graxos hidroxilados, que desempenham um papel na regulação da comunicação célula a célula envolvida nas ações dos sistemas cardiovascular, reprodutor, respiratório, renal, endócrino, tegumentar, nervoso e imune. O ácido araquidônico é derivado do ácido linoleico, que dá origem às prostaglandinas da série 2, às prostaciclina da série 2, aos tromboxanos da série 2 e aos leucotrienos da série 4. Esses produtos finais do metabolismo dos ácidos graxos $n-6$

provocam inflamação e imunossupressão. Os prostanoides (nome coletivo para prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) da série 1 e os leucotrienos da série 3 são produzidos a partir do DGLA. Quando ácidos graxos $n-3$ são processados na cascata eicosanoide, ocorre a formação das prostaglandinas da série 3, das prostaciclina da série 3, dos tromboxanos da série 3 e dos leucotrienos da série 5.

As atividades biológicas dos eicosanoides derivados dos ácidos graxos $n-3$ diferem das atividades dos eicosanoides produzidos a partir dos ácidos graxos $n-6$. Por exemplo, as prostaglandinas da série 2 formadas do ácido araquidônico podem prejudicar a função imune, enquanto as prostaglandinas da série 3 produzidas a partir do EPA atenuam a imunodisfunção. O tromboxano A_2 produzido do ácido araquidônico é um potente vasoconstritor e agregador de plaquetas, ao passo que o tromboxano A_3 sintetizado a partir do EPA é um vasoconstritor leve e tem propriedades antiagregadoras (von Schacky, 2003). Além disso, os ácidos graxos $n-3$ inibem competitivamente a formação dos eicosanoides derivados dos ácidos graxos da família $n-6$.

Os ácidos graxos $n-3$ – como o AAL, o EPA e o ácido docosa-hexaenoico (DHA) – trazem numerosos benefícios à saúde, associados à doença cardiovascular, à inflamação, às alergias, ao câncer e aos distúrbios imunes e renais. Bang e Dyerberg (1972, 1986) revelaram que o teor relativamente alto de ácidos graxos $n-3$ (em especial, EPA e DHA) da dieta dos Inuits estava ligado com a incidência menor de doença cardiovascular entre eles. A pesquisa mostrou que o DHA é essencial para o funcionamento adequado do sistema nervoso central e para a acuidade visual dos bebês. Os ácidos graxos $n-3$ são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento normais durante todo o ciclo de vida dos humanos e, portanto, devem ser incluídos na dieta. O peixe e os óleos marinhos são fontes ricas de ácidos graxos $n-3$, principalmente de EPA e DHA. A maioria dos óleos de peixe, como os óleos de fígado de bacalhau, de sável e de sardinha, contém cerca de 30% de EPA e DHA.

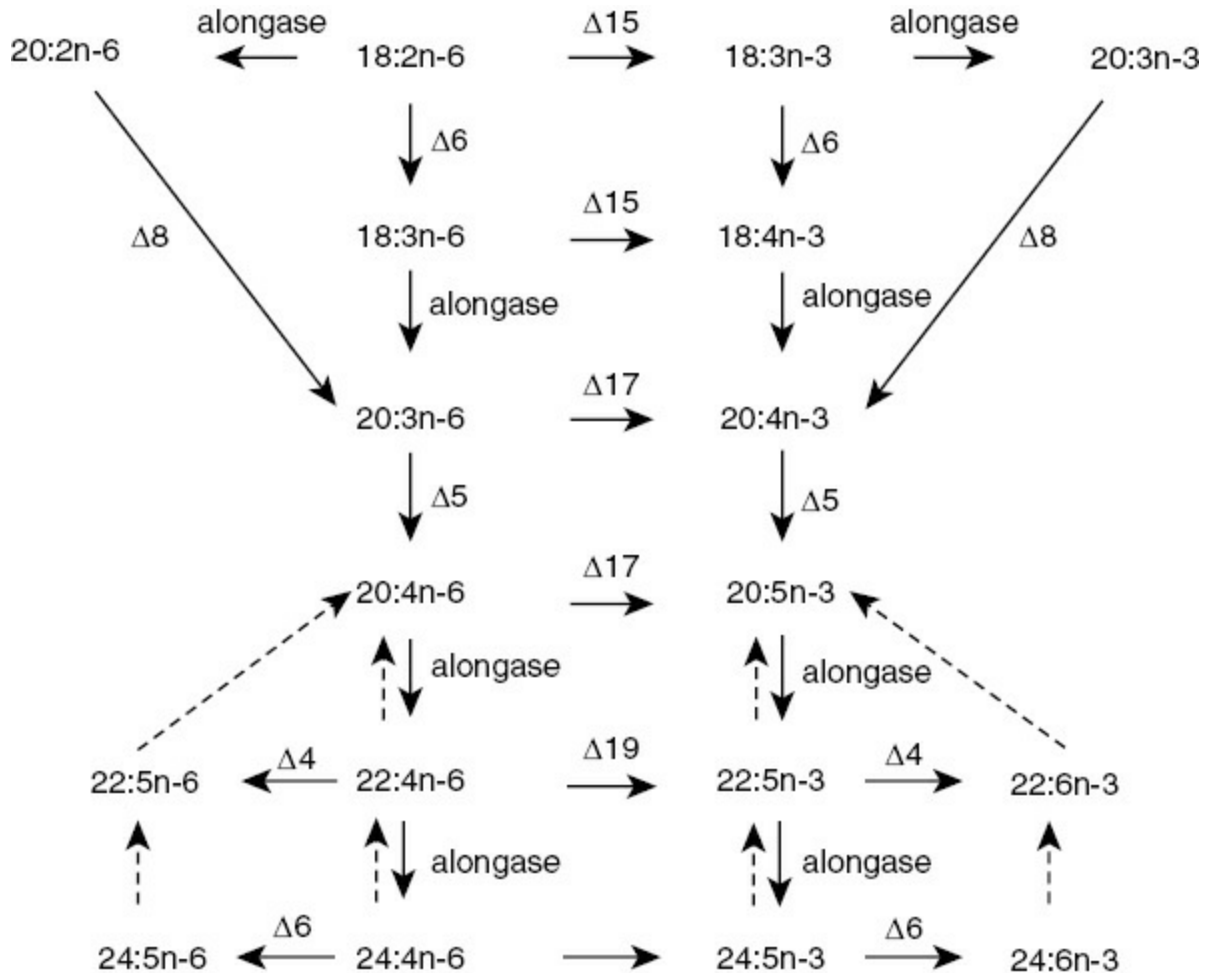


FIGURA 9.1 Biossíntese de ácidos graxos $n-3$.

Os ácidos graxos $n-6$ desempenham várias funções fisiológicas no corpo humano. As principais funções desses

ácidos graxos estão relacionadas com os seus papéis na estrutura das membranas e na biossíntese dos derivados de vida curta (eicosanoides) que regulam vários aspectos da atividade celular. Os ácidos graxos *n*-6 estão envolvidos na manutenção da integridade da barreira impermeável à água da pele. Eles também estão envolvidos na regulação do transporte do colesterol pelo corpo.

O ácido γ -linolênico (GLA) traz benefícios terapêuticos para numerosas doenças e síndromes, em particular para o eczema atópico, a mastalgia cíclica, a síndrome pré-menstrual, a doença cardiovascular, a inflamação, o diabetes e o câncer (Horrobin, 1990). Enquanto o ácido araquidônico é encontrado nas carnes, na gema de ovo e no leite humano, o GLA está presente na aveia, na cevada e no leite humano. O GLA também é encontrado em quantidades maiores nos óleos de sementes, como aqueles oriundos da borragem, da primula e da groselheira-preta (Gunstone, 1992). Algas como a *Spirulina* e várias espécies de fungos também parecem ser fontes desejáveis de GLA (Carter, 1988).

B. Produção de lipídeos estruturados e especiais

A produção dos lipídeos especiais empregados em formulações à base de gordura para confeitaria e em aplicações nutricionais pode ser realizada utilizando-se reações catalisadas por enzimas. Na área das gorduras para confeitaria, a interesterificação do óleo de girassol com alto teor de ácido oleico (alto oleico) com o ácido esteárico, utilizando-se a lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, produz principalmente 1,3-diestearoil-2-mono-oleína (StOSt) (Macrae, 1983). Existem outros reagentes que podem ser empregados na produção de gorduras especiais para confeitaria. Em particular, há muitos relatos sobre a interesterificação enzimática de misturas de frações do óleo de palma com o ácido esteárico, ou seus ésteres, para a produção de gorduras com altas concentrações de StOSt e 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoilglicerol (POST) (Macrae, 1983). Esses produtos são os principais componentes da manteiga de cacau; por essa razão, a interesterificação enzimática pode produzir gorduras com composição e propriedades físicas semelhantes à da manteiga de cacau (Macrae, 1985).

Reações catalisadas por enzimas são empregadas na síntese de um substituto da gordura do leite humano para uso em fórmulas para bebês (Quinlan e Moore, 1993). A reação de acidólise entre uma mistura de tripalmitina e ácidos graxos insaturados, com o uso de uma lipase específica para as posições *sn*-1,3 como biocatalisador, forneceu TAGs totalmente derivados de óleos vegetais, ricos em palmitato na posição 2, com grupos acila graxos insaturados nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Esses TAGs imitam em detalhes a distribuição dos ácidos graxos encontrados na gordura do leite humano, sendo constatado que, quando eles são utilizados em fórmulas para bebês no lugar das gorduras habituais, a presença do palmitato na posição *sn*-2 dos TAGs melhora a digestibilidade da gordura e a absorção de outros nutrientes importantes, como o cálcio. Hamam e Shahidi (2008) investigaram o efeito do comprimento da cadeia, do número de duplas ligações, da localização e da geometria das duplas ligações, das condições da reação e da reatividade de diferentes lipases sobre a incorporação de AGs de cadeia longa selecionados em TAGs, como a trilinoleína (tri C18:2) e a trilinolenina (tri C18:3). As condições para a síntese de lipídeos estruturados também foram otimizadas com o uso de uma metodologia de superfície de resposta (MSR) (Hamam e Shahidi, 2006a). A partir do óleo de milho, conseguiu-se obter lipídeos estruturados com AGs de cadeia longa na posição *sn*-2 e ácido caprílico (8:0) de cadeia média nas posições *sn*-1,3. Nesse processo, os efeitos da razão molar dos substratos, da quantidade de enzima e do tempo de reação sobre a incorporação do ácido caprílico no óleo de milho foram otimizados (Ozturk *et al.*, 2010).

Reações catalisadas por enzimas também podem ser utilizadas na obtenção de produtos lipídicos comuns, como a matéria sólida (*hardstock*) para margarinas e os óleos de cozinha. Quando lipases inespecíficas, como as de *Candida cylindraceae* e de *Candida antarctica*, são empregadas como biocatalisadores na interesterificação de misturas de óleos, os produtos à base de TAGs formados são muito similares àqueles obtidos por interesterificação química (Macrae, 1983), mas o processo não é interessante do ponto de vista econômico. No entanto, as reações

enzimáticas podem ser mais bem empregadas na produção de gorduras e óleos que contêm AGPIs nutricionalmente importantes, como o EPA e o DHA. Por exemplo, vários óleos de vegetais e peixes têm sido enriquecidos com EPA e DHA, por meio de reações catalisadas por enzimas (Senanayake e Shahidi, 1999a; 1999b, 2001). Já foi descrito o uso dessa técnica para produzir lipídeos estruturados com AGs de cadeia média e AGPIs localizados especificamente na posição *sn*-2 ou *sn*-1,3 do TAG. Os processos enzimáticos são particularmente adequados para a produção e modificação de lipídeos que contêm AGPIs, por causa da instabilidade dos ácidos graxos envolvidos e de sua suscetibilidade à oxidação em condições severas de processamento químico. Wang e Shahidi (2010) analisaram o efeito da distribuição química aleatória sobre a estabilidade dos óleos do peixe sável e de gordura de foca.

A interesterificação entre uma mistura de óleo de palma e óleo de canola totalmente hidrogenado e uma mistura de óleo de semente de algodão e óleo de soja hidrogenado, com o uso de lipases específicas para as posições *sn*-1,3 como catalisadores, forneceu gorduras com baixo teor de ácidos graxos *trans*, que se mostraram efetivas como matéria sólida para margarinas (Mohamed e Larsson, 1994). A reação entre misturas de estearina de palma e gorduras láuricas, com o uso de lipase imobilizada de *R. miehei* como catalisador, também produziu gorduras que se mostraram funcionais como matéria sólida para margarinas (Posorske *et al.*, 1988). Com essas gorduras enzimaticamente interesterificadas, pode-se desenvolver uma margarina sem o uso de gorduras hidrogenadas.

Além dos usos em alimentos, o processo de interesterificação ou acidólise pode trazer benefícios médicos e nutricionais. Por exemplo, lipídeos estruturados podem ser utilizados para melhorar o perfil nutritivo de certos TAGs (Osborn e Akoh, 2002). A presença de ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 é benéfica em fórmulas para bebês e em suplementos enterais, por proporcionar uma ingestão calórica maior (Decker, 1996). Os lipídeos estruturados também têm efeitos benéficos sobre vários parâmetros metabólicos, como o funcionamento do sistema imune, o equilíbrio do nitrogênio e a depuração (melhorada) dos lipídeos da corrente sanguínea (Senanayake e Shahidi, 2005).

C. Lipídeos estruturados que contêm ácidos graxos poli-insaturados *n*-3

Os óleos de sementes, como aqueles oriundos da borragem, da prímula e da groselheira-preta, são fontes importantes de ácido γ -linolênico (GLA) (18:3 n -6). O GLA é utilizado no tratamento de certas doenças cutâneas e em muitas outras condições patológicas. Os AGPIs *n*-3 têm uso potencial na prevenção da doença cardiovascular, da artrite, da hipertensão, dos distúrbios imunológicos e renais, do diabetes e do câncer (Senanayake e Shahidi, 2000). O uso dos lipídeos estruturados que contêm GLA e AGPIs *n*-3 pode ser interessante, em virtude dos benefícios à saúde proporcionados por esses componentes. Já foi relatada a síntese enzimática de lipídeos estruturados com GLA, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosa-hexaenoico (DHA) na mesma molécula de glicerol com o uso de óleos selecionados – como aqueles oriundos da borragem e da prímula – como substratos principais (Senanayake e Shahidi, 1999a, 2001). Nesses estudos, utilizaram-se três enzimas microbianas – as lipases de *C. antarctica* (Novozym-435), de *Mucor miehei* (Lipozyme-IM) e de *Pseudomonas* sp. (Lipase PS-30) – como biocatalisadores, além dos EPA e DHA livres como doadores de grupos acila. Com o uso da lipase da *Pseudomonas* sp., obteve-se uma incorporação maior de EPA + DHA (34,1%) no óleo de borragem, quando comparada com a incorporação de 20,7% e de 22,8% obtidas, respectivamente, com as lipases de *C. antarctica* e *M. miehei* (Tabela 9.1). De modo similar, a lipase da *Pseudomonas* sp. proporcionou o grau mais elevado de incorporação de EPA + DHA (31,4%) no óleo de prímula, seguida pela lipase de *M. miehei* (22,8%) e da lipase de *C. antarctica* (17,0%) (Tabela 9.2). Os óleos modificados de borragem e de prímula assim obtidos são úteis no tratamento de alguns distúrbios clínicos.

TABELA 9.1 Composição dos ácidos graxos dos triacilgliceróis do óleo de borragem, antes e depois da modificação com EPA e DHA

Ácido graxo (% em massa)	Antes da modificação	Depois da modificação		
		Lipozyme-IM	Novozym-435	Lipase PS-30
16:0	9,8	6,9	7,3	5,5
18:0	3,1	2,6	2,8	2,0
18:1n-9	15,2	11,6	13,3	10,4
18:2n-6	38,4	28,8	31,2	26,1
18:3n-6	24,4	22,3	19,3	17,6
20:1n-9	4,1	3,1	3,3	2,6
20:5n-3	–	11,8	8,4	24,1
22:1n-11	2,5	1,8	2,1	1,7
24:1	1,5	–	–	–
22:6n-3	–	11,0	12,3	10,0

EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosa-hexaenoico.

A incorporação de ácidos graxos *n*-3 nos acilgliceróis do óleo de borragem também foi relatada por Ju *et al.* (1998). Nesse trabalho, o óleo de borragem foi hidrolisado de modo seletivo com o uso da lipase imobilizada de *Candida rugosa*, e o produto resultante foi utilizado com ácidos graxos *n*-3 na reação de acidólise. Depois da acidólise, o teor total de ácidos graxos *n*-3 e *n*-6 nos acilgliceróis foi de 72,8%. O teor de GLA, EPA e DHA no lipídeo estruturado preparado dessa forma foi de 26,5%, 19,8% e 18,1%, respectivamente. A razão *n*-3/*n*-6 aumentou de 0 para 1,09, após a reação de acidólise. Em outro estudo, a composição dos ácidos graxos do óleo de borragem foi modificada utilizando-se o éster etílico do EPA com a lipase imobilizada de *C. antarctica* (Akoh e Sista, 1995). A incorporação mais alta (31%) foi obtida com 20% de lipase de *C. antarctica*. Quando a proporção molar dos substratos correspondeu a 1:3, a razão entre os ácidos graxos *n*-3 e *n*-6 foi de 0,64. Em condições similares, o teor de ácidos graxos *n*-3 (até 43%) do óleo de prímula aumentou, e houve um aumento correspondente na razão *n*-3/*n*-6 de 0,01 para 0,6. Sridhar e Lakshminarayana (1992) modificaram a composição dos ácidos graxos do óleo de amendoim ao incorporar o EPA e o DHA, utilizando a lipase específica para as posições *sn*-1,3 de *M. miehei* como biocatalisador. O óleo de amendoim modificado tinha 9,5% de EPA e 8,0% de DHA.

TABELA 9.2 Composição dos ácidos graxos dos triacilgliceróis do óleo de prímula, antes e depois da modificação com EPA e DHA

Ácido graxo (% em massa)	Antes da modificação	Depois da modificação		
		Lipozyme-IM	Novozym-435	Lipase PS-30
16:0	6,2	4,5	4,9	3,6
18:0	1,7	1,3	1,4	1,0
18:1n-9	8,7	6,4	7,1	6,2
18:2n-6	73,6	55,1	60,6	49,7
18:3n-6	9,9	9,7	9,0	7,5
20:5n-3	–	12,3	8,4	22,0
22:6n-3	–	10,5	8,6	9,4

EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosa-hexaenoico.

Também foi relatada a incorporação do EPA e do ácido cáprico (10:0) no óleo de borragem com o uso de duas lipases imobilizadas, a SP435 de *C. antarctica* e a IM60 de *R. miehei*, como biocatalisadores (Akoh e Moussata, 1998). A incorporação de EPA (10,2%) e de ácido cáprico (26,3%), obtidas com o uso da lipase IM60, foi mais alta, quando comparada com as respectivas incorporações de 8,8% e 15,5%, obtidas com a lipase SP435. Em outro estudo, Huang *et al.* (1994) incorporaram o EPA no óleo bruto de semente de melão, utilizando duas lipases imobilizadas como biocatalisadores – a IM60 de *M. miehei* e a SP435 de *C. antarctica*. A incorporação do EPA

com éster etílico de EPA foi mais alta que a incorporação do EPA com o próprio EPA, com ambas as reações catalisadas por enzimas. Além disso, as lipases imobilizadas IM60 de *M. miehei* e SP435 de *C. antarctica* foram utilizadas para modificar a composição dos ácidos graxos do óleo de soja, por meio da incorporação de ácidos graxos *n*-3 (Huang e Akoh, 1994). A reação de transesterificação foi realizada com EPA e DHA nas formas livre e de éster etílico, doadoras de grupos acila. Quando se utilizou o EPA livre como doador de grupos acila, a lipase de *M. miehei* proporcionou uma incorporação mais alta de EPA que a lipase de *C. antarctica*. No entanto, quando os ésteres etílicos do EPA e DHA foram os doadores de grupos acila, a lipase de *C. antarctica* proporcionou uma incorporação mais alta de EPA e DHA que a lipase de *M. miehei*.

Os óleos marinhos também podem ser modificados para incorporar AGs de cadeia média e, assim, aprimorar suas propriedades nutricionais. Lipídeos estruturados específicos com resíduos de AGPIs na posição *sn*-2 e resíduos de AGs de cadeia média nas posições *sn*-1,3 têm um alto potencial de uso em aplicações biomédicas e nutracêuticas. Nessa forma, os resíduos de AGPIs estão protegidos contra a oxidação pelos dois resíduos de AGs de cadeia média saturados. Além disso, os AGPIs são mais bem absorvidos no trato intestinal na forma de 2-monoacilglicerol (2-MAG), quando submetidos à hidrólise pela lipase pancreática. Os AGs de cadeia média são absorvidos de modo eficiente e compõem uma fonte rápida de energia, não se depositando nos tecidos adiposos. A lipase imobilizada de *M. miehei* específica para as posições *sn*-1,3 foi utilizada para incorporar o ácido cáprico (10:0; AG de cadeia média) no óleo de gordura de foca. Depois da reação enzimática, a composição dos ácidos graxos do óleo de gordura de foca foi modificada e, em condições ótimas de reação, obteve-se um lipídeo estruturado com 27,1% de ácido cáprico, 2,3% de EPA e 7,6% de DHA (Tabela 9.3). A distribuição posicional dos ácidos graxos no lipídeo estruturado revelou que a lipase de *M. miehei* incorporou o ácido cáprico, principalmente nas posições *sn*-1,3 das moléculas de TAG (Senanayake e Shahidi, 2002). Em outro estudo, lipídeos estruturados foram produzidos com sucesso, utilizando-se óleo de gordura de foca ou óleo de sável com GLA e lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp. Quanto à reação de acidólise, as condições ótimas para a reação consistiram em uma proporção molar de 1:3 entre o óleo e o GLA, temperatura da reação de 40°C, tempo de reação de 24 horas e concentração enzimática de 500 unidades de atividade enzimática/g de óleo. Sob essas condições, a incorporação do GLA no óleo de gordura de foca foi de 37,1%, sendo obtida uma incorporação de 39,6% quando o óleo de sável foi utilizado (Spurvey *et al.*, 2001). Já foi relatada também a incorporação de ácido cáprico (10:0) nos TAGs do óleo de peixe, com o uso de lipase imobilizada de *R. miehei* (IM 60) (Jennings e Akoh, 1999). O concentrado de óleo de peixe empregado continha 40,9% de EPA e 33,0% de DHA. Depois de 24 horas de incubação em hexano, houve uma incorporação média de 43% de ácido cáprico no óleo de peixe, enquanto os teores de EPA e DHA diminuíram para 27,8% e 23,5%, respectivamente. Além disso, o ácido cáprico (10:0) e o EPA foram incorporados no óleo de borragem, utilizando-se a lipase de *C. antarctica* e de *R. miehei* como biocatalisadores. A incorporação de EPA (10,2%) e 10:0 (26,3%) obtida com a lipase de *R. miehei* foi mais alta que a obtida com a lipase de *C. antarctica*, de respectivos 8,8% e 15,5%.

TABELA 9.3 Modificação enzimática do óleo de gordura de foca com ácido cáprico para a produção de lipídeos estruturados

Ácido graxo (% em massa)	Antes da modificação	Depois da modificação
10:0	–	27,1
14:0	3,4	2,7
14:1	1,0	0,8
16:0	5,0	3,7
16:1 <i>n</i> -7	15,1	11,9
18:1 <i>n</i> -9 e <i>n</i> -11	26,4	19,3
18:2 <i>n</i> -6	1,3	1,7
20:1 <i>n</i> -9	15,0	9,1
20:5 <i>n</i> -3	5,4	2,3
22:1 <i>n</i> -11	3,6	1,9

O ácido caprílico (8:0) e o óleo produzido pelo micro-organismo unicelular marinho *Schizotrium* sp., que contém ácido docosapentaenoico (ADP; 22:5n-6) e DHA, foram utilizados com as lipases de *R. miehei* e de *Pseudomonas* sp. para produzir um lipídeo estruturado (Iwasaki *et al.*, 1999). Os produtos continham ácido caprílico, nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e DHA ou ADP, na posição *sn*-2 do glicerol. Quando a lipase de *Pseudomonas* sp. foi utilizada, mais de 60% dos ácidos graxos totais (palmítico, mirístico, pentadecanoico, esteárico, DHA e ADP) do óleo do micro-organismo foram substituídos pelo ácido caprílico. A quantidade de TAGs com dois ácidos caprílicos e um resíduo de DHA ou de ADP correspondeu a 36%. Quando se utilizou a lipase de *R. miehei*, a incorporação de ácido caprílico foi de apenas 23%. Uma grande quantidade de DHA e ADP não foi afetada por essa enzima e, como consequência, o óleo resultante mostrou-se rico em TAGs com dois ou três resíduos de DHA ou ADP (46%). Supõe-se que a diferença no grau de acidólise com o uso das duas enzimas seja resultante da seletividade distinta dessas enzimas em relação ao ADP e ao DHA, e também da diferença em suas especificidades posicionais.

Hamam e Shahidi (2005, 2006b) produziram vários lipídeos estruturados com AGPIs *n*-3 de cadeia longa e estudaram a estabilidade oxidativa desses lipídeos. Eles constataram que a perda de tocoferóis endógenos do óleo durante a esterificação enzimática era responsável pelo comprometimento da estabilidade oxidativa dos lipídeos estruturados. E demonstraram que os tocoferóis foram esterificados com os AGs livres presentes no meio, esclarecendo o mecanismo pelo qual os tocoferóis foram perdidos durante o processo (Hamam e Shahidi, 2006b).

D. Produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 a partir de óleos marinhos e óleos de algas

É possível obter concentrados de ácidos graxos *n*-3 a partir de óleos marinhos e óleos de algas, com o uso de diversas técnicas. Os concentrados resultantes podem estar na forma de AGs livres, ésteres de alquila comuns ou acilgliceróis. As técnicas a empregar incluem a formação de complexos com ureia, a cristalização em baixa temperatura, a cromatografia, a destilação, a extração com fluido supercrítico e as reações auxiliadas por enzimas (Shahidi e Wanasundara, 1998).

Para a produção em grande escala de concentrados de AGPIs, cada um dos métodos físicos e químicos citados apresentam algumas desvantagens, como baixa produtividade, necessidade de volumes grandes de solvente ou de equipamento sofisticado, risco de alterações estruturais nos produtos à base de ácidos graxos e altos custos da operação. As lipases agem sob temperatura e pH brandos (Gandhi, 1997) e, por essa razão, o uso potencial dessas enzimas para o enriquecimento de óleos com AGPIs desperta muito interesse. As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam as reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, acidólise e alcoólise. As lipases têm como característica comum o fato de serem ativadas por uma interface. Há muitos anos, elas são utilizadas para modificar a estrutura e a composição de lipídeos alimentares. As lipases agem sobre lipídeos neutros e, geralmente, hidrolisam os ésteres de AGPIs em uma velocidade menor que a da hidrólise de ácidos graxos mais saturados (Villeneuve e Foglia, 1997). Essa especificidade relativa pelo substrato é utilizada para aumentar a concentração de AGPIs *n*-3 dos óleos de gordura de foca e do peixe sável, ao submetê-los à hidrólise pela ação de várias lipases microbianas (Wanasundara e Shahidi, 1998). A concentração de ácidos graxos *n*-3 com o uso de reações auxiliadas por enzimas envolve condições de reação brandas e constitui-se em uma alternativa para os métodos tradicionais de concentração, como a destilação e a separação cromatográfica. Além disso, a concentração por meios enzimáticos pode produzir ácidos graxos *n*-3 na forma de acilgliceróis, forma preferida em termos nutricionais.

Em geral, os AGPIs das moléculas de TAGs são resistentes à hidrólise *in vitro* pelas enzimas pancreáticas. Constatou-se, ainda, que as lipases microbianas reconhecem os AGPIs nas reações catalisadas por enzimas. Por

esse motivo, é possível concentrar os ácidos graxos *n*-3 dos óleos marinhos. Foi feita uma tentativa de produzir acilgliceróis de óleos de gordura de foca e de sável enriquecidos com AGPIs *n*-3, por meio da hidrólise enzimática (Wanasundara e Shahidi, 1998). Selecionaram-se várias enzimas microbianas – como as lipases de *C. cylindraceae*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus niveus*, *M. miehei* e *Aspergillus niger* – para enriquecer ambos os óleos com AGPIs *n*-3. Todas as lipases microbianas testadas conseguiram hidrolisar ácidos graxos dos dois óleos, mas em velocidades diferentes (Tabela 9.4). Entre as enzimas analisadas, constatou-se que a lipase de *C. cylindraceae* é o biocatalisador mais eficaz para a produção de concentrados de ácidos graxos *n*-3 a partir de óleo de gordura de foca. No entanto, a lipase de *R. oryzae* promoveu o grau mais elevado de hidrólise no óleo de sável. Outras lipases estudadas com esses dois óleos promoveram graus mais baixos de hidrólise que as lipases de *C. cylindraceae* e *Rhizopus oryzae*. Depois de certo tempo de hidrólise, todas as lipases promoveram graus consideravelmente mais altos de hidrólise no óleo de gordura de foca que no óleo de sável (dados não mostrados). Essa diferença pode resultar da presença de quantidades maiores de AGPIs (principalmente de EPA e DHA), que exibem resistência à hidrólise enzimática no óleo de sável, quando comparado com o óleo de gordura de foca.

Das enzimas testadas, a lipase de *C. cylindraceae* pareceu ser o biocatalisador com mais capacidade de aumentar os teores de ácidos graxos *n*-3 totais na fração não hidrolisada, tanto do óleo de gordura de foca quanto do óleo de sável (Tabela 9.4). No óleo de sável, o teor de ácidos graxos *n*-3 totais aumentou de 30% (óleo original) para 46,4% e para 46,1%, após 75 horas de hidrólise com o uso das lipases de *R. oryzae* e de *C. cylindraceae*, respectivamente. No óleo de gordura de foca, o aumento máximo de ácidos graxos *n*-3 totais, de 20,2% para 45,0%, foi alcançado quando a lipase de *C. cylindraceae* foi utilizada em condições experimentais semelhantes (Tabela 9.4). O uso de enzimas para produzir concentrados de ácidos graxos *n*-3 apresenta uma vantagem sobre os métodos tradicionais de concentração (separação cromatográfica, destilação molecular etc.), já que esses métodos envolvem valores extremos de pH e temperaturas elevadas, que podem destruir parcialmente os AGPIs *n*-3 todo-*cis* naturais por oxidação e por isomerização *cis-trans* ou migração da dupla ligação. Portanto, as condições brandas utilizadas na hidrólise enzimática constituem-se em uma alternativa promissora que também pode poupar energia e aumentar a seletividade do produto.

Bottino *et al.* (1967) demonstraram o mecanismo de resistência dos AGPIs *n*-3 de cadeia longa dos óleos de peixes marinhos às lipases. A presença de duplas ligações *cis* carbono-carbono nos ácidos graxos provoca o encurvamento das cadeias. Como consequência, o grupo metila terminal do ácido graxo aproxima-se da ligação éster, o que pode causar um efeito de impedimento estérico em relação às lipases. O intenso efeito de encurvamento do EPA e DHA deve-se à presença de cinco e seis duplas ligações, respectivamente, que intensificam o efeito de impedimento estérico; por isso, as enzimas não conseguem alcançar a ligação éster desses ácidos graxos e o glicerol. No entanto, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados não apresentam nenhuma barreira à aproximação da lipase e podem ser hidrolisados com facilidade. Como consequência, a seletividade de uma lipase aos ácidos graxos EPA e DHA permite a separação destes dos demais ácidos graxos dos óleos de peixes marinhos, o que é muito importante na produção de concentrados de ácidos graxos *n*-3. Além disso, as lipases são utilizadas, com frequência, para identificar o EPA e o DHA nos concentrados que contêm esses dois ácidos graxos; isso possibilita a preparação de concentrados enriquecidos tanto com EPA quanto com DHA.

O uso de lipases microbianas na produção de concentrados de ácidos graxos *n*-3, por meio de hidrólise ou de transesterificação de óleos de peixes marinhos, tem recebido muita atenção. Tanaka *et al.* (1992) empregaram várias lipases microbianas (de *C. cylindraceae*, *R. oryzae*, *Pseudomonas* sp., *Ch. viscosum* e *A. niger*) na hidrólise do óleo de atum e constataram que a lipase de *C. cylindraceae* foi o biocatalisador com ação mais eficaz para aumentar o teor de DHA nos concentrados. Essa enzima foi capaz de aumentar o teor de DHA da fração não hidrolisada em três vezes o teor presente no óleo de atum original; no entanto, outras lipases não aumentaram o teor de DHA do óleo. Shimada *et al.* (1994) relataram que a hidrólise do óleo de atum pela ação da lipase de *G.*

candidum aumentou o teor de EPA e DHA de 32,1% para 57,5%. Em outro estudo, Hoshino *et al.* (1990) utilizaram várias lipases na hidrólise seletiva dos óleos de fígado de bacalhau e de sardinha. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase inespecífica de *C. cylindraceae* e com a lipase específica para as posições *sn*-1,3 de *A. niger*, mas nenhuma das enzimas foi capaz de elevar muito o teor de EPA dos acilgliceróis. No entanto, quando as duas enzimas foram utilizadas, ocorreu a produção de mais de 50% de ácidos graxos totais.

TABELA 9.4 Hidrólise enzimática dos óleos de gordura de foca e do peixe sável

Fonte da enzima	Óleo de gordura de foca		Óleo de sável	
	Hidrólise (%) ^a	Teor de ácidos graxos <i>n</i> -3 totais (%)	Hidrólise (%) ^a	Teor de ácidos graxos <i>n</i> -3 totais (%)
<i>Candida cylindraceae</i>	84	45	60	46
<i>Rhizopus oryzae</i>	77	34	70	46
<i>Pseudomonas</i> sp.	70	26	53	39
<i>Mucor miehei</i>	59	29	51	40
<i>Chromobacterium viscosum</i>	52	25	50	38
<i>Geotrichum candidum</i>	40	30	33	43
<i>Rhizopus niveus</i>	38	25	25	37
<i>Aspergillus niger</i>	26	23	5	35

^a Depois de 75 horas de hidrólise.

Os concentrados de AGPIs *n*-3 obtidos pela formação de complexos com a ureia e/ou de outros métodos de concentração (Shahidi e Wanasundara, 1998) podem reagir com glicerol por meios enzimáticos para produzir concentrados na forma de acilgliceróis. Prefere-se essa forma de ácido graxo *n*-3 aos AGs livres e seus ésteres de alquila. Se por um lado é possível produzir um TAG, por outro a presença de acilgliceróis parciais não pode ser evitada com facilidade. Sabe-se que várias enzimas catalisam a formação de acilgliceróis. Osada *et al.* (1992) utilizaram as lipases de *Ch. viscosum* e *C. cylindraceae* na esterificação direta do glicerol com AGs livres individuais, inclusive com o EPA e o DHA. A lipase de *Ch. viscosum* exibiu uma ação superior à da lipase de *C. cylindraceae* e levou a uma incorporação de 89%-95%. Com a segunda lipase, obteve-se uma incorporação de ácidos graxos de 71%-75%, com exceção do DHA, que alcançou um total de 63%.

E. Lipídeos estruturados e especiais com baixas calorias

A alta incidência de obesidade que resulta do consumo excessivo de lipídeos ou de alimentos com muitas calorias tem motivado pesquisadores a desenvolver produtos que são apenas parcialmente digeríveis e fornecem menos calorias que as gorduras e os óleos comuns, apesar de serem similares aos lipídeos convencionais em outros aspectos. Assim, a produção de lipídeos com baixas calorias, que se caracterizam por apresentar uma combinação de AGs de cadeia curta e/ou de AGs de cadeia média e AGs de cadeia longa no mesmo esqueleto de glicerol, é uma área de pesquisa e desenvolvimento bastante ativa no campo dos lipídeos estruturados e especiais. O interesse nesse tipo de produtos emergiu do fato de que eles contêm 5-7 kcal/g, enquanto as gorduras e óleos convencionais contêm 9 kcal/g; a quantidade menor de kcal/g deve-se ao teor calórico mais baixo dos AGs de cadeia curta e média, quando comparados às suas contrapartes com cadeia longa. Lipídeos especiais com calorias reduzidas são concebidos para uso em gotas de chocolate ou de outros sabores, coberturas, molhos (do tipo *dips*), produtos de panificação e laticínios, ou como substitutos da manteiga de cacau. Atualmente, esses produtos são sintetizados por meio de interesterificação química aleatória entre um triacilglicerol (TAG) de cadeia curta e um TAG de cadeia longa, quase sempre um óleo vegetal hidrogenado, como o óleo de soja ou de canola (Smith *et al.*, 1994). Os exemplos de lipídeos com baixas calorias encontrados no comércio englobam o Caprenin, o Salatrim e o Neobee, que comentaremos brevemente aqui.

O Caprenin, um lipídeo estruturado com calorias reduzidas, é composto de uma molécula de ácido graxo de cadeia muito longa, o ácido behênico (C22:0), e de duas moléculas de ácidos graxos saturados de cadeia média, o ácido caprílico (C8:0) e o ácido cáprico (C10:0). Ele fornece 5 kcal/g, enquanto as gorduras e os óleos convencionais fornecem 9 kcal/g, e foi produzido pela primeira vez pela empresa Procter & Gamble. Os ácidos graxos constituintes que participam da síntese do Caprenin provêm de fontes alimentares naturais. Por exemplo, os ácidos caprílico e cáprico são obtidos pelo fracionamento dos óleos de palma e de coco, enquanto o ácido behênico é produzido a partir do óleo de semente de colza. O ácido behênico, um ácido graxo saturado de cadeia muito longa, é fracamente absorvido, independentemente de sua posição na molécula de glicerol. Os AGs de cadeia média fornecem menos calorias que os AGs de cadeia longa absorvíveis. O Caprenin exibe características funcionais similares às da manteiga de cacau e pode ser utilizado como seu substituto em certos produtos de confeitaria. Ele é digerido, absorvido e metabolizado pela mesma via dos outros TAGs (Artz e Hansen, 1996). O Caprenin é um produto líquido ou semissólido à temperatura ambiente, tem sabor suave e é bastante estável quando exposto ao calor. A Procter & Gamble apresentou uma petição à FDA (United States Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, solicitando a classificação do Caprenin como produto GRAS (em geral, reconhecido como seguro) para uso em barras de chocolate com recheio e em coberturas de confeitaria para frutos secos, frutas e biscoitos, mas retirou-a logo depois.

O Salatrim, outro lipídeo estruturado com calorias reduzidas, é composto de uma mistura de AGs de cadeia muito curta (C2:0-C4:0) e AGs de cadeia longa (principalmente C18:0) (Smith *et al.*, 1994). Os AGs de cadeia curta são transesterificados quimicamente com óleos vegetais, como o óleo de soja ou de canola altamente hidrogenado. Os ácidos graxos de cadeia muito curta reduzem o valor calórico para cerca de 5 kcal/g, e os AGs de cadeia longa dão funcionalidade ao lipídeo. O Salatrim foi desenvolvido pelo Nabisco Foods Group e é comercializado, hoje, pela Cultor Food Science, Inc., com o nome comercial Benefat™. Ele tem o sabor, a textura e as características funcionais das gorduras convencionais e, dependendo da quantidade de AGs de cadeia curta e de cadeia longa utilizada em sua síntese química, pode exibir perfis de fusão diferentes. As gotas de chocolate e de outros sabores que contêm baixos teores de gordura são um dos produtos do mercado que contêm Salatrim e foram lançadas no mercado, em 1995, pela Hershey Food Corporation. O Salatrim recebeu o *status* de produto GRAS da FDA, em 1994, e também pode ser utilizado como um substituto da manteiga de cacau. Foi destinado para uso em coberturas com sabor de chocolate, salgadinhos, balas de caramelo, recheios para confeitaria e produtos de panificação, pastas de amendoim, molhos (para saladas, do tipo *dips* etc.) e laticínios (Kosmark, 1996).

O Neobee – outra gordura com calorias reduzidas – é composto pelos ácidos cáprico e caprílico e produzido pela Stepan Company. Essa classe de lipídeos especiais engloba diferentes produtos. Por exemplo, o Neobee 1053 e o Neobee M-5 contêm os ácidos cáprico e caprílico, enquanto o Neobee 1095 é composto apenas de ácido cáprico (Heydinger e Nakhasi, 1996). O Neobee 1095 é um produto sólido. Portanto, pode ser adequado para certas aplicações que requerem gorduras sólidas. O Neobee 1814 é um derivado de TCM formado pela interesterificação do TCM com óleo de manteiga (Babayan *et al.*, 1990); ele contém metade dos ácidos graxos saturados de cadeia longa encontrados no óleo de manteiga convencional e é adequado para substituir o óleo de manteiga em diversas aplicações. O Neobee 1814 pode ser utilizado como transportador de sabor e age como componente de textura em produtos alimentícios com baixo teor de gordura (Heydinger e Nakhasi, 1996).

F. Os lipídeos modificados na promoção da saúde e na redução do risco de doenças

Vários ácidos graxos (das famílias *n-3* e *n-6*) podem ser incorporados em lipídeos estruturados e modificados para promover a saúde e a nutrição. Esses ácidos graxos têm trazido benefícios para a saúde de indivíduos com doenças como artrite, trombose, doença cardiovascular, diabetes e câncer (Horrobin, 1990; Vartak *et al.*, 1997; Senanayake e Sahidi, 2000).

As dietas ricas em ácidos graxos *n*-3 e *n*-6 têm mostrado efeitos benéficos em pacientes com artrite. Em um estudo duplo-cego cruzado, os pacientes artríticos que consumiram suplementos de EPA exibiram uma melhora significativa da rigidez matinal e do número de articulações doloridas, quando comparados com os pacientes tratados com placebo (Kremer *et al.*, 1987).

Trombose é a formação de coágulos de sangue. A coagulação do sangue envolve a formação de grandes agregados de plaquetas e é desencadeada quando as células endoteliais que revestem a parede das artérias são lesadas. Quando a membrana das plaquetas é rica em AGPIs *n*-3 de cadeia longa, a formação de certos eicosanoides, como a prostaciclina I_3 e o tromboxano A_3 , é estimulada. Essas substâncias não desencadeiam a agregação plaquetária no mesmo grau que os eicosanoides prostaciclina I_2 e o tromboxano A_2 , que são formados a partir de AGPIs *n*-6. Por essa razão, os AGPIs *n*-3 de cadeia longa podem ajudar a reduzir a tendência do sangue a coagular (Groom, 1993).

Foi constatado que os Inuits, da Groenlândia, apresentam uma incidência mais baixa de doença cardiovascular, quando comparados com suas contrapartes dinamarquesas (Bang e Dyerberg, 1972, 1986). Dyerberg *et al.* (1975) sugeriram que a ingestão relativamente alta de AGPIs *n*-3 na dieta dos Inuits estava ligada a essa incidência mais baixa de doença cardiovascular. Mori *et al.* (1997) revelaram que a ingestão de ácidos graxos *n*-3 pelo consumo de peixe, associada a uma dieta com baixo teor de gorduras, teve um efeito mais benéfico, quando se levou em conta a redução da doença cardiovascular. Estudos recentes indicam que os ácidos graxos *n*-3, principalmente o EPA e o DHA, podem ser eficazes na redução do risco clínico de doença cardiovascular, por alterarem de modo favorável os lipídeos e fatores hemostáticos como o tempo de sangramento e a agregação plaquetária (Hornstra, 1989). A suplementação da dieta com ácidos graxos *n*-3 também foi recomendada para reduzir o risco de doença cardiovascular e melhorar a saúde global dos humanos, em virtude da diminuição dos níveis plasmáticos de TAGs e da incidência de arritmias, entre outros fatores.

Também foram estudados os possíveis efeitos dos AGPIs *n*-3 nos pacientes diabéticos. Constatou-se que o desenvolvimento de resistência à insulina em ratos normais, alimentados com dieta de óleo de cártamo rica em gorduras, é evitado com a substituição parcial do ácido linoleico pelos EPA e DHA, oriundos do óleo de peixe (Storlien *et al.*, 1987). Estudos sobre o diabetes em humanos revelaram que os AGPIs *n*-3 exercem efeitos benéficos sobre o metabolismo dos lipídeos, podem diminuir a gravidade do distúrbio cardíaco e, por consequência, reduzir a incidência de doença arterial coronariana (Bhathena, 1992).

Mitsuyoshi *et al.* (1992) estudaram o efeito do lipídeo estruturado que contém os ácidos caprílico e linoleico como substrato energético, após ressecção hepática em ratos diabéticos. As fontes de lipídeos utilizadas nesse estudo foram TCMs, TCLs, uma mistura física simples de TCMs/TCLs e o lipídeo estruturado. A razão entre os corpos cetônicos do sangue (acetoacetato/ β -hidroxibutirato) e a excreção acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ no ar expirado após administração de glicose com ^{14}C estavam significativamente mais altas no grupo do lipídeo estruturado que nos outros grupos. Esses achados sugerem que os lipídeos estruturados podem ser um substrato energético superior, quando comparados a outras preparações de TAGs durante o período crítico após a hepatectomia em pacientes diabéticos.

Ling *et al.* (1991) demonstraram que o crescimento de tumores em camundongos diminuiu, quando esses animais foram alimentados com um lipídeo estruturado feito a partir de óleo de peixe e TCMs. Em outro estudo, a velocidade de crescimento dos tumores diminuiu nos ratos alimentados com um lipídeo estruturado que continha AGs de cadeia média e óleo de peixe (Mendez *et al.*, 1992). Ao contrário do efeito estimulante sobre os tumores exibido pelas dietas com alto teor de gorduras, as dietas ricas em óleo de peixe não estimularam o desenvolvimento de tumores em ratos (Branden e Carroll, 1986). Reddy e Maruyama (1986) também mostraram que as dietas com altos teores de óleo de peixe inibem ou suprimem o crescimento de tumores em modelos animais. A ingestão alimentar de óleos de peixe foi eficaz na destruição de algumas células cancerosas, mas não se

sabe se esses resultados são reproduzíveis em humanos e quais seus possíveis efeitos colaterais (Haumann, 1997b). Embora se saiba que os AGPIs *n*-3 desempenham um papel importante no crescimento de certas células do corpo humano, os mecanismos envolvidos no efeito desses AGs sobre o tratamento do câncer permanecem indefinidos.

O Impact (Novartis Nutrition) é outro exemplo de lipídeo estruturado, produzido pela interesterificação de um óleo com alto teor de ácido láurico com um óleo com alto teor de ácido linoleico. Ele é utilizado em pacientes que sofreram traumatismo ou cirurgia e também naqueles com sepse ou câncer (Haumann, 1997a). Um lipídeo estruturado que contém AGs de cadeia média e ácido linoleico é mais eficaz nos pacientes com fibrose cística que o óleo de cártamo, que tem cerca de duas vezes mais ácido linoleico (McKenna *et al.*, 1985). Quando comparada a outras fórmulas enterais, a dieta Impact com lipídeos estruturados, que contém níveis baixos de ácido linoleico, reduziu a infecção e o tempo de internação. Bower *et al.* (1995) também demonstraram uma diminuição no tempo de internação e na taxa de infecção, quando foram utilizadas dietas com baixo teor de ácido linoleico e adição de óleo de peixe.

G. Novos avanços na produção de conjugados de ácidos graxos e seus potenciais efeitos sobre a saúde

Estudos recentes revelaram benefícios potenciais inesperados quando ácidos graxos *n*-3, como o ácido esteárico, o EPA e o DHA, foram conjugados a outras moléculas bioativas, como o polifenol do chá-verde, o galato de epigalocatequina (GEGC) e os fitosteróis. Os produtos com GEGC-DHA, assim obtidos, exibiram bioatividades excelentes, que incluíram as propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e anticâncer, algumas das quais maiores que aquelas apresentadas pelo GEGC ou pelo DHA isolados (Shahidi e Zhong, 2010). Os conjugados GEGC-ácido graxo agiram como removedores dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e peroxila, e como quelantes de íons metálicos, e mostraram-se mais potentes que o GEGC, ou se compararam a ele. Os conjugados foram capazes de inibir a oxidação lipídica em sistemas de modelos alimentares (óleo puro, emulsão de óleo em água e carne) e o resultado levantou a possibilidade de serem aproveitados como conservantes antioxidantes na indústria alimentícia. Eles também se mostraram eficazes em proteger vários sistemas de modelos biológicos do dano oxidativo, inclusive da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade-colesterol induzida pelo cobre, da cisão do DNA induzida por radicais e da foto-oxidação dos lipossomos induzida pela luz ultravioleta. Esses dados destacam as propriedades antiaterosclerótica, antimutagênica e de proteção das membranas dessas substâncias e, como consequência, seu potencial de prevenir/tratar doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios de pele e outras doenças mediadas pela oxidação. Além disso, os conjugados GEGC-ácido graxo exibiram atividade antiviral ao inibir a protease NS3/4A e a α -glicosidase, enzimas importantes do processo de infectividade do vírus da hepatite C e do vírus da imunodeficiência humana, respectivamente. O GEGC isolado não apresentou efeito antiviral. Além disso, os conjugados de ácido docosapentaenoico e GEGC exerceram um papel anti-inflamatório em macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarídeos ao suprimirem a expressão gênica de óxido nítrico sintase induzível e de ciclo-oxigenase-2. Constatou-se também que os conjugados GEGC-DHA são eficazes em inibir a tumorigênese do colo induzida pelo azoximetano. Ao mesmo tempo, os ésteres docosa-hexaenoatos de fitosterol reduziram de modo eficaz os níveis plasmáticos de colesterol e as lesões ateroscleróticas em camundongos (Tan *et al.*, 2012). Assim, a conjugação de polifenóis ou fitosteróis com ácidos graxos, principalmente com AGPIs *n*-3 de cadeia longa, pode ser útil no desenvolvimento de novas substâncias bioativas com propriedades promotoras da saúde, na forma de ingredientes alimentares funcionais potenciais e de produtos naturais voltados para a saúde.

REFERÊNCIAS

- Akoh, C.C., Moussata, C.O., 1998. Lipase-catalyzed modification of borage oil: incorporation of capric and eicosapentaenoic acids to form structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 697-701.
- Akoh, C.C., Sista, R.V., 1995. Enzymatic modification of borage oil: incorporation of eicosapentaenoic acid. *J. Food Lipids* 2, 231-238.
- Andersen, A.J.C., 1962. Refining of fats and oils for edible purposes. In: Williams, P.W. (Ed.), 2nd ed. Pergamon, Oxford, p. 40.
- Artz, W.E., Hansen, S.L., 1996. Current developments in fat replacers. In: McDonald, R.E., Min, D.B. (Eds.), *Food Lipids and Health*. Marcel Dekker, New York, p. 385-415.
- Babayan, V.K., 1987. Medium-chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* 22, 417-420.
- Babayan, V.K., Blackburn, G.L. and Bistrrian, B. R. 1990. Structured lipid containing dairy fat. US Patent No. 4,952,606.
- Bach, A.C., Babayan, V.K., 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 950-962.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., 1972. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West-coast Eskimos. *Acta Med. Scand.* 192, 85-94.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., 1986. Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. *Adv. Nutr. Res.* 3, 1-21.
- Bell, S.J., Mascioli, E.A., Bistrrian, B.R., Babayan, V.K., Blackburn, G.L., 1991. Alternative lipid sources for enteral and parenteral nutrition: long- and medium-chain triglycerides, structured triglycerides, and fish oils. *J. Am. Diet. Assoc.* 91, 74-78.
- Bernardini, E., 1985. *Vegetable Oils and Fats Processing*. Vol. II. Interstampa, Rome.
- Bhathena, S.J., 1992. Fatty acids and diabetes. In: Chow, C.K. (Ed.), *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Marcel Dekker, New York, p. 823-855.
- Bhosle, B.M., Subramanian, R., 2005. New approaches in the deacidification of edible oils – a review. *J. Food Eng.* 69, 481-494.
- Bottino, N.R., Vandenberg, G.A., Reiser, R., 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* 2, 489-493.
- Bower, R.H., Daly, J.M., Lieberman, M.D., Goldfine, J., Shou, J., Weintraub, F., Rosato, E.F., Lavin, P., 1995. Early enteral administration of a formula (Impact[®]) supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil in intensive care unit patients: results of a multicenter prospective, randomized clinical trial. *Crit. Care Med.* 23, 436-449.
- Branden, L.M., Carroll, K.K., 1986. Dietary polyunsaturated fats in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* 21, 285-288.
- Canavag, G.C., 1976. Miscella refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53, 361-363.
- Carter, J.P., 1988. Gamma-linolenic acid as a nutrient. *Food Technol.* 42 (72), 74-82.
- Ceci, L.N., Constenla, D.T., Capiste, G.H., 2008. Oil recovery and lecithin production using water degumming sludge of crude soybean oils. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2460-2466.
- Ceriani, R., Meirelles, A.J.A., 2006. Simulation of continuous physical refiners for edible oil deacidification. *J. Food Eng.* 76, 261-271.
- Chakrabarti, P.P., Rao, B.V.S.K., 2004. Process for the pre-treatment of vegetable oils for physical refining. US Patent No. 005,399.
- Choukri, A., Kinany, M.A., Gibon, V., Tirtiaux, A.J., Jamil, S., 2001. Improved oil treatment conditions for soft gumming. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 1157-1160.
- Cleenewerck, B., Dijkstra, A., 1992. The total degumming process – theory and industrial application in refining and hydrogenation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 94, 317-322.
- Copeland, D., Belcher, M.W., 2005. Vegetable oil refining Int.Cl.C11B3/00. US Patent No. 6,844,458.
- Cvenegros, J., 1995. Physical refining of edible oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1193-1196.
- Decker, E.A., 1996. The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition. *Nutr. Rev.* 54, 108-110.
- Dijkstra, A.J., Opstal, M.W., 1987. Process for producing degummed vegetable oils and gums of high phosphatidic acid content Int.Cl.C11B3/00. US Patent No. 4,698,185.
- Dijkstra, A.J., Opstal, M.V., 1989. The total degumming process (TOP). In: Erickson, D.R. (Ed.), *Proceedings of World Conference on Edible Fats and Oils Processing*. AOCS Press, Champaign, IL, p. 176-177.
- Dyerberg, J., Bang, H., Hjorne, N., 1975. Fatty acid composition of plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 958-966.
- Fairhurst, T.H., Mutert, E., 1999. Introduction to oil palm production. *Better Crops Int.* 13, 3-6.
- Gandhi, N.N., 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 621-634.
- Ghosh, M., 2007. Review on recent trends in rice bran oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 315-324.
- Groom, H., 1993. Oil-rich fish. *Nutr. Food Sci. Nov.-Dec.*, 4-8.
- Gunstone, F.D., 1992. Gamma linolenic acid – occurrence and physical and chemical properties. *Prog. Lipid Res.* 31, 145-161.
- Gunstone, F.D., Norris, F.A., 1983. *Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*. Pergamon Press, Oxford.
- Hamam, F., Shahidi, F., 2005. Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. *Food Chem.* 91, 583-591.
- Hamam, F., Shahidi, F., 2006. Synthesis of structured lipids containing medium-chain and omega-3 fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4390-4396.
- Hamam, F., Shahidi, F., 2006. Acidolysis reactions lead to esterification of endogenous tocopherols and compromised oxidative stability of modified oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7319-7323.
- Hamam, F., Shahidi, F., 2008. Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin. *Food Chem.* 106, 33-39.
- Harada, E., Kato, S., 1983. Effect of short-chain acids on the secretory response of the ovine exocrine pancreas. *Am J. Physiol.* 244, G284-G290.
- Hashim, A., Babayan, V.K., 1978. Studies in man of partially absorbed dietary fats. *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 5273-5276.
- Haumann, B.F., 1997. Structured lipids allow fat tailoring. *INFORM* 8, 1004-1011.
- Haumann, B.F., 1997. Nutritional aspects of *n*-3 fatty acids. *INFORM* 8, 428-447.
- Heird, W.C., Grundy, S.M., Hubbard, V.S., 1986. Structured lipids and their use in clinical nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 43, 320-324.
- Henry, J., 2009. Processing, manufacturing, uses and labelling of fats in the food supply. *Ann. Nutr. Metabol.* 55, 273-300.
- Heydinger, J.A., Nakhasi, D.K., 1996. Medium chain triacylglycerols. *J. Food Lipids* 3, 251-257.
- Hornstra, G., 1989. Effects of dietary lipids on some aspects of the cardiovascular risk profile. In: Ziant, G. (Ed.), *Lipids and Health*. Elsevier Applied Science, New York, p. 39-42.
- Horrobin, D.F., 1990. Gamma linolenic acid: an intermediate in essential fatty acid metabolism with potential as an ethical pharmaceutical and as a food. *Rev. Contemp. Pharmacother* 1, 1-41.
- Hoshino, T., Yamane, T., Shimuzu, S., 1990. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate w3 polyunsaturated fatty acids. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1459-1467.
- Huang, K., Akoh, C.C., 1994. Lipase-catalyzed incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1277-1280.
- Huang, K., Akoh, C.C., Erickson, M.C., 1994. Enzymatic modification of melon seed oil: incorporation of eicosapentaenoic acid. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2646-2648.
- Ikeda, I., Tomari, Y., Sugano, M., Watanabe, S., Nagata, J., 1991. Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. *Lipids* 26, 369-373.
- Indira, T.N., Hemavathy, J., Khatoon, S., Gopala Krishna, A.G., Bhattacharya, S., 2000. Water degumming of rice bran oil: a response surface approach. *J. Food Eng.* 43, 83-90.

- Iwasaki, Y., Han, J.J., Narita, M., Rosu, R., Yamane, T., 1999. Enzymatic synthesis of structured lipids from single cell oil of high docosahexaenoic acid content. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 563-569.
- Jang, E.S., Jung, M.Y., Min, D.B., 2005. Hydrogenation for low *trans* and high conjugated fatty acids. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 4, 22-30.
- Jennings, B.H., Akoh, C.C., 1999. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1133-1137.
- Ju, Y., Huang, F., Fang, C., 1998. The incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acids into acylglycerols of borage oil via lipase-catalyzed reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 961-965.
- Kaimal, T.N.B., Vali, S.R., Rao, B.V.S.K., Turaga, V., Rao, C., Bhaerao, U.T., 2000. A process for the preparation of purified rice bran oil by simultaneous dewaxing and degumming. Indian Patent INP 183,639.
- Kemper, T.G., 2005. Oil extraction. In: Shahidi, F. (Ed.), 6th ed. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Vol. 5. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 57-98.
- Kennedy, J.P., 1991. Structured lipids: fats for the future. *Food Technol.* 11, 76-83.
- King, J.W., Holliday, R.L., List, G.R., Snyder, J.M., 2001. Hydrogenation of vegetable oils using mixtures of supercritical carbon dioxide and hydrogen. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 107-113.
- Kosmark, R., 1996. Salatrim: properties and applications. *Food Technol.* 50, 98-101.
- Kovari, K., 2004. Recent developments, new trends in seed crushing and oil refining. *Oléagineux Corps. Gras Lipides* 11, 381-387.
- Kremer, J.M., Jubiz, W., Michalek, A., Rynes, R.I., Bartholomew, L.E., Bigaouette, J., Timchalk, M., Beeler, D., Lininger, L., 1987. Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 106, 497-502.
- Kreulen, H.P., 1976. Fractionation and winterization of edible fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53, 393-396.
- Lee, T.W., Hastilow, C.I., 1999. Quantitative determination of triacylglycerol profile of structured lipid by capillary supercritical fluid chromatography and high-temperature gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1405-1413.
- Leibowitz, Z., Ruckenstein, C., 1984. Winterization of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 870-872.
- Lin, L., Rhee, K.C., Koseoglu, S.S., 1997. Bench-scale membrane degumming of crude vegetable oil: process optimization. *J. Membr. Sci.* 134, 101-108.
- Ling, P.R., Istfan, N.W., Lopes, S.M., Babayan, V.K., Blackburn, G.L., Bistrain, B.R., 1991. Structured lipid made from fish oil and medium chain triglyceride alters tumor and host metabolism in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 1177-1184.
- List, G.R., King, J.W., Johnson, J.H., Warner, K., Mounts, T.L., 1993. Supercritical CO₂ degumming and physical refining of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 473-476.
- Macher, M., Holmquist, A., 2001. Hydrogenation of palm oil in near-critical and supercritical propane. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 101, 81-84.
- Macher, M., Hogberg, J., Moller, P., Harrod, M., 1999. Partial hydrogenation of fatty acid methyl esters at supercritical conditions. *Fette/Lipid* 8, 301-305.
- Macrae, A.R., 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 291-294.
- Macrae, A.R., 1985. Interesterification of fats and oils. In: Tramper, J., van der Plas, H.C., Linko, P. (Eds.), *Biocatalysis in Organic Syntheses*. Elsevier Applied Science, Amsterdam, p. 195-208.
- Mascioli, E.A., Bistrain, B.R., Babayan, V.K., Blackburn, G.L., 1987. Medium-chain triglycerides and structured lipids as unique nonglucose energy sources in hyperalimentation. *Lipids* 22, 421-423.
- McKenna, M.C., Hubbard, V.S., Pieri, J.G., 1985. Linoleic acid absorption in patients with cystic fibrosis with pancreatic insufficiency and in control subjects. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4, 45-48.
- Megremis, C.L., 1991. Medium-chain triglycerides: a nonconventional fat. *Food Technol.* 45, 108-110.
- Mendez, B., Ling, P.R., Istfan, N.W., Babayan, V.K., Bistrain, B.R., 1992. Effects of different lipid sources in total parenteral nutrition on whole body protein kinetics and tumor growth. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 16, 545-551.
- Meshehdani, T., Pokorny, J., Davidek, J., Panek, J., 1990. Deactivation of lipoxygenases during rapeseed processing. *Corps Gras* 37, 23-27.
- Mitsuyoshi, K., Hiramatsu, Y., Nakagawa, M., Yamamura, M., Hioki, K., Yamamoto, M., 1992. Effect of structured lipids as energy substrate after hepatectomy in rats with streptozocin-induced diabetes. *Nutrition* 8, 41-46.
- Mohamed, H.M.A., Larsson, K., 1994. Modification of fats by lipase interesterification. 2. Effect on crystallisation behaviour and functional properties. *Fat Sci. Technol.* 96, 56-59.
- Mori, T.A., Beilin, L.J., Burke, V., Morris, J., Ritchie, J., 1997. Interactions between dietary fat, fish and fish oils and their effects on platelet-function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 279-286.
- Mounts, T.L., 1981. Chemical and physical effects of processing fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58 51A-54A.
- Mounts, T.L., Khym, F.P., 1980. Refining. In: Erickson, D.R., Pryde, E.H., Brekke, O.L., Mounts, T.L., Falb, R.A. (Eds.), *Handbook of Soybean Oil Processing Technology*. American Soybean Association, St. Louis, MO, p. 89-103.
- Ochoa, N., Pagliero, C., Marchese, J., Mattea, M., 2001. Ultrafiltration of vegetable oils degumming by polymeric membranes. *Separ. Purif. Technol.* 22-23, 417-422.
- Osada, K., Nakamura, M., Nonaka, M., Hatano, M., 1992. Esterification of glycerol with EPA and DHA by *Chromobacterium viscosum* and *Candida cylindracea* lipases. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 41, 39-43.
- Osborn, H.T., Akoh, C.C., 2002. Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 1, 110-120.
- Ozturk, T., Ustun, G., Aksoy, H.A., 2010. Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: optimization by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 101, 7456-7461.
- Patterson, H.W.B., 1992. *Bleaching and Purifying Fats and Oils. Theory and Practice*. AOCS Press, Champaign, IL.
- Plourde, M., Cunnane, S.C., 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 619-634.
- Pokorny, J., 1991. Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 223-227.
- Posorske, L.H., LeFebvre, G.K., Miller, C.A., Hansen, T.T., Glenvig, B.L., 1988. Process considerations of continuous fat modification with an immobilised lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 922-926.
- Quinlan, P., Moore, S., 1993. Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *INFORM* 14, 580-585.
- Rajam, L., Kumar, D.R.S., Sundarsan, A., Arumugham, C., 2005. A novel process for physically refined rice bran oil through simultaneous degumming and dewaxing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 213-220.
- Raß, M., Schein, C., Matthäus, B., 2008. Virgin sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 618-624.
- Reddy, B.S., Maruyama, H., 1986. Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.* 46, 3367-3370.
- Roediger, W.E.W., Rae, D.A., 1982. Trophic effect of short-chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. *Br. J. Surg.* 69, 23-25.
- Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K.H., Wood, C.M., Schmitt, M.G., 1980. Absorption of short chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 78, 1500-1507.
- Scott, F.W., Lee, N.S., 1996. Bureau of Nutritional Science Committee on Functional Foods. Food Directorate Health Protection Branch, Ottawa, ON.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 1999. Enzyme-assisted acidolysis of borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils: incorporation of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3105-3112.

- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 1999. Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1009-1015.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 2000. Structured lipids containing long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: Shahidi, F.F. (Eds.), *Seafood in Health and Nutrition. Transformation in Fisheries and Aquaculture: Global Perspectives*, ScienceTech. St. John's, NF, Canada, p. 29-44.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 2001. Modified oils containing highly unsaturated fatty acids and their stability. In: Shahidi, F., Finley, J.W. (Eds.), *Omega-3 Fatty Acids. Chemistry, Nutrition and Health Effects*, ACS Symposium Series, 788. American Chemical Society, Washington, DC, p. 162-173.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 2002. Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal blubber oil with capric acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 35, 745-752.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 2005. Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. In: Shahidi, F. (Ed.), 6th ed. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Vol. 3. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 555-584.
- Sengupta, R., Bhattacharyya, D.K., 1992. A comparative study between biorefining combined with other processes and physical refining of high acid mohua oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 1146-1149.
- Shahidi, F., Wanasundara, U.N., 1998. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 230-240.
- Shahidi, F. and Zhong, Y. 2010. US Provisional Patent. Application No. 61/322,004.
- Shahidi, F., Zhong, Y., Tan, Z., 2010. Food bioactives and enhancement of their beneficial health effects by structure modification. Book of Abstracts, TCH-251, #333. *Chemistry, Safety, Quality and Regulations Aspects of Functional Food Ingredients, Nutraceuticals and Natural Health Products*, 15-20 December. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI.
- Shimada, Y., Murayama, K., Okazaki, S., Nakamura, M., Sugihara, A., Tominaga, Y., 1994. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 951-954.
- Smith, R.E., Finley, J.W., Leveille, G.A., 1994. Overview of Salatrim, a family of low-calorie fats. *J. Agric. Food Chem.* 42, 432-434.
- Spurvey, S.A., Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 2001. Enzyme-assisted acidolysis of menhaden and seal blubber oils with gamma-linolenic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 1105-1112.
- Sridhar, R., Lakshminarayana, G., 1992. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into groundnut oil by lipase-catalyzed ester interchange. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 1041-1042.
- Stein, J., 1999. Chemically defined structured lipids: current status and future directions in gastrointestinal diseases. *Int. J. Colorect. Dis.* 14, 79-85.
- Storlien, L.H., Kraegen, E.W., Chisholm, D.J., Ford, G.L., Bruce, D.G., Pascoe, W.S., 1987. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding rats. *Science* 237, 885-888.
- Sullivan, F.E., 1976. Steam refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53, 358-361.
- Szydlowska-Czerniak, A., 2007. MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process. *Food Chem.* 105, 1179-1187.
- Tan, Z., Le, K., Moghadasian, M., Shahidi, F., 2012. Enzymatic synthesis of phytosteryl docosahexaenoates and their evaluation of anti-atherogenic effects in apo-E deficient mice. *Food Chem.* 134, 2097-2104.
- Tanaka, Y., Hirano, J., Funada, T., 1992. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 1210-1214.
- Ulrich, H., Pastores, S.M., Katz, D.P., Kvetan, V., 1996. Parenteral use of medium-chain triglycerides: a reappraisal. *Nutrition* 112, 231-238.
- Vartak, S., Robbins, M.E.C., Spector, A.A., 1997. Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. *Lipids* 32, 283-292.
- Villeneuve, P., Foglia, T.A., 1997. Lipase specificities: potential application in lipid bioconversions. *INFORM* 8, 640-650.
- von Schacky, C., 2003. The role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 5, 139-145.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1998. Lipase-assisted concentration of *n*-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 945-951.
- Wang, J., Shahidi, F., 2010. Stability characteristics of omega-3 oil and their randomized counterparts. In: Ho, C.T., Mussinan, C.J., Shahidi, F., Contis, T. (Eds.), *Recent Advances in Food and Flavour Chemistry*. RSC Publishing, Cambridge, p. 297-307.
- Willem, V.N., Mabel, C.T., 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 472-486.
- Young, F.V.K., 1983. Palm kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 374-379.
- Zufarov, O., Schmidt, S., Sekretár, S., 2008. Degumming of rapeseed and sunflower oils. *Acta Chim. Slovac.* 1, 321-328.

Parte III

Bioquímica dos alimentos deteriorados

Escurecimento enzimático

Vera Lúcia Valente Mesquita, Christiane Queiroz 

I. INTRODUÇÃO

O escurecimento enzimático é um fenômeno que ocorre em muitas frutas, como maçãs e bananas, vegetais, como batatas e também em cogumelos. Quando o tecido vegetal é danificado, cortado, descascado, afetado por doença ou exposto a condições anormais, ele escurece rapidamente quando exposto ao ar, o que se deve à conversão de compostos fenólicos em melaninas marrons (Figura 10.1).

A nomenclatura internacional das enzimas envolvidas na reação de escurecimento mudou. A primeira enzima, a monofenol mono-oxigenase ou tirosinase (EC 1.14.18.1), dá início à reação de escurecimento, que posteriormente envolve a difenol oxidase ou catecol oxidase (EC 1.10.3.2) e a lacase (EC 1.10.3.1). Neste capítulo, a catecol oxidase será chamada de “polifenoloxidase” (PFO). Essa enzima requer a presença de um grupo prostético com cobre e oxigênio. Acredita-se que a PFO dos cogumelos tenha cobre monovalente e que a PFO das batatas tenha cobre divalente (Bendall e Gregory, 1963). A PFO é classificada como uma oxidoreductase e o oxigênio atua como aceptor de hidrogênio. A enzima é amplamente distribuída nas plantas superiores, fungos e tecidos animais e foi revisada por Swain (1962), Mathew e Parpia (1971), Mayer e Harel (1979), Vámos-Vigyázó (1981) e Mayer (1987; 2006).

A. Aspectos históricos da polifenoloxidase

O trabalho mais antigo é atribuído a Lindet, que em 1895 reconheceu a natureza enzimática do escurecimento enquanto trabalhava com a cidra. Ao mesmo tempo, Bourquelot e Bertrand começaram a estudar a tirosina oxidase de cogumelos. Em seguida, em 1920, Onslow mostrou que o escurecimento enzimático do tecido vegetal exposto ao ar resultava da presença de compostos *o*-difenólicos, como o catecol, o ácido protocatecuico e o ácido

cafeico, além de enzimas apropriadas (oxigenases). Acreditava-se que o produto dessa reação era um peróxido que reagia com um “cromógeno”, formando um pigmento marrom. Foi constatado que muitas frutas e vegetais, entre eles a maçã, a pera, o damasco e a batata, eram ricos em compostos fenólicos e oxigenases. Outras, como as cítricas, o abacaxi e a groselha vermelha, eram desprovidas dessas substâncias e, por essa razão, chamadas de “plantas com peroxidases”.

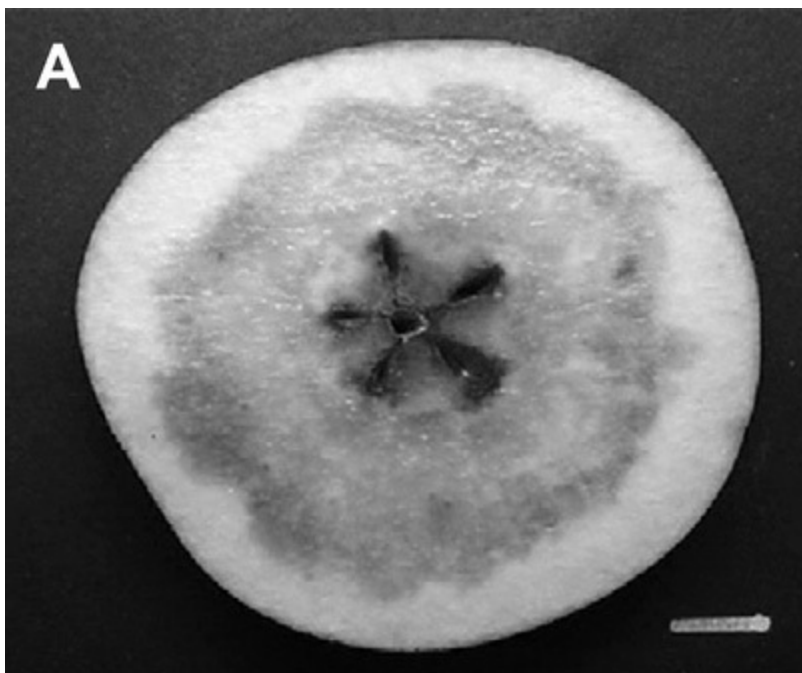


FIGURA 10.1 Escurecimento de peras *Conference* após quatro meses em condições de armazenamento que induziam o escurecimento (sem período de resfriamento, 1% de O₂, 10% de CO₂, - 1 C). Reproduzido de Franck *et al.* (2007). © 2007 com a permissão da Elsevier.

Essa distinção foi abandonada quando se constatou que a peroxidase e a catalase estavam presentes nos dois grupos de plantas e que, na verdade, eram ubíquas nos tecidos vegetais. Posteriormente, o termo “oxigenase” foi substituído por “fenolase” ou “polifenoloxidase”. Em 1937, Kubowitz demonstrou que a PFO era uma enzima que continha cobre.

II. CARACTERÍSTICAS DA POLIFENOLOXIDASE

A. Estrutura e sequência

A fim de compreender o papel fisiológico da PFO, realizaram-se muitas pesquisas para identificar a expressão gênica e as sequências de aminoácidos da PFO de diferentes plantas. Sabe-se que a PFO dos vegetais é sintetizada na forma de pré-proteína e contém peptídeos de trânsito na região N-terminal, no plastídio putativo, o qual direciona a enzima para o interior dos cloroplastos e do lúmen dos tilacoides (Marusek *et al.*, 2006). Estudos moleculares indicam que a PFO tem um genoma único ou faz parte de uma família com vários genes. Por exemplo, descobriu-se que o gene da PFO da cherimólia está presente em uma cópia do genoma e tem uma sequência de nucleotídeos muito diferente das outras sequências publicadas. Apesar dessas diferenças, ela apresenta proteínas conservadas no sítio ativo proposto e, também, aminoácidos básicos e estratégicos relacionados com a acessibilidade ao sítio ativo, a estrutura proteica e a estabilidade da proteína (Prieto *et al.*, 2007). Em macieiras Fuji, observou-se a expressão de dois genes da PFO (APO5 e MD-PPO2) durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutor, e em resposta a uma injúria. Foi constatado que esses genes não eram expressos no mesmo momento

ou pelo mesmo estímulo estressante. O teor máximo do RNA mensageiro (mRNA) do APO5 foi registrado em frutas danificadas após 24 horas, e a expressão do MD-PPO2 não aumentou, sugerindo que a ativação seletiva de genes individuais sob diferentes condições podia refletir a existência de vias de transdução de sinais distintas para ativar os diferentes genes da PFO (J. Y. Kim *et al.*, 2001). Além disso, foram identificados sete genes no tomate (Newmann *et al.*, 1993) e cinco cDNAs distintos de PFO foram isolados de plantas de batata (Hunt *et al.*, 1993).

A existência de vários genes resulta na presença de isoenzimas da PFO, e a variabilidade nas sequências de aminoácidos observada nos estudos explica as diferenças entre as enzimas extraídas de diferentes fontes. Foram encontradas duas isoenzimas no caqui, na maçã Fuji (J. Y. Kim *et al.*, 2001), no café (Mazzafera e Robinson, 2000) e na alcachofra (Aydemir, 2004); já a PFO da nêspera europeia apresentou quatro isoformas (Dincer *et al.*, 2002). A PFO purificada obtida da fava consiste em um tetrâmero com 120 kDa, havendo apenas uma única isoforma na semente (Paul e Gowda, 2000), enquanto a PFO do abacaxi tem três isoenzimas, e a isoforma principal consiste em um tetrâmero de subunidades de 25 kDa idênticas (Das *et al.*, 1997).

A massa molecular da PFO de outras espécies é apresentada a seguir: amora, 65 kDa (Arslan *et al.*, 2004); castanhas, 69 kDa (Xu *et al.*, 2004); e a polpa do pinheiro, 90 kDa (Lima *et al.*, 2001).

Pesquisadores já descreveram a estrutura cristalina da PFO da batata-doce, da uva e do fungo *Neurospora crassa*. A PFO de *Vitis vinifera* é constituída de uma proteína monomérica de 38,4 kDa. Tem forma elipsoidal, e suas dimensões são $56,7 \times 48,0 \times 48,3 \text{ \AA}^3$ (Figura 10.2A, B). A estrutura secundária é, principalmente, R-helicoidal, e o centro da proteína é formado por um feixe com quatro hélices, composto pelas R-hélices denominadas R4, R5, R12 e R14 (Figura 10.2A). A Figura 10.2(B) mostra imagens sobrepostas das três estruturas de PFO existentes. Há algumas áreas nas quais o enovelamento é um pouco diferente. Em sua maior parte, essas diferenças ocorrem na superfície e não envolvem alterações nas R-hélices ou nas fitas b (Virador *et al.*, 2010).

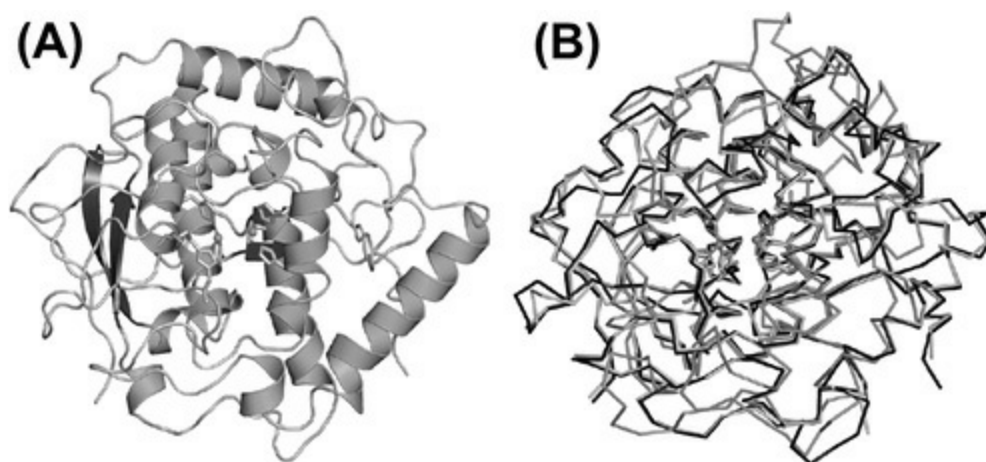


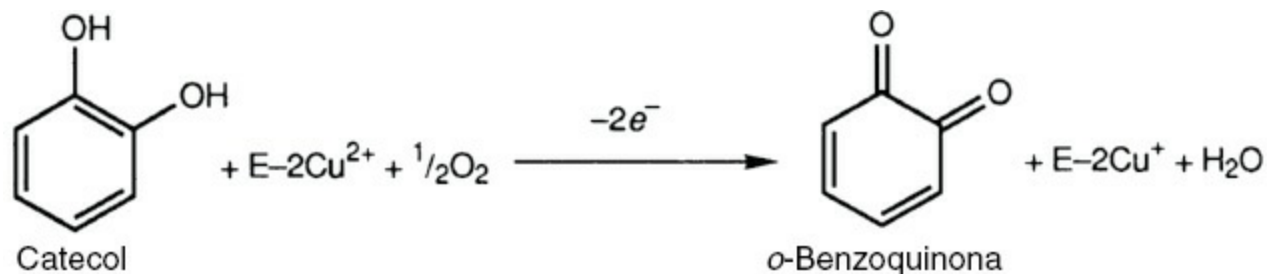
FIGURA 10.2 Estrutura obtida por raios X da polifenoloxidase (PFO) de *Vitis vinifera*. (A) Modelo em fitas que mostra a forma elipsoidal, duas folhas b e o centro com dois átomos de cobre, no interior de um feixe com quatro hélices. (B) Representação dos C_α da PFO de *V. vinifera* (azul) sobreposta à da PFO de batata-doce (amarela) e de *Streptomyces castaneoglobisporus* (verde). A versão colorida dessa figura (Virador *et al.*, 2010) está disponível on-line. Reproduzido com permissão, © 2010 The American Chemical Society.

B. Mecanismo da reação

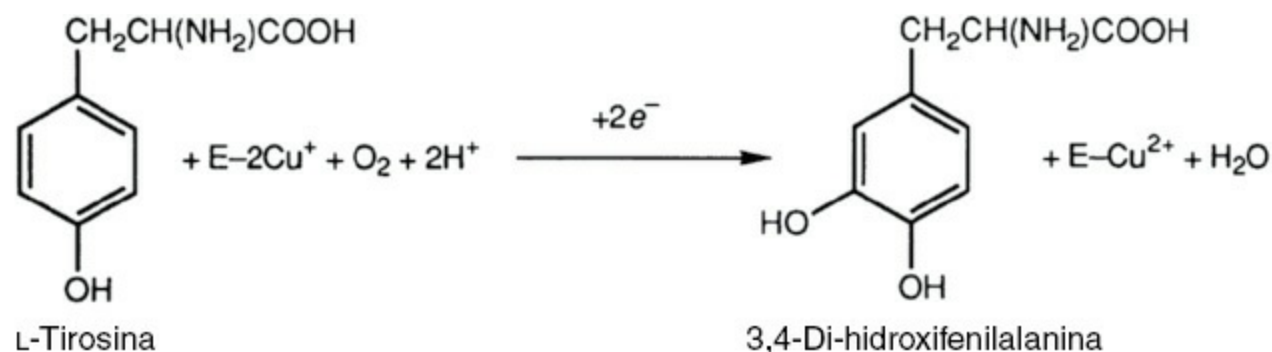
O mecanismo de ação proposto para a PFO baseia-se em sua capacidade de oxidar compostos fenólicos. Quando o tecido vegetal é danificado, a ruptura de plastídios, o compartimento celular no qual a PFO está localizada, permite que essa enzima entre em contato com os compostos fenólicos liberados pela ruptura do vacúolo, a principal organela de armazenamento desses compostos (Mayer e Harel, 1979).

A PFO catalisa dois tipos de reação: a atividade de cresolase, por meio da qual monofenóis são hidroxilados a o-difenóis, e a atividade catecolase. A reação do tipo catecolase, ou difenolase, é mais bem ilustrada pela oxidação

do catecol, um *o*-difenol bastante utilizado como substrato em laboratório:



A atividade cresolase ou monofenolase envolve a hidroxilação de monofenóis em *o*-difenóis, como mostrado pela oxidação da L-tirosina em 3,4-di-hidroxfenilalanina, que ocorre nas batatas (Schwimmer e Burr, 1967):



O sítio ativo da PFO consiste em dois átomos de cobre coordenado a seis histidinas e existe em três estados de oxidação: *desoxi* (E_d), *met* (E_m) e *oxi* (E_o) (Figura 10.3). Um dos átomos de Cu²⁺ está ligado aos monofenóis, enquanto os difenóis se ligam aos dois. Como mostrado nos mecanismos das reações, a atividade de monofenolase está intimamente associada à de difenolase e produz dois elétrons que são necessários para a incorporação de um átomo de oxigênio no substrato monofenólico.

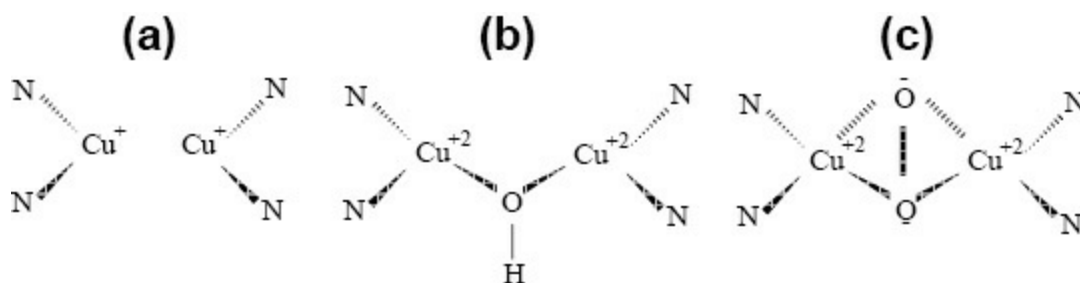
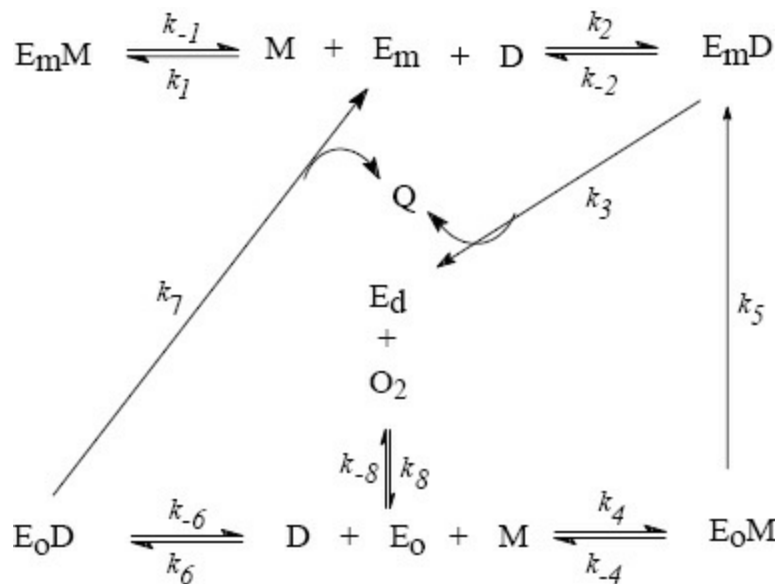


FIGURA 10.3 Estrutura da polifenoloxidase: (a) *desoxi*PFO, (b) *met*PFO e (c) *oxi*PFO. Adaptado com a permissão de Espín *et al.* (1998.) © 2010 The American Chemical Society.



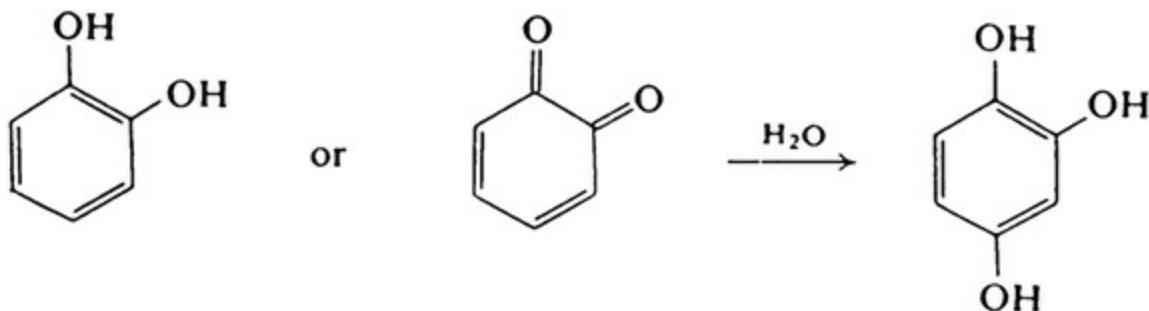
ESQUEMA 10.1 Mecanismo da reação cinética da polifenoloxidase (PFO) sobre monofenóis e *o*-difeníis. Em: *met*PFO; Ed: *desoxi*PFO; Eo: *oxi*PFO; M: monofenol; D: difenol; Q: *o*-quinona. Reproduzido com permissão, Espín *et al.* (1998). © 1998 The American Chemical Society.

Os mecanismos estruturais e cinéticos da hidroxilação dos monofenóis (M) e da oxidação dos *o*-difeníis (D) em *o*-quinonas (Q) catalisadas pela PFO já foram determinados (Fenoll *et al.*, 2004; Espín *et al.*, 1998; Rodriguez-Lopes *et al.*, 1992). O substrato monofenólico une-se inicialmente à posição axial de um dos átomos de cobre da E_o , o que leva à hidroxilação do monofenol pelo peróxido ligado, à perda de água e à formação do complexo enzima-difenol ($E_m D$). Esse complexo pode produzir difenol livre ou o intermediário difenolato, ligado ao sítio ativo, pode sofrer oxidação, originando uma quinona livre e um dos átomos de cobre, do sítio enzimático, reduzido (E_d). A *Oxy*PFO é, então, regenerada após a ligação de oxigênio molecular à E_d (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992). Quando um ortodifenol está presente no meio, esse substrato se liga tanto a E_o quanto a E_m , formando os intermediários $E_o D$ e $E_m D$, que, por sua vez, dão origem a duas quinonas (Orenes-Piñero *et al.*, 2005) (Esquema 10.1).

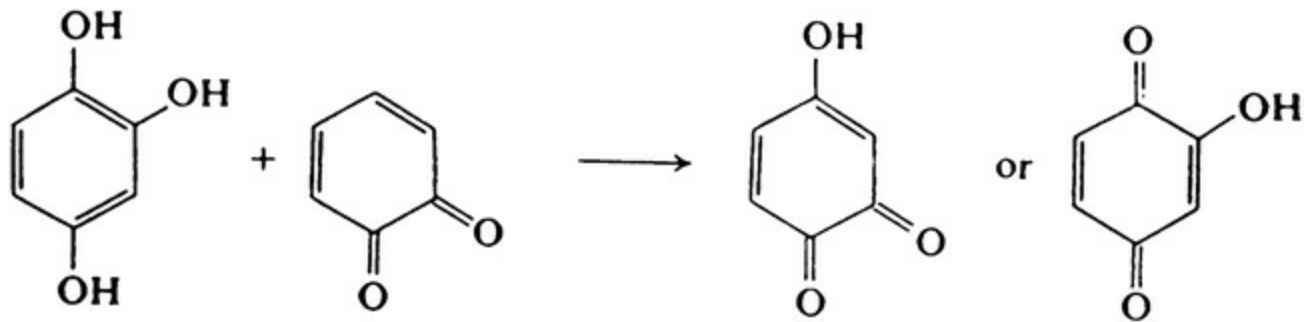
A presença do complexo final $E_m M$ está relacionada com a ocorrência de um período de latência na atividade de monofenolase da PFO (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992), que pode ser eliminada pela adição de pequenas quantidades de agentes redutores ou de *o*-difeníis como cosubstratos.

A formação das quinonas depende da enzima e do oxigênio. Assim que as quinonas se formam, as reações subsequentes ocorrem de modo espontâneo e não dependem mais da presença da PFO ou do oxigênio. Joslyn e Ponting (1951) resumiram as reações químicas que podem ser as responsáveis pela formação de melaninas marrons.

Acredita-se que a primeira reação seja uma hidroxilação secundária da *o*-quinona ou de *o*-difenol em excesso:



O composto resultante (tri-hidroxi-benzeno trifenólico) interage com a *o*-quinona, formando hidroxiquinonas:



As hidroxiquinonas sofrem polimerização e são progressivamente convertidas em polímeros vermelhos, vermelho-marrons e, por fim, em melaninas marrons, que aparecem no local da lesão do tecido vegetal (Matheis e Whitaker, 1984; Whitaker, 1972).

A proporção entre a atividade de difenolase e monofenolase depende da fonte vegetal e pode variar de 1:10 a 1:40 (Vámos-Vigyázó, 1981). Sanchez-Ferrer *et al.* (1988) purificaram parcialmente a PFO de uvas Monastrell e identificaram as atividades de cresolase e catecolase. Rocha e Morais (2001) também constataram a ocorrência de atividade de cresolase e catecolase na PFO das maçãs Jonagored. Espín *et al.* (1997a; 1997b) descreveram a atividade de cresolase em morangos e peras. No entanto, foi constatado que a atividade de monofenolase está ausente em várias plantas, entre elas o café (Mazzafera e Robinson, 2000), flores de brócolis (Gawlik-Dziki *et al.*, 2007), alface manteiga (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008) e caju (Queiroz *et al.*, 2011).

C. Importância biológica da polifenoloxidase nas plantas

Até recentemente, o papel da PFO na célula viva intacta permaneceu um tanto obscuro. Os primeiros estudos sugeriram seu envolvimento como oxidase terminal na respiração (James, 1953) e na biossíntese da lignina (Mason *et al.*, 1955). Posteriormente, essas ideias foram descartadas nos estudos de Nakamura (1967), que analisou o papel de três enzimas isoladas do látex da árvore-da-laca japonesa (*Rhus vermicifera*): a fenolase, a peroxidase e a lacase. Dessas enzimas, apenas a peroxidase estava envolvida na lignificação. Estudos recentes mostraram o papel da lacase na lignificação (Srebotnik e Hammel, 2000; Arora *et al.*, 2002; Shleev *et al.* 2006). O mecanismo será discutido na seção II, E.

A PFO também pode ter algum papel na biossíntese da betalaína. A beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) e a onze-horas (*Portulaca portiflora*) contêm uma PFO que hidroxila a tirosina, formando 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA), e oxida a DOPA em dopaquinona (Steiner *et al.*, 1996, 1999). A atividade enzimática é complementada pela atividade dioxigenase, que leva à formação da betalaína. No entanto, são necessárias mais evidências para confirmar essa função.

A PFO está restrita aos plastídios. A enzima parece estar em uma forma latente e ligada à membrana dos tilacoides, onde as reações fotoquímicas da fotossíntese ocorrem. A forma latente pode ser ativada na presença de ácidos graxos (Siegenthaler e Vaucher-Boniour, 1971), detergentes (Sellés-Marchart *et al.*, 2006) ou tripsina (Tolbert, 1973). Pinto *et al.* (2008) isolaram as frações solúvel e insolúvel da PFO da planta do feijão-fradinho e relataram a ativação da PFO pelo detergente dodecil sulfato de sódio apenas na fração solúvel, sugerindo que a PFO insolúvel havia sido purificada na forma ativa.

Em células intactas, a PFO parece ter pouca atividade sobre os fenóis, que estão localizados no vacúolo, relativamente isolado do plastídio. Visto que a enzima funciona normalmente apenas quando as células são danificadas ou estão senescentes, ela pode ter ainda um papel protetor, como proposto de início por Craft e Audia (1962). Quando os conteúdos do plastídio e do vacúolo se misturam, a PFO participa do metabolismo dos fenóis. Essa mistura ocorre durante a senescência, quando a integridade da célula é rompida e a enzima é ativada (Goldbeck e Cammarata, 1981). No entanto, estudos recentes mostraram que a enzima tem uma atividade maior

durante o desenvolvimento da planta. Yu *et al.* (2010) avaliaram a ação da PFO no pericarpo da fruta longana (ou olho-de-dragão) colhida entre o 30º dia após a floração até a fase de fruta madura. Eles observaram uma atividade enzimática mais alta na primeira fase, seguida de uma diminuição acentuada e, depois, de um aumento lento na fase final. Esses dados estão em concordância com aqueles descritos previamente por Yang *et al.* (2000) e Sun *et al.* (2009). Ayaz *et al.* (2008) investigaram a atividade da PFO nas nêspas europeias durante a maturação e a maturação excessiva e mostraram que a velocidade da reação é mais alta na fruta madura do que na fruta excessivamente madura. Isso pode indicar que a enzima é mais ativa na fruta madura que na fruta excessivamente madura. Um estudo molecular realizado por J. Y. Kim *et al.* (2001) mostrou a expressão distinta de dois genes da PFO da maçã. Os autores investigaram o mRNA da PFO extraída da flor, da fruta e da folha, em diferentes estágios, e as análises por *blotting* mostraram uma expressão maior nos estágios iniciais (Figura 10.4).

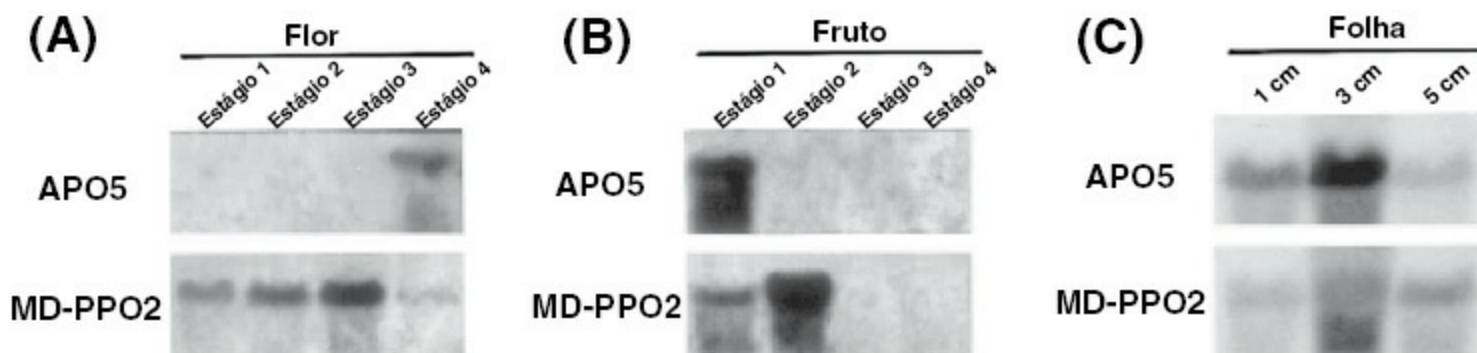


FIGURA 10.4 Expressão tecido-específica de dois mRNAs da polifenoloxidase (PFO) de maçã Fuji. Os RNAs totais foram isolados de (A) flor, (B) fruto e (C) tecidos da folha, em diferentes estágios do desenvolvimento, conforme indicado. Reproduzido de J. Y. Kim *et al.* (2001). © 2001, com a permissão da Elsevier.

O escurecimento enzimático também ocorre depois que a fruta ou vegetal sofre injúria mecânica que causa a ruptura do plastídio, a ativação da PFO latente e a catálise dos compostos fenólicos liberados do vacúolo. Vários estudos mostraram a ativação da PFO por estresse biótico e abiótico. A PFO da maçã exibiu atividade máxima 24 horas após a injúria, enquanto a PFO do feijão-fradinho atingiu o nível máximo de atividade 48 horas após a injúria (J. Y. Kim *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2008). A temperatura é um fator importante na determinação do nível de ativação, já que a PFO é termossensível. Queiroz *et al.* (2011) estudaram o efeito da lesão mecânica e do armazenamento por 24 horas em diferentes temperaturas sobre a PFO do caju (Tabela 10.1). Eles observaram que a ativação da PFO foi cinco vezes mais alta nas frutas mantidas a 2°C e a 27°C, mas a atividade da PFO foi baixa na temperatura mais alta estudada (40°C). O estresse ambiental também pode afetar a atividade da PFO. As situações de estresse estão relacionadas com um aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase, que regula a síntese de compostos fenólicos, aumentando a quantidade de substratos da PFO na célula vegetal (Dixon e Paiva, 1995). Tegelberg *et al.* (2008) constataram uma atividade enzimática mais alta nas folhas de *Betula pendula* após exposição a uma concentração elevada de dióxido de carbono (700 ppm), associada a uma temperatura elevada (2,5°C mais alta que a temperatura ambiente) e a uma radiação ultravioleta (UV)-B elevada (7,95 kJ/m²/dia). Por outro lado, Thipyapong *et al.* (2004b) relataram que o tomate transgênico com supressão da PFO apresentava uma tolerância maior ao estresse de água que as plantas não transformadas e as plantas transgênicas com superexpressão da PFO. No entanto, em tais condições, os autores também observaram uma superregulação de dois genes da PFO, provavelmente associados à resistência ao estresse. Rivero *et al.* (2001) submetteram melancias e tomates ao estresse pelo frio e pelo calor e observaram que a atividade da PFO diminuiu e a atividade da fenilalanina amônia-liase aumentou, levando a um acúmulo de polifenóis nas plantas estressadas. Esses resultados mostram os diferentes modos pelos quais as plantas se defendem de situações indesejáveis.

A enzima parece desempenhar um papel importante na resistência das plantas à infecção por vírus, bactérias e fungos (Tyagi *et al.*, 2000; Mohammadi e Kazemi, 2002; Wang e Constabel, 2004). Nessas situações, a atividade da enzima aumenta com a produção de polímeros insolúveis que atuam como uma barreira contra a disseminação da

infecção pela planta. Por outro lado, alguns dos intermediários da polimerização oxidativa dos polifenóis impedem ou reduzem as infecções ao inativar (ou se ligar a) algumas enzimas lábeis da planta ou os vírus. Mahanil *et al.* (2008) observaram que os tomates transgênicos com superexpressão da PFO exibiam uma resistência maior à lagarta comum [*Spodoptera litura* (F.)] (Figura 10.5). O estudo também mostrou que a atividade maior da PFO elevou a mortalidade das larvas. Os autores constataram que a eficiência da conversão do alimento ingerido e do alimento digerido dos terceiros ínstar foi significativamente diferente entre os tomates cujos genótipos levaram a graus diferentes de atividade da PFO, sugerindo que a atividade da PFO torna as folhas menos nutritivas. Outros estudos realizados com tomates mostraram o papel da PFO na resistência às doenças: a supressão *antisense* da PFO aumenta a suscetibilidade e a expressão excessiva da PFO aumenta a resistência dos tomates à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Li e Steffens, 2002; Thipyapong *et al.*, 2004a).

D. Compostos fenólicos na matéria-prima alimentar

Os compostos fenólicos são substâncias naturais que contribuem para as propriedades sensoriais (cor, sabor, aroma e textura) associadas à qualidade das frutas (Marshall *et al.*, 2000). Eles formam uma das principais classes de metabólitos secundários, exibem uma ampla variedade de estruturas e funções e, geralmente, têm um anel aromático com um ou mais substituintes hidróxi. A composição fenólica das frutas é determinada por fatores genéticos e ambientais, mas pode ser modificada por reações oxidativas. Os compostos fenólicos são sintetizados durante o desenvolvimento do vegetal, porém sua síntese é estimulada em condições estressantes pela ativação da fenilalanina amônia-liase. Assim, esses compostos desempenham um papel nos mecanismos de defesa e de adaptação dos vegetais. Os compostos fenólicos que são encontrados na matéria-prima alimentar e que participam do escurecimento dos vegetais podem ser divididos em quatro grupos: fenóis simples, ácidos fenólicos, derivados do ácido cinâmico e flavonoides.

TABELA 10.1 Atividade da polifenoloxidase no caju danificado

Extrato da enzima	Atividade específica (U/min/mg de proteína)	Ativação
0 hora (controle)	0,62	–
2°C/24 horas	2,92	4,8
27°C/24 horas	3,33	5,4
40°C/24 horas	1,07	1,7

Reproduzido de Queiroz *et al.* (2011). © 2011, com a permissão da Elsevier.

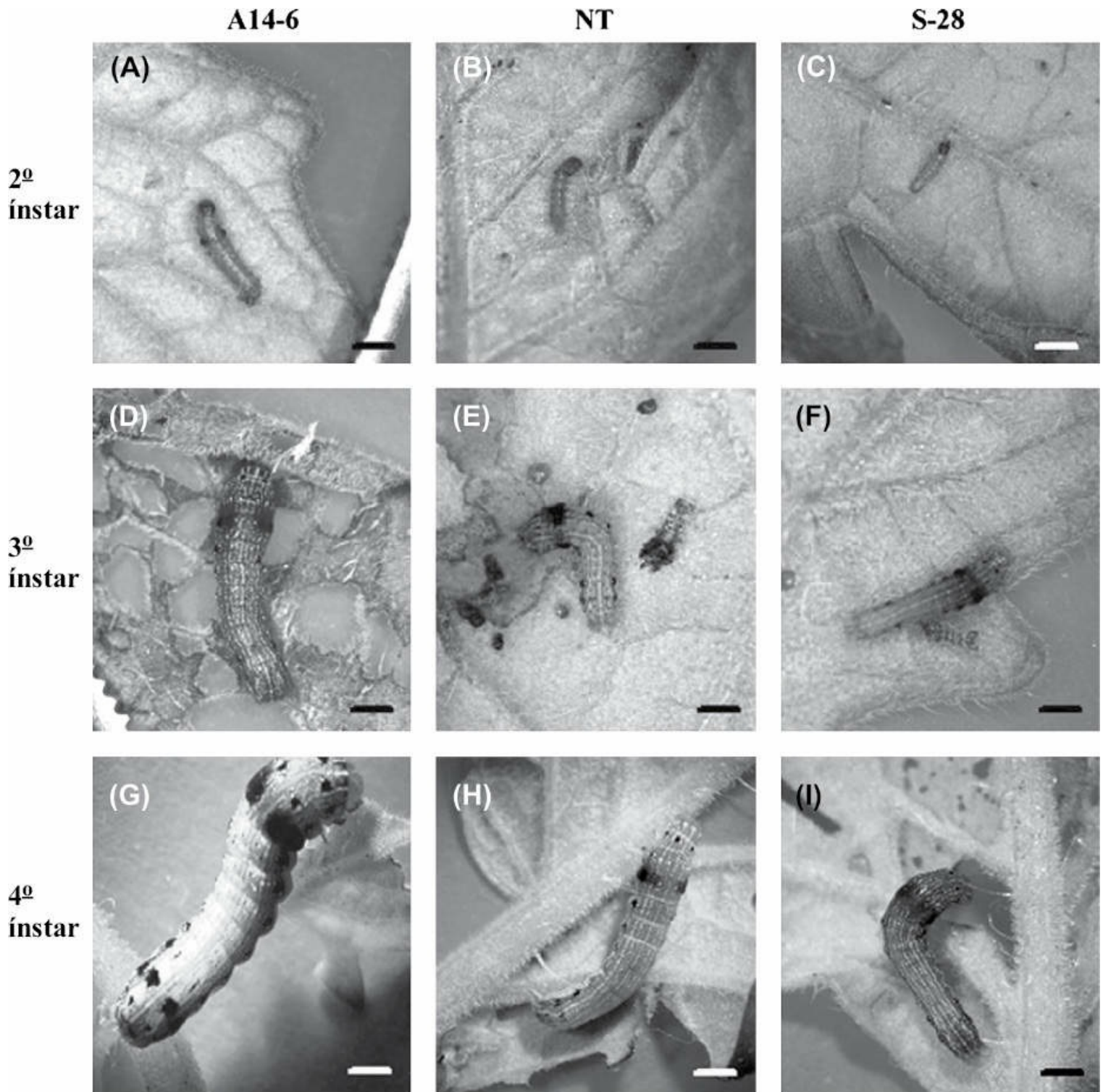
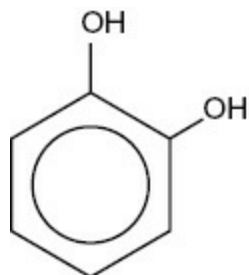


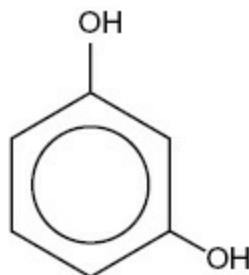
FIGURA 10.5 (A-C) Segundo ínstar, (D-F) terceiro ínstar e (G-I) quarto ínstar larval de *Spodoptera litura* (F) alimentando-se de folhas de tomateiros (nódulo 8) com graus variados de atividade da polifenoloxidase (PFO). A14-6: linhagem transgênica com atividade de PFO suprimida; NT: controle não transformado; S-28: linhagem transgênica com atividade de PFO superexpressa. Escala da barra = 2,5 mm Reproduzido de Mahanil *et al.* (2008). © 2008, com permissão da Elsevier.

1. Fenóis simples

Os fenóis simples incluem monofenóis, como a L-tirosina, e *o*-difenois, como o catecol, o resorcinol e a hidroquinona. No entanto, desses compostos, apenas o catecol pode ser oxidado pela PFO, porque sua hidroxila está na posição *orto*. O catecol foi identificado nas raízes de *Diospyro kaki* por Jeong *et al.* (2009), e a PFO exibiu alta afinidade por esse composto fenólico (Özen *et al.*, 2004).



catecol



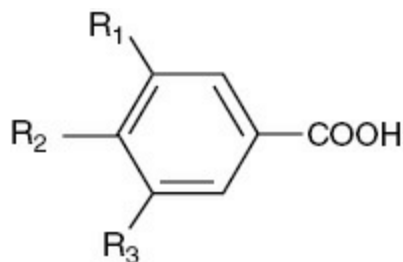
resorcinol



hidroquinona

2. Ácidos fenólicos

Essa classe engloba os ácidos sintetizados a partir do ácido benzoico (precursor) e esses ácidos estão amplamente distribuídos nos vegetais. O ácido gálico está presente na forma esterificada nos flavonoides do chá. Os ácidos gálico e protocatecuico foram encontrados no caju (Michodjehoun-Mestres *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2011) e o ácido protocatecuico foi o principal ácido fenólico livre identificado nas nêspersas europeias (Gruz *et al.*, 2011).



Ácidos benzoicos

Ácido gálico $R_1=R_2=R_3=OH$

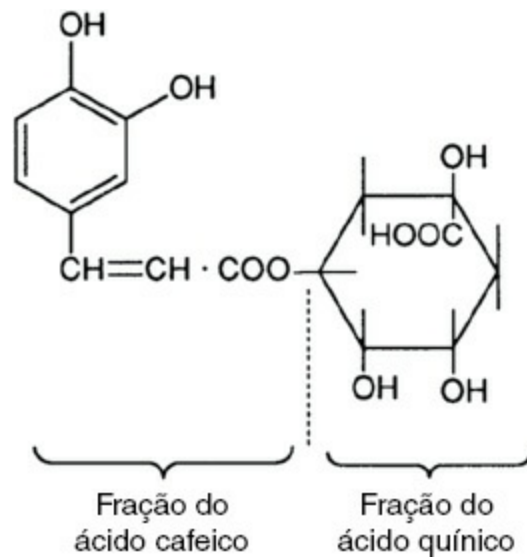
Ácido protocatecuico $R_1=H$, $R_2=R_3=OH$

Ácido vanílico $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=OCH_3$

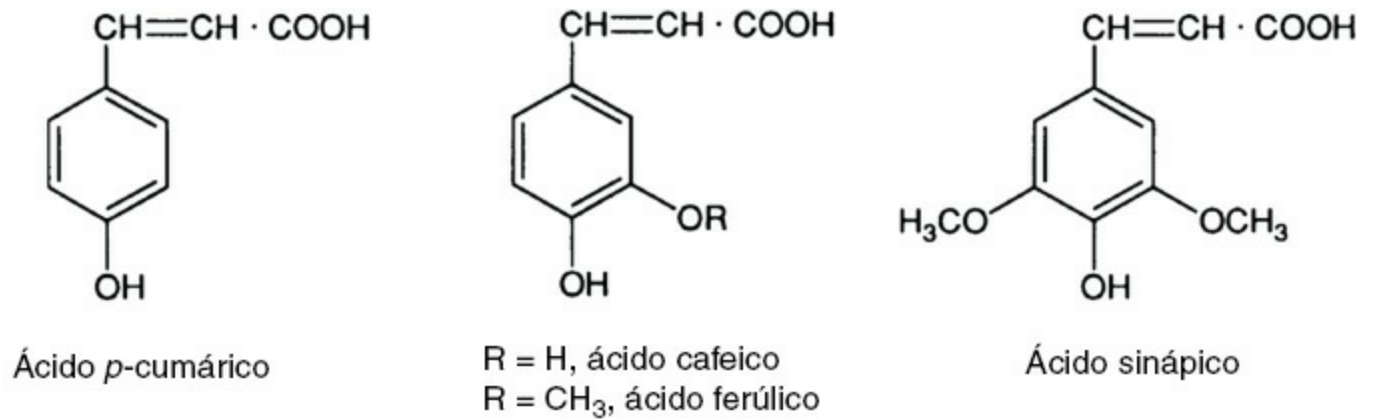
Ácido siríngico $R_2=OH$, $R_1=R_3=OCH_3$

3. Derivados do ácido cinâmico

O membro mais importante desse grupo de compostos da matéria-prima alimentar é o ácido clorogênico, que é o substrato-chave do escurecimento enzimático, especialmente nas maçãs e peras (Gauillard e Forget, 1997; Song *et al.*, 2007). Embora a batata seja rica em ácido clorogênico, esse ácido não é o fator determinante para o surgimento das manchas escuras. Batatas de dois cultivares (cv. *Bildstar* e cv. *Lady Rosetta*) foram danificadas e os pigmentos, identificados. O ácido quínico foi detectado nos hidrolisados dos pigmentos das batatas *Bildstar*, mas não naqueles das batatas *Lady Rosetta*, o que indicou que o ácido clorogênico pode participar da formação das manchas escuras, mas não é essencial para essa mudança de cor (Stevens e Davelaar, 1996). Esses dados foram confirmados por Lærke *et al.* (2002), que encontraram uma correlação entre os produtos finais escuros e a tirosina livre, mas nenhuma correlação entre a cor preta e os ácidos clorogênico e cafeico nos cultivares de batatas (cv. *Dali* e cv. *Oleva*). A alteração de cor causada pelo ácido clorogênico é atribuída à oxidação dos complexos formados entre o ferro e os ácidos cafeico e clorogênico.

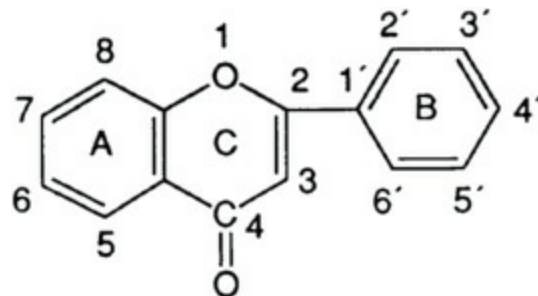


Outros membros desse grupo de compostos incluem os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. A distribuição universal e a alta concentração dos ácidos cinâmicos nas frutas podem resultar de sua função como precursores na via da biossíntese de polifenóis mais complexos.

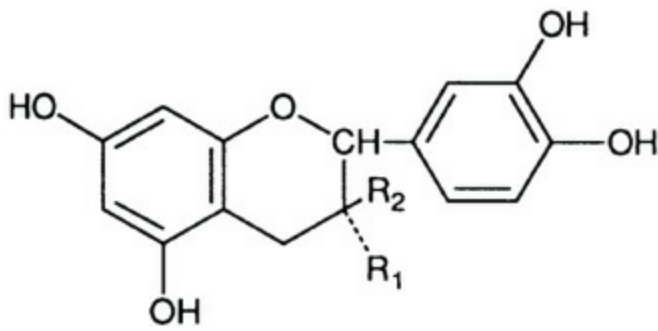


4. Flavonoides

Entre os polifenóis, esse grupo é o mais difundido e o que apresenta estruturas mais variadas. Todos os membros desse grupo de compostos estão estruturalmente relacionados com a flavona:

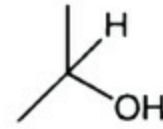


Na matéria-prima alimentar, os flavonoides importantes são as catequinas, as antocianinas e os flavonóis. A estrutura da catequina é apresentada a seguir:

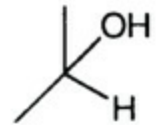


(+) – Catequina ($R_1 = H$; $R_2 = OH$)

(-) – Epicatequina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

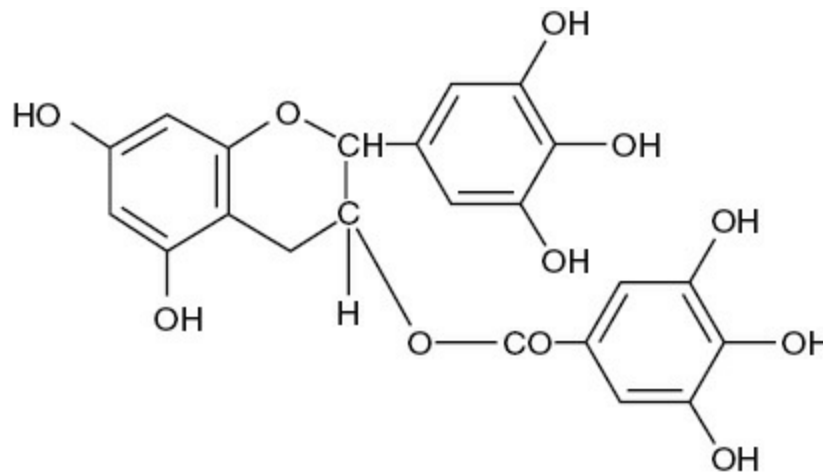


Catequina

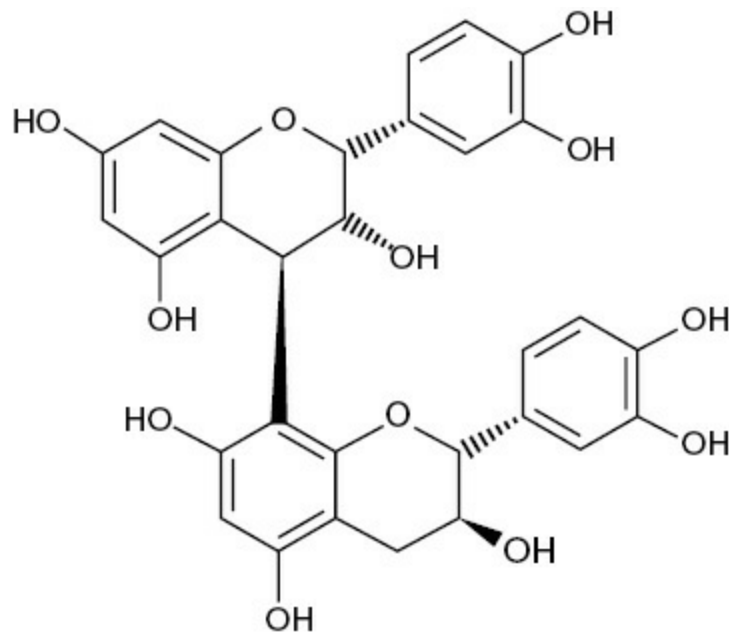


Epicatequina

Um grupo hidroxila adicional ligado na posição 5' do anel B da catequina e da epicatequina dá origem à galocatequina e à epigalocatequina, respectivamente. Os galatos de catequina são ésteres de catequinas e ácido gálico; a ligação éster é formada entre o grupo carboxila do ácido gálico e o grupo hidroxila ligado na posição 3 do anel C da catequina. Um exemplo é o (-)-galato de epigalocatequina, o principal polifenol das folhas secas de chá.

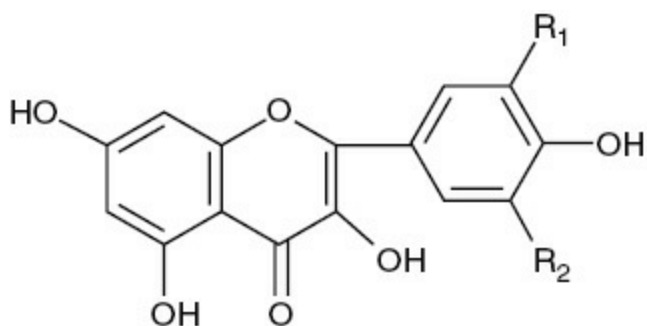


Esses compostos não são os principais fenóis das frutas, mas são constituintes importantes presentes nas formas oligomérica ou polimérica, como as proantocianidinas (ou taninos condensados). A procianidina é um dímero e está presente na maçã, na uva e na cereja (Robards *et al.*, 1999).



Procianidina B-1

Os flavonóis também participam das reações de escurecimento e estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais. Os flavonóis de ocorrência mais comum são o canferol, a quercetina e a miricetina:



Canferol ($R_1 = R_2 = H$)

Quercetina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

Miricetina ($R_1 = R_2 = OH$)

Os flavonóis têm cor amarelo-clara e, por conferirem adstringência a alguns alimentos, assumem particular importância em frutas e vegetais. Eles ocorrem naturalmente na forma de glicosídeos, cujos exemplos são a rutina e os glicosídeos da quercetina, este último encontrado nas folhas de chá e na casca das maçãs (Hulme, 1958).

Todos os compostos discutidos até aqui são substratos da PFO. Essas reações de oxidação são importantes na fermentação do chá, no escurecimento dos pêssegos (Luh *et al.*, 1967) e na etapa de secagem da cura das sementes frescas de cacau (Roelofsen, 1958). Esta etapa parece ser uma fase importante do desenvolvimento da cor, do sabor e do aroma finais do cacau e do chocolate. A PFO desempenha um papel benéfico na fermentação do chá e do cacau, o que contrasta com seu papel no escurecimento de frutas e vegetais.

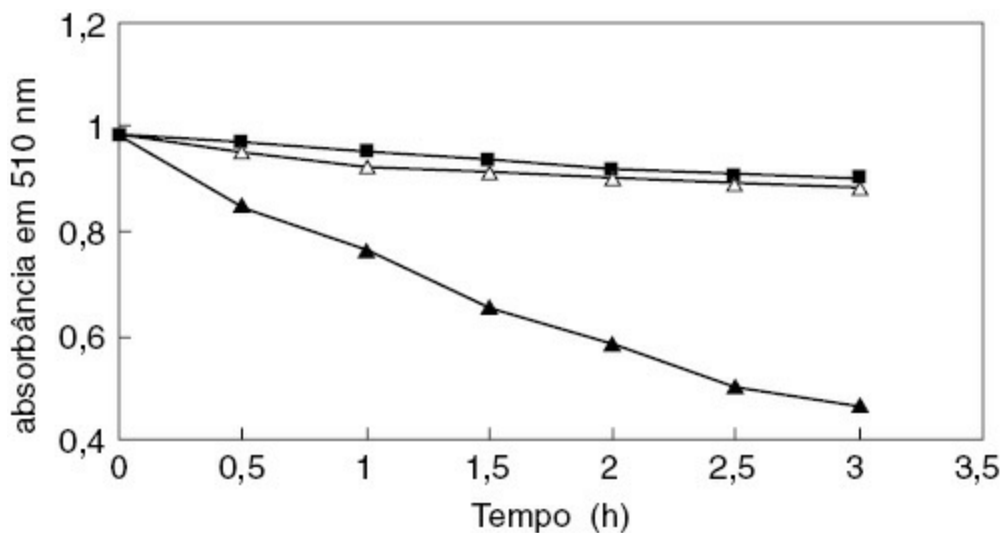


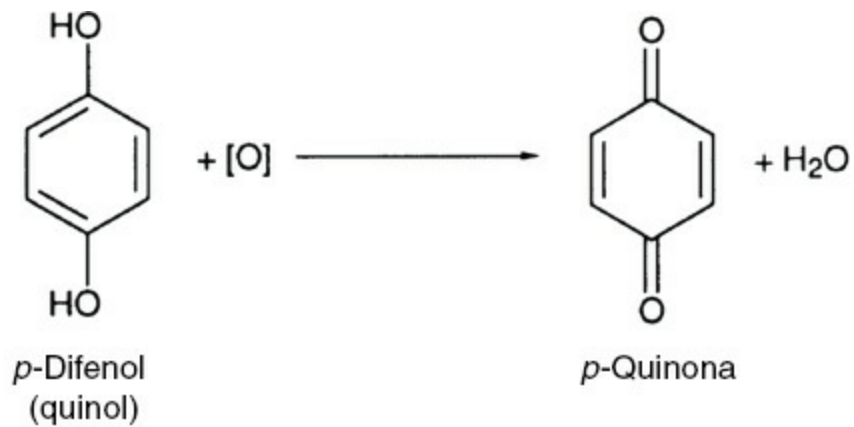
FIGURA 10.6 Alterações na absorbância da antocianina de morango chinês (bayberry) a 510 nm durante sua degradação pela polifenoloxidase (PFO) de morango chinês, na presença (●) e na ausência (Δ) de ácido gálico, e após desnaturação térmica da PFO, na presença de ácido gálico (■). Reproduzido de Fang *et al.* (2007). © 2007, com permissão da Elsevier.

) e na ausência (Δ) de ácido gálico, e após desnaturação térmica da PFO, na presença de ácido gálico (■). Reproduzido de Fang *et al.* (2007). © 2007, com permissão da Elsevier.

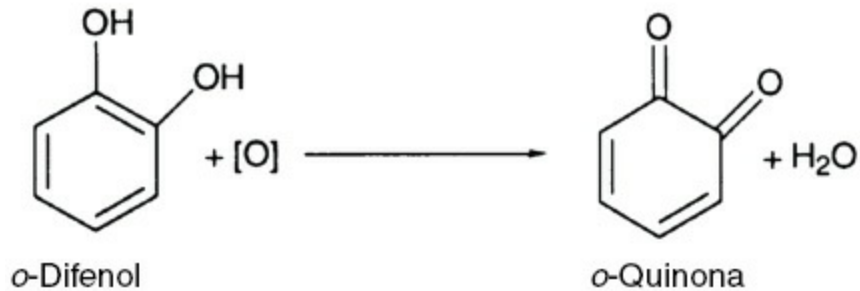
Vários estudos foram realizados para identificar outros substratos endógenos da PFO em frutas. A epicatequina é o substrato endógeno da PFO da lichia e da longana (Sun *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). Outros flavonoides, como o eriodictiol, a miricetina e a fisetina, também podem ser oxidados pela PFO (Jiménez *et al.*, 1998; Jiménez e García-Carmona, 1999; Jiménez-Atiénzar *et al.*, 2005a; 2005b). As antocianinas não são oxidadas diretamente pela PFO ou são substratos inadequados (Mathew e Parpia, 1971), mas podem ser degradadas por um mecanismo acoplado de oxidação. Ruenroengklin *et al.* (2009) sugeriram que a PFO da lichia oxida diretamente a epicatequina e os produtos da oxidação da epicatequina, por sua vez, catalisam a degradação da antocianina da lichia, levando à reação de escurecimento, que pode ser responsável pelo escurecimento do pericarpo após a colheita dessa fruta. Fang *et al.* (2007) obtiveram resultados similares, que demonstraram que a velocidade de degradação da antocianina do morango chinês (*Myrica rubra*) foi estimulada pela adição de ácido gálico. A velocidade da mudança de cor da cianidina 3-glicosídeo na ausência de ácido gálico foi quase igual à velocidade quando o extrato enzimático foi inativado por aquecimento e o ácido gálico estava presente (Figura 10.6).

E. Lacase

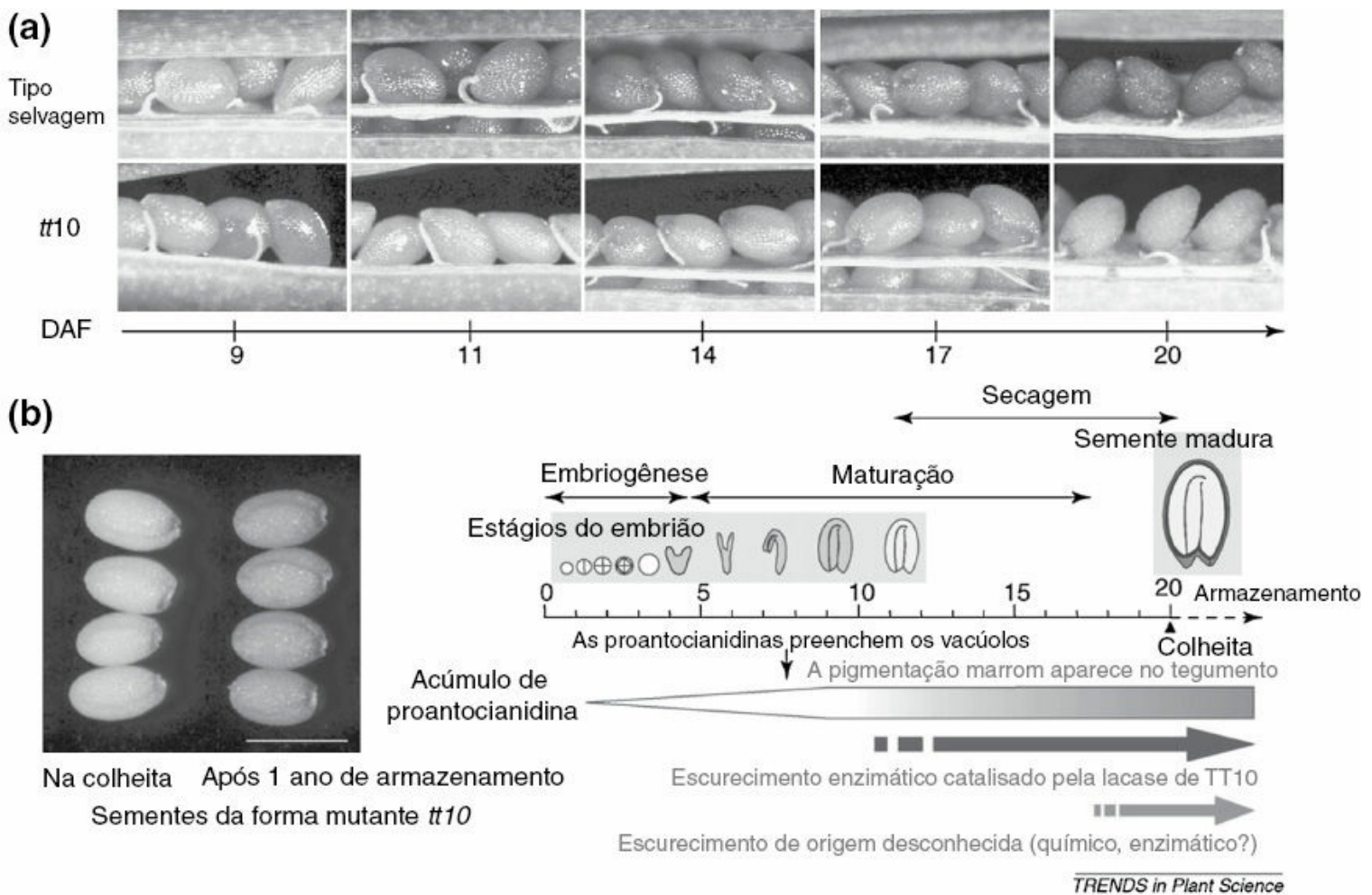
Os primeiros estudos sobre o escurecimento enzimático de compostos fenólicos identificaram dois tipos de atividade, que, no início, foram denominadas tirosinase e lacase. Os respectivos nomes sistemáticos utilizados no passado eram *o*-difenoil: oxigênio oxidoredutase (EC 1.10.3.1) e *p*-difenoil: oxigênio oxidoredutase (EC 1.10.3.2), agora chamadas monofenol mono-oxigenase (EC 1.14.18.1). A lacase possui como característica a capacidade de oxidar *p*-difenois, uma propriedade que a tirosinase e a PFO não têm (Mayer e Harel, 1979). Ela está presente em muitas plantas, fungos e micro-organismos; contudo, a maioria das lacases conhecidas é obtida de fungos, em especial dos fungos causadores da podridão branca (Thurston, 1994; Revankar e Lele, 2006; Fonseca *et al.*, 2010). A reação básica catalisada pela lacase responsável pela oxidação do *p*-difenoil é:



ou



A lacase é responsável pela oxidação dos flavonoides e pelo escurecimento durante o desenvolvimento das sementes de *Arabidopsis* (Figura 10.7) e uma das principais enzimas responsáveis pela oxidação da lignina, um polímero amorfo que serve como material cimentante nas células da madeira. A enzima atua em conjunto com outras enzimas fúngicas ligninolíticas (que degradam a lignina), como a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a peroxidase versátil (Arora *et al.*, 2002). A lacase sozinha só consegue oxidar as unidades fenólicas da lignina. Por essa razão, a lacase é muitas vezes utilizada junto com um mediador da oxidação, uma pequena molécula capaz de estender o efeito da lacase até as unidades não fenólicas da lignina e de superar a dificuldade de acessibilidade (Srebotnik e Hammel, 2000; Shleev *et al.*, 2006). De início, o mediador é oxidado pela lacase e, em seguida, difunde-se para o interior da parede celular, oxidando a lignina inacessível para a lacase. O uso desses mediadores nas reações da lacase possibilita o emprego dessa enzima na indústria de produtos florestais, como removedor de resina, contaminantes fenólicos e corantes da madeira e da água; a tecnologia da lacase é aplicável a quase toda a cadeia de produção da indústria do papel, desde a polpação até a recuperação das fibras secundárias e o tratamento dos efluentes (Widsten e Kandelbauer, 2008).



TRENDS in Plant Science

FIGURA 10.7 Pigmentação da casca das sementes de *Arabidopsis*: ilustração do processo de escurecimento. (a) Fotografias que mostram o aspecto da pigmentação marrom no tegumento com genótipo selvagem durante a secagem das sementes. O pigmento marrom está ausente no mutante com tegumento transparente 10 (*tt10*), que é deficiente em lacase. (b) As sementes da planta mutante *tt10* tornam-se lentamente marrons depois da colheita e, com o tempo, assemelham-se às sementes selvagens. Escala da barra = 550 mm. (c) Desenho esquemático que indica o surgimento do pigmento marrom durante o desenvolvimento das sementes de *Arabidopsis*. DAF: dias após a floração Reproduzido de Pourcel *et al.* (2006). © 2006, com permissão da Elsevier.

F. Especificidade da polifenoloxidase

Conforme discutido previamente, a PFO catalisa duas reações diferentes: a hidroxilação dos monofenóis em *o*-di-hidroxfenóis e a oxidação dos *o*-di-hidroxfenóis em *o*-quinonas. A estrutura química mais adequada para a ação da PFO, quando a velocidade da reação é máxima, parece ser a estrutura *o*-di-hidroxi, conforme evidenciado em compostos como o catecol, o ácido cafeico e as catequinas (Rocha e Morais, 2001; Gawlik-Dziki *et al.*, 2007). A oxidação dos *o*-difenois para as *o*-quinonas correspondentes é uma reação geral de todas as PFO conhecidas, independentemente da fonte ser batata, batata-doce (Hyodo e Uritani, 1965), alface (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008), maçã (Harel *et al.*, 1966), tomate (Hobson, 1967), banana (Ünal, 2007), alcachofra (Aydemir, 2004), tabaco (Shi *et al.*, 2002), caju (Queiroz *et al.*, 2011), lichia (Ruenroengklin *et al.*, 2009; Yue-Ming *et al.*, 1997) ou azeitonas verdes (Segovia-Bravo *et al.*, 2009).

Os monofenóis são substâncias com ação mais lenta, já que precisam ser hidroxiladas antes de serem oxidadas para as *o*-quinonas correspondentes. A oxidação dos monofenóis é menos difundida que a dos difenois e é catalisada, por exemplo, por preparações enzimáticas obtidas de batatas e cogumelos. A relação entre a atividade cresolase e a atividade catecolase ainda não é de todo compreendida. Parece que muitas PFOs são altamente específicas, visto que só atacam *o*-difenois. Ao estudar a PFO da alcachofra, Aydemir (2004) constatou que a enzima apresentava alta especificidade para o catecol, seguido pelo 4-metilcatecol e pelo pirogalol. De acordo com

Espín *et al.* (1998), os melhores substratos são aqueles que têm cadeia lateral com substituintes de baixa massa molecular e capacidade elevada de doar elétrons. Erat *et al.* (2006), estudando a atividade da PFO na *Ferula* sp., obtiveram os melhores resultados utilizando catecol e (-)-epicatequina com enzima extraída da folha e do caule, respectivamente. Sellés-Marchart *et al.* (2006), estudando a ação da PFO da nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.), constataram que o ácido clorogênico é o substrato mais eficiente, seguido pelo 4-metilcatecol, 4-*tert*-butilcatecol, epicatequina, catecol e isoproterenol. A PFO da castanha portuguesa catalisa a oxidação do catecol e do ácido pirogálico, mas não tem efeito sobre o cresol ou a tirosina (Xu *et al.*, 2004). Com relação à PFO da maçã *Amasya* (*Mallus sylvestris* Miller cv. *Amasya*), o substrato com atividade mais alta foi o catecol, seguido pelo 4-metilcatecol, pirogalol e 3,4-di-hidroxifenilalanina (l-DOPA) (Oktay *et al.*, 1995). Os outros parâmetros cinéticos analisados pelos pesquisadores estão descritos na Tabela 10.2.

III. POLIFENOLOXIDASE EM ALIMENTOS E NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

A. O papel da polifenoloxidase na fermentação do chá

A produção do chá-preto depende das alterações oxidativas que os polifenóis das folhas de *Camellia sinensis* sofrem durante o processamento. Essas alterações são especialmente importantes para o desenvolvimento da cor e para a redução do gosto amargo associado ao tanino não oxidado (composto polifenólico). Vários tipos de chá, como o chá-branco, o chá-verde, o chá *oolong* e o chá-preto, originam-se da mesma planta, a *C. sinensis*. É o processamento pelo qual passam as folhas do chá que determina seu tipo e sua composição fenólica.

Os principais polifenóis das folhas do chá, determinados pela cromatografia por partição, englobam a (+)-catequina, a (-)-epicatequina, a (+)-galocatequina, a (-)-epigalocatequina, o (-)-galato de epicatequina e o (-)-galato de epigalocatequina. Desses compostos, o (-)-galato de epigalocatequina é o principal componente do broto da planta do chá. Durante o processamento do chá, Muthumani e Kumar (2007) observaram que quantidades consideráveis de galato de epigalocatequina, epigalocatequina e galato de epicatequina foram oxidadas, formando teaflavinas e seus galatos. Não foram observadas mudanças no teor de catequina e de epicatequina, provavelmente por causa da formação de ácido gálico e catequina livres a partir de outras frações da catequina, como o galato de epigalocatequina, a epigalocatequina e o galato de epicatequina, por meio de remoção oxidativa de ácido gálico. Munoz-Munoz *et al.* (2008) publicaram resultados diferentes. Esses autores constataram que os melhores substratos para a PFO das folhas de chá são a epicatequina, seguida da catequina, por causa do acesso mais fácil da enzima aos radicais hidroxila.

TABELA 10.2 Características das polifenoloxidasas de fontes vegetais

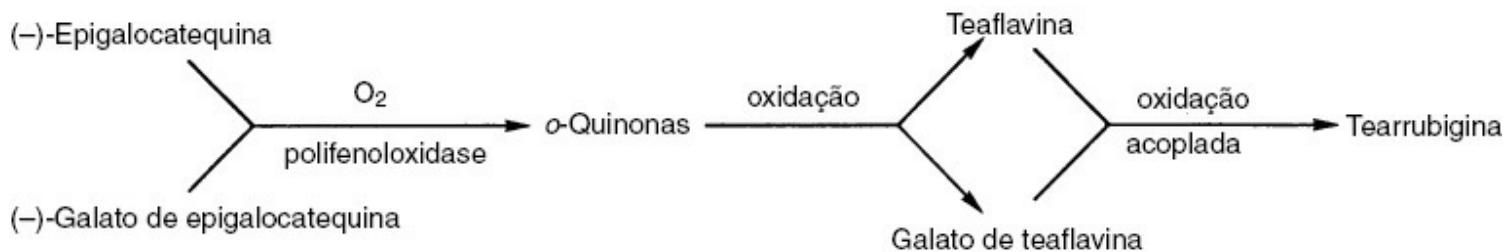
Planta	Substrato	K_m (mM)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo
Maçã ^a	Catecol	34	15	7,0
	4-Metilcatecol	3,1		
Alcachofra ^b	Catecol	10,2	25	6,0
	4-Metilcatecol	12,4		
Banana ^c	Catecol	8,5	30	7,0
Brócolis ^d	Catecol	12,3	–	5,7
	4-Metilcatecol	21,0		
Caju ^e	Catecol	18,8	–	6,5
Uva ^f	Ácido clorogênico	3,2	25	5,0
	Catequina	4,3		

Manga ^g	Catecol	6,3	30	7,0
Melão ^h	DOPAC ⁱ	7,2	60	7,0
Morango ⁱ	Catecol	5,9	25	5,0
Baunilha ^j	Catecol	85,0	37	3,4
	4-Metilcatecol	10,6	37	3,0
Raiz de yacon ^k	Ácido cafeico	0,2	30	6,6
	Ácido clorogênico	1,1		

^aOklay *et al.* (1995); ^bAydemir *et al.* (2004); ^cÜnal (2007); ^dGawlik-Dziki *et al.* (2007); ^eQueiroz *et al.* (2011); ^fRapeanu *et al.* (2006); ^gWang *et al.* (2007); ^hChisari *et al.* (2008); ⁱDalmadi *et al.* (2006); ^jWaliszewski *et al.* (2009); ^kNeves e Silva (2007); ^lácido 3,4-di-hidroxifenilacético; Adaptado de Queiroz *et al.* (2008).

A produção do chá-preto, a forma mais popular da bebida, é realizada em quatro etapas. A primeira é denominada murchamento, quando os brotos da planta do chá são deixados para secar. Em seguida, ocorre o tratamento mecânico em um cilindro, que rompe os tecidos das folhas de chá, danifica as células e fornece as condições necessárias para o desenvolvimento dos processos oxidativos. A etapa seguinte é a fermentação das folhas de chá fragmentadas, que são mantidas em temperatura ambiente e atmosfera úmida, com suprimento contínuo de oxigênio. Essas condições são ótimas para a ação da PFO sobre as catequinas das folhas de chá; além de reduzir a adstringência, a ação altera a cor verde das folhas de chá processadas no cilindro, dando origem a pigmentos vermelho-acobreados e castanhos. A fermentação é concluída com a secagem, na qual o chá é posto para secar em temperaturas de 90°C-95°C e a umidade é reduzida para 3%-4%.

A reação bioquímica crucial do processo de fermentação do chá é a oxidação das catequinas pela PFO nas o-quinonas correspondentes, compostos intermediários que passam por uma oxidação secundária que leva à produção de teaflavina e galato de teaflavina, os pigmentos laranja-amarelados do chá-preto, e de um grupo de compostos conhecidos como tearrubiginas. Essas tearrubiginas são os produtos da oxidação das teaflavinas, têm cor castanho-escuro e formam os principais compostos que contribuem para a cor familiar do chá-preto. O Esquema 10.2 mostra um resumo das reações oxidativas que ocorrem durante a fermentação do chá. Hilton e Ellis (1972) mostraram que o teor de teaflavina do chá está correlacionado com a avaliação dos provadores de chá. E esse resultado é compatível com os resultados obtidos em estudos anteriores, realizados por Roberts (1952) e Sanderson (1964), que observaram uma correlação positiva entre a qualidade do chá e a atividade da PFO. Posteriormente, Hilton (1972) purificou essa enzima. A degradação oxidativa dos anéis de floroglucinol das teaflavinas pela peroxidase levou a uma perda de teaflavinas e a um declínio na qualidade do chá (Cloughley, 1980a; 1980b). Logo, a presença dessas duas enzimas afeta a qualidade do chá. Van Lelyveld e de Rooster (1986) examinaram o potencial de escurecimento de clones e mudas de chá-preto. De acordo com o estudo, o teor de PFO de um clone híbrido de alta qualidade (MT12) é muito mais alto que o teor de PFO no chá de muda de baixa qualidade (Tabela 10.3). Observou-se o inverso com relação à peroxidase, ou seja, a atividade dessa enzima é mais de duas vezes maior no chá de qualidade inferior. Os dados indicam que a combinação de níveis mais altos de teaflavina e atividade de PFO mais elevada é responsável pela qualidade melhor associada ao clone MT12. Subramanian *et al.* (1999) estudaram o papel da PFO e da peroxidase na formação das teaflavinas. Eles demonstraram que a PFO gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante a oxidação das catequinas e que a peroxidase utiliza esse H₂O₂ na subsequente oxidação dos produtos das reações catalisadas pela PFO, diminuindo o teor de teaflavinas. O tempo de fermentação também é importante na formação das teaflavinas e tearrubiginas. Muthumani e Kumar (2007) relataram um tempo ótimo de 45 minutos até as teaflavinas alcançarem seu teor máximo; depois disso, o teor de teaflavinas declinou para 20%, originando um chá de qualidade inferior.



ESQUEMA 10.2 Transformações oxidativas da (-)-epigalocatequina e seu galato durante a fermentação do chá.

TABELA 10.3 Atividade específica ($\Delta DO/\text{min}/\text{mg}$ proteína) de folhas de chá de clones (M12) e mudas

Clone	Peroxidase ^a	Polifenoloxidase ^b
M12	1,821	0,055
Muda	0,735	0,020

^aSignificativa em $p < 0,05$.

^bSignificativa em $p < 0,01$.

Extraído de Van Lelyveld e de Rooster (1986).

O chá-verde é particularmente comum nos países orientais, como o Japão. Trata-se de um chá não fermentado com cor clara e um grau de adstringência característico, por causa do alto teor de catequinas. Isso é conseguido pela aplicação de calor durante as etapas iniciais da fabricação do chá, o que inibe ou impede a oxidação. Os chás vermelho e amarelo são intermediários entre os chás preto e verde e são produtos semifermentados (parcialmente fermentados antes do processo de secagem). Um exemplo de chá-verde é a variedade chinesa *oolong*. As catequinas das folhas do chá geram teaflavinas e tearrubiginas durante o tempo de processamento mais longo. Os chás branco e verde têm teores mais altos de catequina, enquanto os chás *oolong* e preto são ricos em teaflavinas e tearrubiginas (Tabela 10.4).

TABELA 10.4 Composição de flavonoides do chá (porcentagem por massa seca)

Componente	Chá-verde	Chá-preto
Flavonoides totais	15-25	15-25
Catequinas totais	12-18	2-3
(-)-Epicatequina	1-3	< 1
(-)-Galato de epicatequina	3-6	< 1
(-)-Epigalocatequina	3-6	< 1
(-)-Galato de epigalocatequina	9-13	1-2
Flavonóis	2-3	1-2
Teaflavinas	< 1	4
Outros polifenóis	2-4	7-15

Reproduzido de Hodgson e Croft (2010). © 2010, com permissão da Elsevier.

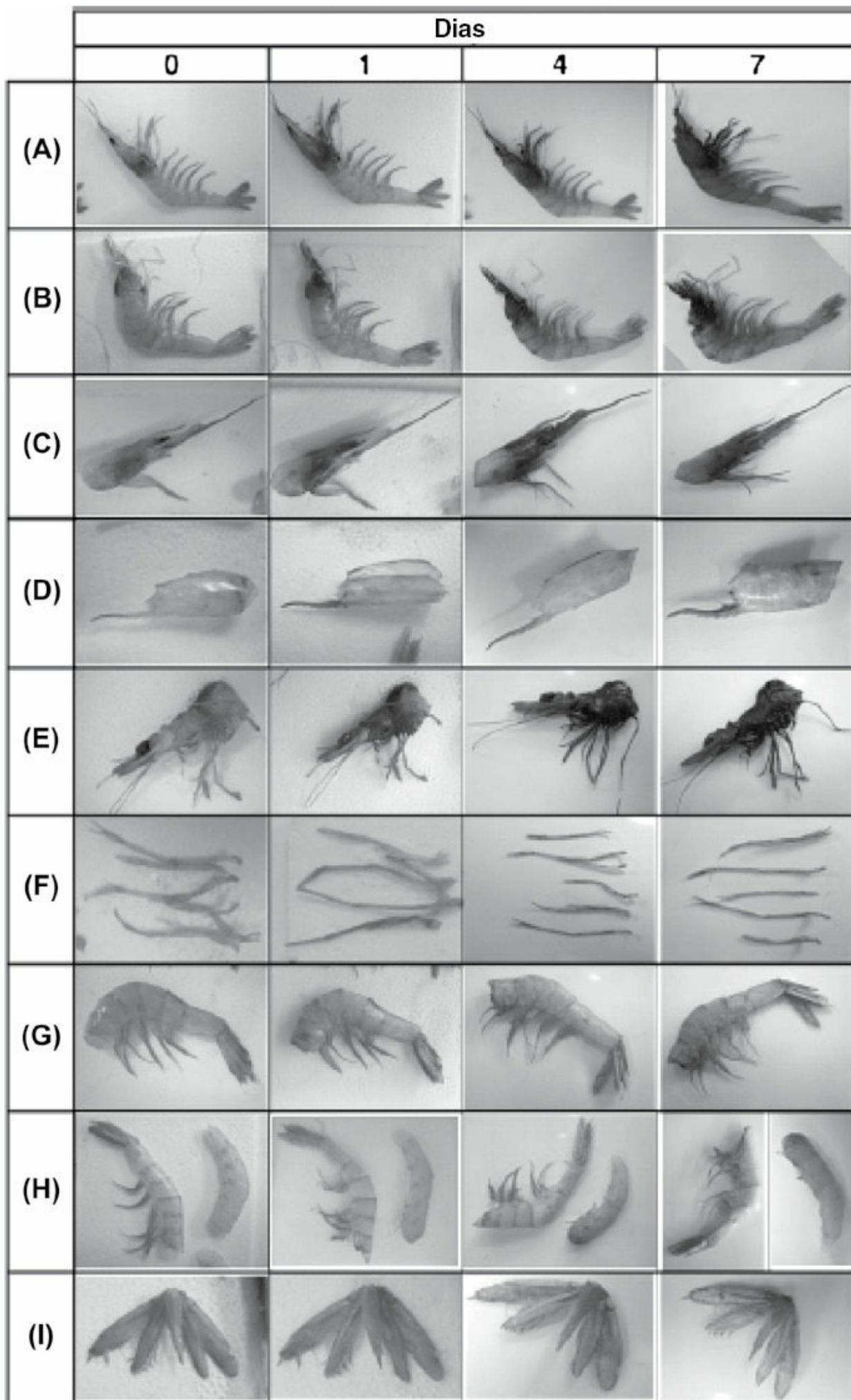


FIGURA 10.8 Aspecto da melanose em diferentes partes anatômicas do camarão-rosa de águas profundas durante 0, 1, 4 e 7 dias de armazenamento a 4°C. (A) Camarão inteiro; (B) Camarão inteiro com a carapaça removida; (C) Cabeça (carapaça + cefalotórax + pereiópodes e maxilípedes); (D) Carapaça; (E) Cabeça com a carapaça removida; (F) Pereiópodes + maxilípedes; (G) Abdome inteiro (que inclui o exoesqueleto, músculo, pleiópodes e télson); (H) Abdome com o músculo removido (esquerda) e o músculo correspondente (direita); e (I) Télson. Reproduzido de Zamorano *et al.* (2009). © 2009, com permissão da Elsevier.

B. Camarões e outros crustáceos

O escurecimento enzimático, que tem sido estudado extensamente em frutas e vegetais, também foi implicado na alteração da cor de camarões, e outros crustáceos, denominada melanose ou manchas pretas (Zamorano *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010): as manchas tornam esses produtos pouco atrativos para o consumidor e reduzem seu valor comercial. Nos crustáceos, a PFO está localizada principalmente na cutícula; para ser mais específico, na superfície interna, no interior de cromatóforos. Durante a estocagem dos crustáceos em gelo, a PFO inativa armazenada nos hemócitos e nas glândulas digestivas também pode ser ativada pela ação de enzimas proteolíticas que vazam do trato digestivo. Além disso, a hidrólise proteica realizada por essas proteases fornece substratos para a PFO ativa (Ali *et al.*, 1994).

Em um estudo recente, Zamorano *et al.* (2009) avaliaram a atividade da PFO *in situ* e em extratos parcialmente purificados de diferentes órgãos do camarão-rosa de águas profundas *Parapenaeus longirostris*. Eles verificaram uma atividade enzimática mais alta nos extratos de carapaça, havendo o surgimento de melanose acentuada na cabeça e no cefalotórax após 1 dia sob 4°C (Figura 10.8). Mesmo após 7 dias sob 4°C, não surgiu melanose na carapaça, confirmando assim que o aparecimento da melanose em diferentes tecidos depende de outro fator, além dos níveis da PFO. Em condição nativa não desnaturante, foi identificada uma banda de 500 kDa capaz de oxidar a di-hidroxifenilalanina. A Tabela 10.5 mostra algumas características bioquímicas da PFO extraída de fontes marinhas.

Inibidores da melanose são utilizados em alimentos de origem marinha para impedir o escurecimento e prolongar a vida de prateleira dos produtos. Os métodos tradicionais incluem o uso de formulações à base de sulfito, mas este provoca reações adversas. Por tal razão, outros compostos, inclusive aqueles de origem natural, são estudados como alternativas aos compostos com enxofre. Martínez-Alvarez *et al.* (2007) pulverizaram formulações à base de 4-hexilresorcinol sobre lagostas-da-noruega. Depois de 12 dias de armazenamento, eles observaram uma atividade menor da PFO e da melanose e uma melhora na aparência das lagostas. A cisteína e a glutatona inibiram a oxidação da l-DOPA catalisada pela PFO do camarão *kuruma* (*Penaeus japonicus*) (Benjakul *et al.*, 2006). Entre as substâncias naturais, estudos recentes demonstraram o uso potencial de compostos fenólicos que inibem o escurecimento. Camarões tratados com ácido ferúlico a 2% após 10 dias de armazenamento apresentaram uma pontuação de melanose mais baixa e pontuações mais altas para cor, sabor e aceitação global, quando comparados com os camarões do grupo de controle e com os camarões tratados com metabissulfito de sódio (Nirmal e Benjakul, 2009). O tratamento que combina catequina e ácido ferúlico antes do congelamento-descongelamento foi eficaz em retardar a melanose no camarão-branco do Pacífico. Os fenóis também agiram diminuindo o crescimento das bactérias psicrófilas e retardaram a oxidação lipídica durante o subsequente armazenamento refrigerado (Nirmal e Benjakul, 2010).

Uma nova tecnologia de alta pressão hidrostática, estudada por Montero *et al.* (2001), resultou em inativação parcial da PFO do camarão-grande após tratamento de 300-400 MPa por 10 minutos. O mecanismo da inativação da enzima pela alta pressão é discutido na seção IV, D.

IV. CONTROLE OU INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

É necessário inativar a PFO a fim de minimizar as perdas de produtos causadas pelo escurecimento. Vários métodos e tecnologias já foram estudados. O tratamento com calor e a adição de agentes antiescurecimento são utilizados com frequência, mas vários pesquisadores já propuseram o uso de outros métodos como alternativas ao processamento térmico para a inativação da PFO (Queiroz *et al.*, 2008).

Os inibidores da atividade da PFO podem agir interferindo no modo de ação dessa enzima; por exemplo, excluindo reagentes como o oxigênio, desnaturando a estrutura proteica da enzima, interagindo com o grupo prostético (cobre) ou interagindo com substratos fenólicos ou quinonas.

A. Exclusão do oxigênio

O método mais simples de controle do escurecimento enzimático consiste na imersão em água do produto descascado, como as batatas, antes do cozimento. É uma técnica que pode ser feita facilmente em casa para limitar o acesso do oxigênio ao tecido cortado da batata. Esse procedimento foi utilizado por muito tempo, em grande escala, na produção de batatas fritas do tipo *chips* e *french fries* (Talburt e Smith, 1967). O método é limitado, visto que as frutas e os legumes escurecem quando reexpostos ao ar ou por causa do oxigênio produzido naturalmente pelos tecidos vegetais. A remoção do oxigênio dos tecidos das frutas e legumes pode levar à anaerobiose, se eles forem armazenados por períodos prolongados, o que, por sua vez, pode levar à formação de metabólitos anormais e à decomposição dos tecidos. No caso dos pêssegos fatiados congelados, as superfícies são tratadas com ácido ascórbico em excesso, para consumir todo o oxigênio da superfície.

TABELA 10.5 Características das polifenoloxidasas de fontes marinhas

Crustáceos	Substrato	K _m	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo
Camarão-rosa de águas profundas ^a	DOPA	1,85	15-60	4,5
Camarão ^b	DOPA	–	40-60	5,0 e 8,0
Lagosta-da-noruega ^c (carapaça)	Catecol	19,40	60	7,0
Lagosta-da-noruega ^c (vísceras)	Catecol	5,90	60	8,0

DOPA: 3,4-di-hidroxi-fenilalanina.

^aZamorano *et al.* (2009).

^bMontero *et al.* (2001).

^cGiménez *et al.* (2010).

Mais recentemente, atmosferas modificadas também têm sido utilizadas para impedir o escurecimento enzimático. Como o escurecimento é uma reação de oxidação, ele pode ser retardado eliminando-se o oxigênio da superfície de corte dos legumes (Limbo e Piergiovanni, 2006). O acondicionamento com atmosfera modificada tem o poder de prolongar a vida de prateleira de frutas e legumes, principalmente por limitar os processos oxidativos. As atmosferas com baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono conseguem reduzir o escurecimento das superfícies. Essa redução do fenômeno do escurecimento é acompanhada de vários efeitos fisiológicos, como a diminuição da taxa respiratória e o retardamento do início do aumento climatérico e do etileno (Solomos, 1997). Day (1996) levantou a hipótese de que as altas concentrações de oxigênio podem causar a inibição da PFO pelo substrato, ou de que os altos teores de quinonas incolores formadas podem causar a inibição da enzima, por retroalimentação. Gorny *et al.* (2002) constataram que atmosferas modificadas com baixo teor de oxigênio (0,25 ou 0,5 kPa), alto teor de dióxido de carbono (ar enriquecido com 5, 10 ou 20 kPa de CO₂) ou alto teor de oxigênio (40, 60 ou 80 kPa), sozinhas, não previnem de modo eficaz o escurecimento das superfícies de fatias recém-cortadas de peras. Os estudos da influência da embalagem com atmosfera modificada e do uso de compostos antioxidantes sobre a vida de prateleira de peras recém-cortadas enfocaram, em especial, as qualidades sensoriais dos produtos (Sapers e Miller, 1998; Gorny *et al.*, 2002; Soliva-Fortuny *et al.*, 2002; 2004). De acordo

com Oms-Oliu *et al.* (2008), a compreensão do impacto dos tratamentos de imersão e das condições de embalagem sobre as propriedades antioxidantes das peras recém-cortadas é apenas parcial, principalmente da embalagem ativa com altos níveis de oxigênio. Y. Kim *et al.* (2007) analisaram os efeitos do tratamento com água quente, combinado com o armazenamento em atmosfera controlada (AC) e as alterações resultantes na qualidade e nos polifenóis antioxidantes da manga. Eles observaram que a qualidade externa da manga durante o amadurecimento foi melhorada em condições de estocagem de baixos teores de oxigênio e/ou em altos teores de dióxido de carbono e tratamentos de imersão em água quente. O armazenamento com dióxido de carbono retardou o amadurecimento das frutas, conforme evidenciado pelas alterações físico-químicas, e o tratamento com água quente somado ao armazenamento em AC foi uma combinação eficaz para prolongar a vida pós-colheita das mangas, sem alterar negativamente o perfil nutricional das frutas.

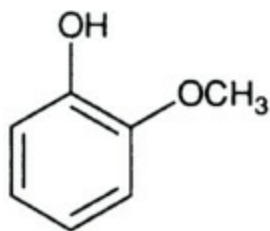
Limbo e Piergiovanni (2006) estudaram os efeitos de pressões parciais elevadas de oxigênio, combinadas com os ácidos ascórbico e cítrico, sobre o desenvolvimento do escurecimento enzimático em batatas (da variedade “Primura”) descascadas e cortadas, acondicionadas em embalagens flexíveis e armazenadas a 5°C por 10 dias. Eles observaram que os tratamentos com pressões parciais elevadas de oxigênio tinham alguns efeitos positivos sobre o escurecimento enzimático, apenas quando a atmosfera inicial estava perto de 100 kPa e as concentrações do ácido para imersão eram escolhidas com cuidado. Wszelaki e Mitcham (2000) mostraram que pode ser difícil manter atmosferas com quase 100 kPa de oxigênio no interior de uma embalagem ou utilizar essa pressão em grande escala, além do perigo representado pela inflamabilidade. Um estudo realizado por Saxena *et al.* (2008) mostrou que o efeito sinérgico de compostos antiescurecimento e antimicrobianos e atmosferas com baixos teores de oxigênio e altos teores de dióxido de carbono pode aumentar a conservação dos bulbos de jaca recém-cortados ao minimizar as alterações deteriorantes nas características fisiológicas, sensoriais e microbianas. Martínez-Sánchez *et al.* (2011), estudando a influência das pressões parciais do oxigênio (pO_2) e da exposição à luz durante o armazenamento sobre a vida de prateleira da alface-romana recém-cortada, notaram que o consumo de oxigênio nas amostras expostas à luz por 24 horas diferiu de modo significativo daquelas armazenadas em um fotoperíodo de 12 horas na luz/12 horas no escuro ou no escuro por 24 horas ($10,6 \pm 7,0$, $18,3 \pm 3,5$ e $25,8 \pm 8,6$ nmol de O_2 /kg/segundo, respectivamente). As embalagens expostas à luz apresentaram pO_2 mais alta que as embalagens armazenadas no escuro, enquanto aquelas expostas ao fotoperíodo apresentaram valores intermediários. Esse estudo mostrou que, quando os vegetais são expostos à luz, a atividade respiratória é compensada pela fotossíntese, resultando em uma pO_2 mais alta. Assim, o escurecimento da alface-romana recém-cortada pode ser estimulado pela exposição à luz durante o armazenamento, já que a luz aumenta a pO_2 no espaço livre do interior das embalagens. De fato, condições de iluminação não controladas durante o armazenamento e a distribuição comercial podem contribuir para a indução do processo de escurecimento, que pode tornar o produto não comercializável.

B. Inibidores químicos da polifenoloxidase

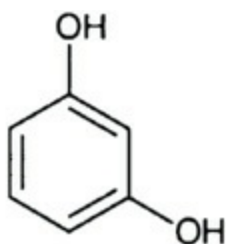
Diferentes compostos são capazes de controlar o escurecimento enzimático e, com base no mecanismo da inibição, esses compostos são classificados em agentes redutores, agentes quelantes, acidulantes, inibidores enzimáticos, tratamentos enzimáticos e agentes formadores de complexos (Özoğlu e Bayındırlı, 2002).

Vários compostos têm uma estrutura química intimamente relacionada com os *o*-difenóis, porém não atuam como substratos da PFO. Estes incluem os derivados com substituinte metila, como o guaiacol e o ácido ferúlico (Finkle e Nelson, 1963; Nirmal e Benjakul, 2009), e os *m*-difenóis, como o resorcinol e o floroglucinol, que têm um efeito inibitório sobre a atividade da PFO, seja por competição (Montero *et al.*, 2001; Waliszewski *et al.*, 2009), seja por um mecanismo de inibição do tipo ligação lenta (Jiménez e García-Carmona, 1997), dependendo

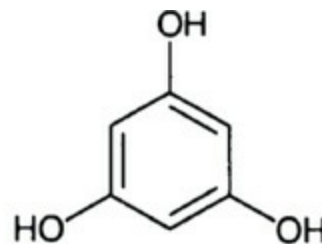
do substrato.



Guaiacol



Resorcinol



Floroglucinol

Visto que a PFO é uma metaloproteína que tem cobre como grupo prostético, ela pode ser inibida por diversos agentes quelantes, entre eles o dietilditiocarbamato de sódio (DIECA), a azida de sódio, o etilxantato de potássio e o etilenodiaminotetraacetato (EDTA). Apesar de inibirem a PFO, a azida de sódio e o EDTA parecem ser quelantes menos específicos que o DIECA e o etilxantato de potássio (Kavrayan e Aydemir, 2001; Aydemir, 2004; Gawlik-Dziki *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009). Anderson (1968) relatou que, além de quelar o cobre, estes últimos compostos combinam-se com as quinonas produzidas pela PFO.

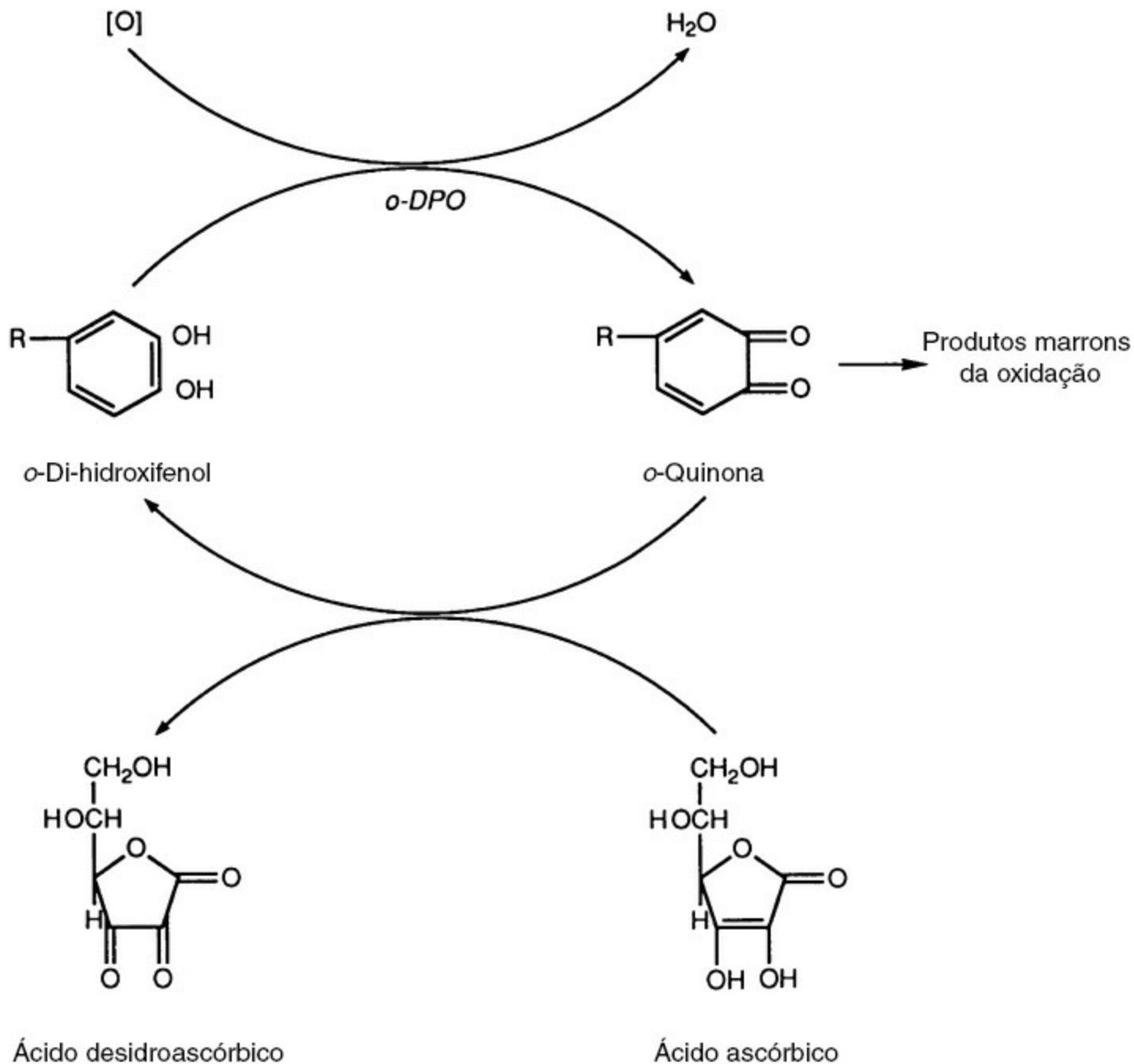
Os sulfitos são inibidores fortes e foram utilizados, durante muito tempo, na indústria alimentícia. No entanto, o uso excessivo de formulações à base de sulfito pode causar reações adversas, principalmente nos indivíduos asmáticos. Desde que foi divulgado, no 51º encontro do Joint Expert Committee on Food Additives, que a ingestão de sulfitos poderia estar acima dos limites de segurança, não se recomenda o uso dessas substâncias como aditivos alimentares. Pesquisadores têm realizado estudos para encontrar agentes antiescurecimento potentes que não causem dano ao organismo. Foi constatado que a L-cisteína é um inibidor eficaz da PFO, por agir como agente acoplador de quinonas e também como agente redutor. Ela reage com os intermediários das *o*-quinonas, dando origem a produtos estáveis e incolores (İyidoğan e Bayındırlı, 2004). Desde que Kahn (1985) relatou que a L-cisteína é o inibidor mais eficaz da PFO do abacate, da banana e do cogumelo, muitos estudos mostraram seu efeito sobre a atividade da PFO na alcachofra, no suco de maçã, no purê de manga, na uva e na alface (İyidoğan e Bayındırlı, 2004; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005; Rapeanu *et al.*, 2006; Altunkaya e Gökmen, 2009). No entanto, concentrações eficazes de cisteína produzem um odor indesejado, que limita seu uso no processamento de alimentos. Altunkaya e Gökmen (2009), tentando selecionar o composto antiescurecimento mais eficaz para a alface fresca, analisaram a eficácia do ácido ascórbico, da cisteína, do ácido cítrico e do ácido oxálico. Eles constataram que a alface tratada com ácido oxálico e ácido ascórbico manteve um teor mais alto de compostos fenólicos que aquela tratada com ácido cítrico e cisteína. Curiosamente, a cisteína não teve nenhum efeito positivo sobre o bloqueio da oxidação dos compostos fenólicos, embora tenha impedido o escurecimento da alface.

A aplicação de ácidos para controlar o escurecimento enzimático é muito utilizada. Os ácidos empregados são aqueles encontrados naturalmente nos tecidos vegetais, como os ácidos cítrico, málico, fosfórico e ascórbico. Esse método se baseia no fato de que a diminuição de pH do tecido vegetal reduz ou retarda o desenvolvimento do escurecimento enzimático. O pH ótimo para a maioria das PFOs está entre pH 4,0 e 7,0, ocorrendo pouca atividade abaixo de pH 3,0, conforme ilustrado na Tabela 10.2. Muneta (1977) analisou o efeito do pH na formação das melaninas durante o escurecimento enzimático. Embora, como discutido previamente, a reação inicial que envolve a formação de quinonas seja catalisada por enzimas, a polimerização dessas quinonas para a formação de melaninas marrons ou preto-amarronzadas é, basicamente, não enzimática. Uma vez que ambas dependem do pH, Muneta (1977) estudou o efeito do pH sobre as reações não enzimáticas que levam à formação das melaninas nas batatas. A formação de dopacromo, a partir da dopaquinona, foi monitorada em soluções com tampão fosfato pH 5,0, 6,0 e 7,0. No pH 7,0, a melanina surgiu de modo rápido, enquanto no pH 5,0, o processo foi um pouco lento. Essa observação poderá ser importante para o processador, principalmente se as batatas descascadas forem lavadas de modo inadequado, resultando em uma superfície com pH alto, que facilita o

escurecimento enzimático e a formação de melanina.

O ácido cítrico tem sido utilizado, em combinação com o ácido ascórbico ou o sulfito de sódio, como inibidor do escurecimento enzimático (Limbo e Piergiovanni, 2006; Ducamp-Collin *et al.*, 2008; Hiranvarachat *et al.*, 2011; Queiroz *et al.*, 2011). As frutas e os vegetais cortados costumam ser imersos em soluções diluídas desses ácidos um pouco antes do processamento. Essa técnica tem particular importância nos casos de frutas com polpa aderida ao caroço, descascadas com hidróxido de sódio, pois a imersão em ácido neutraliza o efeito que o hidróxido de sódio residual poderia ter sobre o escurecimento enzimático. O ácido cítrico também inibe a PFO ao quelar o cobre da enzima. No entanto, comparado ao ácido cítrico, o ácido málico – principal ácido do suco da maçã – é um inibidor muito mais eficaz do escurecimento enzimático.

O ácido ascórbico é um inibidor particularmente eficaz da PFO (Özoğlu e Bayındırlı, 2002). Na concentração utilizada para inibir essa enzima, o ácido ascórbico não tem sabor detectável, nem ação corrosiva sobre os metais. Essa vitamina age como antioxidante, porque reduz a quinona produzida antes que ela seja submetida às reações secundárias que levam ao escurecimento e também diminui o pH associado à atividade enzimática (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005). O modo de ação do ácido ascórbico está resumido no Esquema 10.3 (Walker, 1976). O ácido ascórbico consegue inibir a enzima ao diminuir o pH e agir como antioxidante. Assim, ele reduz as quinonas em difenóis, revertendo a reação e diminuindo os pigmentos marrons. Degl' Innocenti *et al.* (2007) analisaram a alface, a escarola, a rúcula e a sensibilidade desses vegetais ao escurecimento enzimático. Eles observaram que a resistência da rúcula ao escurecimento estava associada ao teor mais alto de ácido ascórbico, quando comparado ao teor presente nas outras espécies. Em um estudo, Hsu *et al.* (1988) compararam a eficácia de vários derivados do ácido ascórbico, entre eles o ácido desidroascórbico, o ácido isoascórbico, o ácido ascórbico 2-fosfato e o ácido ascórbico 2-sulfato, com a eficácia do ácido ascórbico. Baseados em estudos cinéticos, eles constataram que o ácido ascórbico e o ácido isoascórbico são os inibidores mais eficazes da PFO de cogumelos, seguidos pelo ácido desidroascórbico. De acordo com Özoğlu e Bayındırlı (2002), o ácido ascórbico mostrou ser mais eficaz que seu isômero, o ácido isoascórbico. O efeito do ácido ascórbico pode ser considerado temporário, porque é oxidado de forma irreversível pela reação com intermediários, como pigmentos, enzimas endógenas e metais como o cobre. No suco de maçã, observou-se efeito inibitório do ácido ascórbico na concentração de 1,8 mM durante 4 horas.



ESQUEMA 10.3 Redução dos produtos da oxidação primária da quinona (escurecimento enzimático) pelo ácido ascórbico. Walker (1976).

É preciso adicionar uma quantidade adequada de ácido ascórbico à matéria-prima alimentar para retardar o escurecimento enzimático. Nos sucos de frutas tratados com ácido ascórbico, a auto-oxidação do ácido ascórbico, ou a atividade natural da ácido ascórbico oxidase, consome todo o oxigênio dissolvido no suco. Assim, o oxigênio torna-se o fator limitante que determina a velocidade do escurecimento enzimático. Hope (1961) mostrou que a adição de ácido ascórbico na concentração de 300 mg por libra (= 0,454 kg) de fruta controla o escurecimento, além de reduzir o oxigênio do espaço livre do interior das latas com metades de maçãs em calda. Esse método se mostrou particularmente eficaz no controle do escurecimento enzimático, apesar da espessura do tecido da maçã e de seu teor de oxigênio comparativamente elevado.

Muneta (1977) sugeriu o uso do pirofosfato ácido de sódio como um inibidor alternativo do escurecimento enzimático. Esse composto apresenta várias vantagens sobre os ácidos orgânicos: é muito menos azedo que o ácido cítrico e minimiza o escurecimento pós-cozimento das batatas, causado pela formação de complexos com o ferro. A quelação do ferro também tem a vantagem de limitar o papel desse metal na catálise do processo de

rancidez das batatas fritas ou desidratadas.

O ácido kójico é encontrado em muitos alimentos japoneses fermentados. Embora esteja presente em certos alimentos como um produto natural da fermentação, o uso do ácido kójico na indústria alimentícia poderá ser restringido pelas dificuldades da produção em grande escala e pelo seu alto custo. İyidoğan e Bayındırlı (2004) mostraram que o ácido kójico, em concentrações que variam de 1 a 4 mM, tem um efeito antiescurecimento significativo. Esse agente inibiu a PFO e clareou a melanina, por meio da redução química do pigmento marrom em compostos incolores.

Os ácidos carboxílicos aromáticos benzoico e cinâmico são inibidores da PFO, em razão de sua similaridade estrutural com os substratos fenólicos. As formas não dissociadas desses ácidos são capazes de inibir a PFO, por meio da formação de complexos com o cobre do sítio ativo da enzima (Marshall *et al.*, 2000). Rapeanu *et al.* (2006) relataram uma fraca inibição na concentração de 0,5 mM (23%) quando o ácido benzoico foi testado com toranja (*grapefruit*).

As ciclodextrinas são uma família de oligossacarídeos cíclicos, compostos de subunidades de glicopirranose, unidas por ligações do tipo α -1,4. As ciclodextrinas são produzidas pela degradação enzimática do amido. Esses carboidratos macrocíclicos, com cavidades internas apolares, são capazes de formar complexos com compostos normalmente insolúveis em água e solubilizar muitos desses compostos (Singh *et al.*, 2002). As b-ciclodextrinas ligam-se ao núcleo hidrofóbico do substrato. A propriedade funcional mais importante das ciclodextrinas é sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas orgânicas, inclusive com substratos da PFO (Irwin *et al.*, 1994). Por serem capazes de formar complexos de inclusão, as propriedades dos materiais com os quais elas os constituem podem ser modificadas de maneira significativa. Como resultado da formação de complexos moleculares, as ciclodextrinas são amplamente utilizadas em muitos produtos industriais, tecnologias e métodos analíticos (Martin Del Valle, 2004). Özoğlu e Bayındırlı (2002), utilizando concentrações que variaram de 0,3 a 1,8 mM, constataram que a b-ciclodextrina não apresentou nenhum efeito, indicando assim que era necessária uma quantidade maior do composto para haver inibição. Além disso, a atividade da PFO no suco de maçã foi afetada de acordo com o tipo de ciclodextrina (López-Nicolás *et al.*, 2007). Para obter uma inibição eficaz da PFO, as indústrias alimentícias deverão observar os principais compostos fenólicos presentes no produto e o tipo de b-ciclodextrina utilizado.

O cloreto de sódio é um agente oxidante forte, capaz de gerar dióxido de cloro sob condições ácidas. Abaixo de valores de pH em torno de 5, observa-se um efeito inibitório fortemente dependente do pH e o grau da inibição aumenta com a acidez do meio no qual a reação ocorre. Por outro lado, observa-se um efeito de ativação quando os valores do pH são mais altos (Valero e García-Carmona, 1998; M. H. Fan *et al.*, 2005). Severini *et al.* (2003) analisaram o efeito do cloreto de sódio na prevenção do escurecimento enzimático de batatas fatiadas e observaram que todos os tratamentos de clareamento considerados possibilitaram a inativação da PFO. Com relação à cor, o uso de cloreto de cálcio, em baixas concentrações, pareceu ser melhor que o uso do cloreto de sódio.

Essas diferenças nos mecanismos permitem o uso de combinações de agentes antiescurecimento que poderão intensificar a inibição. A combinação de ácido ascórbico, cisteína e ácido cinâmico mostraram um efeito sinérgico no suco de maçã turvo, quando comparada ao emprego isolado de cada composto (Özoğlu e Bayındırlı, 2002). İyidoğan e Bayındırlı (2004) obtiveram 89% de inibição enzimática no suco de maçã Amasya tratado com 3,96 mM de L-cisteína, 2,78 mM de ácido kójico e 2,34 mM de 4-hexilresorcinol (4-HR). Eles observaram também no suco de maçã um efeito sinérgico entre a b-ciclodextrina e o 4-HR que não foi detectado na combinação da b-ciclodextrina com o jasmonato de metila. Na primeira combinação, a b-ciclodextrina reduziu a concentração do substrato livre que poderia ser oxidado, enquanto o 4-HR interagiu diretamente com a enzima, por meio de um mecanismo competitivo. Na segunda combinação, a b-ciclodextrina formou um complexo com o substrato e o jasmonato de metila, aumentando a quantidade de substrato livre e diminuindo a concentração de jasmonato de

metila que poderia inibir a atividade da PFO (Alvarez-Parrilha *et al.*, 2007). A inibição pelo jasmonato de metila observada nesse estudo poderia ser uma exceção, já que alguns autores descreveram a ativação da PFO por esse composto (Koussevitzky *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2006).

Alguns agentes naturais têm um efeito antiescurecimento. O mel contém vários componentes que agem como conservantes, como o α -tocoferol, o ácido ascórbico, flavonoides e outros compostos fenólicos. Mel proveniente de diferentes fontes florais reduziu em 2%-45% a atividade da PFO em homogêneos de frutas e vegetais. Quando combinado com o ácido ascórbico, esse efeito inibitório é intensificado (Chen *et al.*, 2000). Também foi mostrado que as procianidinas nativas, polímeros do flavanol de ocorrência natural nos vegetais, inibem a atividade da PFO nos sucos de maçãs do tipo cidra e que a intensidade da inibição aumenta com o grau de polimerização das procianidinas. É provável que o mecanismo resulte da ligação do polifenol à proteína, o que afeta a atividade catalítica da enzima, ou da formação de um complexo enzima inativa-polifenol-substrato (Le Bourvellec *et al.*, 2004). Lee e Park (2005) testaram a ação de produtos da reação de Maillard, sintetizados a partir de soluções de aminoácidos e açúcares, sobre a atividade da PFO de batatas e observaram um efeito inibitório que dependia do aminoácido (arginina > cisteína > histidina > lisina) e do tipo de açúcar utilizado (monossacarídeos > dissacarídeos).

Proteínas, peptídeos e aminoácidos são capazes de afetar as atividades da PFO ao reagir com as *o*-quinonas e ao quelar o cobre do sítio ativo da PFO. Girelli *et al.* (2004) mediram a atividade da PFO na presença de vários glicildipeptídeos e constataram que esses compostos eram capazes de afetar as atividades da PFO ao reagir com *o*-quinonas e ao quelar o cobre do sítio ativo da PFO. O ácido glicilaspártico, a glicilfenilalanina, a glicilglicina, a glicil-lisina, a gliciltirosina e a glicil-histidina afetaram a formação da quinona em todas as concentrações utilizadas, as quais variaram de 1 a 50 mM. Em um estudo, Shi *et al.* (2005) demonstraram os diferentes tipos de inibição que ocorrem entre o ácido cinâmico e seus derivados. A potência e os tipos de inibição observados são: ácido cinâmico (não competitiva) > ácido 4-hidroxicinâmico (competitiva) > ácido 4-metoxicinâmico (não competitiva). Não se observou nenhum efeito inibitório do ácido 2-hidroxicinâmico sobre a atividade da PFO. De acordo com os autores, esses inibidores estavam ligados a uma região diferente do sítio ativo e obstruíam a ligação do substrato à enzima, por meio de impedimento estérico ou de alteração na conformação da proteína. Chen *et al.* (2005) demonstraram que a PFO era inibida por vários ácidos *p*-alcoxibenzóicos e que o ácido *p*-metoxibenzóico era o inibidor mais potente. Song *et al.* (2006) estudaram os efeitos inibidores dos isômeros *cis* e *trans* do 3,5-di-hidroxiestilbeno. Embora ambos os compostos tenham inibido a atividade da PFO, a forma *cis* apresentou uma capacidade inibitória maior, porque ela é capaz de se ligar com mais força ao sítio ativo da enzima do que seu isômero.

Oms-Oliu *et al.* (2010) analisaram alguns avanços recentes na manutenção da qualidade de frutas recém-cortadas, relacionados com o uso de compostos químicos, incluindo antimicrobianos e antioxidantes naturais vegetais, assim como sais de cálcio na manutenção da textura. Eles enfocaram o uso de conservantes naturais, que estão despertando um interesse crescente por causa da toxicidade e da alergenicidade de alguns conservantes alimentares tradicionais, e as dificuldades da aplicação dessas substâncias nas frutas recém-cortadas sem que se afete negativamente as características sensoriais do produto. Os revestimentos comestíveis são apresentados como uma maneira excelente de carrear aditivos, já que, como foi demonstrado, mantêm elevada a concentração dos conservantes na superfície do alimento, reduzindo o impacto dessas substâncias químicas sobre a aceitabilidade geral das frutas recém-cortadas pelo consumidor.

C. Processamento térmico

O tratamento pelo calor é o método mais utilizado para estabilizar os alimentos, em razão da capacidade de destruir micro-organismos e de inativar enzimas. O branqueamento é o método mais comum utilizado para

inativar enzimas vegetais (Marshall *et al.*, 2000). Ele causa a desnaturação e, portanto, a inativação das enzimas, mas provoca a destruição dos nutrientes termossensíveis e raramente é empregado no tratamento de frutas macias (Lado e Yousef, 2002), porque resulta em perda de vitaminas, sabor, cor, textura, carboidratos e de outros componentes solúveis em água.

A inativação da PFO e de outras enzimas associadas à decomposição pode ser obtida submetendo o alimento a altas temperaturas, por um período adequado, para desnaturar a proteína. Em geral, a exposição da PFO a temperaturas de 70°C-90°C destrói sua atividade catalítica, mas o tempo necessário para a inativação depende do produto (Chutintrasri e Noomhorm, 2006). Fortea *et al.* (2009), estudando a inativação térmica da PFO e da peroxidase da uva, observaram que elas apresentam uma termoestabilidade semelhante, perdendo mais de 90% da atividade relativa depois de apenas 5 minutos de incubação a 78°C e 75°C, respectivamente. Khandelwal *et al.* (2010) calcularam as concentrações de polifenol em diferentes cultivares de quatro leguminosas consumidas habitualmente na Índia e analisaram os efeitos do processamento doméstico. Eles demonstraram que o processamento reduziu a concentração dos compostos fenólicos em 19%-59%. Chutintrasri e Noomhorm (2006), estudando a inativação térmica da PFO de abacaxi, observaram que a atividade enzimática diminuiu em aproximadamente 60%, após a exposição a 40°C-60°C por 30 minutos. A desnaturação aumentou rapidamente acima de 75°C. Assim, a atividade residual foi de cerca de 7%, após 5 minutos a 85°C, e de 1,2%, após 5 minutos a 90°C. Em outro estudo, para determinar o efeito das condições do aquecimento sobre o escurecimento enzimático, Krapfenbauer *et al.* (2006) analisaram sucos de maçã aquecidos obtidos de oito variedades diferentes de maçãs e submetidos a combinações de alta temperatura (60°C-90°C) por tempo curto (20-100 segundos) (HTST, *high temperature and short time*). Os resultados mostraram que o tratamento HTST a 80°C conseguiu inativar a PFO, enquanto a atividade da pectinesterase foi reduzida à metade e não pode ser totalmente inativada, até a 90°C. A atividade residual mais elevada da pectinesterase foi observada a 60°C. A atividade dessa enzima permaneceu estável a 70°C, e inclusive um pouco mais acima, durante períodos de aquecimento de 50 e 100 segundos. Rapeanu *et al.* (2006) relataram a inativação total da PFO da uva Victoria, após 10 minutos a 70°C (Figura 10.9). A atividade da PFO das castanhas *Castanea henryi*, após incubação a 70°C durante 30 minutos, foi de 8% (Xu *et al.*, 2004).

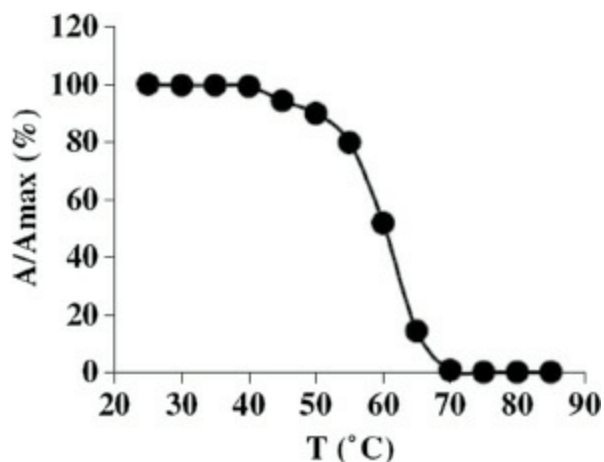


FIGURA 10.9 Estabilidade térmica do extrato de polifenoloxidase da uva Victoria. A atividade residual foi medida após um tratamento de 10 minutos em diferentes temperaturas. Reproduzido de Rapeanu *et al.* (2006). © 2006, com permissão da Elsevier.

A inativação das enzimas dos alimentos pelo calor não depende apenas do tempo, mas também do pH. A Tabela 10.2 mostra que a temperatura ótima para a ação da PFO varia de maneira considerável com as diferentes fontes vegetais, com os cultivares e com o substrato utilizado no ensaio.

D. Processamento com alta pressão

O tratamento de frutas e legumes com alta pressão hidrostática (APH) é uma alternativa natural e menos prejudicial ao ambiente para a pasteurização e oferece a possibilidade de se produzir alimentos com alta qualidade e segurança e vida de prateleira aumentada (Welti-Chanes *et al.*, 2005). A APH reduz a contagem microbiana e inativa enzimas (Bayındırlı *et al.*, 2006). Espera-se que o tratamento com APH seja menos danoso aos compostos alimentares com baixa massa molecular – como os aromatizantes, os pigmentos e as vitaminas – que os processos térmicos, já que as ligações covalentes não são afetadas pela pressão (Butz *et al.*, 2003). No suco de caju processado com alta pressão hidrostática de 250 ou 400 MPa durante 3, 5 e 7 minutos não foram observadas alterações no pH, na acidez, nos sólidos solúveis totais, no ácido ascórbico e no teor de polifenóis hidrolisáveis. Esses dados mostram que a APH pode ser utilizada na indústria alimentícia, gerando produtos com qualidade nutricional maior (Queiroz *et al.*, 2010). Perera *et al.* (2010) estudaram cubos de maçã de duas variedades diferentes, que foram embalados a vácuo em embalagens flexíveis com 0% a 50% (v/v) de suco de abacaxi e submetidos a APH de 600 MPa por 1-5 minutos (22°C). Os pesquisadores não observaram alterações na cor dos cubos durante quatro semanas de armazenamento nessas embalagens. No entanto, notaram que, após cinco horas de exposição ao ar, a textura e a cor do produto, ainda dentro da embalagem, foram afetadas de maneira significativa pela variedade da maçã, pelo tempo de APH e pela porcentagem de suco de abacaxi utilizada. O tratamento combinado reduziu de forma significativa a atividade residual da PFO, enquanto a atividade da pectinametilesterase não foi afetada em nenhuma variedade.

A APH pode afetar a conformação das proteínas e causar desnaturação, agregação ou gelificação das proteínas, dependendo do sistema de proteínas, da pressão aplicada, da temperatura e da duração do tratamento por pressão. A desnaturação das proteínas se associa a alterações conformacionais e é capaz de alterar a funcionalidade da enzima ao aumentar ou diminuir a atividade biológica ou modificar a especificidade pelo substrato. A eficácia do tratamento depende do tipo de enzima, do pH, da composição do meio, da temperatura, do tempo e do nível de pressão aplicado (Hendrickx *et al.*, 1998).

Rapeanu *et al.* (2005) relataram que, para várias PFOs, a inativação induzida pela pressão avançou mais rápido em pH mais baixo e que essa inativação foi influenciada pela adição de sais, açúcares ou agentes químicos antiescurecimento. Sabe-se que, quando comparada a outras enzimas, a PFO é mais resistente à pressão que ao tratamento térmico (Y.-S. Kim *et al.*, 2001). Em geral, a PHA é mais eficaz em pressões acima de 600 MPa (Figura 10.10), mas a combinação desses métodos aumenta a eficácia da inativação. Em estudos que visavam à diminuição da atividade da PFO em purê de banana (Palou *et al.*, 1999), lichia (Phunchaisri e Apichartsrangkoon, 2005) e suco de cenoura (Y.-S. Kim *et al.*, 2001), os melhores resultados foram obtidos em pressões superiores a 400 MPa combinadas com aquecimento brando (50°C). Por outro lado, pressões baixas (até 400 MPa) induziram a ativação da PFO na pera (200-400 MPa, 25°C, 10 minutos) (Asaka e Hayashi, 1991) e no suco de maçã (100 MPa, 1 minuto) (Anese *et al.*, 1995).

A APH pode ser utilizada para criar novos produtos (nova textura ou novo sabor) ou para obter produtos análogos com efeitos mínimos sobre o sabor, a cor e o valor nutricional, sem nenhuma degradação térmica (Messens *et al.*, 1997). A pressão também pode influenciar as reações bioquímicas ao reduzir o espaço entre as moléculas e aumentar as reações intercadeias (Marshall *et al.*, 2000).

E. Radiação gama

A radiação é um tratamento físico que consiste na exposição direta do alimento a elétrons ou a raios eletromagnéticos para conservar, melhorar a segurança e aumentar a qualidade dos alimentos. Por essas razões, ela pode ser utilizada para prolongar a vida de prateleira de frutas e vegetais. A radiação inativa micro-organismos, garantindo a desinfecção, retardando o processo de amadurecimento e a senescência (Lacroix e Ouattara, 2000). Além disso, foi relatada a ocorrência de retenção de ácido ascórbico e de síntese de polifenóis durante o

armazenamento dos alimentos irradiados (Moussaid *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006).

A irradiação g em dose baixa é aplicada com frequência em frutas e vegetais para prolongar a vida de prateleira. Prakash *et al.* (2000) notaram que o tratamento da alface-romana cortada com a dose de 0,35 kGy reduziu 1,5 log do total de micro-organismos aeróbicos e 1 log do total de leveduras e mofos, e que essa dose não afetou as características sensoriais, como o aspecto visual e a produção de sabor indesejado. Latorre *et al.* (2010) observaram o efeito de doses baixas de radiação g (1 ou 2 kGy) sobre a atividade da PFO da beterraba vermelha recém-cortada e concluíram que a radiação produziu alterações bioquímicas no conteúdo das células e na composição da parede celular que não necessariamente poderiam ser detectadas pelos consumidores. Os pesquisadores também mencionaram alterações que envolviam um aumento da capacidade antioxidante do tecido da beterraba vermelha, mostrando que as doses estudadas poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de uma técnica combinada para o processamento das beterrabas vermelhas. D. Kim *et al.* (2007) relataram que a quantidade de bactérias aeróbicas totais no suco de couve fresco, preparado via processo culinário comum, estava dentro do intervalo de 10^6 UFC/ml, e que sobreviveram em torno de 10^2 UFCs de bactérias/ml do suco, apesar do tratamento com radiação g na dose de 5 kGy. No teste de inoculação, o crescimento de *B. megaterium* e *E. acetylicum* sobreviventes no suco de couve irradiado com doses de 3-5 kGy foi retardado, e/ou diminuiu de maneira significativa, durante um período de armazenamento pós-irradiação de 3 dias. No entanto, quando se analisaram a atividade residual da PFO e o índice de escurecimento, não se observaram diferenças relevantes entre o suco de couve controle não irradiado e o suco de couve irradiado durante o período de pós-irradiação. Lu *et al.* (2005) mostraram uma diminuição de 73% na atividade da PFO no aipo recém-cortado tratado com 1,0 kGy (0,5 kGy/hora) após 3 dias sob refrigeração (4°C). Em 9 dias, a enzima mostrou uma atividade cerca de 25% menor que a enzima da amostra controle.

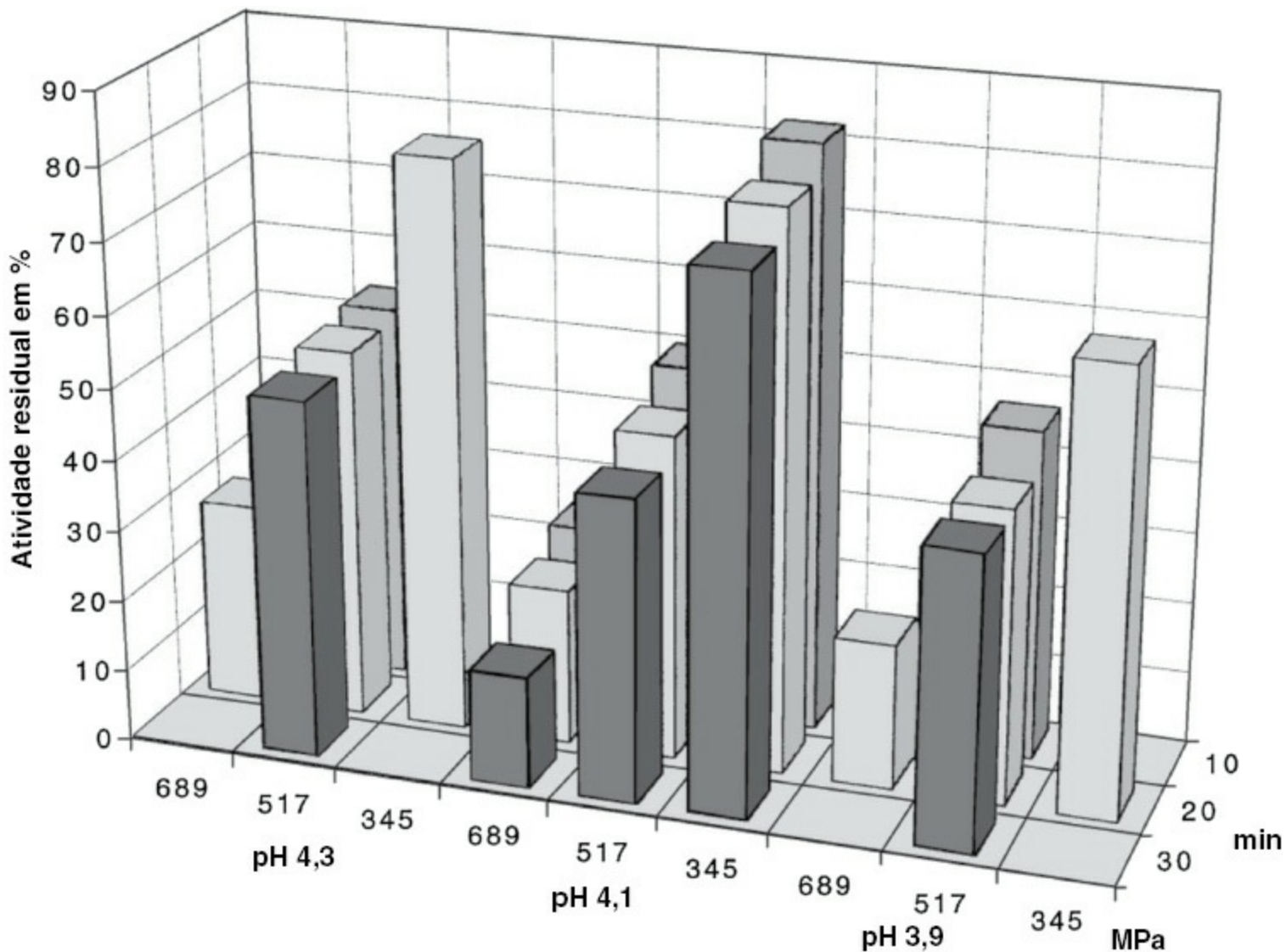


FIGURA 10.10 Efeito dos tratamentos com alta pressão hidrostática, e do pH inicial, sobre a atividade residual da polifenoloxidase do purê de abacate. Reproduzido de Lopez-Malo *et al.* (1998). © 1998, com permissão da Elsevier.

O uso de irradiação junto com outros métodos, ou com inibidores químicos antiescurecimento, pode resultar em produtos de alta qualidade e microbiologicamente seguros (X. Fan *et al.*, 2005).

F. Campo elétrico pulsado

O campo elétrico pulsado (CEP) é uma tecnologia não térmica para a conservação de alimentos – utilizada como alternativa a outras técnicas convencionais – que consiste na colocação do alimento em uma câmara com dois eletrodos que emitem pulsos de alta voltagem (20-80 kV) por um curto período (microsegundos).

Nos últimos anos, vários estudos mostraram a capacidade dos tratamentos intensos de produzir alimentos líquidos seguros, e também estáveis, na prateleira. Atualmente, são desenvolvidas novas aplicações práticas, como a melhoria dos processos de transferência de massa ou a geração de compostos bioativos, com o uso de campos com intensidades moderadas (Soliva-Fortuny *et al.*, 2009).

Essa tecnologia emergente para processamento de alimentos é investigada em virtude de sua capacidade para inativar micro-organismos e enzimas indesejáveis, com um aumento limitado da temperatura do alimento. Como consequência, obtém-se alimentos mais estáveis com poucas alterações na composição, nas propriedades físico-químicas e nas características sensoriais (Martín-Belloso e Elez-Martínez, 2005). O CEP aplicado aos alimentos causa eletroporação, isto é, a perda irreversível da funcionalidade da membrana celular, alteração que leva à

inativação das células microbianas (Zhong *et al.*, 2005; Cserhalmi *et al.*, 2006). O CEP também induz alterações na estrutura secundária de algumas enzimas. Depois do tratamento com o CEP, calculou-se a perda das frações relativas de α -hélice da PFO e da peroxidase, e os resultados mostraram que a PFO é mais suscetível ao tratamento que a peroxidase (Zhong *et al.*, 2007).

Há muitos estudos na literatura enfocando o efeito do CEP na inativação de micro-organismos (García *et al.*, 2003; 2005; Evrendilek *et al.*, 2004; Li e Zhang, 2004), mas poucos estudos sobre o efeito dessa tecnologia na atividade da PFO (Giner *et al.*, 2001; 2002; Zhong *et al.*, 2007). A inativação comercial da PFO depende da intensidade do campo elétrico e do tempo do tratamento. A maior redução da atividade da PFO foi de 76,2%, a 25 kV/minuto durante 744 μ s (Zhong *et al.*, 2007). Giner *et al.* (2001; 2002) relataram uma diminuição de 97% da atividade da PFO no extrato de maçã, com 24,6 kV/cm durante 6000 μ s, de 72% na PFO da pera, com 22,3 kV/cm durante o mesmo tempo de tratamento, e de 70% na PFO do pêssego, com 24,3 kV/cm durante 5000 μ s. Riener *et al.* (2008) observaram uma redução de 71% na atividade da PFO no suco de maçã recém-preparado, quando utilizaram uma combinação de pré-aquecimento a 50°C com CEP de 40 kV/cm durante 100 μ s. Esse grau de inativação foi significativamente mais alto ($p < 0,05$) que o registrado no suco processado por pasteurização branda convencional, no qual a atividade da PFO diminuiu em 46%.

De acordo com Yang *et al.* (2004), a sensibilidade ao tratamento com CEP varia de enzima para enzima. A sequência da sensibilidade ao CEP de cinco enzimas testadas foi: pepsina > PFO > peroxidase > quimotripsina e lisozima. O efeito de inativação do CEP sobre as enzimas foi afetado pela intensidade do campo elétrico, pela condutividade elétrica e pelo pH.

G. Outras tecnologias

Embora a maioria dos estudos tenha focado os tratamentos com APH, irradiação e CEP, estão surgindo técnicas emergentes que poderão trazer avanços para a área da tecnologia dos alimentos.

O aquecimento ôhmico é definido como um processo em que correntes elétricas são passadas através de alimentos, com o objetivo de aquecê-los. Esse método de aquecimento afeta a distribuição da temperatura dentro do alimento e modifica diretamente a relação tempo *versus* temperatura associada à inativação enzimática. O aquecimento ôhmico distingue-se de outros métodos de aquecimento elétrico por ter eletrodos que entram em contato com os alimentos, pela frequência e pela forma da onda do campo elétrico estabelecido entre os eletrodos. Icier *et al.* (2008) analisaram o suco de uva fresco aquecido ôhmicamente em diferentes gradientes de voltagem (20, 30 e 40 V/cm), de 20°C para 60°C, 70°C, 80°C ou 90°C, e a atividade da PFO. Eles constataram que as temperaturas críticas de inativação eram de 60°C ou inferior para 40 V/cm e de 70°C para 20 e 30 V/cm. A energia de ativação da inativação da PFO relativa ao intervalo de temperatura de 70°C-90°C foi de 83,5 kJ/mol. De acordo com Castro *et al.* (2004), a cinética da reação de inativação da PFO é de primeira ordem nos tratamentos convencional e de aquecimento ôhmico. Os autores mostraram que utilizando essa tecnologia o tempo necessário para inativar a enzima foi reduzido. Icier *et al.* (2006) salientaram que o aquecimento ôhmico também pode ser utilizado para branquear produtos alimentícios. Depois do tratamento por branqueamento ôhmico, a peroxidase do purê de ervilhas foi inativada em um tempo de processamento mais curto que o tempo registrado no branqueamento com água convencional.

O dióxido de carbono supercrítico é uma tecnologia não térmica na qual uma etapa de pressurização assegura que o gás aplicado penetre nas células microbianas e uma subsequente descompressão explosiva leva a uma rápida expansão desse gás no interior das células, o que as destrói fisicamente (Corwin e Shellhammer, 2002). O dióxido de carbono supercrítico atinge a inativação enzimática porque o gás provoca mudanças conformacionais nas estruturas secundária e terciária (Gui *et al.*, 2007). De acordo com um estudo realizado por Gui *et al.* (2007), o

suco de maçã turvo, exposto ao dióxido de carbono supercrítico a 55°C e 30 MPa durante 60 minutos, apresentou uma redução na atividade da PFO de mais de 60%, enquanto o mesmo suco, exposto a condições atmosféricas a 55°C, apresentou uma redução de 27,9%. Esses dados indicam que os efeitos combinados da pressão, da temperatura e do tempo ocorreram após o tratamento com dióxido de carbono. Corwin e Shellhammer (2002) mostraram a ocorrência de inibição da atividade da PFO, com atividade residual de 57,6% (500 MPa, 3 minutos a 50°C), inclusive quando o dióxido de carbono foi adicionado antes da PHA. Nesse estudo, a adição de dióxido de carbono diminuiu significativamente a atividade da PFO em todas as pressões (0,500 e 800 MPa) e temperaturas (25°C e 50°C) avaliadas, um efeito muito maior que o obtido pela pressão isolada. Niu *et al.* (2010) avaliaram a qualidade dos sucos de maçã turvos obtidos de fatias de maçã, tratadas com dióxido de carbono em alta pressão e aquecimento brando, e observaram que a PFO foi totalmente inativada e que sua atividade residual mínima a 65°C era de 38,6%.

O ultrassom é uma tecnologia não térmica que provoca inativação enzimática por lise celular usando uma energia vibratória que produz bolhas de cavitação e, temporariamente, gera pontos de pressão e temperatura extremamente altos quando implodem (Morris *et al.*, 2007). Constatou-se que a ultrassonicação é mais eficaz na inibição da atividade enzimática quando associada a outros processos, como a pressão e/ou o aquecimento elevados, ao contrário dos efeitos inibitórios mínimos da aplicação isolada. Jang e Moon (2011) e Jang *et al.* (2009) investigaram os efeitos do ultrassom e do ácido ascórbico sobre as mudanças na atividade da PFO e da peroxidase durante o armazenamento de maçãs recém-cortadas. Eles constataram que o tratamento combinado inativou a monofenolase, a difenolase e a peroxidase, enquanto o tratamento isolado, apenas com ultrassom ou ácido ascórbico, teve um efeito inibitório limitado e inverso sobre as enzimas. Essa investigação revelou que o tratamento simultâneo com ultrassom e ácido ascórbico gera efeitos inibitórios sinérgicos sobre várias enzimas relacionadas com o escurecimento enzimático.

O branqueamento com água quente ou vapor tem sido bastante utilizado na inativação térmica de enzimas indesejáveis, inclusive da PFO. Como os tratamentos térmicos também são responsáveis por alterações indesejáveis na textura dos tecidos, pesquisadores têm experimentado muitos outros métodos para inibir a atividade da PFO e evitar alterações de cor em frutas (Lamikanra, 2002). O aquecimento por micro-ondas é um método alternativo para a pasteurização de alimentos líquidos; as micro-ondas, quando comparadas ao método convencional, são capazes de aquecer internamente os produtos, penetrar mais profundamente e alcançar velocidades de aquecimento mais rápidas, o que melhora a retenção dos constituintes termolábeis dos alimentos (Heddleson e Doores, 1994; Deng *et al.*, 2003). De acordo com Cañumir *et al.* (2002), a energia das micro-ondas induz efeitos térmicos nos micro-organismos e enzimas, similares àqueles dos mecanismos de aquecimento convencionais. Matsui *et al.* (2007) submetem soluções que simulavam os constituintes químicos da água de coco a um processo descontínuo em um forno de micro-ondas, observando que a atividade da PFO na água e em uma solução com açúcares diminuiu após o tratamento. Em uma solução com sais, a estabilidade da PFO foi afetada de modo significativo e o contato entre o sal e a enzima provocou uma redução drástica na atividade inicial. Os autores constataram que, em temperaturas superiores a 90°C, o efeito combinado dos sais com a energia das micro-ondas reduziu a atividade enzimática até níveis indetectáveis. No entanto, a 90°C, a inativação pode ter sido causada apenas pela temperatura. Em um estudo posterior, Matsui *et al.* (2008) mostraram que a inativação térmica da PFO durante o processamento por micro-ondas da água de coco verde foi significativamente mais rápida que nos processos convencionais registrados na literatura.

A radiação por luz ultravioleta de ondas curtas (UV-C) é um método alternativo e de baixo custo para reduzir o número de micro-organismos da superfície de frutas e legumes frescos e cortados (Yaun *et al.*, 2004; Fonseca e Rushing, 2006; Shama, 2006). O potencial da luz UV-C para uso comercial no processamento mínimo de frutas depende de sua capacidade de contribuir para a segurança dos alimentos sem desencadear alterações indesejáveis na qualidade. Há poucos estudos sobre a influência da UV-C na qualidade (cor, textura, sabor e aroma) dos produtos

agrícolas durante o armazenamento. Os efeitos relatados são muito diversos, dependendo do tipo de produto agrícola e das doses aplicadas (Shama, 2006). Embora tenha sido dito que o tratamento com UV-C não gera subprodutos indesejáveis que poderiam alterar o sabor, o odor e a cor, há relatos de alteração da cor da pele de tomates, escurecimento do cálice de morangos e aumento da suscetibilidade dos pêssegos à podridão parda (Shama e Alderson, 2005). Erkan *et al.* (2001) constataram que doses altas de UV-C causaram uma leve coloração castanho-avermelhada na superfície da abobrinha (*zucchini squash*). Gómez *et al.* (2010) analisaram o efeito da luz UV-C em diferentes doses e exploraram o uso concomitante de alguns pré-tratamentos (branqueamento com água quente, imersão em uma solução com ácido ascórbico e cloreto de cálcio), com o objetivo de diminuir o escurecimento da superfície de discos recém-cortados de maçã. Os autores constataram que os parâmetros relativos à cor e à compressão dependem da dose de UV-C, do tempo de armazenamento e do tipo de pré-tratamento. As amostras expostas apenas à luz UV-C tornaram-se mais escuras e menos verdes, quando comparadas às fatias recém-cortadas de maçã ou às amostras no dia zero, efeito mais pronunciado na dose de UV-C mais elevada. As imagens obtidas com o microscópio de luz mostraram a ruptura das membranas celulares nas amostras tratadas com UV-C, o que explicaria o aumento no escurecimento das maçãs irradiadas.

REFERÊNCIAS

- Ali, M.T., Gleeson, R.A., Wei, C.I., Marshall, M.R., 1994. Activation mechanisms of pro-phenoloxidase on melanosis development in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle. *J. Food Sci.* 59, 1024-1030.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., 2009. Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*). *Food Chem.* 117, 122-126.
- Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vázquez-Flores, A., González-Aguilar, G.A., 2007. Dual effect of b-cyclodextrin (b-CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chem.* 101, 1346-1356.
- Anderson, J.W., 1968. Extraction of enzyme and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7, 1973-1988.
- Anese, M., Nicoli, M.C., Dall'Aglio, G., Leric, C.R., 1995. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. *J. Food Biochem.* 18, 285-293.
- Arora, D.S., Chander, M., Gill, P.K., 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 115-120.
- Arslan, O., Erzen, E., Sinan, S., Ozensoy, O., 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chem.* 88, 479-484.
- Asaka, M., Hayashi, R., 1991. Activation of polyphenoloxidase in pear fruits by high pressure treatment. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2439-2440.
- Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., Colak, A., 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chem.* 106, 291-298.
- Aydemir, T., 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem.* 87, 59-67.
- Bayındırlı, A., Alpas, H., Bozoğlu, F., Hizal, M., 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control* 17, 52-58.
- Bendall, D.S., Gregory, R.P.F., 1963. Purification of phenol oxidases. In: Pridham, J.B. (Ed.), *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. MacMillan, New York, p. 7-24.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M., 2006. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chem.* 98, 158-163.
- Butz, P., García, A.F., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A., Tausher, B., 2003. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J. Food Eng.* 56, 233-236.
- Cañumir, J.A., Celis, J.E., de Bruijn, J., Vidal, L.V., 2002. Pasteurization of apple juice by using microwaves. *Food Sci. Technol.* 35, 389-392.
- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2004. The effect of electric field on important food-processing enzymes: comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *J. Food Sci.* 69, C696-C701.
- Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangeri, A.R., Engeseth, N.J., 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4997-5000.
- Chen, Q.-X., Song, K.-K., Qiu, L., Liu, X.-D., Huang, H., Guo, H.-Y., 2005. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids. *Food Chem.* 91, 269-274.
- Chisari, M., Barbagallo, R.N., Spagna, G., 2008. Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J. Agric. Food Chem.* 56, 132-138.
- Chutintrasri, B., Noomhorm, A., 2006. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT – Food Sci. Technol.* 39, 492-495.
- Cloughley, J.B., 1980. The effect of fermentation on the quality parameters and price evaluation of Central African black teas. *J. Sci. Food Agric.* 31, 911-919.
- Cloughley, J.B., 1980. The effect of temperature on enzyme activity during the fermentation phase of black tea manufacture. *J. Sci. Food Agric.* 31, 920-923.
- Corwin, H., Shellhammer, T.H., 2002. Combined carbon dioxide and high pressure inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*. *J. Food Sci.* 67, 697-701.
- Craft, C.C., Audia, W.V., 1962. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz. (Chicago)* 123, 211-219.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, Á., Tóth-Markus, M., Lechner, N., 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7, 49-54.
- Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M., 2006. Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *J. Food Biochem.* 30, 56-76.
- Das, J.R., Boht, S.G., Eowda, L.R., 1997. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J. Agric. Food*

- Chem. 45, 2031-2035.
- Day, B.P.F., 1996. High oxygen modified atmosphere packaging for fresh prepared produce. *Postharvest News Inf.* 7, 31-34.
- Degl'Innocenti, E., Pardossi, A., Tognoni, F., Guidi, L., 2007. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in "lettuce", "escarole" and "rocket salad" when stored as fresh-cut products. *Food Chem.* 104, 209-215.
- Deng, Y., Singh, R.K., Lee, J.H., 2003. Estimation of temperature profiles in microwaved particulates using enzyme and vision system. *LWT – Food Sci. Technol* 36, 331-338.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae). *Food Chem.* 77, 1-7.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Ducamp-Collin, M.-N., Ramarson, H., Lebrun, M., Self, G., Reyne, M., 2008. Effect of citric acid and chitosan on maintaining red colouration of litchi fruit pericarp. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 241-246.
- Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O.I., 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp.* *Food Chem.* 95, 503-508.
- Erkan, M., Wang, C.Y., Krizek, D.T., 2001. UV-C irradiation reduces microbial population and deterioration in *Cucurbita pepo* fruit tissue. *Environ. Exp. Bot.* 45, 1-9.
- Espin, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., García-Canovas, F., 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from blanquilla pear. *Phytochemistry* 44, 17-22.
- Espin, J.C., Ochoa, M., Tudela, J., García-Canovas, F., 1997. Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 45, 667-670.
- Espin, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., Varón, R., García-Canovas, F., 1998. Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2968-2975.
- Evrendilek, G.A., Li, S., Dantzer, W.R., Zhang, Q.H., 2004. Pulsed electric field processing of beer: microbial, sensory, and quality analyses. *J. Food Sci.* 69, M228-M232.
- Fan, M.H., Wang, M., Zou, P., 2005. Effect of sodium chloride on the activity and stability of polyphenol oxidase from Fuji apple. *J. Food Biochem.* 29, 221-230.
- Fan, X., Niemera, B.A., Mattheis, J.P., Zhuang, H., Olson, D.W., 2005. Quality of fresh-cut apple slices as affected by low-dose ionizing radiation and calcium ascorbate treatment. *J. Food Sci.* 70, S143-S148.
- Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., Sun, J., 2007. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chem.* 103, 268-273.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F., Tudela, J., 2004. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 235-246.
- Finkle, B.J., Nelson, R.F., 1963. Enzyme reactions with phenolic compounds: effects of *o*-methyltransferase on a natural substrate of fruit polyphenol oxidase. *Nature (London)* 197, 902-903.
- Fonseca, J.M., Rushing, J.W., 2006. Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 256-261.
- Fonseca, M.I., Shimizu, E., Zapata, P.D., Villalba, L.L., 2010. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme Microb. Technol.* 46, 534-539.
- Fortea, M.I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Carreño, J., Núñez-Delicado, E., 2009. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chem.* 113, 1008-1014.
- Franck, C., Lammertyn, J., Quang Tri Ho, Q.T., Verboven, P., Verlinden, B., Nicola, B.T., 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 1-13.
- Gao, Z.-J., Han, X.-H., Xiao, X.-G., 2009. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chem.* 117, 342-348.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 140-144.
- García, D., Hassani, M., Manas, P., Condon, S., Pagan, R., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *J. Food Saf.* 25, 30-42.
- Gaillard, F., Forget, R.F., 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L. cv. Williams): activation, purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.* 74, 49-56.
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chem.* 105, 1047-1053.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., Świeca, M., 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chem.* 107, 129-135.
- Giménez, B., Martínez-Alvarez, O., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C., 2010. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *LWT – Food Sci. Technol.* 43, 1240-1245.
- Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G.V., Martin, O., 2001. Effects of pulsed electric field processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Sci. Technol. Int* 7, 339-345.
- Giner, J., Ortega, M., Meseguer, M., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G.V., Martin, O., 2002. Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *J. Food Sci.* 67, 1467-1472.
- Girelli, A.M., Mattei, E., Messina, A., Tarola, A.M., 2004. Inhibition of polyphenol oxidases activity by various dipeptides. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2741-2745.
- Goldbeck, J.H., Cammarata, K.V., 1981. Spinach thylakoid polyphenoloxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67, 977-984.
- Gómez, P.L., Alzamora, S.M., Castro, M.A., Salvatori, D.M., 2010. Effect of ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: microorganism, color and compression behavior. *J. Food Eng.* 98, 60-70.
- Gorny, J.R., Hess-Pierce, B., Cifuentes, R.A., Kader, A.A., 2002. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 271-278.
- Gruz, J., Ayaz, F.A., Torun, H., Strnad, M., 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chem.* 124, 271-277.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V., 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT – Food Sci. Technol* 38, 625-630.
- Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z., 2007. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 100, 1678-1685.
- Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y., 1966. Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples. *J. Sci. Food Agric.* 17, 389-392.
- Heddleson, R.A., Doores, S., 1994. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens – a review. *J. Food Protec.* 57, 1025-1037.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I., Weemaes, C., 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 9,

- Hilton, P.J., 1972. *In vitro* oxidation of flavonols from tea leaf. *Phytochemistry* 11, 1243-1248.
- Hilton, P.J., Ellis, R.T., 1972. Estimation of the market value of Central African tea by theaflavin analysis. *J. Sci. Food Agric.* 23, 227-232.
- Hiranvarachat, B., Devahastin, S., Chiewchan, N., 2011. Effects of acid pretreatments on some physicochemical properties of carrot undergoing hot air drying. *Food Bioprod. Process.* 89, 116-127.
- Hobson, G.E., 1967. Phenolase activity in tomato fruit in relation to growth and to various ripening disorders. *J. Sci. Food Agric.* 18, 523-526.
- Hodgson, J.M., Croft, K.D., 2010. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Mol. Aspects Med.* 312, 478-481.
- Hope, G.W., 1961. The use of antioxidants in canning apple halves. *Food Technol.* 15, 548-556.
- Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D., White, K., 1988. Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. *J. Food Sci.* 53, 765-767.
- Hulme, A.C., 1958. Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits. *Adv. Food Res.* 8, 297-413.
- Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Yu, H., Newmann, S.M., Steffens, J.C., 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21, 59-68.
- Hyodo, H., Uritani, I., 1965. Purification and properties of *o*-diphenol oxidases in sweet potato. *J. Biochem. (Tokyo)* 58, 388-395.
- Icier, F., Yildiz, H., Baysal, T., 2006. Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *J. Food Eng.* 74, 424-429.
- Icier, F., Yildiz, H., Baysal, T., 2008. Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. *J. Food Eng.* 85, 410-417.
- Irwin, P.L., Pfeffer, P.E., Doner, L.W., Sapers, G.M., Brewster, J.D., Nagahashi, G., Hicks, K.B., 1994. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomaltoligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res.* 256, 13-27.
- İyidoğan, N.F., Bayındırlı, A., 2004. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *J. Food Eng.* 62, 299-304.
- James, W.O., 1953. The terminal oxidases of plant respiration. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 28, 245-260.
- Jang, J.-H., Moon, K.-D., 2011. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chem.* 124, 444-449.
- Jang, J.-H., Kim, S.-T., Moon, K.-D., 2009. Inhibitory effects of ultrasound in combination with ascorbic acid on browning and polyphenol oxidase activity of fresh-cut apples. *Food Sci. Biotechnol.* 18, 1417-1422.
- Jeong, E.-Y., Jeon, J.-H., Lee, C.-H., Lee, H.-S., 2009. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food Chem.* 115, 1006-1010.
- Jiménez, M., García-Carmona, F., 1997. 4-Substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2061-2065.
- Jiménez, M., García-Carmona, F., 1999. Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1993-2000.
- Jiménez, M., Escribano-Cebrián, J., García-Carmona, F., 1998. Oxidation of the flavonol fisetin by polyphenol oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 534-542.
- Jiménez-Atiánzar, M., Escribano, J., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2005. The flavonoid eriodictyol as substrate of peach polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 70, C540-C544.
- Jiménez-Atiánzar, M., Josefa Escribano, J., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2005. Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 866-873.
- Joslyn, M.A., Ponting, J.D., 1951. Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Adv. Food Res.* 3, 1.
- Kahn, V., 1985. Effect of protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* 50, 111-115.
- Kavrayan, D., Aydemir, T., 2001. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem.* 74, 147-154.
- Khandelwal, S., Udipi, S.A., Ghugre, P., 2010. Polyphenols and tannins in Indian pulses: effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Res. Int.* 43, 526-530.
- Kim, D., Song, H., Lim, S., Yun, H., Chung, J., 2007. Effects of gamma irradiation on the radiation-resistant bacteria and polyphenol oxidase activity in fresh kale juice. *Radiat. Phys. Chem.* 76, 1213-1217.
- Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S.K., Song, K.J., An, G., Kim, W.T., 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Sci.* 161, 1145-1152.
- Kim, Y., Brecht, J.K., Talcott, S.T., 2007. Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chem.* 105, 1327-1334.
- Kim, Y.-S., Park, S.-J., Cho, Y.-H., Park, J., 2001. Effects of combined treatment of high hydrostatic pressure and mild heat on the quality of carrot juice. *J. Food Sci.* 66, 1355-1360.
- Koussevitzky, S., Ne'eman, E., Harel, E., 2004. Import of polyphenol oxidase by chloroplasts is enhanced by methyl jasmonate. *Planta* 219, 412-416.
- Krapfenbauer, G., Kinner, M., Gossinger, M., Schonlechner, R., Berghofer, E., 2006. Effect of thermal treatment on the quality of cloudy apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5453-5460.
- Lacroix, M., Ouattara, B., 2000. Combined industrial process with irradiation to assure innocuity and preservation of food products – a review. *Food Res. Int.* 33, 719-724.
- Lado, B.H., Yousef, A.E., 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes Infect.* 4, 433-440.
- Lærke, P.E., Christiansen, J., Veierskov, B., 2002. Colour of blackspot bruises in potato tubers during growth and storage compared to their discolouration potential. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 99-111.
- Lamikanra, G., 2002. Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables. In: Lamikanra, G. (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables. Science, Technology and Market*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 125-185.
- Latorre, M.E., Narvaiz, P., Rojas, A.M., Gerschenson, L.N., 2010. Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) root. *J. Food Eng.* 98, 178-191.
- Le Bourvellec, C., Le Quééré, J.-M., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., Guyot, S., 2004. Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* 52, 122-130.
- Lee, M.-K., Park, I., 2005. Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products. *Food Chem.* 91, 57-61.
- Li, L., Steffens, J.C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215, 239-247.
- Li, S.-Q., Zhang, Q.H., 2004. Inactivation of *E. coli* 8739 in enriched soy milk using pulsed electric fields. *J. Food Sci.* 69, 169-174.
- Lima, E.D.P.A., Pastore, G.M., Lima, C.A.A., 2001. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21, 98-104.
- Limbo, S., Piergiovanni, L., 2006. Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 254-264.
- Lopez-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Swanson, B.G., 1998. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Res. Int.* 31, 549-556.

- López-Nicolás, J.M., Núñez-Delgado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F., 2007. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: the use of maltosyl- β -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem.* 101, 1164-1171.
- Lu, Z., Yu, Z., Gao, X., Lu, F., Zhang, L., 2005. Preservation of gamma irradiation on fresh-cut celery. *J. Food Eng.* 67, 347-351.
- Luh, B.S., Hsu, E.T., Stachowicz, K., 1967. Polyphenolic compounds in canned cling peaches. *J. Food Sci.* 32, 251-258.
- Mahanil, S., Attajarusit, J., Stout, M.J., Thipyaopong, P., 2008. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. *Plant Sci.* 174, 456-466.
- Marshall, M.R., Kim, J., Wei, C.I., 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. Available at <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html> (accessed November 2010).
- Martin Del Valle, E.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39, 1033-1046.
- Martín-Belloso, O., Elez-Martínez, P., 2005. Enzymatic inactivation by pulsed electric fields. In: Sun, D.-W. (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, London, p. 155.
- Martínez-Alvarez, O., López-Caballero, M.E., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C., 2007. Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. *Food Chem.* 100, 147-155.
- Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., Luna, C., Allende, A., Gil, M.I., 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 34-42.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* 100, 108-123.
- Mason, H.S., Fowlks, W.L., Peterson, E., 1955. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2914-2915.
- Matheis, G., Whitaker, J.R., 1984. Peroxidase-catalyzed crosslinking of proteins. *J. Protein Chem.* 3, 35-48.
- Mathew, A.G., Parpia, H.A.B., 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 19, 75-145.
- Matsui, K.N., Granado, L.M., Oliveira, P.V., Tadini, C.C., 2007. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT – Food Sci. Technol.* 40, 852-859.
- Matsui, K.N., Gut, J.A.W., Oliveira, P.V., Tadini, C.C., 2008. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *J. Food Eng.* 88, 169-176.
- Mayer, A.M., 1987. Polyphenol oxidases in plants – recent progress. *Phytochemistry* 26, 11-20.
- Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67, 2318-2331.
- Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol oxidase in plants (review). *Phytochemistry* 18, 193-215.
- Mazzafera, P., Robinson, S.P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55, 285-296.
- Melo, G.A., Shimizu, M.M., Mazzafera, P., 2006. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry* 67, 277-285.
- Messens, W., Camp, J.V., Huyghebaert, A., 1997. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 107-112.
- Michodjehoun-Mestres, L., Souquet, J.-M., Hélène Fulcrand, H., Bouchut, C., Reynes, M., Brillouet, J.-M., 2009. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem.* 112, 851-857.
- Mohammadi, M., Kazemi, H., 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sci.* 162, 491.
- Montero, P., Ávalos, A., Pérez-Mateosa, M., 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem.* 75, 317-324.
- Morris, C., Brody, A.L., Wicker, L., 2007. Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Pack. Technol. Sci.* 20, 275-286.
- Moussaid, M., Lacroix, M., Nketsia-Tabiri, J., Boubekri, C., 2000. Phenolic compounds and the colour of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 57, 273-275.
- Muneta, P., 1977. Enzymatic blackening in potatoes: influence of pH on dopachrome oxidation. *Am. Potato J.* 54, 387-393.
- Munoz-Munoz, J.L., García-Molina, F., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N., 2008. Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9215-9224.
- Muthumani, T., Kumar, R.S.S., 2007. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. *Food Chem.* 101, 98-102.
- Nakamura, W., 1967. Studies on the biosynthesis of lignin. I. Disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. *J. Biochem. (Tokyo)* 62, 54-61.
- Neves, V.A., Silva, M.A., 2007. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 2424-2430.
- Newmann, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., De Vicente, C.M., Tanksley, S.D., Steffens, J.C., 1993. Organization of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21, 1035-1051.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2009. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chem.* 116, 323-331.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2010. Effect of catechin and ferulic acid on melanosis and quality of Pacific white shrimp subjected to prior freeze-thawing during refrigerated storage. *Food Control* 21, 1263-1271.
- Niu, S., Xu, Z., Fang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liao, X., Hu, X., 2010. Comparative study on cloudy apple juice qualities from apple slices treated by high pressure carbon dioxide and mild heat. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 91-97.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., Şakiroğlu, H., 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. *J. Food Sci.* 60, 494-496.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2008. Antioxidant content of fresh-cut pears stored in high-O₂ active packages compared with conventional low-O₂ active and passive modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* 56, 932-940.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M.A., González, L.A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M.I.H., Munuera, I.P., Fiszman, S., Martín-Belloso, O., 2010. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 57, 139-148.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A., 2005. A kinetic study of *p*-cresol oxidation by quince fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1196-1200.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B., Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). *Food Chem.* 85, 431-437.
- Özoğlu, H., Bayındırlı, A., 2002. Inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control* 13, 213-221.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Swanson, B.G., 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *J. Food Sci.* 64, 42-45.
- Paul, B., Gowda, L.R., 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 3839-3846.
- Perera, N., Gamage, T.V., Wakeling, L., Gamlath, G.G.S., Versteeg, V., 2010. Colour and texture of apples high pressure processed in pineapple juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 39-46.

- Phunchaisri, C., Apichartsrangkoon, A., 2005. Effects of ultra-high pressure on biochemical and physical modification of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Food Chem.* 93, 57-64.
- Pinto, M.S.T., Siqueira, F.P., Oliveira, A.E.A., Fernandes, K.V.S., 2008. A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Phytochemistry* 69, 2297-2302.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* 12, 29-36.
- Prakash, A., Guner, A.R., Caporaso, F., Foley, D.M., 2000. Effects of low-dose gamma irradiation on the shelflife and quality characteristics of cut romaine lettuce packaged under modified atmosphere. *J. Food Sci.* 65, 549-553.
- Prieto, H., Utz, D., Castro, A., Aguirre, C., González-Agüero, M., Valdés, H., Cifuentes, N., Defilippi, B.G., Zamora, P., Zúñiga, G., Campos-Vargas, R., 2007. Browning in *Annona cherimola* fruit: role of polyphenol oxidase and characterization of a coding sequence of the enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9208-9218.
- Queiroz, C., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24, 361-375.
- Queiroz, C., Moreira, C.F.F., Lavinias, F.C., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2010. Effect of high hydrostatic pressure on the phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. *High Press. Res.* 30, 507-513.
- Queiroz, C., Silva, A.J.R., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2011. Polyphenol oxidase, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem.* 125, 128-132.
- Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M., 2005. Effect of pH on thermal and/or pressure inactivation of Victoria grape (*Vitis vinifera sativa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *J. Food Sci.* 70, E301-E307.
- Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M., 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*). *Food Chem.* 94, 253-261.
- Revankar, M.S., Lele, S.S., 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus. WR-1. *Process Biochem.* 41, 581-588.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G., 2008. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food Chem.* 109, 402-407.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L., 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160, 315-321.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401-436.
- Roberts, E.A.H., 1952. Chemistry of tea fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 23, 227-232.
- Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B., 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from Jonagored apple. *Food Control* 12, 85-90.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F., 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 3801-3810.
- Roelofsen, P.A., 1958. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Adv. Food Res.* 8, 225-296.
- Ruenroengklin, N., Sun, J., Shi, J., Xue, S.J., Jiang, Y., 2009. Role of endogenous and exogenous phenolics in litchi anthocyanin degradation caused by polyphenol oxidase. *Food Chem.* 115, 1253-1256.
- Sanchez-Ferrer, A., Bou, R., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., 1988. Characterization of catecholase and cresolase activities of Manartrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 27, 319-320.
- Sanderson, G.W., 1964. The chemical composition of fresh tea flush as affected by clone and climate. *Tea Q.* 35, 101-109.
- Sapers, G.M., Miller, R.L., 1998. Browning inhibition in fresh-cut pears. *J. Food Sci.* 63, 342-346.
- Saxena, A., Bawa, A.S., Raju, P.S., 2008. Use of modified atmosphere packaging to extend shelf-life of minimally processed jackfruit (*Arotocarpus heterophyllus* L.) bulbs. *J. Food Eng.* 87, 455-466.
- Schwimmer, S., Burr, H.K., 1967. Structure and chemical composition of the potato tuber. In: Talburt, W.F., Smith, O. (Eds.), *Potato Processing*. Avi, Westport, CT, p. 12.
- Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., 2009. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. *Food Chem.* 114, 1380-1385.
- Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martínez, R., 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): kinetic characterization and comparison with the active form. *Arch. Biochem. Biophys.* 446, 175-185.
- Severini, C., Baiano, A., De Pilli, T., Romaniello, R., Derossi, A., 2003. Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 657-665.
- Shama, G., 2006. Ultraviolet light. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, 122-1-122-14. CRC/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
- Shama, G., Alderson, P., 2005. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialization. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 128-136.
- Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y., Liu, Q., 2002. The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Expr. Purif.* 24, 51-55.
- Shi, J., Sun, J., Wei, X., Shi, J., Cheng, G., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., Jiang, Y., 2008. Identification of (-)-epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase from longan fruit pericarp. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 1742-1747.
- Shi, Y., Chen, Q.-X., Wang, Q., Song, K.-K., Qiu, L., 2005. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem.* 92, 707-712.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L., 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator system with lignin. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 841-847.
- Siegenthaler, P.-A., Vaucher-Bonjour, P., 1971. Vieillessement de l'appareil photosynthétique. III. Variations et caractéristiques de l'activité *o*-diphényloxydase (polyphénoloxydase) au cours du vieillissement *in vitro* de chloroplastes isolés dépinard. *Planta* 100, 106-123.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* 20, 341-359.
- Soliva-Fortuny, R.C., Biosca-Biosca, M., Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., 2002. Browning, polyphenol oxidase activity and headspace gas composition during storage of fresh-cut pears using modified atmosphere packaging. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1490-1496.
- Soliva-Fortuny, R.C., Alós-Saiz, N., Espachs-Barroso, A., Martín-Belloso, O., 2004. Influence of maturity at processing on quality attributes of fresh-cut "Conference" pears. *J. Food Sci.* 69, 290-294.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., Martín-Belloso, O., 2009. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 544-556.
- Solomos, T., 1997. Principles underlying modified atmosphere packaging. In: Wiley, R.C. (Ed.), *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Chapman and Hall, New York, p. 183-225.
- Song, K.-K., Huang, H., Han, P., Zhang, C.-L., Shi, Y., Chen, Q.-X., 2006. Inhibitory effects of *cis*- and *trans*-isomers of 3,5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1147-1151.

- Song, Y., Yao, Y.-X., Zhang, H., Du, Y.-P., Chen, F., Wei, S.-W., 2007. Polyphenolic compound and degree of browning in processing apple varieties. *Agric. Sci. China* 6, 607-612.
- Srebotnik, E., Hammel, K.E., 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81, 179-188.
- Steiner, U., Schliemann, W., Strack, D., 1996. Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Anal. Biochem.* 238, 72-75.
- Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., Strack, D., 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208, 114-124.
- Stevens, L.H., Davelaar, E., 1996. Isolation and characterization of blackspot pigments from potato tubers. *Phytochemistry* 42, 941-947.
- Subramanian, N., Venkatesh, P., Ganguli, S., Sinkar, V.P., 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2571-2578.
- Sun, J., Jiang, Y., Wei, X., Shi, J., You, Y., Liu, H., Kakuda, Y., Zhao, M., 2006. Identification of (-)-epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase isolated from litchi pericarp. *Food Res. Int.* 39, 864-870.
- Sun, J., Xiang, X., Yu, C., Shi, J., Peng, H., Yang, Y., Yang, S., Yang, E., Jiang, Y., 2009. Variations in contents of browning substrates and activities of some related enzymes during litchi fruit development. *Sci. Hortic.* 120, 555-559.
- Swain, T., 1962. Economic importance of flavonoid compounds. *Foodstuffs*. In: Geissman, T.A. (Ed.), *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon, Oxford, p. 513-552.
- Talbut, W.F., Smith, O. (Eds.), 1967. *Potato Processing*, Avi, Westport, CT.
- Tegelberg, R., Julkunen-Tiitto, R., Vartiainen, M., Paunonen, R., Rousi, M., Kellomäki, S., 2008. Exposures to elevated CO₂, elevated temperature and enhanced UV-B radiation modify activities of polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase and concentrations of chlorophylls, polyamines and soluble proteins in the leaves of *Betula pendula* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 62, 308-315.
- Thipyapong, P., Hunt, M.D., Steffens, J.C., 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220, 105-117.
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J.C., 2004. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.* 167, 693-703.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Tolbert, N.E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51, 234-244.
- Tyagi, M., Kayastha, A.M., Sinha, B., 2000. The role of peroxidase and polyphenol oxidase isozymes in wheat resistance to *Alternaria triticina*. *Biol. Plant* 43, 559-562.
- Ünal, M.U., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chem.* 100, 909-913.
- Valero, E., García-Carmona, F., 1998. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2447-2451.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 49-127.
- van Lelyveld, L.J., de Rooster, K., 1986. Browning potential of tea clones and seedlings. *J. Hortic. Sci.* 61, 545-548.
- Virador, V.M., Reyes-Grajeda, J.P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A., Whitaker, J.R., 2010. Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1189-1201.
- Waliszewski, K.N., Márquez, O., Pardo, V.T., 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chem.* 117, 196-203.
- Walker, J.R.L., 1976. The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids. *J. Food Technol.* 11, 341-345.
- Wang, J., Constabel, C.P., 2004. Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* 220, 87-96.
- Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., Luo, Y., 2007. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) pulp. *J. Food Biochem.* 31, 45-55.
- Welti-Chanes, J., López-Malo, A., Palou, E., Bermúdez, D., Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V., 2005. Fundamentals and applications of high pressure processing of foods. In: Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (Eds.), *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, New York, p. 157-182.
- Whitaker, J.R., 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Dekker, New York, p. 571-582.
- Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enz. Microb. Technol.* 42, 293-307.
- Wszelaki, A.L., Mitcham, E.J., 2000. Effects of superatmospheric oxygen on strawberry fruit quality and decay. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 125-133.
- Xu, J., Zheng, T., Meguro, S., Kawachi, S., 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). *J. Wood Sci.* 50, 260-265.
- Yang, C.P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2732-2735.
- Yang, R.-J., Li, S.-Q., Zhang, Q.H., 2004. Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *J. Food Sci.* 69, FCT241-FCT248.
- Yaun, B.R., Summer, S.S., Eifert, J.D., Marcy, J.E., 2004. Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 1-8.
- Yu, C., Sun, J., Xiang, X., Yang, B., Jiang, Y., 2010. Variations in contents of (-)-epicatechin and activities of phenylalanineammonialyase and polyphenol oxidase of longan fruit during development. *Sci. Hortic.* 125, 230-232.
- Yue-Ming, J., Zauberman, G., Fuchs, Y., 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 221-228.
- Zamorano, J.-P., Martínez-Álvarez, O., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C., 2009. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostis*). *Food Chem.* 112, 104-111.
- Zhang, L., Lu, Z., Lu, F., Bie, X., 2006. Effect of γ irradiation on quality-maintaining of fresh-cut lettuce. *Food Control* 17, 225-228.
- Zhong, K., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., 2005. Kinetics of inactivation of *Escherichia coli* in carrot juice by pulsed electric field. *J. Food Process. Eng.* 28, 595-609.
- Zhong, K., Wu, J., Wang, Z., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., 2007. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chem.* 100, 115-123.

Oxidação lipídica

Karen M. Schaich,^{***} Fereidoon Shahidi,[†] Ying Zhong[†] e N. A. Michael Eskin^{**}

I. INTRODUÇÃO

Os micróbios são os primeiros agentes a causar a deterioração dos alimentos. No entanto, depois que os micróbios são controlados pelo processamento, a oxidação passa a ser o fator que mais limita a vida de prateleira dos alimentos e que mais degrada sua qualidade. Os consumidores normalmente reconhecem a oxidação lipídica pelos odores e sabores desagradáveis característicos do ranço, mas o impacto da reação de oxidação é muito maior. Os ácidos graxos insaturados – o grupo químico funcional mais sensível entre as moléculas biológicas – basicamente capturam o potencial oxidante da atmosfera e o transformam em espécies químicas altamente reativas. Uma vez iniciadas, as cadeias de radicais livres da oxidação lipídica são responsáveis por uma cascata de oxidações que afetam proteínas estruturais e enzimas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, vitaminas e lipídeos. Como consequência desse processo, ocorrem alterações nas propriedades físicas, degradação da funcionalidade das moléculas e destruição da palatabilidade dos alimentos.

A oxidação lipídica não ocorre apenas nos alimentos, visto que radicais, hidroperóxidos, epóxidos e aldeídos participam da fisiologia normal e dos processos patológicos dos tecidos vivos, entre eles o envelhecimento (Pryor, 1985), o câncer (McBrien e Slater, 1982), a aterosclerose (Uchida, 2000), a doença de Alzheimer (Sayre *et al.*, 1997) e outras demências, a doença inflamatória intestinal (Kruidenier e Verspaget, 2002) e a degeneração macular (Gu *et al.*, 2003; Ebrahim *et al.*, 2006).

Na maior parte do tempo, a oxidação lipídica é vista como um processo tóxico que leva à decomposição de membranas, à inativação de enzimas, à formação de adutos e cisão das fitas de DNA, e à deterioração das funções celulares (Logani e Davies, 1980; Borg *et al.*, 1981; McBrien e Slater, 1982; Borg e Schaich, 1983; 1984; Fadeel *et al.*, 2007). No entanto, há alguns impactos positivos, visto que concentrações baixas de produtos da oxidação desempenham papéis importantes na transdução de sinais nos tecidos, tais como a regulação da resposta ao

oxigênio ambiental (Suzuki *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2006). Por exemplo, quando os fungos *Phanerochaete chrysosporium* (fungos da podridão branca) são cultivados em alto teor de oxigênio, a oxidação lipídica nas membranas regula a produção de lignina peroxidases, que utilizam o oxigênio em excesso, e de enzimas antioxidantes (catalase e glutathione peroxidase), que reduzem os produtos da oxidação (C. Frenkel e K. M. Schaich, dados não publicados, 1992). Dessa forma, a oxidação lipídica ultrapassou o campo da ciência dos alimentos e se transformou em um tema importante de pesquisa na biologia e na medicina.

Independentemente do campo de aplicação, novas descobertas mostram que a oxidação lipídica consiste em uma série de reações complexas, com mecanismo químico fascinante e efeitos que vão muito além da molécula de lipídeo vizinha ou da liberação de odores rançosos. Este capítulo traz uma introdução à oxidação lipídica como um processo químico dinâmico. O principal foco está na oxidação lipídica que ocorre nos alimentos, e não no papel desse processo químico na medicina, embora os princípios discutidos aqui sejam amplamente aplicáveis a todos os tecidos vivos vegetais e animais.

II. ONDE OCORRE A OXIDAÇÃO DOS LIPÍDEOS?

A oxidação dos lipídeos consiste principalmente na reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados (ácidos graxos com duplas ligações), embora não se possa excluir a ocorrência de reações secundárias envolvendo ácidos graxos saturados (sem duplas ligações). A oxidação lipídica que ocorre nos alimentos está mais associada a gorduras e óleos puros ou à fase oleosa de emulsões, e certamente é onde a reação é mais óbvia para os consumidores. Contudo, é importante reconhecer que a oxidação ocorre onde quer que haja ácidos graxos insaturados:

- Triacilgliceróis: no tecido adiposo e na gordura intramuscular (Watts, 1954; Ladikos e Lougovois, 1990), nos corpos lipídicos de grãos, nos óleos essenciais de frutas, no chocolate (Rossi-Olson, 2011), nos óleos puros (Schaich, 2005a) e na fase oleosa de emulsões (Sun *et al.*, 2011).
- Fosfolipídeos: nas membranas (em particular de músculos, vísceras, vegetais), nas camadas de farelo, nas gemas dos ovos e em emulsificantes naturais e sintéticos (Corliss e Dugan, 1971; Igene *et al.*, 1980; Mead, 1980; Yamamoto *et al.*, 1984; Porter e Wagner, 1986).
- Ácidos graxos livres: produtos da hidrólise de triacilgliceróis e fosfolipídeos que resultam da ação de ácidos, bases, do calor com ou sem água e da lipase (Heaton e Uri, 1961; deGroot *et al.*, 1973; Campbell *et al.*, 1974; Miyashita e Takagi, 1986); encontrados principalmente em alimentos que são aquecidos, que sofreram contaminação microbiana ou que contêm lipídeos lácteos ou tropicais.
- Ácidos graxos esterificados a outras moléculas, como esteróis e alcoóis (como nas ceras).

Isso significa que a oxidação lipídica está bastante disseminada nos alimentos, inclusive em fórmulas com baixo teor de lipídeos.

III. COMO OCORRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA?

A. Mecanismos da oxidação lipídica: a cadeia de radicais livres tradicional

Há tempos se sabe que a oxidação lipídica é uma reação em cadeia via radicais livres, que se dá em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 11.1) (Farmer *et al.*, 1943; Farmer e Sutton, 1943; Bolland, 1945; 1949; Swern, 1961). A reação em cadeia via radical é responsável por várias características cinéticas singulares que criam diferentes desafios quando se quer medir e controlar a oxidação lipídica, e que se constituem em parte da razão

pela qual a oxidação lipídica é um problema importante na estabilização dos alimentos armazenados:

- A oxidação lipídica é autocatalítica: uma vez iniciada, a reação se propaga e acelera de modo independente.
- Em cada iniciação, várias moléculas de lipídeos são oxidadas e vários LOOH são formados. Já foram medidas cadeias com várias centenas de moléculas de lipídeos (Hyde e Verdin, 1968; Cosgrove *et al.*, 1987).
- Quantidades muito pequenas de pró-oxidantes ou de antioxidantes provocam grandes alterações na velocidade.
- A reação produz vários intermediários e produtos que variam de acordo com as condições e com o tempo da reação.

1. Iniciação ($LH \rightarrow L^{\bullet}$)

Por ser uma reação ubíqua e rápida, a oxidação lipídica é, com frequência, chamada de processo espontâneo (Anônimo, 1981). No entanto, a oxidação lipídica não é uma reação termodinamicamente espontânea, isto é, ela não é capaz de ocorrer de modo independente. O oxigênio molecular está no estado tripleto natural (elétrons ímpares em paralelo), enquanto as duplas ligações estão no estado singleto (elétrons com *spins* opostos); por isso, o oxigênio atmosférico não consegue reagir diretamente com as duplas ligações dos lipídeos:



Assim, a oxidação lipídica *precisa* sempre de um iniciador ou catalisador que remova um elétron do lipídeo ou do oxigênio, dando origem a radicais, ou que mude o *spin* dos elétrons do oxigênio, de modo que ele possa se ligar diretamente a uma dupla ligação, formando hidroperóxidos que quebram radicais. Seja qual for o iniciador, o resultado final é a formação de radicais alquila (de lipídeos) iniciais que reagem com oxigênio, dando início ao processo de oxidação. A seção IV, C traz uma descrição das reações com os iniciadores mais comuns.

2. Propagação e ramificação

a. Reações básicas

A propagação é o coração do processo de oxidação (Kochi, 1973a). Nela, o oxigênio liga-se em velocidades controladas por difusão (quase instantaneamente) a radicais alquila (L^{\bullet}) relativamente não reativos de lipídeos, convertendo-os em radicais peroxila (LOO^{\bullet}) reativos (Reação 2 da Figura 11.1), que dão início à cadeia de radicais livres e a mantém ativa (Ingold, 1969a). Os radicais peroxila abstraem hidrogênios de moléculas de lipídeos adjacentes, formando hidroperóxidos (LOOH) e novos radicais alquila (L^{\bullet}) no processo (Reação 3, Figura 11.1). Cada novo radical alquila (L^{\bullet}) formado liga-se a um oxigênio, formando um radical peroxila, que, por sua vez, abstrai um hidrogênio de outro lipídeo, formando outro hidroperóxido e um novo radical alquila, que fornece a força propulsora da reação em cadeia (Reação 4, Figura 11.1). O processo continua indefinidamente até que a fonte de hidrogênios cesse ou até que a cadeia seja interrompida.

Os radicais peroxila são os principais propagadores da cadeia na fase inicial da oxidação. Suas abstrações são lentas e específicas ($k = 36\text{-}62 \text{ l/mol/s}$) (Gaddis *et al.*, 1961; Howard e Ingold, 1967; Gebicki e Bielski, 1981), o que contribui para tornar a fase inicial demorada. Nessa fase, a oxidação lipídica é ou não detectada. A cadeia continua com uma abstração por vez, a partir do ponto de iniciação. Sem a presença de forças capazes de decompor os hidroperóxidos, esse processo poderá continuar indefinidamente em uma velocidade lenta. No entanto, as reações aceleram quando os hidroperóxidos se acumulam e, em seguida, são decompostos por metais, pelo calor e pela luz

ultravioleta (UV), formando radicais alcoxila, peroxila e hidroxila (Reações 5, 6 e 7 da Figura 11.1). Uma característica importante da decomposição dos hidroperóxidos é que as reações com metais são heterolíticas, produzindo um radical e um íon, enquanto o calor e a luz UV induzem cisões homolíticas, que dão origem a dois radicais – alcoxila (LO^{\bullet}) e hidroxila (HO^{\bullet}) – que reagem muito mais rápido, e de modo mais geral, que o radical peroxila (LOO^{\bullet}). Logo que são formados, esses radicais aumentam muito a velocidade de reciclagem da reação em cadeia e atacam mais sítios em lipídeos.

A mudança na velocidade de propagação e a especificidade da abstração assinalam a progressão para uma segunda fase da propagação, denominada ramificação, na qual a reação em cadeia via radical se expande, gerando novas cadeias em velocidades mais rápidas. A Figura 11.2 mostra um esquema do efeito da ramificação. A oxidação lipídica ganha força, aumentando em velocidade e extensão, enquanto o radical alcóxila (LO^\bullet) se torna o propagador de cadeia dominante, mais rápido ($k = 10^6 - 10^7$ l/mol/s) (Pryor, 1986; Erben-Russ *et al.*, 1987) e as cadeias secundárias se ampliam de maneira considerável e difundem a oxidação lipídica para além da cadeia de radical inicial. Desse modo, um único evento iniciador é capaz de desencadear a oxidação sucessiva de, literalmente, centenas de moléculas da cadeia primária e de cadeias de ramificação secundárias (Hyde e Verdin, 1968; Cosgrove *et al.*, 1987).

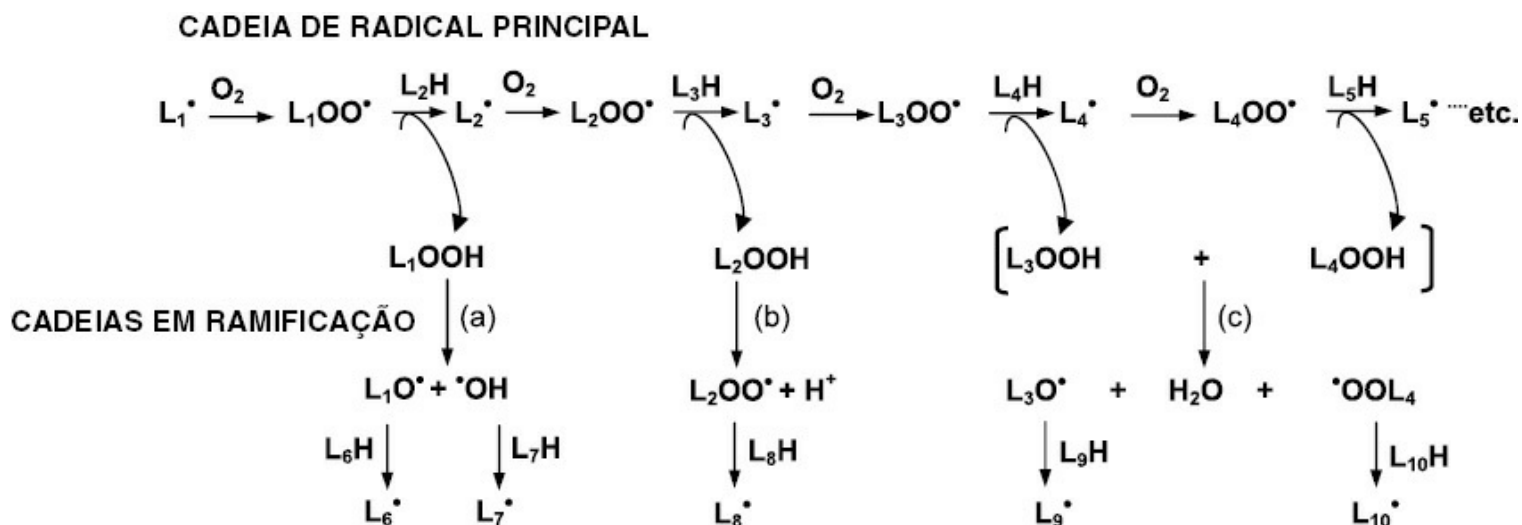
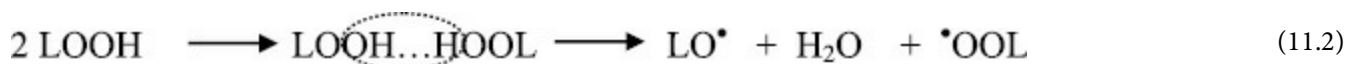
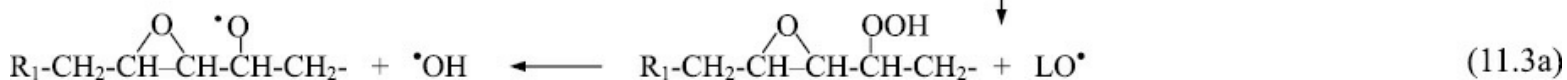
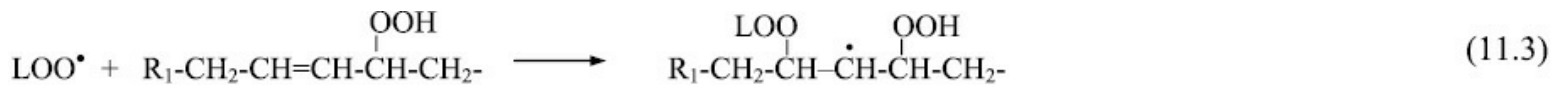


FIGURA 11.2 Expansão da reação em cadeia da oxidação lipídica por meio da ramificação das cadeias. A propagação prolonga a cadeia original do primeiro radical por meio da abstração de hidrogênios (cadeia no alto). A ramificação da cadeia ocorre quando os hidroperóxidos – produtos da cadeia original – decompõem-se por (a) redução, (b) oxidação ou (c) dismutação bimolecular, formando vários radicais, que iniciam novas cadeias. As velocidades da propagação são mais rápidas nas cadeias que têm o LO^\bullet como propagador da cadeia. Adaptado de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.

Antes de prosseguir, é preciso fazer um último comentário sobre a etapa de propagação. Nas etapas iniciais da oxidação lipídica, quando os hidroperóxidos estão em concentrações baixas, a decomposição dos hidroperóxidos ocorre de modo monomolecular (uma molécula por vez), conforme mostrado nas Reações 5, 6 e 7 da Figura 11.1. No entanto, à medida que a oxidação avança e o hidroperóxido se acumula, a decomposição passa a ocorrer por meio de mecanismos bimoleculares, nos quais dois hidroperóxidos interagem para induzir a decomposição. A explicação tradicional propõe que os hidrogênios de dois hidroperóxidos se ligam e, em seguida, sofrem hidrólise conjunta, produzindo dois radicais (Reação 11.2); esses radicais dão início às reações de ramificação e aceleram a velocidade global da oxidação (Sliwiok *et al.*, 1974; Hiatt e McCarrick, 1975):



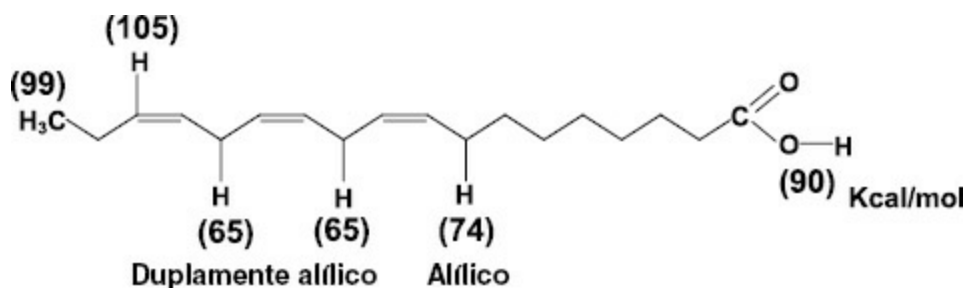
Outra explicação sugere que, ao se levar a cinética em conta, é mais provável que ocorra um aumento acentuado da oxidação quando um radical de reação lenta reage com um hidroperóxido não propagador e dá origem a uma cascata poderosa de três radicais muito reativos: LO^\bullet , epóxi- LO^\bullet e $\bullet OH$ (Elson *et al.*, 1975):



Qualquer que seja o mecanismo em ação, o efeito inicial da decomposição bimolecular é uma aceleração considerável da oxidação lipídica. No entanto, à medida que a oxidação avança, a decomposição dos hidroperóxidos e as reações de terminação – como a recombinação de radicais e a cisão de radicais alcóxila – tornam-se mais rápidas que a iniciação de novas cadeias. A oxidação então desacelera, enquanto produtos secundários estáveis se formam e os sabores e odores indesejados passam a ser detectáveis.

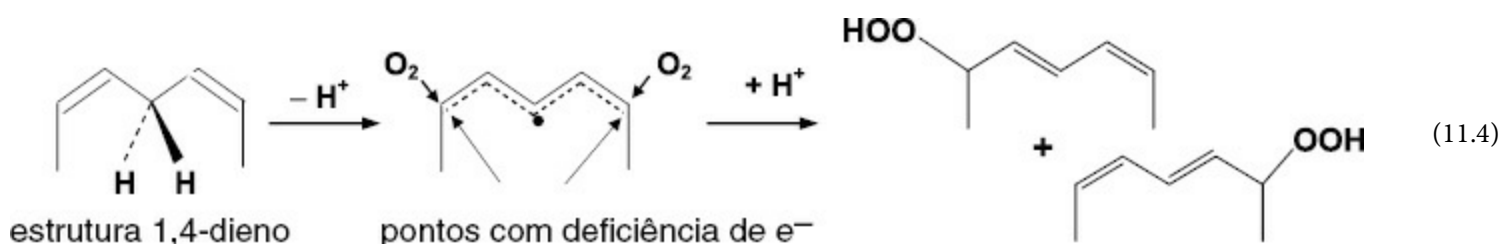
b. Sítios de abstração de hidrogênio e de formação de L[•]/LOOH nos ácidos graxos insaturados

Durante a propagação, os radicais livres -oxila de lipídeos abstraem os hidrogênios que estão ligados mais fracamente a carbonos. Nos ácidos graxos insaturados, as ligações C-H com energia mais baixa são aquelas formadas com os hidrogênios alílicos (próximos de duplas ligações) (Kerr, 1966); por isso, essas ligações se tornam os sítios preferidos para a remoção de H e formação de um radical livre. Nos lipídeos, os grupos metileno –CH₂– situados entre duas duplas ligações (denominados duplamente alílicos) estão duplamente ativados; por isso, as energias das ligações C-H caem de modo considerável, conforme mostrado na estrutura apresentada a seguir (Scott, 1965; Kerr, 1966).



Como consequência, a ordem de preferência para as abstrações de hidrogênios nos ácidos graxos é: H entre duas duplas ligações (isso explica parcialmente por que a oxidabilidade dos ácidos graxos aumenta com o número de duplas ligações) > H alílico isolado e próximo de ligações duplas >> H adjacente ao grupo -COOH > H dos grupos metileno situados mais abaixo nas cadeias acila (Patterson e Hasegawa, 1978).

Quando um hidrogênio é abstraído de um carbono situado entre duas duplas ligações, o elétron livre restante (isto é, o radical) distribui-se ao longo de um sistema de duplas ligações estabilizado por ressonância (Reação 11.4). A densidade eletrônica mais alta concentra-se no centro (ligação C-H mais fraca), por isso, as posições das extremidades se tornam relativamente deficientes de elétrons, criando bons alvos para a adição de oxigênio e a formação de hidroperóxido.

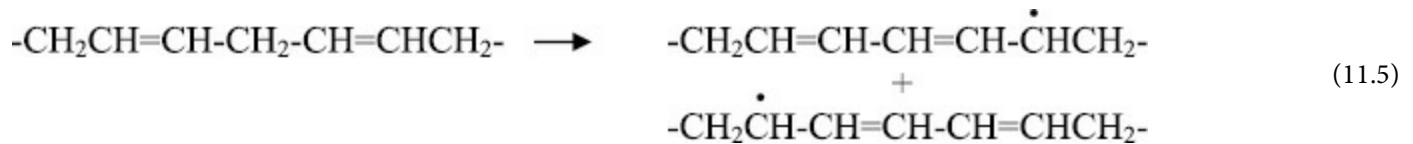
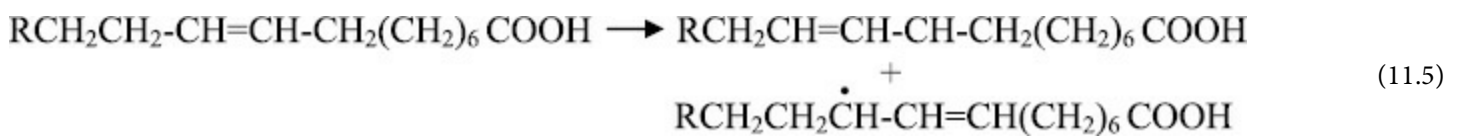


Desse modo, o ácido linoleico forma hidroperóxidos quase exclusivamente nos carbonos 9 e 13 (posições

externas), durante a auto-oxidação. Nos ácidos graxos poli-insaturados com mais de duas duplas ligações e várias estruturas 1,4-dieno, os hidroperóxidos dominantes da auto-oxidação dos ácidos graxos também são encontrados nas posições externas (Figura 11.3), independentemente do número de duplas ligações.

Esse padrão apresenta duas exceções importantes: (1) hidrogênios são abstraídos (e hidroperóxidos são formados) igualmente em ambos os carbonos da dupla ligação e em ambos os carbonos vizinhos de duplas ligações isoladas, como ocorre no ácido oleico; e (2) hidroperóxidos internos, por exemplo, nos carbonos 10 e 12 do ácido linoleico, são formados durante a oxidação fotossensibilizada por oxigênio singlete, conforme será discutido mais adiante na seção IV, D, 1.

Outro ponto importante a ser destacado sobre a oxidação lipídica é que a abstração do hidrogênio não rompe as duplas ligações: quando os radicais são formados, as duplas ligações migram para o carbono seguinte e invertem a configuração de *cis* para *trans* até quando as duplas ligações estão isoladas, como ocorre no ácido oleico (Reação 11.5) (Farmer *et al.*, 1943; Porter, 1990; Porter *et al.*, 1995). Nos sistemas 1,4-dieno dos ácidos graxos poli-insaturados, a migração da dupla ligação dá origem a um dieno conjugado (Reação 11.6).



Os dienos conjugados respondem por duas consequências importantes da oxidação lipídica. Eles são a primeira alteração química detectável da oxidação lipídica, por isso, são intermediários importantes para as etapas iniciais seguintes da oxidação lipídica, por sua absorção de luz UV no comprimento de onda de 234 nm (Parr e Swoboda, 1976). Além disso, o sistema conjugado prepara a cadeia para novas reações (ver seção III, B) e transforma a cadeia acila inclinada e flexível em reta e rígida. Por essa razão, até a oxidação inicial altera a fluidez das membranas e perturba seu funcionamento.

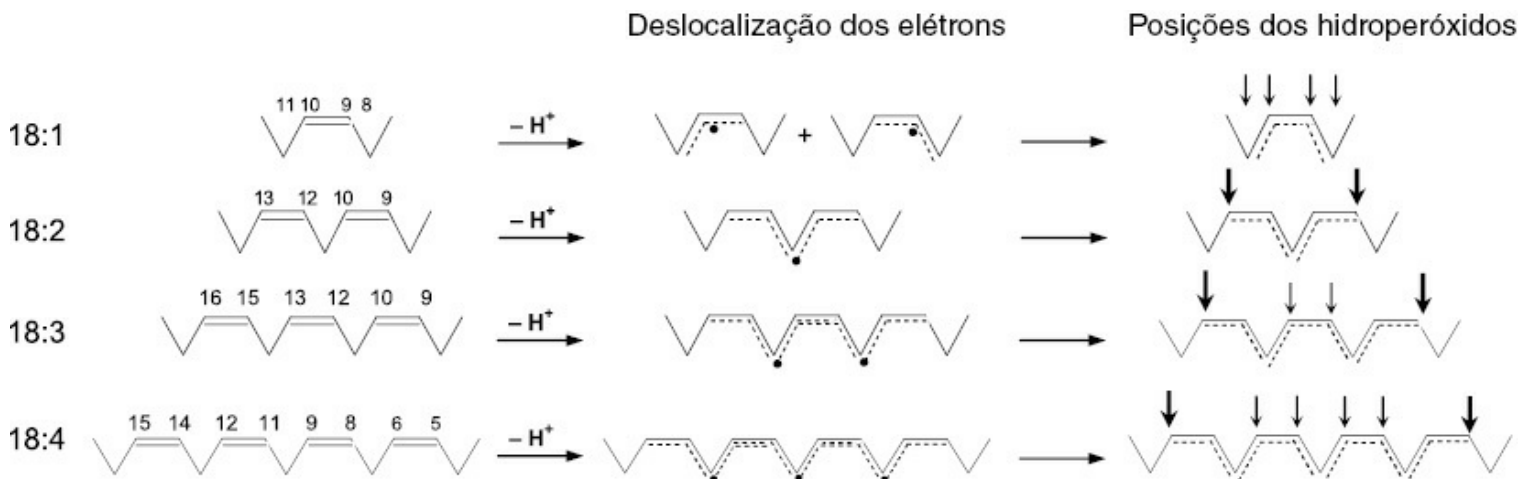


FIGURA 11.3 Distribuição dos elétrons por ressonância e localização correspondente dos hidroperóxidos formados quando hidrogênios são abstraídos de ácidos graxos insaturados. As setas grossas indicam as posições dominantes para a formação de hidroperóxidos. Obtido de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.

3. Processos de terminação

Na oxidação lipídica, “terminação” é quase uma denominação inadequada, já que esse processo nunca para totalmente. Um radical específico poderá acabar e formar um produto, mas geralmente há outro radical deixado para trás, de modo que a reação em cadeia continua. A oxidação desacelera quando os processos de eliminação de radicais ultrapassam a velocidade de produção de novas cadeias e o *momentum* da oxidação desloca-se da propagação de radicais e da expansão das cadeias para a geração de produtos estáveis. Assim, a palavra “terminação”, utilizada na discussão a seguir, refere-se à conversão de dado radical de lipídeo em um produto, sem que ocorra a interrupção total do processo. O efeito cumulativo sobre um sistema alimentar é determinado pelo número de cadeias de radicais que são encerradas.

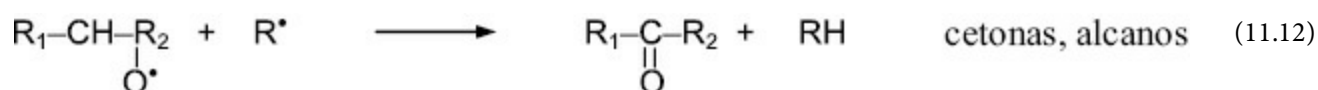
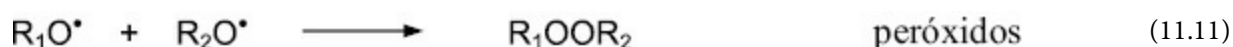
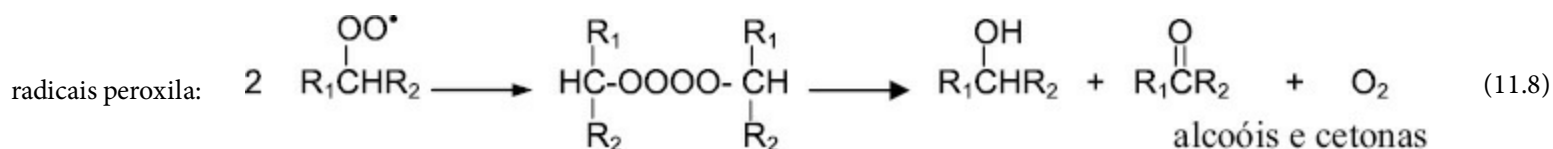
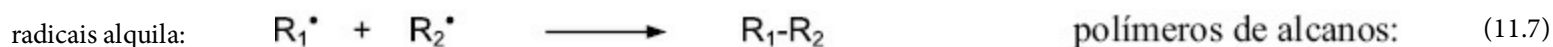
Os radicais livres de lipídeos se rearranjam para formar produtos não radicalares por meio de quatro mecanismos principais (Schaich, 2005b):

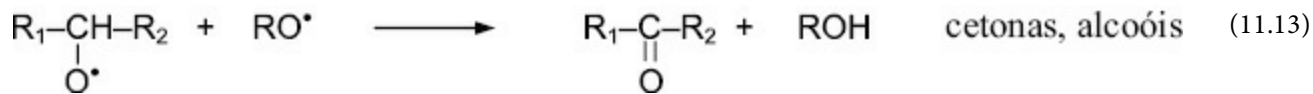
- Recombinação de radicais.
- Reações de cisão α e β de radicais alcoxila quando há fontes de prótons (por exemplo, a água) para estabilizar os produtos.
- Cooxidação de moléculas não lipídicas, como as proteínas.
- Eliminações de grupos ou dismutação.

Os mecanismos que prevalecem em dado alimento são influenciados pela natureza e concentração dos radicais, pela temperatura, pela pressão do oxigênio e pelo solvente. Os aspectos básicos da química das reações serão abordados aqui; os efeitos das reações de cooxidação serão vistos com mais detalhes na seção V.

a. Recombinação de radicais

Os radicais formados na oxidação dos lipídeos podem se recombinar de maneira ilimitada, dando origem a uma ampla variedade de produtos oxidativos. No entanto, essas recombinações não são aleatórias e já foram identificados padrões distintos para certas recombinações. Algumas das recombinações mais importantes, responsáveis pelos principais produtos da oxidação lipídica, são:





A temperatura e a pressão de oxigênio são cruciais na determinação das vias de recombinação dos radicais. As recombinações do radical alquila (L^\bullet) predominam quando a pressão do oxigênio é baixa ($pO_2 = 1$ para aproximadamente 80-100 mmHg) e a temperatura é alta (solubilidade do oxigênio diminuída) (Figura 11.4) (Lundberg e Chipault, 1947; Labuza, 1971). Condições com teor de O_2 alto favorecem as reações do radical peroxila (LOO^\bullet), mas a ligação desse radical às duplas ligações passa a competir com a combinação. As contribuições do radical alcóxila (LO^\bullet) para a mistura de produtos predominam nas etapas secundárias da oxidação, e em temperatura e pressão de oxigênio moderadas, quando a decomposição do $LOOH$ e do radical peroxila (LOO^\bullet) é mais rápida que sua formação (Bolland, 1949). À medida que a oxidação aumenta e os intermediários se acumulam, a recombinação de radical ganha importância em relação aos outros produtos. Por exemplo, os radicais alcóxila de hidroperoxiepídióxidos aquecidos a $40^\circ C$ geram $> 90\%$ de dímeros (Neff *et al.*, 1988).

As recombinações de radicais são responsáveis por muitas das características dos lipídeos e óleos oxidados e são controladas pela difusão e concentração (Erben-Russ *et al.*, 1987; Tsentalovich *et al.*, 1998). Por isso, ocorrem com mais rapidez quando a viscosidade e a concentração dos radicais são altas, isto é, nos óleos puros após intensa oxidação; as recombinações diminuem com a diluição dos lipídeos e, provavelmente, são insignificantes nos solventes polares. As recombinações de radicais alquila primários geram os dímeros e polímeros responsáveis pela viscosidade maior dos óleos oxidados. O fato mais importante talvez seja que as recombinações de radicais alcóxila e seus produtos de fragmentação (ver discussão, mais adiante) geram níveis baixos de compostos voláteis e de componentes que dão sabor, e essas substâncias intensificam aquelas produzidas nas reações de cisão e fornecem tons e sobretons que dão um toque final ao sabor (Grosch, 1987). Cetonas e peróxidos de dialquila, em particular, são produzidos apenas por reações de recombinação.

b. Reações de cisão de radicais alcóxila (LO^\bullet)

É provável que as maiores consequências práticas da oxidação lipídica estejam relacionadas com a cisão dos radicais alcóxila, porque os produtos gerados por essa reação são responsáveis pelos sabores e odores voláteis desagradáveis, e característicos, que marcam a presença do ranço (Grosch, 1987). Os radicais alcóxila de lipídeos sofrem cisões das ligações C-C de ambos os lados do grupo alcóxila, produzindo uma mistura de produtos carbonílicos finais (em geral, aldeídos e oxo-ésteres, a partir dos radicais alcóxila iniciais) e radicais livres alquila (L^\bullet) que dão continuidade à reação em cadeia:



Os fragmentos de radicais insaturados oxidam-se ainda mais e, em seguida, sofrem cisões secundárias, produzindo carbonilas e alcanos de cadeia mais curta. Como consequência, a mistura dos produtos (oriundos dos lipídeos oxidados) que se acumulam pode se tornar bastante complexa.

A cisão dos radicais alcóxila requer um doador de prótons potente (Russell, 1959). Os átomos de hidrogênio ligam-se aos estados intermediários de transição e também aos produtos finais da clivagem polar, reduzindo a energia de ativação para a ruptura das ligações (Walling e Padwa, 1963; Walling e Wagner, 1963; Kochi, 1973b;

Avila *et al.*, 1993; Tsentalovich *et al.*, 1998); em seguida, H^+ do solvente liga-se imediatamente aos radicais da cisão, fornecendo o impulso propulsor para a reação (Schauenstein, 1967). Assim, as cisões dos radicais alcoxila são bastante rápidas na presença de água (por exemplo, em emulsões) e, na verdade, são responsáveis por cerca de metade das reações dos radicais alcoxila em meios polares, principalmente em soluções diluídas de lipídeos nas quais a competição pela abstração de hidrogênios é menor (Bors *et al.*, 1984). No entanto, a maior contribuição dessa reação de terminação (e propagação) ocorre em temperaturas altas (Kochi, 1973b), porque a cisão do radical alcoxila tem E_a e $\log A$ (fator de Arrhenius) elevados (Horner *et al.*, 2000). O calor acelera as cisões dos radicais alcoxila em todos os solventes, se bem que o padrão de clivagem pode mudar, à medida que a temperatura se eleva. A cisão é um processo secundário nos lipídeos puros, em temperatura ambiente.

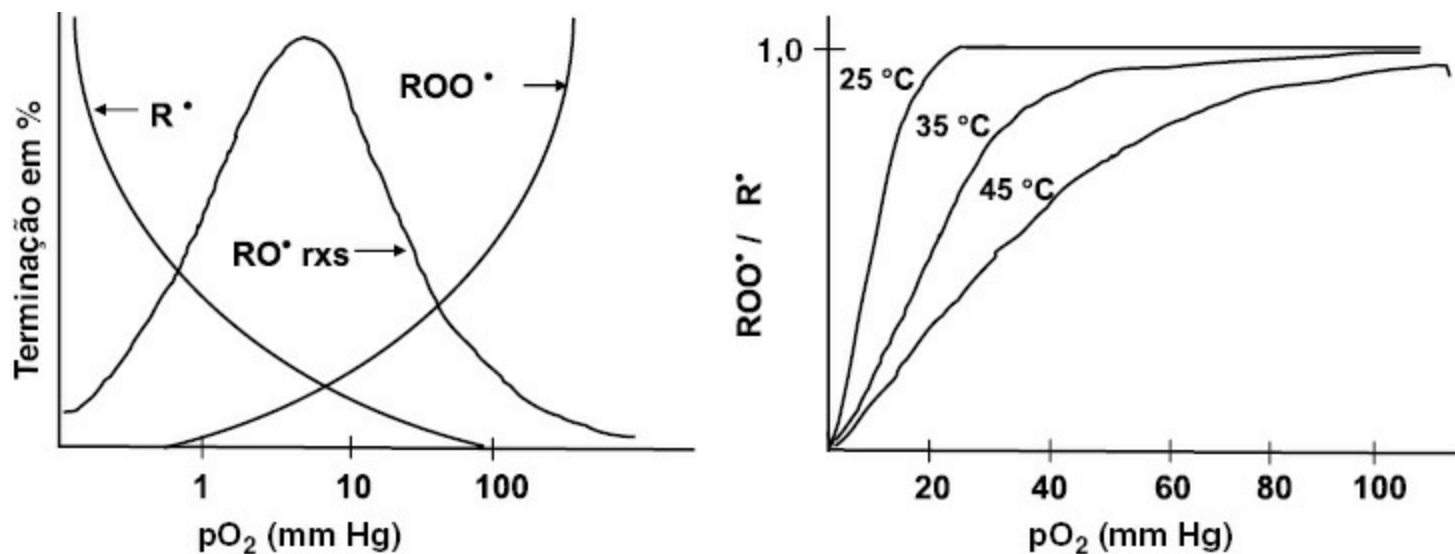
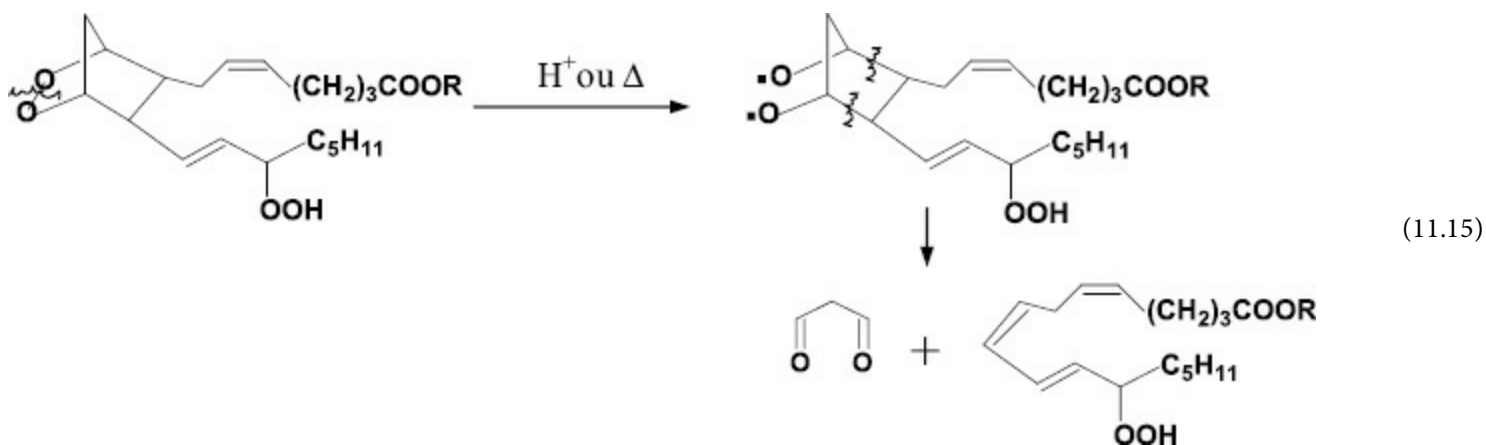


FIGURA 11.4 Efeitos do oxigênio e da temperatura sobre os processos de terminação da oxidação lipídica. Os produtos mais oxigenados são favorecidos pelos teores altos de oxigênio e pelas temperaturas baixas; as reações alquila e as dimerizações são favorecidas pelos teores baixos de oxigênio e pelas temperaturas altas (Schaich, 2005b). Redesenhado de Labuza (1971). Reproduzido com permissão.

As Figuras 11.5 a 11.7 mostram algumas das várias cisões que ocorrem na oxidação dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, respectivamente, e levam à formação de misturas complexas de produtos. Estudos realizados por Frankel e Grosch, pioneiros neste campo (Frankel, 1982; 1984; 1985; 1987; Grosch, 1987), fornecem mais detalhes sobre as reações de cisão responsáveis por centenas de produtos voláteis da oxidação lipídica.

A discussão sobre as reações de cisão ficaria incompleta se não mencionássemos o malondialdeído (MDA), um dos produtos mais conhecidos da oxidação lipídica. O MDA tem origem em várias cisões de hidroperóxidos internos cíclicos, formados nos ácidos graxos com três ou mais duplas ligações (linolênico e superior) (Reação 11.15) (Dahle *et al.*, 1962; Pryor *et al.*, 1976).



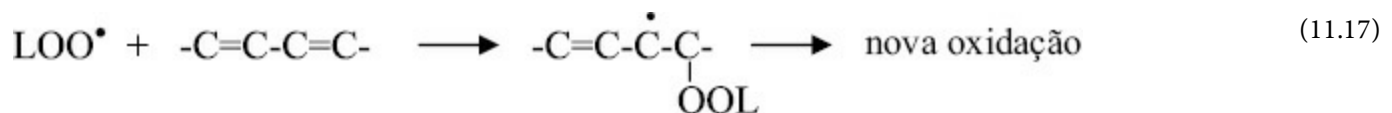
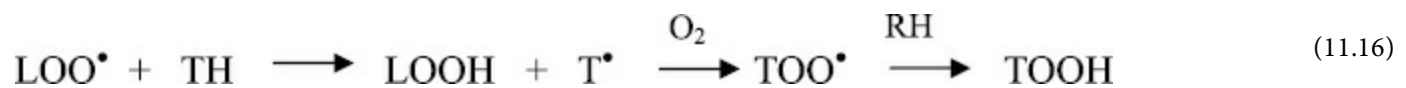
O MDA é utilizado com muita frequência – e de forma incorreta – em estudos sobre a oxidação lipídica, porque é detectado sem a extração dos lipídeos. No entanto, o MDA não é um produto universal nem apropriado para a análise da oxidação de ácidos graxos com menos de três duplas ligações. A formação do MDA é facilitada nas fases lipídicas puras pelas baixas concentrações de lipídeos e oxigênio e pela oxidação fotossensibilizada (Porter *et al.*, 1984); a presença de calor brando e ácido também é necessária para a clivagem dos endoperóxidos (Frankel e Neff, 1983). Na auto-oxidação dos lipídeos, a produção do verdadeiro MDA, em geral, é inferior a 0,1% (Shamberger *et al.*, 1977; Frankel e Neff, 1983), embora nos ácidos graxos fotossensibilizados, nos quais ocorre a formação de altas concentrações de hidroperóxidos internos, as concentrações de MDA podem chegar a 5% ou mais (Frankel e Neff, 1983). Por essa razão, a determinação do MDA não é o método mais adequado para a análise da oxidação lipídica, na maioria dos sistemas alimentares.

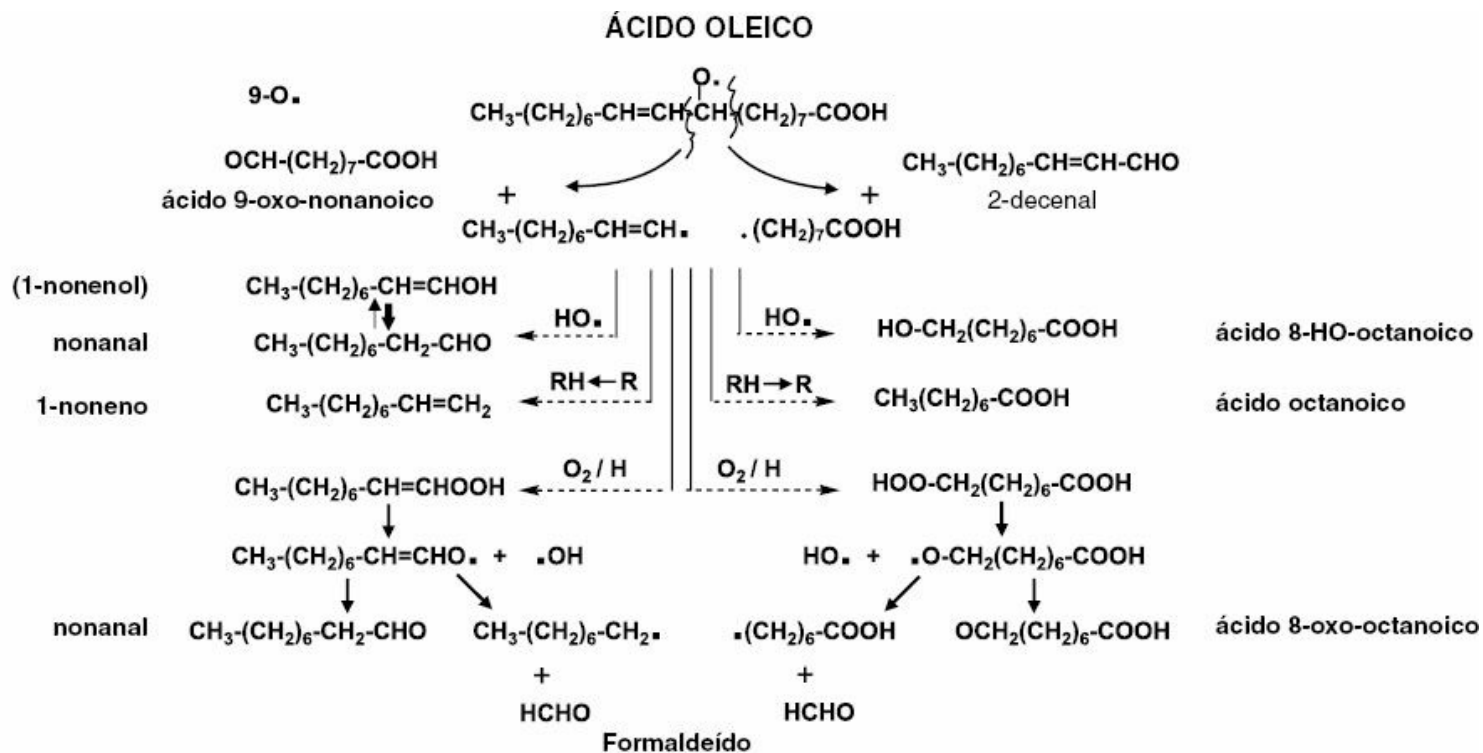
c. Cooxidação de moléculas não lipídicas

Enquanto a transferência de hidrogênios é necessária para a eliminação de dado radical de lipídeo, o átomo de hidrogênio vem de qualquer molécula que tenha hidrogênios abstraíveis (ligados fracamente) e que esteja próxima do lipídeo. Nos alimentos e nas células, os lipídeos estão intimamente associados a proteínas, carotenoides e outros pigmentos, amidos, antioxidantes e vitaminas, e a transferência de radicais para qualquer uma dessas moléculas por meio da abstração de hidrogênios, ou da adição de radicais peroxila (LOO•) ou alcoxila (LO•) às duplas ligações, resulta na cooxidação dessas moléculas.

A cooxidação é um processo no qual a interceptação de radicais livres de lipídeos por moléculas não lipídicas interrompe a propagação e forma produtos lipídicos e, ao mesmo tempo, transfere radicais e potencial oxidante para proteínas e outras biomoléculas (Schaich, 2008). Essa reação é similar àquela dos antioxidantes, porém exibe uma diferença crucial: os radicais formados não são estáveis. A maioria desses radicais não lipídicos liga-se ao oxigênio formando radicais peroxila, que também abstraem H de outras moléculas e provocam a degradação oxidativa do alvo molecular. Desse modo, os lipídeos agem “disseminando” o dano oxidativo para outras moléculas, que, então, deixam indícios da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos (Pryor, 1978; 1989; Schaich, 1980a; 2008; Borg e Schaich, 1984).

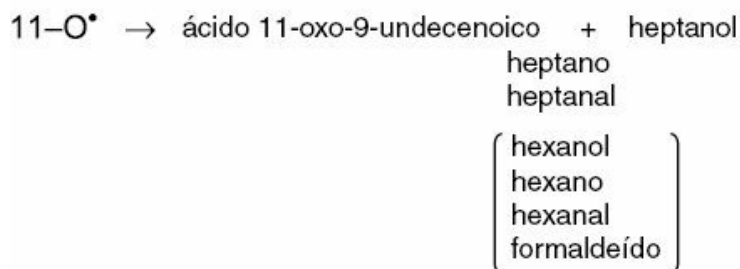
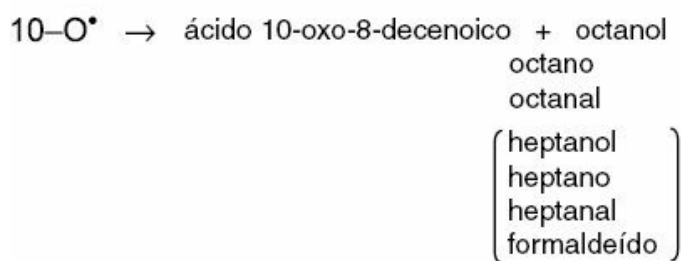
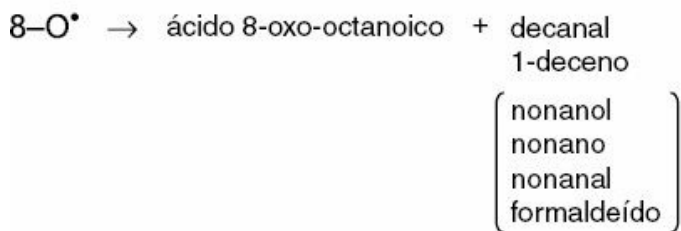
As Reações 11.16 e 11.17 mostram reações de cooxidação genéricas de moléculas-alvo. TH é qualquer molécula-alvo, e RH é qualquer molécula com um hidrogênio abstraível, lipídica ou não lipídica. As duplas ligações conjugadas da Reação 11.17 estão em qualquer molécula, mas são particularmente numerosas nos carotenoides.





Seguindo o mesmo padrão de fragmentação –

β -cisão



α -cisão

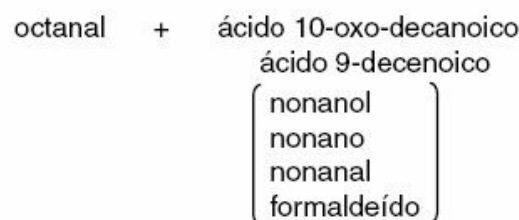
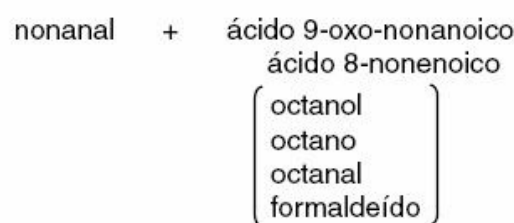
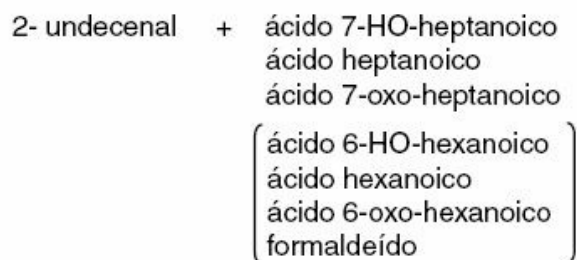
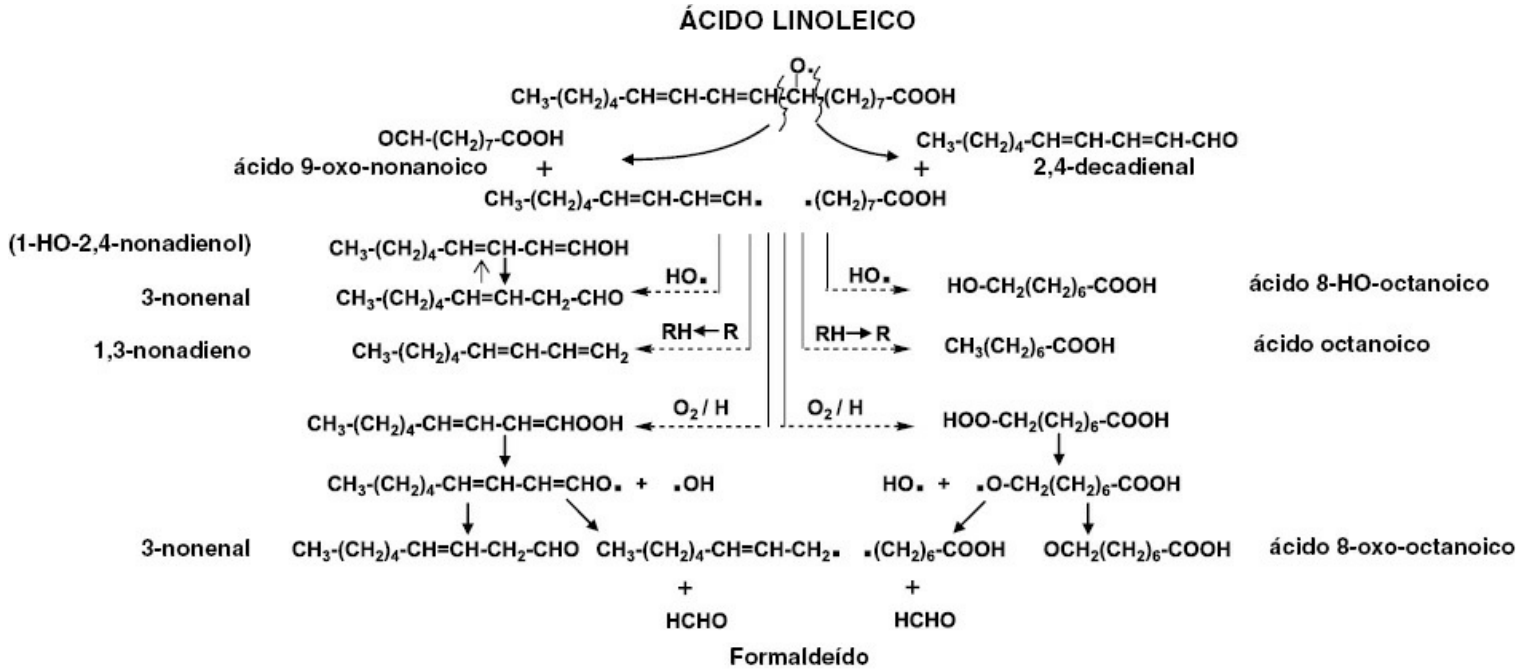
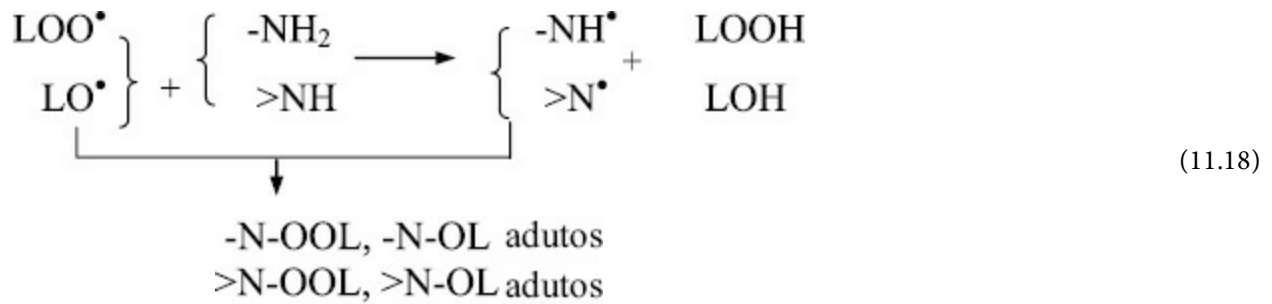


FIGURA 11.5 Vias da cisão do ácido oleico. Obtido de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.

É possível que as cooxidações mais importantes sejam aquelas que envolvem proteínas. Há hidrogênios abstraíveis nos grupos amino (Reação 11.18) e tiol (Reação 11.19) das cadeias laterais dos aminoácidos, de modo que a histidina, a lisina, a arginina e a cisteína são os principais alvos da abstração de hidrogênios de proteínas (Karel, 1975; Schaich e Karel, 1975; 1976; Yong e Karel, 1978; 1979; Schaich, 1980a). Também há registros de reações de adição de radicais (Reações 11.18a e 11.19a) (Gardner e Weisleder, 1976; Gardner *et al.*, 1977; 1985).



Seguindo o mesmo padrão de fragmentação –

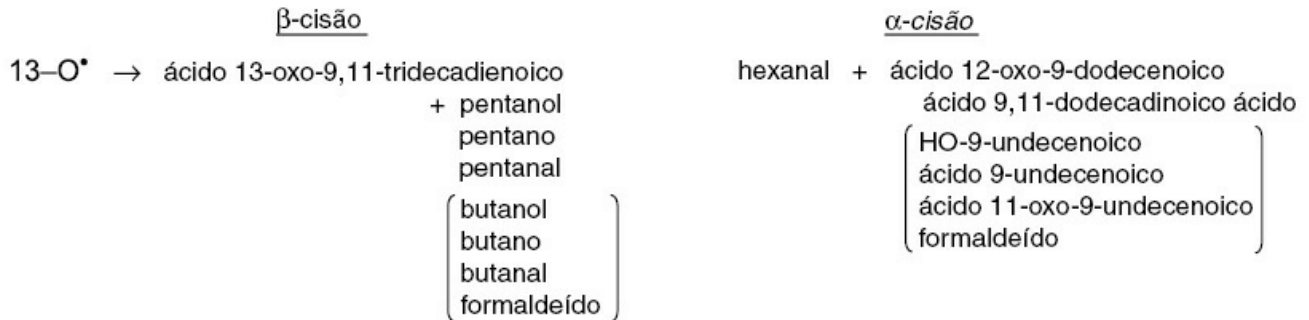
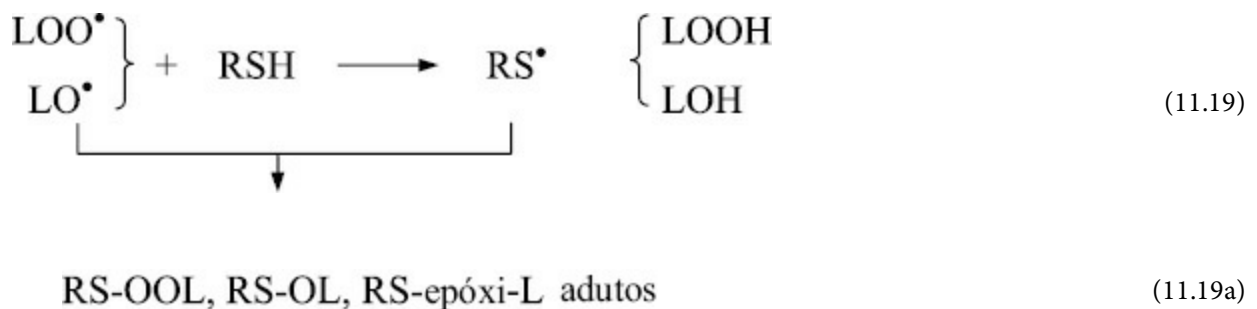


FIGURA 11.6 Vias da cisão do ácido linoleico. Obtido de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.



As reações de cooxidação não devem ser menosprezadas quando são considerados a cinética, os mecanismos e os efeitos globais da oxidação lipídica nos alimentos e nos sistemas biológicos. Um detalhe importante é que, enquanto as reações de cooxidação encerram cadeias da oxidação lipídica, também agem como antioxidantes e a

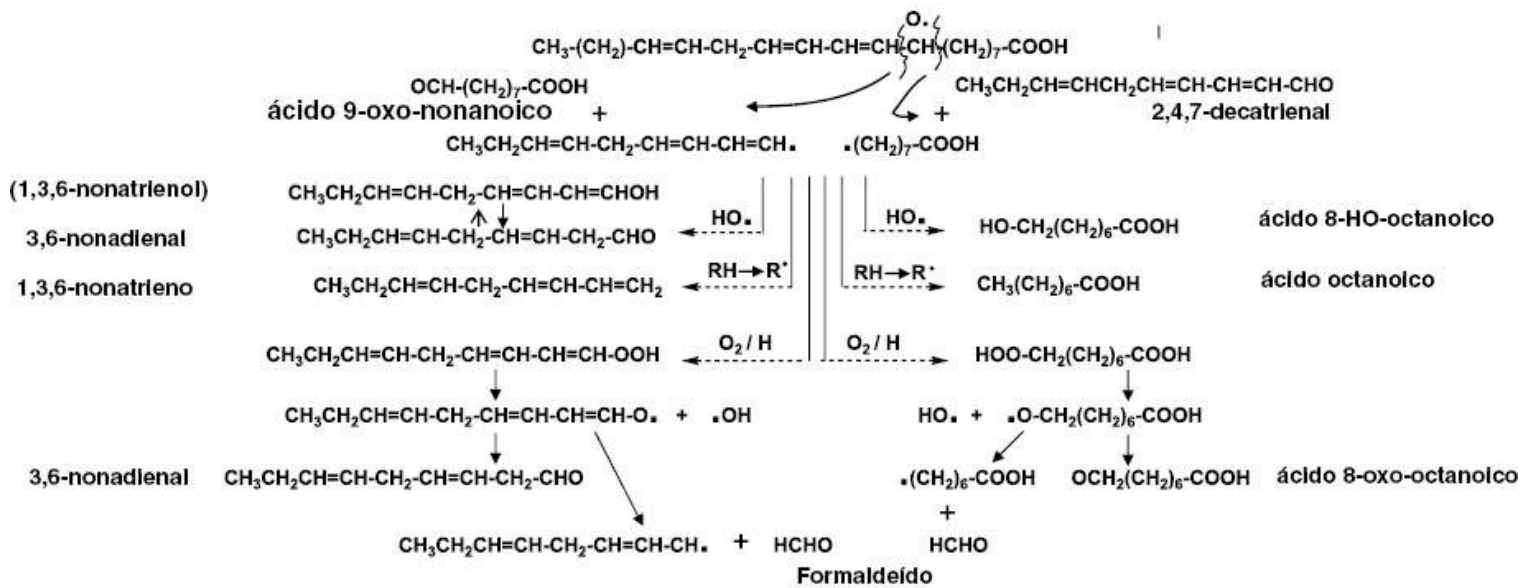
oxidação lipídica medida pelos hidroperóxidos, ou por produtos formados adiante, desacelera. Os produtos da cooxidação também limitam a capacidade de extração de lipídeos para análise e, com frequência, removem lipídeos dos fluxos de produtos normalmente analisados. Como consequência, é provável que a oxidação lipídica que ocorre em sistemas complexos seja sempre subestimada – às vezes, de modo acentuado –, a menos que os produtos da cooxidação também sejam medidos. Nos alimentos, por exemplo, isso significa monitorar, pelo menos, a oxidação das proteínas e o branqueamento dos pigmentos. É preciso identificar as moléculas-alvo sensíveis presentes em cada alimento, a fim de adequar as análises e abranger toda a oxidação lipídica.

Os efeitos das cooxidações serão analisados com mais detalhes na seção V.

d. Eliminação de grupos

A eliminação de grupos é uma forma secundária de terminação, mas é importante identificar essa reação, porque ela é responsável por alguns produtos da oxidação lipídica que não são formados facilmente por outros mecanismos. As eliminações mais comuns envolvem os grupos HO^\cdot e HOO^\cdot , eliminados do LOOH, produzindo uma carbonila (cetona) interna (a) e um produto dessaturado com uma dupla ligação extra (b) (Reação 11.20) (Terao *et al.*, 1975; Bothe *et al.*, 1978). O produto específico formado é determinado pela posição do hidroperóxido na cadeia do ácido graxo.

ÁCIDO LINOLÊNICO



Seguindo o mesmo padrão de fragmentação –

β-cisão

α-cisão

16-O* → ácido 16-oxo-9,12,14-hexadecatrienoico
+ etano

propanal + ácido 15-oxo-9,12-pentadecadienoico
ácido 9,12,14-pentadecatrienoico
 (ácido 14-HO-9,12-tetradecadienoico
 ácido 9,12-tetradecadienoico
 ácido 14-oxo-9,12-tetradecadienoico
 formaldeído)

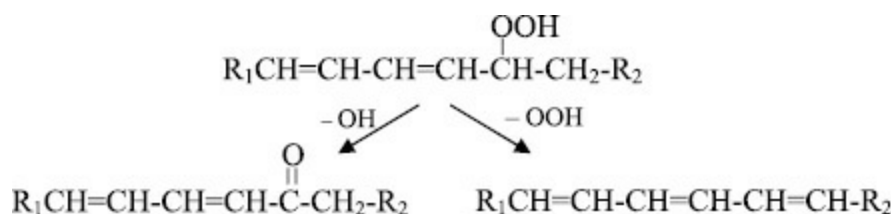
13-O* → ácido 13-oxo-9,11-tridecadienoico
+ 2-pentanol
2-penteno
2-pental
 (butanal
 buteno
 formaldeído)

3-hexenal + ácido 12-oxo-9-dodecenoico ácido
9,11-dodecadienoico ácido
 (11-HO-9-undecenoico
 ácido 9-undecenoico
 ácido 11-oxo-9-undecenoico
 formaldeído)

12-O* → ácido 12-oxo-9-dodecenoico
+ 3-hexenal
3-hexeno
 (2-pentanol
 2-penteno
 2-pental
 formaldeído)

2,4-heptadienal + ácido 11-HO-9-undecenoico
ácido 9-undecenoico
 (ácido 11-oxo-9-undecenoico
 ácido 10-oxo-decanoico
 ácido 9-decenoico
 formaldeído)

FIGURA 11.7 Vias da cisão do ácido linolênico. Obtido de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.



(11.20)

A formação da cetona, o produto dominante, impede a decomposição do hidroperóxido em radicais alcóxila

reativos. A adição de uma dupla ligação a um ácido graxo poli-insaturado forma um trieno conjugado muito reativo que é altamente suscetível à adição de radicais e a várias outras oxidações secundárias. Assim, enquanto encerra uma única cadeia de radicais, esse produto pode participar, ainda, de outras cadeias, aumentando a complexidade da oxidação lipídica.

B. Mecanismos da reação: as múltiplas vias da reação

Há mais de 50 anos, o esquema da reação em cadeia da Figura 11.1 corresponde à explicação mais aceita da oxidação lipídica, porém não esclarece em detalhes a grande variedade de produtos observados na oxidação dos lipídeos ou a cinética de todo o processo. Na verdade, muitos resultados publicados são incompatíveis com a reação em cadeia descrita. De modo mais específico, o esquema da reação, tal como está desenhado, prevê que os produtos devem ser gerados e observados em uma sequência rigorosa, isto é, os hidroperóxidos formam-se em primeiro lugar e sua decomposição leva a uma cascata de produtos não especificados. Em alguns estudos, os produtos seguem esse padrão de forma muito geral, mas, em muitas situações, os produtos previstos formam-se junto com os hidroperóxidos, ou não se formam. Quaisquer estratégias adotadas para a análise minuciosa da oxidação lipídica e para o uso planejado de antioxidantes requerem a compreensão clara e o rastreamento de todos os processos da oxidação que estão ativos em um alimento. Assim, é importante começar levando em consideração as múltiplas vias alternativas dos radicais peroxila e alcoxila que podem estar ativas, além da clássica abstração de hidrogênios da oxidação lipídica, com a qual essas vias alternativas competem. A Figura 11.8 mostra um esquema integrado da oxidação lipídica, o qual incorpora a clássica cadeia de radicais livres que flui verticalmente para baixo, no centro, e adiciona reações laterais importantes do radical peroxila (LOO^\bullet), do LOOH , do radical alcoxila (LO^\bullet) e de radicais secundários, que competem com a abstração de hidrogênios na propagação e alteram os processos de terminação (Schaich, 2005b). Esse esquema, compilado a partir de uma grande quantidade de informações extraídas da literatura e ainda não foi provado, indica que o modo de ver a oxidação lipídica precisa ser ampliado para explicar tanto a cinética como os produtos observados em diferentes condições de oxidação, e para enfrentar os desafios da estabilização dos alimentos com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, inclusive ácidos graxos *n*-3.

As principais consequências das múltiplas vias da reação são apresentadas a seguir.

- As múltiplas vias da reação dos radicais peroxila (LOO^\bullet) e alcoxila (LO^\bullet) ocorrem simultaneamente e competem entre si. Misturas de produtos podem ser formadas em todas as etapas, não apenas no final das cadeias. As reações alternativas competitivas dos radicais peroxila e alcoxila alteram as sequências de propagação e, assim, modificam consideravelmente, e de forma complexa, a cinética, os produtos dominantes, a detectabilidade e os efeitos da oxidação lipídica.
- Os ensaios tradicionais que monitoram apenas um produto podem subestimar demais a oxidação lipídica, ou omiti-la por completo, se as vias alternativas forem mais ativas que a via analisada. Isso é particularmente válido para os hidroperóxidos e compostos voláteis isolados, como o hexanal. Vários produtos precisam ser analisados para se identificar todas as vias alternativas e avaliar de modo preciso a extensão total da oxidação lipídica.

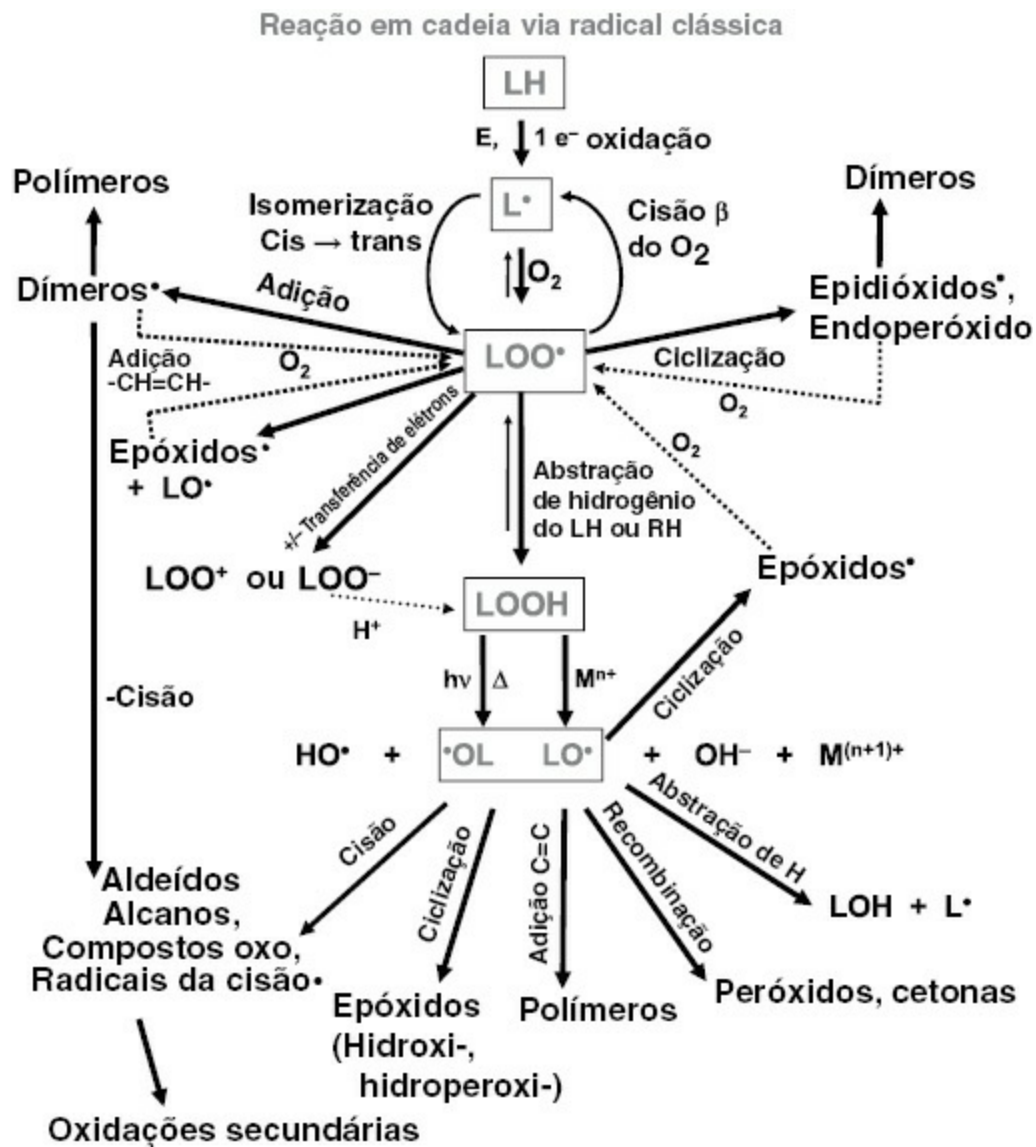


FIGURA 11.8 Esquema integrado da oxidação lipídica, mostrando as reações alternativas que competem com a abstração de hidrogênios clássica (reações na vertical mostradas no centro). Obtido de Schaich (2005b). Reproduzido com permissão.

- Todas as alterações causadas pela oxidação lipídica (sabores, odores, escurecimento, alterações na textura, perda de cor etc.) resultam de produtos específicos da oxidação lipídica. Quando o processo se afasta da abstração de hidrogênios, aldeídos, epóxidos, dímeros ou outros produtos são formados no lugar dos alcoóis, e isso altera acentuadamente a qualidade e os padrões de estabilidade dos alimentos. Portanto, a compreensão de como a oxidação lipídica afeta as propriedades dos alimentos requer a análise de grande variedade de produtos da oxidação lipídica.
- Questões relacionadas com a toxicidade e a segurança: quando o processo se desvia da formação de produtos voláteis por cisão para a formação de produtos não voláteis por adição e rearranjo interno, há uma redução dos odores desagradáveis, o que é desejável. No entanto, esses odores desagradáveis são a primeira pista para o consumidor de que os alimentos estão rançosos e não devem ser consumidos. Os epóxidos são mais tóxicos e reagem mais rapidamente com o DNA e as proteínas, enquanto os dímeros têm digestibilidade reduzida e algumas evidências de toxicidade. Esses produtos não emitem sinais sensoriais de alerta para os consumidores.

A seguir, apresentamos uma breve descrição dos processos de propagação e dos produtos formados nas vias alternativas e as condições que favorecem vias específicas.

1. Abstração de hidrogênio

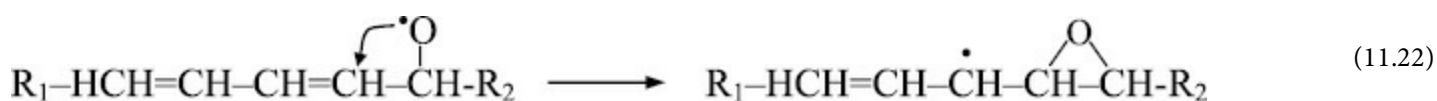
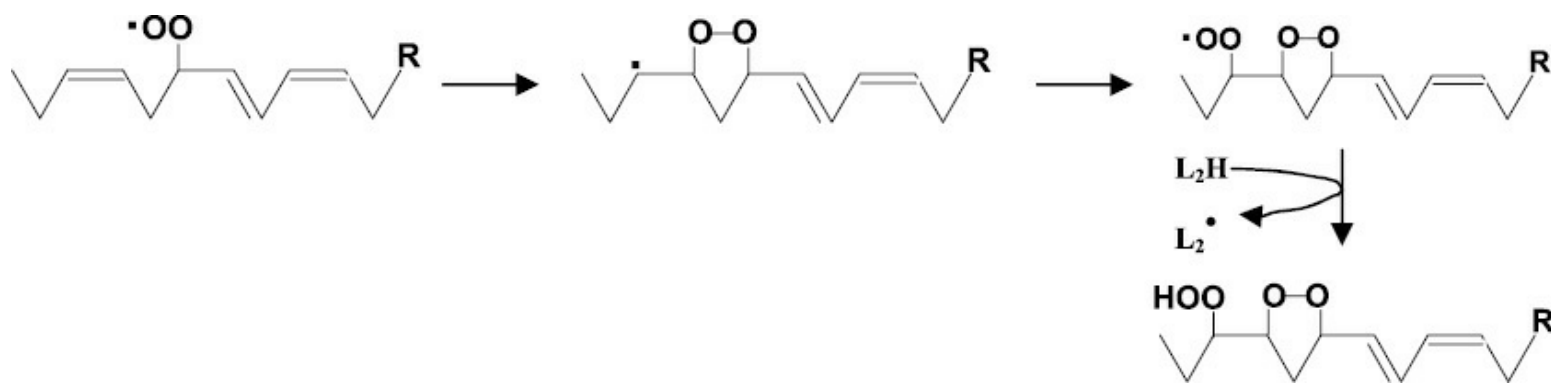
A abstração de hidrogênios é a reação propagadora de cadeias mais bem conhecida que aparece em todos os esquemas da oxidação lipídica e a principal reação até em vias alternativas. A abstração de hidrogênios por radicais peroxila produz hidroperóxidos (Reações 3 e 4, Figura 11.1), o primeiro produto estável da oxidação lipídica e o mais analisado quando se quer determinar a extensão da oxidação lipídica. Já a abstração de hidrogênios por radicais alcoxila (Reações 8a e 10, Figura 11.1) produz alcoóis ou hidroxilipídeos. No entanto, os álcoois, em geral, são produtos secundários, embora devam ser os únicos produtos, caso a abstração de hidrogênios seja a única reação ativa. Portanto, deve haver outras vias de reação competitivas que produzam os aldeídos, os epóxidos e os outros produtos observados, com frequência, na oxidação lipídica.

As abstrações de hidrogênios de outras moléculas lipídicas por radicais peroxila e alcoxila são favorecidas pelas condições que proporcionam um contato estreito entre as cadeias lipídicas, sem que haja competição de outras fontes de H. Por exemplo, nos lipídeos puros; nos ácidos graxos altamente poli-insaturados com cadeias curvas, que possibilitam o alinhamento de vários hidrogênios bis-aliílicos; no interior lipídico das membranas; nos solventes apróticos, que não competem com lipídeos; nos meios com baixa viscosidade, que facilitam o movimento molecular; e em temperaturas elevadas, que contribuem para a energia de ativação (Ingold, 1969a; Kim *et al.*, 1993; Schaich, 2005b). Nos solventes, a abstração de H é favorecida em concentrações moderadas de lipídeos, nas quais há substrato suficiente para fornecer hidrogênios. No entanto, em concentrações baixas de lipídeos, predominam a ciclização ou a cisão e, quando a concentração é alta, as adições e recombinações de radicais passam a ser mais importantes (Schaich, 2005b). É crucial entender essas diferenças ao projetar sistemas de modelos para experimentos ou ao interpretar os padrões da oxidação lipídica em diferentes sistemas alimentares.

Quando a quantidade de hidrogênios abstraíveis, ou o acesso a eles, é limitada, as reações alternativas apresentadas a seguir desviam o fluxo de radicais.

2. Rearranjo interno ou ciclização

Os radicais livres de lipídeos têm vida muito curta. Se não houver um composto com hidrogênio abstraível por perto, o elétron livre irá procurar outra via na qual encontre um elétron para emparelhar. Uma opção é ligar-se ao primeiro carbono de uma dupla ligação adjacente, produzindo epidióxidos com rearranjo do radical peroxila (Reação 11.21) e epóxidos com a ciclização do radical alcoxila (Reação 11.22), além de deixar um novo radical livre no carbono distal da dupla ligação. Note que, com dois átomos de oxigênio, os radicais peroxila ligam-se a uma dupla ligação situada dois carbonos distante, enquanto os radicais alcoxila se ligam a uma dupla ligação em posição imediatamente adjacente.



Como ocorre com todos os radicais alquila de lipídeos, a adição de oxigênio gera novos radicais peroxila, agora em uma nova posição, e estes radicais continuam a abstrair hidrogênios das moléculas de lipídeo vizinhas. Como consequência, a cadeia de radicais se propaga enquanto ocorre a formação de hidroperoxi epidióxidos e epóxidos (Chan *et al.*, 1980).

Embora o rearranjo interno possa ocorrer em qualquer posição, no caso dos radicais peroxila e alcoxila há uma tendência maior de ocorrer ciclização em posições internas, provavelmente porque o $-O^{\bullet}$ apresenta uma orientação mais favorável. Hidroperóxidos internos são encontrados em concentrações mais altas nos ácidos graxos com quatro ou mais duplas ligações e nas oxidações fotossensibilizadas (ver seção IV, D, 1), por essa razão, os produtos cíclicos epidióxidos e epóxidos também estão mais elevados. Na verdade, os níveis e a distribuição posicional dos produtos cíclicos internos são marcadores característicos que distinguem a auto-oxidação da oxidação fotossensibilizada.

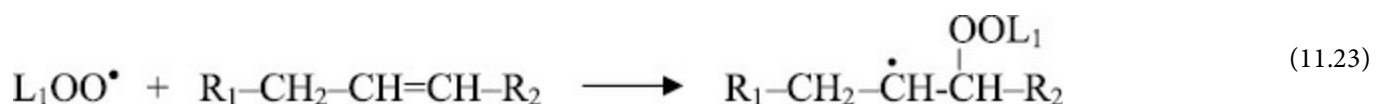
As reações de ciclização interna apresentam razoável rapidez (Kochi, 1962; Porter, 1990). Suas velocidades – $k(LOO^{\bullet}) \sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ e $k(LO^{\bullet}) \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ – são comparáveis à velocidade da abstração de hidrogênio, principalmente nos ácidos graxos com três ou mais duplas ligações; por essa razão, as condições da reação é que irão determinar a via dominante nos óleos e alimentos.

A ciclização é favorecida quando o teor de oxigênio é limitado (Van Sickle *et al.*, 1967) e não há hidrogênios abstraíveis disponíveis; por exemplo, nos solventes apróticos (Kochi, 1962) e quando a concentração de lipídeos é baixa (Van Sickle *et al.*, 1967). Quando os lipídeos estão dissolvidos em solventes apróticos, como o clorofórmio ou a acetonitrila em baixas concentrações, e são armazenados em temperatura ambiente ou moderadamente elevada, como nos experimentos de oxidação lipídica típicos, os hidrogênios abstraíveis externos estão ausentes ou são limitados; portanto, a ciclização é a única reação ativa (Haynes e Vonwiller, 1990). Nos lipídeos puros ou óleos, os hidrogênios abstraíveis estão prontamente disponíveis e próximos; como consequência, a abstração compete com a ciclização para gerar produtos mistos cujas porcentagens variam com a temperatura e com a extensão da oxidação. Em óleos e em ácidos graxos, já foram registradas porcentagens de ciclização que variaram de 30% a 100% (Schaich, 2005b). A ciclização também é favorecida pelas temperaturas moderadamente elevadas (por exemplo, 40°C) (Bors *et al.*, 1984) e pela orientação da cadeia do lipídeo (Wu *et al.*, 1977). Na verdade, epóxidos já foram identificados como os produtos dominantes da oxidação lipídica em monocamadas superficiais (por exemplo, no óleo que é pulverizado sobre a superfície de alguns alimentos ou que a cobre) e no interior de membranas. A propagação por meio de rearranjos internos diminui com a temperatura, porque os radicais peroxila epidióxi e epóxi têm uma tendência crescente de formar dímeros, em vez de abstrair hidrogênios (Schaich, 2005b).

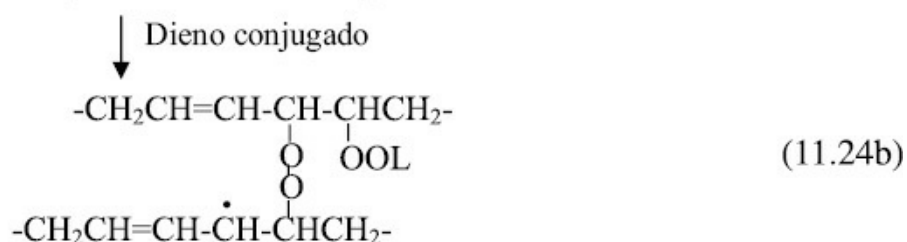
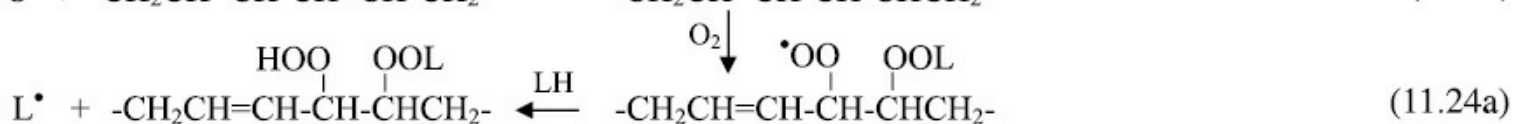
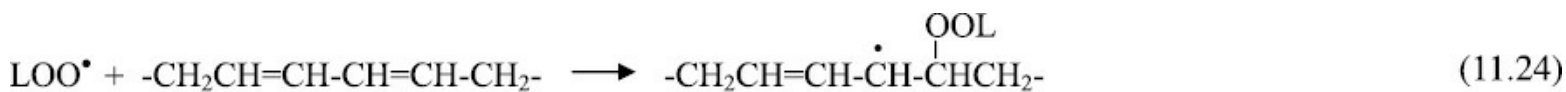
Um comentário final sobre os produtos cíclicos da oxidação lipídica: eles são altamente reativos, por isso, muitas vezes é difícil detectá-los. Os radicais epidióxido- OO^{\bullet} , em particular, propensos à dimerização até em calor moderado (Neff *et al.*, 1988), e os dímeros com frequência se decompõem ainda mais. Os epóxidos reagem muito rapidamente com as proteínas de sistemas complexos e, assim, desaparecem dos extratos lipídicos. Por essa razão, muitas vezes é necessário procurar indícios de epidióxidos e epóxidos para determinar a participação dessas substâncias na oxidação lipídica de alimentos e tecidos biológicos.

3. Adição

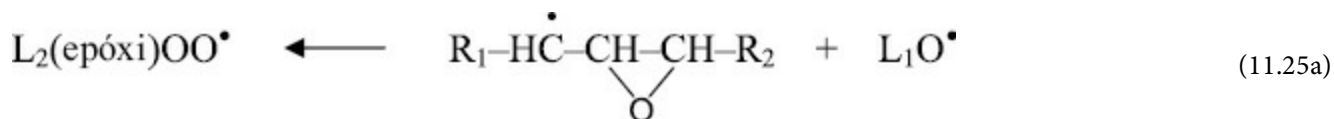
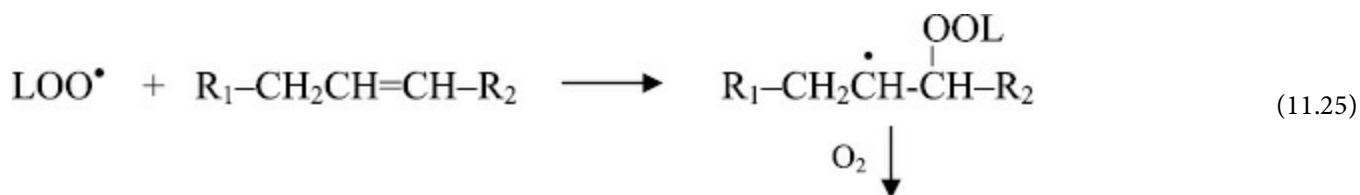
Os radicais peroxila de lipídeos têm uma forte atração por duplas ligações e ligam-se a elas com relativa facilidade, transferindo o elétron desemparelhado para o segundo carbono da dupla ligação:



Essa terceira via de propagação tem dois desfechos possíveis. O mais óbvio é a formação de dímeros e polímeros quando o grupo peroxila permanece intacto. Essa reação é favorecida pela ligação desse radical a duplas ligações conjugadas (ver a série de Reações 11.24); o propagador da cadeia é o novo radical peroxila formado no segundo carbono da dupla ligação. Esse radical peroxila abstrai hidrogênios, formando novos hidroperóxidos (Reação 11.24a), ou se liga a outra dupla ligação (Reação 11.24b), levando, por fim, ao surgimento de polímeros longos e ao aumento da viscosidade característicos dos óleos muito oxidados (Witting *et al.*, 1957; Privett, 1959; Sims e Hoffman, 1962). As contribuições das dimerizações do radical peroxila aumentam com a oxidação, porque os hidrogênios duplamente alílicos abstraíveis são removidos durante as reações iniciais e o sistema de duplas ligações é desviado para o sistema conjugado.



A reação é diferente quando o radical peroxila se liga a duplas ligações isoladas ou não conjugadas, como no ácido oleico ou no ácido linoleico não oxidado, respectivamente (Reação 11.25) (Schaich, 2005b). Nesse caso, o aduto com o radical peroxila decompõe-se, formando um epóxido e um radical alílico e liberando um radical alcoxila (Reação 11.25a). A cadeia é propagada pelo radical alcoxila e pelo novo radical epoxiperoxila formado na presença de oxigênio (Reação 11.25a). Essa é uma reação de ramificação verdadeira, visto que dois radicais propagadores novos (LO^\bullet e epóxiOO^\bullet) com maior reatividade são gerados a partir do radical peroxila inicial.



Os radicais alcoxila ligam-se a duplas ligações (Reação 11.26), mas sem facilidade, porque são fortes abstratores de hidrogênios e sofrem ciclização com muita rapidez, formando epóxidos (Schaich, 2005b). Essa ligação do radical alcoxila é favorecida pela ausência de hidrogênios alílicos e pela conjugação, condições que apenas se mantêm após a oxidação estar razoavelmente bem estabelecida. Por essa razão, a propagação pela ligação do radical alcoxila é mais ativa na catálise da ramificação das cadeias que ocorre nas etapas secundárias da oxidação. Além disso, o radical alcoxila liga-se apenas às duplas ligações *cis* (Walling e Thaler, 1961), ao contrário do radical peroxila, que é capaz de se ligar às duplas ligações *cis* e *trans*.

Note que, em ambas as reações, oxigênio é liberado de volta para o espaço livre do interior da embalagem, ou para a amostra, fornecendo combustível que mantém a cadeia de radicais. Portanto, esse pode ser um modo importante de prolongar a oxidação lipídica mesmo quando o oxigênio se torna limitado nas amostras. Paradoxalmente, a liberação de oxigênio também pode confundir as análises da oxidação lipídica por meio do consumo de oxigênio, ao entrever que a oxidação desacelerou quando, na verdade, está apenas deixando de ser mediada pelo radical peroxila, passando a ser mediada pelo radical alcoxila. A reciclagem do oxigênio explica, em parte, por que o consumo de oxigênio parece desacelerar enquanto a oxidação avança, conforme será discutido na subseção C, a seguir.

Favorecido pelo alto teor de oxigênio, que aumenta o radical ROO•, o desproporcionamento é mais importante nas etapas secundárias da oxidação ou durante a oxidação térmica. Ele ocorre apenas em óleos puros oxidados ou em solventes apróticos. Em solventes polares, como os alcoóis, ou em sistemas aquosos, como as emulsões, a decomposição de radicais ROO• aumenta de forma considerável, a reação preferida dos radicais ROO• muda, ocorre uma liberação direta de oxigênio (ROO• → R•) e o desproporcionamento passa a ser um processo de terminação, em vez de um processo de propagação (Walling *et al.*, 1970; Heijman *et al.*, 1985). O aumento de solvente ou da viscosidade do sistema também faz a terminação prevalecer sobre a propagação, ao tornar lento o movimento dos radicais e inibir a Reação 11.19 (Hiatt e Traylor, 1965).

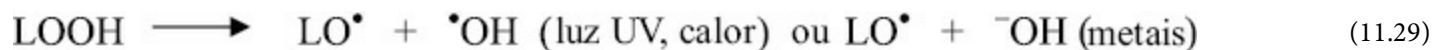
C. Progressão e cinética da oxidação lipídica

1. Progressão da oxidação lipídica

Um dos aspectos mais desafiadores da oxidação lipídica é o fato de ela ser uma reação indefinida. A maioria das reações químicas tem um início conhecido e produtos finais fixos. No entanto, os precursores da oxidação lipídica estão sempre presentes nos alimentos, e a velocidade da reação, vias da reação e os produtos mudam com o passar do tempo. Por isso, a oxidação lipídica é uma mistura crescente de reações que criam um processo dinâmico e em constante mudança.

Os hidroperóxidos (LOOH) são os primeiros produtos estáveis e se decompõem, dando continuidade à oxidação. Por essa razão, é comum a oxidação lipídica ser descrita em função das reações dos hidroperóxidos. Normalmente, a oxidação é dividida em três períodos de velocidade (Labuza, 1971):

- Período de indução: níveis muito baixos de oxidação; o LOOH e outros produtos formados não são detectados.
- Período de velocidade monomolecular: engloba as etapas iniciais da oxidação até ~1% de oxidação; os LOOH acumulam-se lentamente e se decompõem, formando moléculas únicas, isoladas (Reação 11.29); o radical LOO• é o principal propagador de cadeia nas etapas iniciais; os radicais LOO• e LO• tornam-se propagadores de cadeias à medida que a oxidação se estabelece.



- Período de velocidade bimolecular: engloba as etapas mais avançadas da oxidação lipídica até ~7%-15% de oxidação; os LOOH acumulam-se rapidamente até atingir níveis elevados e começam a se decompor por meio de interações LOOH ou LOOH + LOO•, conforme mostrado nas Reações 11.2 e 11.3, respectivamente. Contudo, as reações do radical LO• são muito mais rápidas e específicas; por essa razão, o radical LO• se torna o propagador de cadeia dominante e controla as direções das reações ao longo do período de velocidade

bimolecular.

Esses três períodos de velocidade estão conceitualmente integrados na progressão das reações individuais da iniciação, propagação e terminação da oxidação lipídica da Figura 11.9. Os intermediários ou produtos utilizados para medir a extensão da oxidação lipídica em alimentos e materiais biológicos foram incluídos na Figura 11.9.

O consumo de oxigênio revela os primeiros eventos da oxidação lipídica e reflete a velocidade da iniciação; vale destacar que esse consumo não depende dos produtos e das vias, por isso, é um reflexo real da fase inicial da oxidação. O consumo de oxigênio continua durante toda a oxidação, mas seu uso prático termina quando o oxigênio torna-se limitante no espaço livre do interior da embalagem ou quando os radicais peroxila se acumulam até níveis que liberam quantidades excessivas de oxigênio de volta para o espaço livre da embalagem.

Os dienos conjugados, a primeira alteração química dos lipídeos, e os hidroperóxidos correspondentes também são indicadores da fase inicial da oxidação lipídica e continuam a ser bons indicadores pelo menos até os hidroperóxidos começarem a se decompor bimolecularmente. Pelo fato de o oxigênio se ligar aos ácidos graxos e se desprender deles repetidas vezes durante o período de indução até o aparecimento de um doador de hidrogênio, o surgimento dos hidroperóxidos deixará os dienos conjugados para trás; e os dienos conjugados durarão mais tempo que os hidroperóxidos, por permanecerem intactos em muitos produtos. Contudo, tanto os dienos conjugados quanto os hidroperóxidos decompõem-se à medida que a oxidação lipídica avança; assim, são úteis para acompanhar o avanço das reações das etapas iniciais e avaliar continuamente, com o passar do tempo. Porém, a quantificação dessas substâncias não fornece dados precisos sobre a extensão da oxidação nas etapas mais avançadas ou em amostras isoladas.

Tradicionalmente, prevê-se que produtos secundários como aldeídos e epóxidos, outras substâncias voláteis, o escurecimento e dímeros/polímeros surjam somente após a decomposição dos hidroperóxidos, conforme mostrado na Figura 11.9. De fato, muitos estudos relataram esse padrão. No entanto, a detecção tardia pode ter resultado do uso de metodologias insensíveis e de intervalos longos entre as coletas das amostras. Estudos recentes que utilizaram a cromatografia a gás e a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), modernas e mais sensíveis, com detecção por espectrometria de massas, assim como novas análises químicas com precisão em nível nanomolar, encontraram produtos secundários formados em paralelo com os hidroperóxidos, como seria de se esperar a partir do esquema integrado de reações da Figura 11.5. Portanto, o gráfico da Figura 11.9 deve ser visto apenas como um guia útil. Mais pesquisas com análises simultâneas de vários produtos serão necessárias para determinar se o gráfico é preciso da forma como foi desenhado e como a curva de cada produto muda em alimentos diferentes e em condições de reação distintas. A abordagem mais segura é sempre acompanhar a oxidação lipídica, analisando, simultaneamente, vários produtos oriundos de etapas e vias diferentes, para obter um quadro preciso da extensão e do progresso da oxidação.

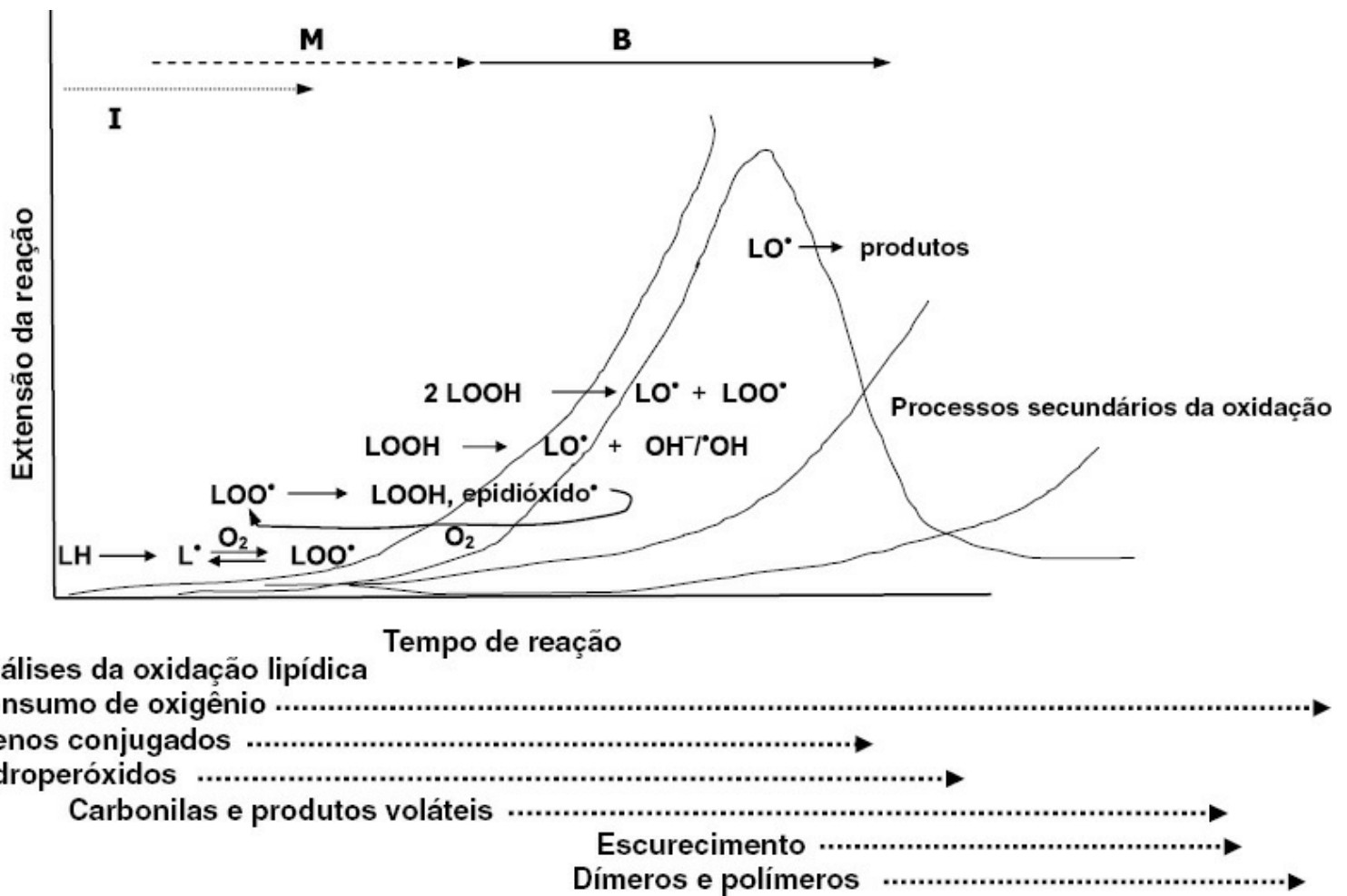


FIGURA 11.9 Representação esquemática das alterações que ocorrem nas reações e produtos dominantes da oxidação lipídica, conforme descrito tradicionalmente. Em geral, identificam-se três períodos diferentes de velocidade: período de indução (I), período de velocidade monomolecular (M) e período de velocidade bimolecular (B). Abaixo do gráfico estão os intermediários e os produtos utilizados para medir a oxidação lipídica em etapas diferentes. É esperado que os produtos secundários surjam apenas depois da decomposição dos hidroperóxidos; contudo, isso não é válido para todos os sistemas. Para fazer uma análise precisa da extensão da oxidação, é preciso medir vários produtos em todos os pontos.

2. Cinética da oxidação lipídica

Alguns aspectos da cinética da oxidação lipídica precisam ser abordados aqui para que se possa compreender as forças propulsoras que estão subjacentes ao processo da oxidação lipídica. É preciso desenvolver equações de velocidade para explicar as condições de cada sistema individual; por isso, essas equações podem se tornar bastante complexas, sendo diferentes em cada referência. Para ilustrar os princípios, apresentaremos aqui apenas abordagens muito gerais.

Quando a pO_2 está baixa, e durante a fase inicial da oxidação (decomposição monomolecular dos LOOH), a reação depende diretamente do oxigênio e da velocidade da iniciação. Assim, a velocidade global da oxidação lipídica pode ser expressa de forma simples, como apresentado a seguir:

$$\text{Velocidade da oxidação } (pO_2 \text{ baixa}) = k_o(k_i/2k_{t1})^{1/2}[\text{LH}][\text{O}_2] \quad (11.30)$$

na qual as constantes de velocidade se referem às reações de oxigenação, iniciação e terminação correspondentes da Figura 11.1. Portanto, a velocidade global reflete o equilíbrio entre as reações da iniciação (k_i) e a terminação (k_t) do radical alquila (L^\bullet), principalmente por recombinação. Supondo que os iniciadores sejam ubíquos, os radicais L^\bullet serão gerados de maneira constante, e a etapa limitante da velocidade, quando as concentrações de oxigênio

forem baixas, será a formação dos radicais peroxila necessários para a propagação; esse processo depende da presença e da difusão de oxigênio até os sítios do radical.

Quando a pO_2 é moderada a alta, há oxigênio suficiente para se ligar a cada radical L^\bullet formado; dessa forma, a velocidade deixa de depender do oxigênio e passa a depender da concentração dos lipídeos oxidáveis disponíveis e dos processos de propagação que envolvem os LOOH:

$$\text{Velocidade da oxidação } (pO_2 \text{ não limitante}) = k_p(k_i/2k_{t3})^{1/2}[\text{LOOH}]^{1/2} [\text{LH}] \quad (11.31)$$

Sob essas condições, a velocidade global é proporcional ao lipídeo disponível (quantidade total e grau de insaturação) somado às concentrações de LOOH em propagação e é controlada pelo equilíbrio entre a iniciação, a propagação e a recombinação dos radicais peroxila. A etapa limitante da velocidade é a abstração de hidrogênios para formar e acumular LOOH. Assim, embora não apareçam nas equações da velocidade nem sejam medidos, fatores como luz, calor e contaminantes metálicos que aumentam a decomposição dos LOOH e intensificam a ramificação das cadeias ou que, de maneira inversa, interferem na propagação das cadeias (por exemplo, antioxidantes ou alvos da cooxidação, como as proteínas) também influenciam fortemente a velocidade das reações.

No período de velocidade monomolecular, a cinética da oxidação pode ser descrita pela Equação 11.30 ou 11.31, ou pela combinação das constantes de velocidade:

$$\text{Velocidade da oxidação} = -dO_2/dt = K_M [\text{ROOH}]^{1/2} \quad (11.32)$$

na qual K_M é a constante da velocidade monomolecular. O valor de K_M pode ser facilmente determinado pelo gráfico da raiz quadrada dos valores do peróxido *versus* o tempo na fase inicial da oxidação: a inclinação corresponde a $K_M/2$. Os valores mais comuns são $[10^{-2}$ a 10^{-3} mols oxidados/mol de lipídeo] $^{1/2}$ por hora (Labuza, 1971).

Contudo, no período de velocidade bimolecular, os lipídeos são consumidos rapidamente, formando hidroperóxidos que, de modo subsequente, decompõem-se aos pares; nessa fase, a oxidação torna-se mais complicada. Ao adicionar a decomposição bimolecular dos LOOH, a velocidade geral, então, torna-se proporcional a $[\text{LOOH}]^2$:

$$\text{Velocidade da oxidação} = \frac{k_p k_i^{1/2}}{(2k_{t1-3})^{1/2}} [\text{LH}] [\text{LOOH}] \quad (11.33)$$

$K_B =$ constante de velocidade bimolecular global

Nesse caso, tanto LH quanto LOOH estão mudando com rapidez. Um gráfico semilog de $[\text{LOOH}]/[\text{LH sem reagir}]$ *versus* tempo da reação dá origem a uma curva na qual a inclinação final corresponde a K_B . As inclinações inicial e final diferenciam o período de velocidade monomolecular do período de velocidade bimolecular para um sistema.

IV. QUE FATORES CONTROLAM A OXIDAÇÃO LIPÍDICA?

Os mecanismos já comentados continuarão a ser apenas um conjunto de reações teóricas até que sejam associados a sistemas reais. A oxidação que ocorre em sistemas alimentares e biológicos é muito mais complicada que as reações descritas aqui, porque esses sistemas têm estrutura complexa, com muitos catalisadores, alvos de oxidação e antioxidantes; e todos esses fatores interagem, influenciando a cinética final, as vias e a extensão da oxidação lipídica. Este capítulo apresentará os fatores mais importantes que influenciam a oxidação lipídica na forma de um guia para a análise de cada sistema alimentar ou biológico e a identificação de quais fatores pró-oxidantes e antioxidantes estão ativos. Os efeitos da composição lipídica, da estrutura física do produto, da presença de catalisadores, antioxidantes e alvos sensíveis da cooxidação, além dos fatores ambientais, precisam ser levados em conta quando se quer formular e processar um produto – tendo em vista a estabilidade – analisar a presença da oxidação lipídica e, por fim, desenvolver estratégias de estabilização eficazes. Estas últimas serão discutidas na seção VI.

Os fatores que afetam a oxidação lipídica são divididos em cinco categorias gerais (Tabela 11.1): natureza dos lipídeos, superfícies, presença de outros compostos pró-oxidantes e antioxidantes, condições ambientais e sistema solvente. Somente os principais efeitos serão discutidos aqui, na forma de uma introdução.

TABELA 11.1 Fatores que influenciam a velocidade e o curso da oxidação lipídica

Natureza dos lipídeos	Grau de insaturação	
	Ácidos graxos livres <i>versus</i> ésteres <i>versus</i> TAGs	
	<i>trans</i> <i>versus</i> <i>cis</i>	
	Conjugação	
	Fosfolipídeos	
Efeitos da superfície	Espalhamento em monocamada	
	Emulsões	
	Lipídeos puros	
Presença de catalisadores	Pró-oxidantes	Hidroperóxidos pré-formados
		Metais
		Porfirinas, por exemplo clorofila
		Compostos com heme
	Enzimas	Lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase, xantina oxidase
	Aminoácidos	
	Ácido ascórbico (concentrações baixas)	
Presença de inibidores	Antioxidantes (endógenos e adicionados)	
	Polifenóis	
	Quelantes de metais e formadores de complexos com metais	
	Sinergistas	
	Aminoácidos	
	Enzimas	Glutathione peroxidase
	Interceptores	Proteínas
		DNA
		Vitaminas
		Pigmentos

Ambiente e solvente	Temperatura
	Luz
	Pressões do oxigênio
	Água
	pH
	Solvente
	Embalagem

TAGs: triacilgliceróis.
 Extraído e modificado de Schaich (2005a).

A. Natureza dos lipídeos

1. Grau de insaturação

O número de hidrogênios duplamente alílicos com alta abstração aumenta com o número de duplas ligações; portanto, não é de surpreender que a oxidabilidade dos ácidos graxos de óleos aumente com o grau de insaturação (Tabela 11.2). Em particular, a presença de ácidos graxos com três ou mais duplas ligações – ácido linolênico, nos óleos vegetais, ácido araquidônico, nas gorduras animais e ácidos docosa-hexaenoico e eicosapentaenoico, nos óleos de peixe, tornam os óleos muito mais sensíveis à oxidação rápida. No entanto, o grau do aumento não é proporcional ao número de duplas ligações, porque cada dupla ligação provoca uma curvatura na cadeia do ácido graxo, e a dificuldade para alinhar as cadeias, de modo que os hidrogênios alílicos fiquem justapostos, diminui a velocidade de abstração dos hidrogênios. Além disso, com quatro ou mais duplas ligações, as cadeias acila curvam-se sobre si mesmas, de modo que as metades opostas da molécula se alinham e facilitam as abstrações intramoleculares de hidrogênio, que competem com as transferências intermoleculares de radicais. Portanto, cada dupla ligação extra aumenta cada vez menos a velocidade da oxidação, por aumentar o número de oxidações dentro das moléculas, reduzindo o número total de moléculas de lipídeo afetadas.

2. Ácidos graxos livres versus ésteres versus triacilgliceróis

Já foram relatados efeitos pró-oxidantes e antioxidantes de ácidos graxos, mediados principalmente pelo grupamento ácido; por isso, é provável que os efeitos específicos dos ácidos graxos livres reflitam a composição e o ambiente do alimento ou do sistema de reações no qual eles são produzidos.

Há muito se sabe que os ácidos graxos livres, muitas vezes, oxidam mais lentamente que seus ésteres (Tabela 11.2). Isso se dá, em grande parte, por causa da decomposição não radicalar dos hidroperóxidos pelos grupamentos ácidos (Figura 11.10). O H⁺ ácido, proveniente dos ácidos graxos ionizados, liga-se ao –OOH do hidroperóxido e induz um rearranjo nucleofílico que resulta na cisão da cadeia em ambos os lados do carbono da peroxila. Os produtos são dois aldeídos, como mostra a Figura 11.10, ou um aldeído e um álcool (Uri, 1961; Scott, 1965). A decomposição do LOOH também é induzida pela ligação de hidrogênio entre ácidos não dissociados (–COOH) e –OOH (Sliwiok *et al.*, 1974). Essas reações impedem a ramificação da cadeia e desaceleram a oxidação global.

TABELA 11.2 Efeitos do grau de insaturação sobre a oxidabilidade relativa dos ácidos graxos

Ácido graxo	Velocidade relativa da oxidação	
	Ácido graxo	Éster
18:1	1	1

Extraído de Schaich (2005b), dados de Scott (1963); utilizado com permissão.



FIGURA 11.10 Decomposição não radicalar de hidroperóxidos de lipídeos por ácidos (ácidos graxos) e nucleófilos (fosfolipídeos, principalmente fosfatidilcolina). Essas vias são responsáveis em parte pelas velocidades mais baixas da oxidação. Figura extraída de Schaich (2005a); redesenhada de O'Brien (1969); utilizada com permissão.

Os ácidos carboxílicos também são excelentes formadores de complexos com metais e são agentes ativos de superfície. Dependendo do sistema, essas características são complementares ou antagonistas. A formação de complexos bloqueia a transferência de elétrons entre os orbitais dos metais e, geralmente, diminui o potencial redox, o que deve reduzir a velocidade da oxidação. Os ácidos graxos são capazes de levar os metais até as interfaces, para longe dos alvos com dupla ligação dos óleos puros, mas se os hidroperóxidos e outros alvos de metais se concentrarem na interface, a oxidação sofrerá uma grande aceleração. Movendo-se na direção oposta, os ácidos graxos captam os metais das interfaces com fases aquosas e transporta-os para o interior dos óleos puros, com sua polaridade atraindo fortemente os metais para as duplas ligações polares, iniciando a oxidação. Como os efeitos dos ácidos graxos livres são imprevisíveis, a conduta mais segura é limitar sua adição ou impedir sua formação o máximo possível.

Sem um grupo carboxila livre para induzir a decomposição dos LOOH, a oxidação aumenta com o número de duplas ligações de ésteres e acilgliceróis e com o grau de esterificação dos acilgliceróis (Tabela 11.3) (Cosgrove *et al.*, 1987). Os triacilgliceróis oxidam mais rápido que os ácidos graxos livres, porém oxidam muito mais devagar que os ésteres livres, porque a organização e a orientação irregular das cadeias de ácidos graxos dos triacilgliceróis impedem o alinhamento estreito e, como consequência, inibem a transferência de átomos de hidrogênio entre as cadeias (Carless e Nixon, 1960) e limitam o acesso dos iniciadores às duplas ligações. O arranjo dos ácidos graxos nos cristais de triacilglicerol também influencia a oxidação: a concentração de ácidos graxos insaturados na posição *sn-2* estabiliza os triacilgliceróis, enquanto a presença de insaturação nas posições *sn-1* e *sn-3* intensifica a oxidação e a distribuição aleatória dos triacilgliceróis diminui a oxidação (Raghuveer e Hammond, 1967). A estrutura simétrica SIS ou ISI favorece as estruturas cristalinas do tipo b, nas quais a estreita associação entre as cadeias facilita a transferência de radicais. Por outro lado, a distribuição aleatória favorece as estruturas do tipo a com

menos organização e, dessa forma, interfere na transferência dos radicais.

3. Isômeros *trans* versus isômeros *cis*

As lições aprendidas nas aulas de química orgânica aplicam-se bem à oxidação lipídica. Nos ácidos graxos *cis*, os hidrogênios alílicos das duplas ligações do tipo *cis* estão mais expostos e são mais acessíveis à abstração que os hidrogênios correspondentes dos isômeros *trans*. Assim, os ácidos graxos *cis* oxidam-se mais facilmente que suas contrapartes *trans* (Sargis e Subbaiah, 2003). Esse padrão de reatividade explica, em parte, por que a oxidação lipídica é inicialmente rápida e então desacelera com o passar do tempo. Isto é, as duplas ligações *cis* reativas que migram quando um radical de lipídeo é formado se convertem nos isômeros *trans* menos reativos, conforme foi explicado na seção III, A, 2, b. A reatividade *trans* diminuída também tem consequências distintas sobre as oxidações secundárias e sobre a ação *in vivo* dos ácidos graxos *trans* da dieta (Pokorny *et al.*, 1976b).

4. Conjugação

A conjugação dos ácidos graxos tem efeitos muito interessantes sobre a oxidação dos lipídeos. As duplas ligações não conjugadas normais tendem a atrapalhar as associações das cadeias acila. Por outro lado, a conjugação de duplas ligações endireita a cadeia acila e possibilita a formação de associações mais íntimas entre cadeias, facilitando as abstrações de hidrogênio. No entanto, os hidrogênios duplamente alílicos necessários estão ausentes nos sistemas conjugados e, por essa razão, reagem mais lentamente na fase inicial da oxidação. Entretanto, conforme discutido nas seções sobre as reações alternativas, os sistemas conjugados facilitam os rearranjos internos e as adições de radicais; por isso, exercem efeitos direcionadores decisivos sobre as vias das reações e a distribuição dos produtos nas etapas secundárias da oxidação. Os efeitos da conjugação passam despercebidos ou são interpretados de forma muito incorreta, se apenas os valores do peróxido forem analisados.

TABELA 11.3 Oxidabilidade dos lipídeos

	Oxidabilidade ($M^{-1/2} s^{-1/2} \times 10^2$)
Ácidos graxos livres	2,03
Monoacilglicerol	2,83
Diacilglicerol	5,89
Triacilglicerol	7,98

5. Fosfolipídeos

Embora as cadeias acila dos fosfolipídeos sigam o mesmo padrão de oxidação dos triacilgliceróis e dos ácidos graxos/ésteres – a oxidação aumenta com o aumento do número de insaturações dos ácidos graxos componentes –, o comportamento oxidativo dos fosfolipídeos, presentes em óleos como contaminantes ou como emulsificantes de produtos multifásicos, é complexo. Os demais componentes do fosfolipídeo participam da reação, e a composição dos ácidos graxos dos fosfolipídeos, em relação aos outros lipídeos do sistema, também afeta a reatividade. Por isso, os fosfolipídeos agem como pró-oxidantes ou antioxidantes, dependendo do sistema e da concentração (Nwosu *et al.*, 1997).

a. Efeitos pró-oxidantes

Os ácidos graxos dos fosfolipídeos são muito insaturados – nos tecidos animais, a presença do ácido araquidônico

é usual – e as cadeias acila dos ácidos graxos dos fosfolipídeos estão bastante orientadas nas membranas e nas interfaces, o que facilita a transferência de elétrons por meio das duplas ligações alinhadas (Weenan e Porter, 1982). Esses dois fatores contribuem para a oxidação muito rápida dos fosfolipídeos, principalmente da fosfatidiletanolamina – que tem a insaturação mais alta. Nos sistemas mistos, há uma preferência pela oxidação dos fosfolipídeos e os radicais gerados dão início à oxidação dos triacilgliceróis (Nwosu *et al.*, 1997). Os fosfolipídeos ligam-se a grandes quantidades de água (por exemplo, cada molécula de fosfatidilcolina liga-se a 37 moléculas de água) e essa água de hidratação permite que eles mobilizem catalisadores. Os fosfolipídeos também ativam metais e, com eles, formam complexos (Nwosu *et al.*, 1997), movendo-os das fases aquosas para as fases lipídicas.

b. Efeitos antioxidantes

Nos sistemas mistos, os fosfolipídeos exercem um efeito “protetor” sobre os triacilgliceróis das fases oleosas. Expostos aos catalisadores nas interfaces (Bishov *et al.*, 1960), os fosfolipídeos sofrem preferencialmente oxidação, de acordo com as insaturações (Sugino *et al.*, 1997). Essa ação poderia ser pró-oxidante, mas a associação dos fosfolipídeos em bicamadas ou mesofases isola os radicais de lipídeos e limita a interação com a fase oleosa. A alta viscosidade das bicamadas diminui a migração dos catalisadores, as transferências de radicais e a propagação das cadeias, enquanto acelera as terminações (Barclay e Ingold, 1981). Os fosfolipídeos também agem como cossolventes para antioxidantes, aumentando a acessibilidade do tocoferol e de outros antioxidantes aos radicais iniciadores de cadeias nos microambientes aquosos (Koga e Terao, 1995).

Contudo, o principal efeito antioxidante dos fosfolipídeos é, de longe, a decomposição não radicalar do LOOH pelo grupo colina nucleofílico $[-N^+(CH_3)_3]$ da lecitina (Figura 11.11, reação à esquerda), que interrompe a cadeia de radicais e bloqueia novas reações (O'Brien, 1969; Corliss e Dugan, 1971). No entanto, a ação não interrompe a iniciação, havendo acúmulo de dienos conjugados, ou produtos de vias alternativas que não serão detectados, se a oxidação lipídica dos sistemas que contêm fosfolipídeos for medida apenas com o valor dos peróxidos.



FIGURA 11.11 Efeitos da espessura do filme sobre a oxidação dos lipídeos espalhados sobre uma superfície. A oxidação máxima ocorre quando a espessura do filme corresponde aproximadamente a uma monocamada molecular de lipídeos. Figura extraída de Schaich (2005a); redenhada de Koch (1962); utilizado com permissão.

Esses efeitos mistos provam novamente que para se ter um quadro preciso da extensão e do progresso da oxidação lipídica esse processo deve sempre ser acompanhado por meio da análise de vários produtos de diferentes etapas e vias.

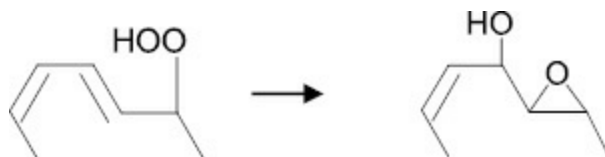
c. Efeitos mistos

Por se ligarem a metais e também à água, os fosfolipídeos são pró-oxidantes ou antioxidantes, ou ambos, dependendo do sistema. Embora os efeitos sobre a oxidação já tenham sido determinados, ainda há pouca informação sobre a ligação dos fosfolipídeos a metais. Alguns sugerem que quando os orbitais ligantes do metal são preenchidos por fosfolipídeos, quando o potencial redox está diminuído até um valor fora do intervalo de ação dos agentes redutores presentes ou quando os fosfolipídeos levam os metais para longe dos sítios reativos, as ações inibem a oxidação (Chen e Nawar, 1991; Yoshida *et al.*, 1991). Contudo, a ligação do fosfolipídeo a um metal acelerará a oxidação, se o potencial redox do metal estiver diminuído em um sistema com LOOH, e o metal e o LOOH estiverem ambos concentrados nas interfaces. O metal, então, catalisa a cascata de decomposição do LOOH e geração de radicais LO^{\bullet} . A ligação do fosfolipídeo à água por meio do grupo fosfato será protetora, ao estabilizar o LOOH e os metais (impedindo a decomposição e a transferência de elétrons, respectivamente), ou destrutiva, ao ativar a transferência de elétrons oriundos dos metais ou facilitar o contato entre os metais e o LOOH. Os efeitos específicos são determinados, principalmente, pela natureza específica do alimento ou do sistema de reações, e essa é uma das razões por que já foram relatados tantos efeitos diferentes dos fosfolipídeos.

B. Efeitos da superfície

A oxidação lipídica é evidente nos óleos puros, mas os alimentos são complexos, têm várias fases e estruturas complexas. Como a forma do lipídeo e sua organização em uma matriz alimentar afetam a oxidação? Todas as matrizes alimentares têm superfícies, tanto sólidas quanto líquidas, que governam a exposição e a organização molecular dos lipídeos, bem como seu contato com pró-oxidantes e antioxidantes. Alguns especialistas chegam a afirmar que todo o processo da oxidação ocorre nas superfícies ou interfaces, mas o ponto de vista é controverso. Já se sabe que a velocidade da oxidação lipídica aumenta com a área da superfície (Bishov *et al.*, 1960). No caso dos lipídeos espalhados sobre uma superfície sólida, como uma matriz alimentar desidratada ou a superfície de bolachas do tipo *cream crackers* ou de salgadinhos, a oxidação máxima ocorre quando o espalhamento forma praticamente uma monocamada de moléculas de lipídeo sobre a matriz sólida (Koch, 1962) (Figura 11.11). Quando a cobertura corresponde a uma monocamada, a área da superfície e a exposição ao oxigênio são máximas para um filme lipídico. Quando a cobertura é menor, há uma separação das moléculas do lipídeo e, por consequência, as transferências de radicais não ocorrem com facilidade. Já uma cobertura com várias camadas força as moléculas do lipídeo a competir pela transferência de radicais, intensifica as reações colaterais que reduzem a eficiência da cadeia de radical primária e aumenta a espessura por meio da qual o oxigênio precisa se difundir. Quando o volume do óleo puro aumenta mais, a difusão do oxigênio e as características interfaciais passam a ser os fatores controladores, e a velocidade da oxidação declina (Mikula e Khayat, 1985).

Os filmes e as superfícies alteram as vias e a cinética da oxidação. O espalhamento de baixas concentrações de um lipídeo em filmes orienta as cadeias, mas restringe a mobilidade migratória dos hidrogênios, dificultando bastante as reações de abstração. Assim, a recombinação de radicais prevalece sobre a abstração de hidrogênios como reação inicial e, como reações secundárias, ocorrem rearranjos do radical LOO^{\bullet} e do LOOH, formando hidroxiepóxidos, endoperóxidos e produtos similares (Reação 11.34), em vez da decomposição no radical LO^{\bullet} (Slawson *et al.*, 1973). Como resultado, observam-se menos produtos que em sistemas de emulsões ou óleo puro, sendo, em sua maioria, produtos de ciclização interna (Leermakers *et al.*, 1966; Porter *et al.*, 1971; Wu *et al.*, 1978).



(11.34)

A oxidação lipídica é, sem dúvida, considerada mais rápida nas emulsões, que têm a maior área de superfície de lipídeos, a maior difusão de oxigênio e a maior interface com a fase aquosa, na qual estão várias fontes de prótons e catalisadores (Tabela 11.4). Não se pode afirmar de modo categórico que as emulsões oxidam mais rapidamente que os filmes superficiais por espalhamento, já que os sistemas individuais variam sobremaneira, e as velocidades relativas da oxidação são afetadas por muitos fatores, além das superfícies. Certamente, há mais lipídeos para manter a oxidação nas emulsões, enquanto o suprimento de LH nos filmes é limitado; por essa razão, a oxidação secundária é mais extensa nas emulsões. Mesmo assim, a fase inicial da oxidação pode ser mais rápida em alguns filmes que nas emulsões. Para os fins dessa discussão, basta observar que qualquer sistema com grande superfície de exposição, sólida ou líquida, tem um potencial muito alto de sofrer oxidação lipídica rápida.

TABELA 11.4 Efeitos da superfície sobre as constantes da velocidade global da oxidação lipídica, durante os períodos de velocidade monomolecular (K_M) e bimolecular (K_B)

Sistema linoleato de metila	$K_M (\times 10^{-3})$	$K_B (\times 10^{-2})$
Puro	13	6,4
Papel de filtro – molhado	20	6,8
Papel de filtro – seco	7	4,6
Emulsão	32	8,5
TAG disperso sobre celulose	1,7	0,8

TAG: triacilglicerol.

Dados extraídos de Labuza (1971); extraído de Schaich (2006); utilizado com permissão.

A oxidação lipídica das emulsões difere daquela dos sistemas de filme seco, uma vez que os efeitos moduladores da água, os agentes emulsificantes e a natureza da interface competem com a dispersão e aumento da área de superfície. Por isso, a formulação e até o método de preparação de uma emulsão podem ter efeitos pró-oxidantes e antioxidantes acentuados sobre sua estabilidade oxidativa. Em geral, a diminuição do tamanho das gotículas (aumento da área de superfície) e o aumento da quantidade de água e da concentração dos agentes emulsificantes (Hyde, 1968) intensificam a iniciação na superfície das gotículas de óleo (Labuza, 1971). No entanto, demonstrou-se, recentemente, que o tipo de emulsificante presente exerce um controle importante sobre a oxidação ao alterar ou facilitar as associações moleculares específicas. Por exemplo, quando a lecitina é o emulsificante, as velocidades aparentes da oxidação nas emulsões são menores que as velocidades nas superfícies de espalhamento, por causa da decomposição não radicalar do LOOH, conforme descrito anteriormente. Se um emulsificante com carga negativa for utilizado e se ligar a metais redox, nas interfaces óleo-água, o inverso será verdadeiro. Além disso, os emulsificantes, como os antioxidantes, tendem a exibir um tipo de “paradoxo polar” no qual os agentes polares e apolares estabilizam de modo preferencial as fases com polaridade oposta.

Ao contrário do que seria de se esperar, a oxidação lipídica é mais lenta nas fases de óleo puro em que a solubilidade do oxigênio é alta, mas sua difusão é limitada e a área da superfície, em geral, é pequena em relação ao volume. Nos triacilgliceróis de óleos, as cadeias hidrocarbonadas dos lipídeos têm fraca associação sem orientação, gerando uma transferência de radicais de relativa ineficiência. Os hidroperóxidos necessários para a propagação migram para as microgotículas de água em suspensão e para as interfaces menos hidrofóbicas, ou se autoassociam no interior da fase oleosa. Quando os hidroperóxidos se decompõem, radicais LO^* propagadores são liberados para longe das cadeias-alvo dos lipídeos com hidrogênios abstraíveis. Quando, nas fases oleosas, são geradas altas concentrações locais de radicais, a polimerização extensa é favorecida, em vez da abstração de hidrogênios e da propagação das cadeias (Treibs, 1948). Essa é uma das razões pelas quais o aumento da viscosidade dos óleos de alimentos oxidados ocorre de forma quase tão rápida quanto se dá a produção de odores e de sabores desagradáveis.

C. Iniciadores e catalisadores

1. Radicais livres pré-formados

A oxidação lipídica está tão presente nos alimentos que, muitas vezes, parece que se inicia sozinha. No entanto, é preciso lembrar que, nos alimentos e nos sistemas biológicos, ocorrem muitas reações que produzem radicais. Mesmo em quantidades mínimas, esses radicais dão início à oxidação lipídica ao abstrair hidrogênios e gerar o primeiro radical alquila (L^{\bullet}):



A Tabela 11.5 traz os radicais livres que, com mais frequência, dão início às cadeias da oxidação lipídica e, também, sua reatividade com os ácidos oleico, linoleico e linolênico. O radical hidroxila (HO^{\bullet}), o radical oxidante mais forte que se conhece, é formado na redução do peróxido de hidrogênio, que é produzido por enzimas, nos tecidos vivos, e por metais, nos alimentos. Ele é tão reativo que abstrai hidrogênios, de preferência de modo não seletivo, das cadeias acila (Patterson e Hasegawa, 1978; Heijman *et al.*, 1985). No entanto, também por ser muito reativo, não migra e, por essa razão, precisa ser gerado muito perto de seu alvo.

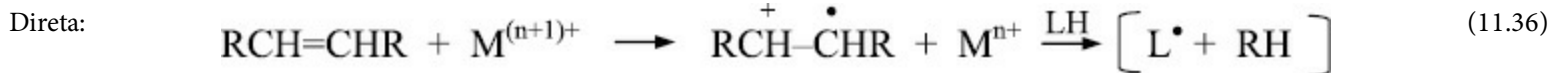
O radical per-hidroxila (HOO^{\bullet}) também é gerado na decomposição do hidroperóxido, bem como na protonação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o produto da redução do oxigênio. Suas reações são mais lentas que as do radical HO^{\bullet} , mas competem com os radicais peroxila orgânicos (Bielski *et al.*, 1985). Quando gerado em reações enzimáticas, em particular, o radical HOO^{\bullet} é um iniciador eficaz da oxidação lipídica; o ânion $O_2^{\bullet-}$. No entanto, reage apenas com hidroperóxidos de lipídeos, e não com lipídeos não oxidados (Bielski *et al.*, 1983) (Tabela 11.5).

Conforme destacado em seções prévias, os radicais peroxila orgânicos abstraem hidrogênios várias ordens de grandeza mais devagar que os radicais alcoxila ($1-200$ versus 10^6-10^7 l/mol/s). Ainda assim, radicais ROO^{\bullet} e RO^{\bullet} com origem na oxidação de moléculas não lipídicas do sistema de reação iniciam de modo muito eficaz as reações em cadeia da oxidação dos lipídeos.

Um comentário final: lembre-se de que esses radicais são necessários apenas para dar início à reação em cadeia da oxidação lipídica; portanto, somente quantidades mínimas são necessárias. Uma vez iniciada, a cadeia da oxidação lipídica é autocatalítica. Assim, quaisquer radicais não lipídicos presentes competem com os radicais de lipídeos, podendo aumentar a oxidação lipídica ou não exercer qualquer efeito.

2. Metais

Os metais de transição, como o ferro, o cobre e o cobalto, talvez sejam os iniciadores mais ativos da oxidação lipídica nos alimentos, porque são ubíquos; os metais, menos influentes, também são importantes nos tecidos animais e vegetais intactos nos quais a compartimentalização celular e os agentes formadores de complexos com metais presentes nas células diminuem o acesso dos metais aos lipídeos. Ambas as valências dos metais (oxidado/reduzido) são ativas (Schaich, 1992). Os metais oxidados são iniciadores diretos mais potentes, ao formar radicais iniciais retirando um elétron das duplas ligações (Reação 11.36). Por outro lado, os metais reduzidos tendem a ser iniciadores indiretos; eles reagem de preferência com o oxigênio, formando complexos (Reação 11.37) ou espécies reduzidas do oxigênio (Reações 11.38 e 11.39) que, então, reagem de modo mais eficiente com os lipídeos. Os metais redutores também decompõem quantidades mínimas de hidroperóxidos não reativos, originando radicais alcoxila reativos que iniciam as cadeias de radicais livres (Reações 11.40 e 11.41).



Indireta:

(a) formação de complexos ativos metal-oxigênio:

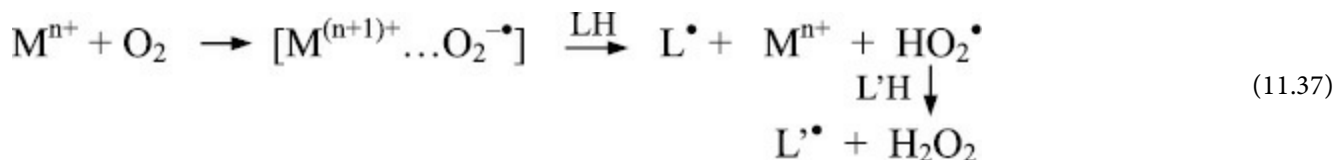
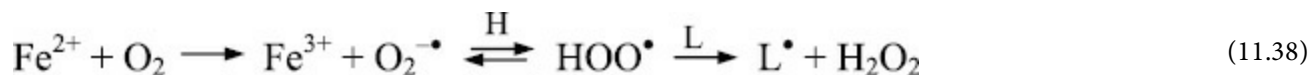


TABELA 11.5 Velocidade da abstração de hidrogênio dos radicais comuns que iniciam a oxidação lipídica

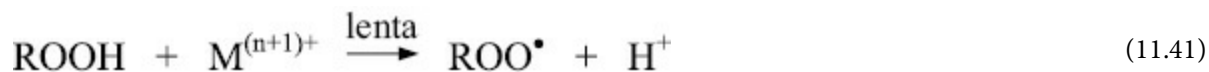
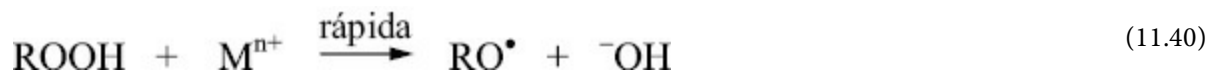
Ácido graxo	Constante de velocidade (l/mol/s)				Meia-vida do radical (s)	Referências
	18:1	18:2	18:3	20:4		
Radical						
HO [•] (Alílico)	~10 ⁹	9,0 × 10 ⁹	7,3 × 10 ⁹	~10 ¹⁰	10 ⁻⁹	Patterson e Hasegawa (1978), Hasegawa e Patterson (1978)
(H não alílico)	4 × 10 ²	3,4 × 10 ³	7,0 × 10 ³	1,0 × 10 ⁴		Patterson e Hasegawa (1978), Hasegawa e Patterson (1978)
RO [•]	3,3 × 10 ⁶	8,8 × 10 ⁶	1,3 × 10 ⁷	2,0 × 10 ⁷	10 ⁻⁶	Erben-Russ <i>et al.</i> (1987)
ROO [•]	1,1	6 × 10 ¹	1,2 × 10 ²	1,8 × 10 ²	10	Hasegawa e Patterson (1978)
O ₂ ^{•-}	Sem reação	Sem reação	< 1	< 1		Bielski <i>et al.</i> (1985), Gebicki e Bielski (1981)
(MLOOH)		7,4 × 10 ³				Bielski <i>et al.</i> , (1983)
HOO [•]	Sem reação	1,1 × 10 ³	1,7 × 10 ³	3,1 × 10 ³		Bielski <i>et al.</i> , (1985)
O ^{•-}	7,5 × 10 ²	9,7 × 10 ³	1,2 × 10 ⁴	1,9 × 10 ⁴		Hasegawa e Patterson (1978)

Adaptado de Schaich (2005b).

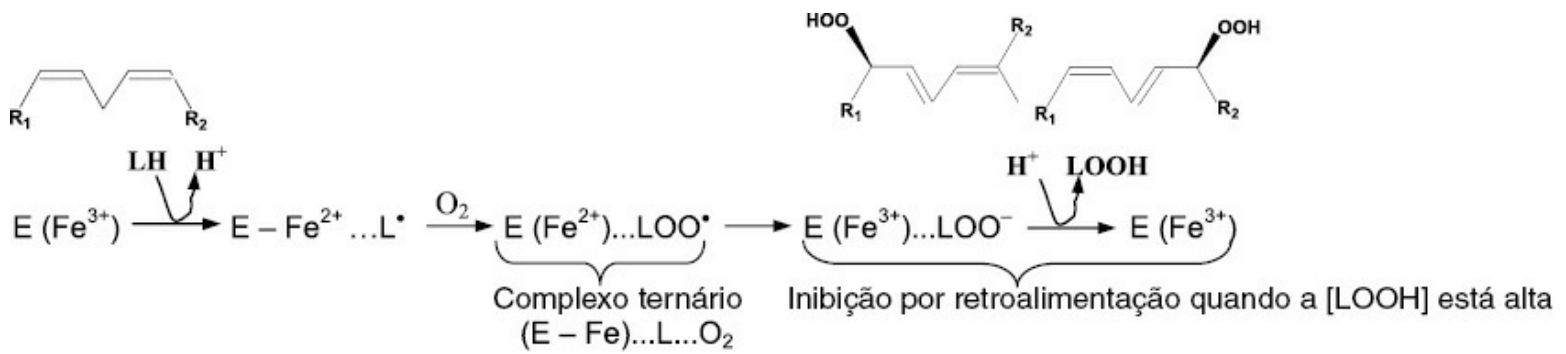
(b) auto-oxidação de metais reduzidos (ativa em pO₂ moderada a alta):



(c) redução ou oxidação de hidroperóxidos (ROOH, H₂O₂, LOOH) (domina quando as concentrações de metal, substrato e oxigênio são baixas):



A decomposição do peróxido de hidrogênio e de diversos peróxidos orgânicos por metais fornece uma fonte importante de radicais para a iniciação da oxidação lipídica. No entanto, a decomposição dos hidroperóxidos por



A ação da lipoxigenase, por si só, não dá início à oxidação lipídica. No entanto, a lipoxigenase age como uma espécie de máquina que produz estoques de LOOH que mais tarde se decompõem, gerando radicais iniciadores LO^* e *OH , por ação da luz e do calor, LO^*/LOO^* , por ação de metais ou LO^* , em reações secundárias da própria enzima (Aoshima *et al.*, 1981). Teores muito baixos de LOOH, produzidos em tecidos animais e vegetais, fornecem os iniciadores “invisíveis” que fazem a oxidação lipídica, por vezes, surgir de modo espontâneo. Em certas condições (por exemplo, frio e escuro, como nos materiais não branqueados congelados), o LOOH produzido pelas lipoxigenases pode se acumular até níveis relativamente altos e, então, desencadear uma cascata de oxidação rápida quando o LOOH se decompõe.

A velocidade e a especificidade das oxidações da lipoxigenase dependem do tipo e da concentração dos ácidos graxos, da concentração do oxigênio, do pH, da fonte da enzima e da forma da isoenzima. O substrato preferido é o ácido linoleico; os ácidos linolênico e araquidônico também são oxidados, porém com mais lentidão (Gardner, 1986). A lipoxigenase tem três isoenzimas que diferem quanto à especificidade pelos C9 e C13 do ácido linoleico, ao pH ótimo e à fase preferida da reação:

- LPOx-1: pH ótimo = 9; prefere substratos com carga (por exemplo, LOO^*); não tem especificidade por uma fase, portanto reage igualmente nas fases orgânica e aquosa.
- LPOx-2: pH ótimo ~6,8; prefere ácidos não ionizados, ésteres e fases orgânicas; nas emulsões, as reações são reduzidas; forte capacidade de cooxidação.
- LPOx-3: pH ótimo ~6,8; prefere emulsões; forte capacidade de cooxidação.

TABELA 11.6 Características da reação das lipo-oxigenases de diferentes fontes vegetais

Planta	pH ótimo	Posição preferencial	Referência
Soja (1)	8,5-9,0	13-OOH	Hamberg e Samuelsson (1967)
	7,0	13-OOH:9-OOH 2:9	
	6,5	9-OOH	
Soja (2)	6,1	13-OOH:9-OOH 80:20	Fukushige <i>et al.</i> (2005)
Soja (3)	6,5	13-OOH:9-OOH 40:60	
Milho	6,6	Principalmente 9-OOH (10t, 12c) Pequena quantidade de 13-OOH (9t, 11t)	Gardner e Weisleder (1970)
	9,0	13-OOH:9-OOH 85:15	
Trigo (1)	5,7-6,5	13-OOH:9-OOH 15:85	Grosch <i>et al.</i> (1976)
Amendoim (1)	6,0	100% 13-OOH	Belitz e Grosch (1986)
	6,2	84% 13-OOH (9c, 11t) 16% 9-OOH (10t- 12c)	
	8,3	10% do produto formado 13-OOH:9-OOH 2:1	

Menos de 13-OOH em pO_2 baixa

Tomate (1)	5,5	13-OOH:9-OOH 95:5	Belitz e Grosch (1986)
Ervilhas (2)	6,5	13-OOH:9-OOH 50:50	Belitz e Grosch (1986)

Os números entre parênteses referem-se à isoenzima.

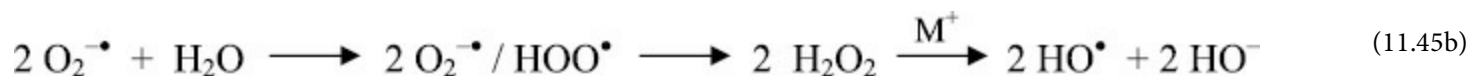
Além dessas preferências gerais, as isoenzimas de diferentes materiais acrescentam suas próprias especificidades ou excentricidades. A Tabela 11.6 traz alguns exemplos. É importante destacar que, no pH ~6, as lipoxigenases apresentam alguma atividade de hidroperoxidase, catalisando a decomposição do LOOH em LOH (Reação 11.44). Essa ação contribui para a formação de alguns compostos de sabor característico nos tecidos vegetais (por exemplo, pepino).



As lipoxigenases são encontradas em teores baixos em todos os materiais biológicos. Teores relativamente altos de lipoxigenase são encontrados em grãos, amendoins, tomates, batatas, sojas e outras leguminosas – como feijões e ervilhas – e no tecido muscular.

b. Xantina oxidase

A xantina oxidase é uma enzima com duas moléculas de flavina adenina dinucleotídeo, dois átomos de molibdênio e oito átomos de ferro em seu sítio ativo. Ela catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina, com a redução simultânea do oxigênio no ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O ânion superóxido sofre dismutação, formando peróxido de hidrogênio, que se decompõe em radicais hidroxila reativos que dão início à oxidação lipídica (Kellogg e Fridovich, 1975; Porter e Lehman, 1982; Thomas *et al.*, 1982). Essa reação é particularmente importante na iniciação da oxidação lipídica de laticínios.



M^+ é um metal redutor.

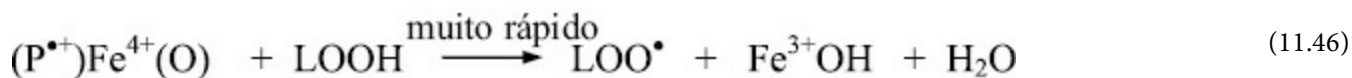
4. Hemes

A capacidade das proteínas que contêm heme – como a hematina, a hemoglobina, a mioglobina, a metamioglobina, as catalases e as peroxidases – de catalisar a oxidação dos lipídeos muito mais rapidamente que o ferro livre foi relatada, pela primeira vez, há quase 90 anos. O trabalho pioneiro de Watts (Watts, 1954; 1962; Younathon e Watts, 1959) e Tappel (1953a; 1953b, 1955; 1961; 1962; 1995), desenvolvido nas décadas de 1950 e 1960, determinou com clareza os efeitos, mas os mecanismos de ação do heme permaneceram controversos. No entanto, foram identificadas várias características ou requisitos da catálise pelo heme (Schaich, 1980a; 1992):

- É necessária a presença da estrutura porfirina-Fe (e não apenas do ferro).
- Nem todas as proteínas com heme exibem a mesma atividade catalítica, por causa, em parte, das diferenças no grau de exposição e/ou na acessibilidade da estrutura da hematina.
- Os hemes-Fe³⁺ são mais ativos, mesmo na ausência de oxigênio; os hemes-Fe²⁺ necessitam de oxigênio para a catálise.
- Na catálise, não ocorre mudança na valência do ferro hêmico.
- A catálise reverte para inibição quando os níveis de heme estão elevados.

A partir dessas observações, foram propostos três mecanismos fundamentais: (1) a transferência de elétrons dos hemes férricos (Watts, 1954; 1962; Younathon e Watts, 1959); (2) os hemes formam complexos com os hidroperóxidos, e os radicais alcóxila, gerados na subsequente decomposição do complexo, aumentam a velocidade de propagação das cadeias (Tappel, 1953a; 1953b, 1955; 1961; 1962; 1995); e (3) o ferro inorgânico livre liberado dos hemes, em vez dos próprios hemes, catalisam a oxidação lipídica (Love e Pearson, 1974). Se, por um lado, cada uma dessas teorias aborda algumas características, nenhuma delas é totalmente compatível com a cinética, os padrões estrutura-atividade, as misturas de produtos e os efeitos dos solventes da catálise pelo heme (Schaich, 1980a).

Técnicas analíticas modernas revelaram que a catálise pelo heme envolve a produção de ferro ferril ~ Fe(IV)=O ou Fe(IV)-OH – nos complexos dos hemes com hidroperóxidos ou oxigênio (Rao *et al.*, 1994; Nam *et al.*, 2000a; 2003). As proteínas ativas ligam-se aos ácidos graxos no grupo heme, com a extremidade de hidrocarbono no interior e as duplas ligações orientadas para o ferro hêmico (Rao *et al.*, 1994; Nam *et al.*, 2000a; 2003). O ferro férrico do heme combina-se com um hidroperóxido ou com o oxigênio, formando Fe(IV), que é um oxidante muito forte, equivalente à HO• quando se considera a velocidade da reação, porém mais seletivo, por causa do potencial redox mais baixo (Traylor e Xu, 1990). Em seguida, o ferro ferril abstrai com rapidez o H do C11 duplamente alílico do ácido linoleico (Rao *et al.*, 1994) ou com velocidade ainda maior dos hidroperóxidos (Traylor e Xu, 1990), ao contrário da oxidação muito lenta dos hidroperóxidos pelo Fe³⁺ não hêmico:



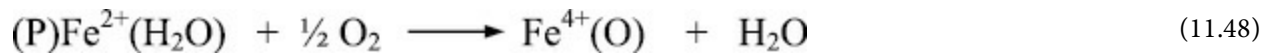
Os estados tetravalentes do ferro (Fe⁴⁺) são mantidos pela movimentação dos elétrons redox entre os estados da apoproteína, sem envolver o centro do ferro.



Assim, os elétrons vão e voltam com facilidade entre os dois estados reativos, sem a perda do poder oxidante ou a redução do Fe⁴⁺ para o Fe³⁺ menos reativo (Nam *et al.*, 2000b). Dessa forma, os hemes tornam-se uma espécie de máquina que produz uma cascata contínua de radicais e catalisa rapidamente a oxidação lipídica.

A Figura 11.12 mostra uma representação geral do atual entendimento da formação (mediada pelo heme férrico) e da reação do Fe⁴⁺ (Schaich, 2005b). Os três fluxos da reação corroboram as três características singulares que diferenciam a catálise pelo heme dos outros oxidantes: uma cascata de propagação de radicais e velocidades de oxidação extremamente rápidas, além de grandes quantidades de epóxidos e produtos hidroxilados (Dix e Marnett, 1983; 1985; Nam *et al.*, 2000a; 2000b).

Os hemes-Fe²⁺ geram complexos com o ferro ferril, de forma mais lenta que os hemes férricos. Eles utilizam hidroperóxidos como fonte de oxigênio ou então reagem diretamente com o oxigênio, formando o ferro ferril.



Essa capacidade de utilizar o oxigênio diretamente possibilita o reabastecimento constante de $Fe^{4+}(O)$ nas reações mais longas. Os hemes- Fe^{2+} também ajudam a retardar a catálise ao regenerarem com mais rapidez os hemes Fe^{3+} reagentes, após a formação de alguns radicais peroxila (Bruice *et al.*, 1988).



De modo geral, essas características fazem com que os hemes- Fe^{2+} sejam mais importantes na manutenção da oxidação, durante os períodos longos de armazenamento, ao contrário da ação imediata e rápida dos hemes- Fe^{3+} . Schaich (2005b) analisou em detalhes os mecanismos das catálises pelo heme da oxidação lipídica, enquanto Baron e Andersen (2002) estudaram as catálises pelo heme da oxidação lipídica em alimentos.

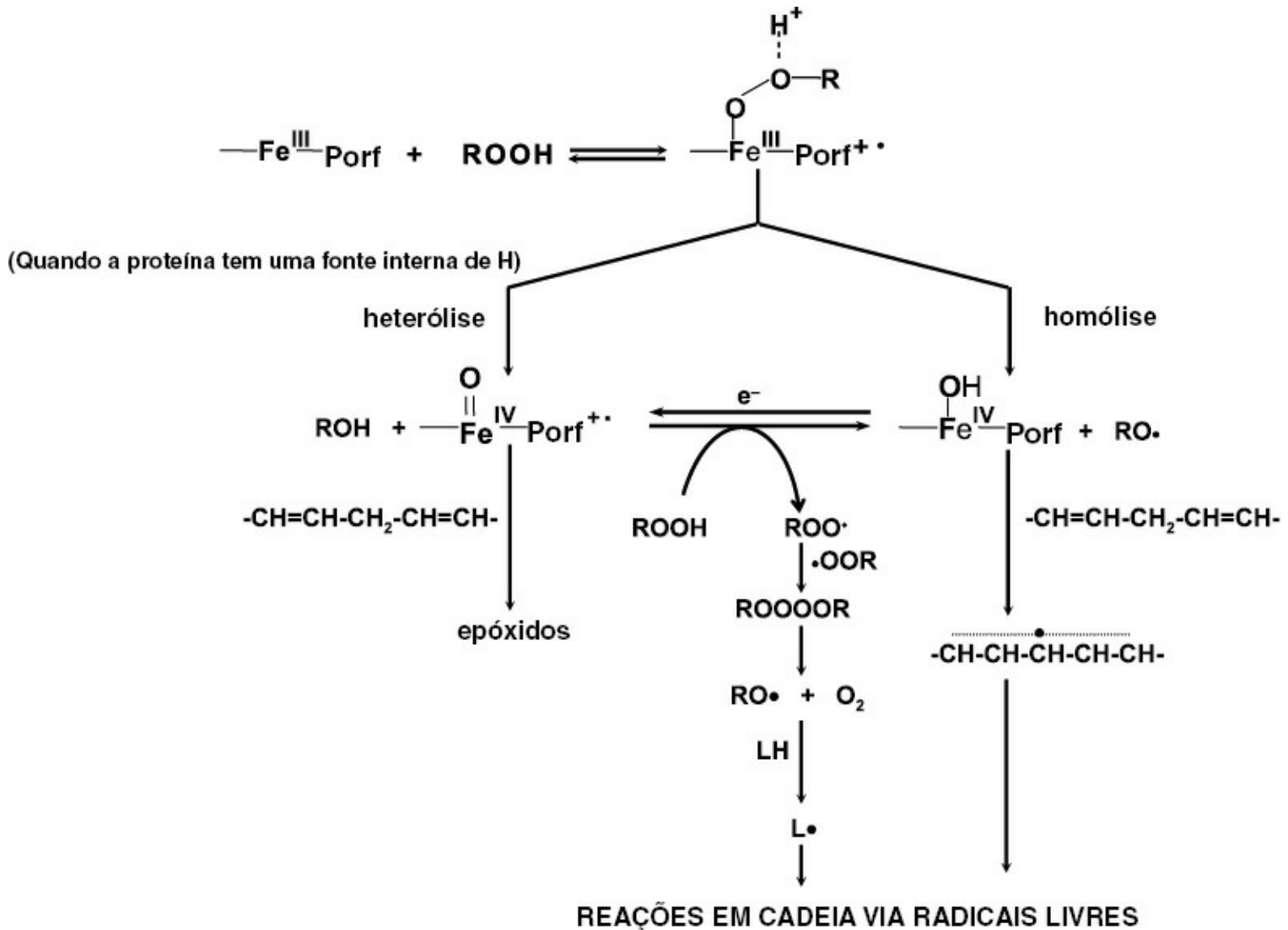


FIGURA 11.12 Formação e vias da reação do ferro ferril na catálise da oxidação lipídica. Figura extraída de Schaich (2005a); dados obtidos de Nam *et al.* (2000a; 2000b); utilizado com permissão.

5. Clorofila e outros pigmentos

A clorofila e muitos outros pigmentos que têm extensos sistemas de duplas ligações conjugadas e/ou carbonilas ativadas agem como coletores de luz nos vegetais. Eles conservam essa capacidade mesmo fora do sistema vegetal; por isso, quando presentes em alimentos ou como contaminantes em óleos, agem como fotossensibilizadores

poderosos. Os fotossensibilizadores absorvem luz visível de baixa energia, que normalmente é inerte, passam para estados excitados e, então, transformam a energia de excitação em espécies reativas – radicais livres ou oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) – que, por sua vez, reagem rapidamente com os lipídeos. Esse processo será explicado em detalhes na próxima seção.

É provável que a clorofila seja o catalisador mais famoso da oxidação entre os pigmentos, porque consegue oxidar lipídeos por meio de radicais livres ou do oxigênio singlete (Figura 11.13); até traços de clorofila que permanecem em óleos ou extratos de lipídeos acionam rapidamente a oxidação lipídica. Sabe-se que muitos corantes sintéticos de alimentos são fotossensibilizadores ativos (Umehara *et al.*, 1979) e é provável que outros pigmentos naturais também influenciem de modo similar a oxidação dos lipídeos.

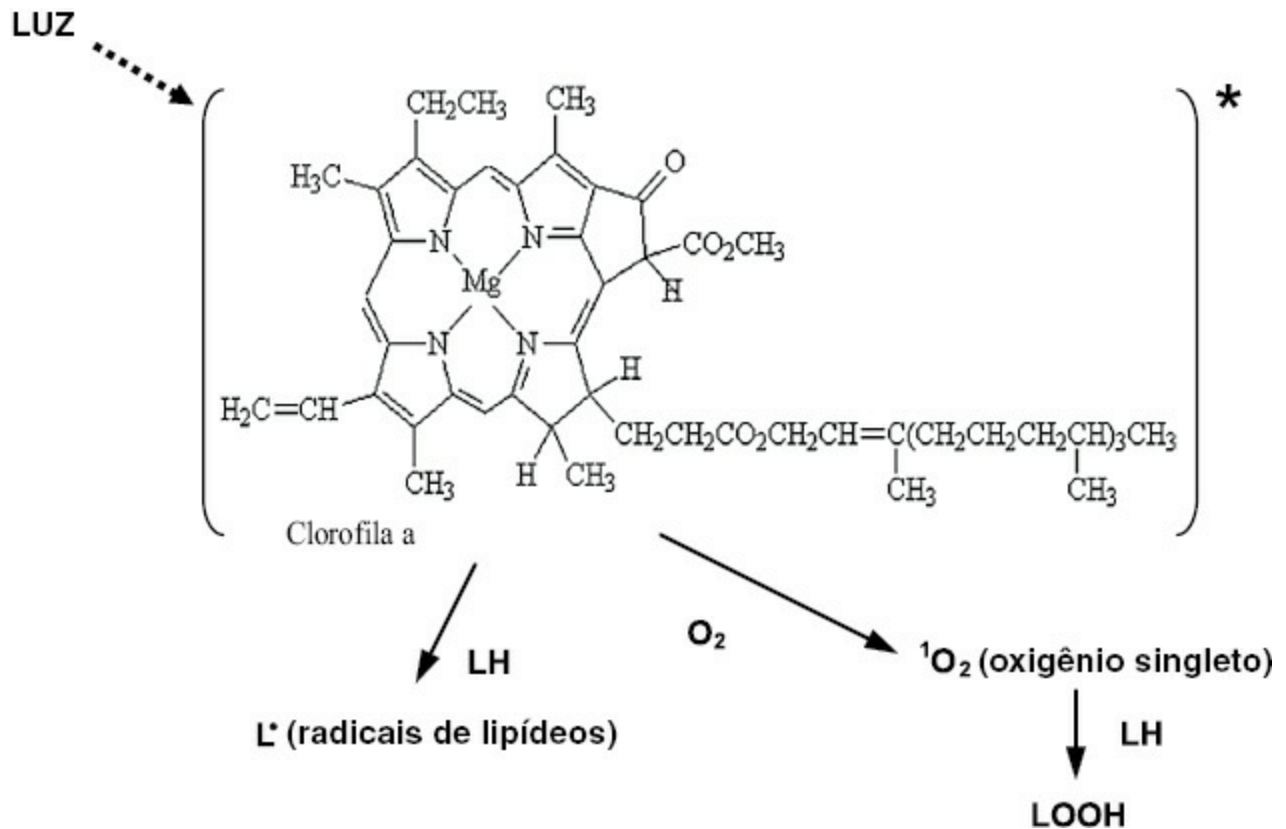


FIGURA 11.13 Vários modos de fotossensibilização ativa com clorofila.

Um aspecto interessante dos pigmentos é que eles têm o potencial de ser pró-oxidantes e antioxidantes. Os carotenoides, que têm extensas regiões com duplas ligações conjugadas, atuam como eliminadores de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), oferecendo várias duplas ligações para a formação de hidroperóxidos, em vez de reagir com os lipídeos. Assim, os carotenoides em baixas concentrações, sobretudo o b-caroteno, são antioxidantes (ver também a seção VI). Contudo, os radicais alcoxila e peroxila dos carotenoides são reativos e, em altas concentrações, esses pigmentos se tornam pró-oxidantes. É provável que outros pigmentos atuem do mesmo modo, por isso a conduta mais segura consiste em limitar as concentrações de pigmentos nos alimentos que contêm lipídeos.

D. Condições ambientais e solventes

1. Luz

a. Luz ultravioleta

A iniciação direta da oxidação lipídica por ação da luz não é uma reação favorável, porque a energia luminosa em comprimentos de onda acima de 200 nm é insuficiente para quebrar ligações e, também, fornecer energia de

ativação para a ionização, afastando os fragmentos moleculares (Tabela 11.7).



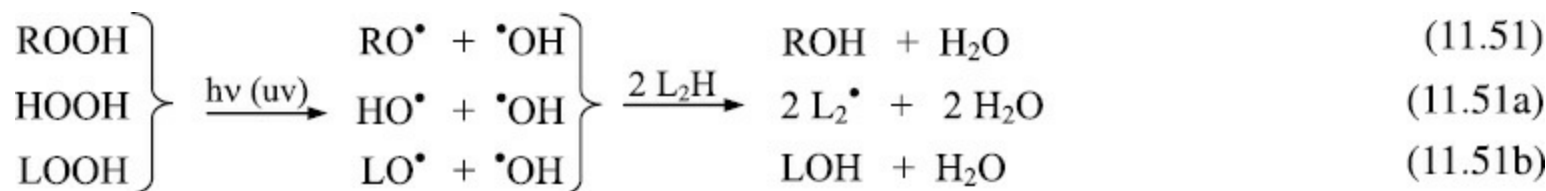
TABELA 11.7 Energia dos fótons (E_p) disponíveis na luz em diferentes comprimentos de onda, em comparação com a energia de dissociação de ligações (EDLs) de grupos funcionais importantes

Ligação	EDL (kJ/mol) ^a	Comprimento de onda (nm)	E_p (kJ) ^b
C=C	612	200	596
O-H	463	230	518
C-H	412	260	458
C-O	360	290	411
C-C	348	320	372
C-N	305	350	341
O-O	157	410	291

^aHecht (2000).

^bAtkins e Beran (1990), Kamiya *et al.* (1963).

Os principais grupos dos lipídeos que absorvem luz UV são as carbonilas, as duplas ligações e as ligações O-O dos peróxidos. Desses, apenas as ligações O-O têm energias de ligação acessíveis à luz UV. Por isso, a catálise da oxidação lipídica pela luz UV é mediada pela cisão homolítica de quaisquer hidroperóxidos pré-formados para produzir os verdadeiros iniciadores – LO^\bullet , HO^\bullet e RO^\bullet –, os quais abstraem hidrogênios de moléculas de lipídeos para começar a reação em cadeia via radical livre. A luz UV é importante como iniciador, porque gera dois radicais reativos – com isso, duas cadeias de oxidação lipídica para cada decomposição de hidroperóxido – e, talvez mais importante, um radical hidroxila (HO^\bullet) fortemente oxidante, em vez de um íon hidróxido.



ROOH é qualquer hidroperóxido orgânico, HOOH é peróxido de hidrogênio e LOOH é um hidroperóxido de lipídeo.

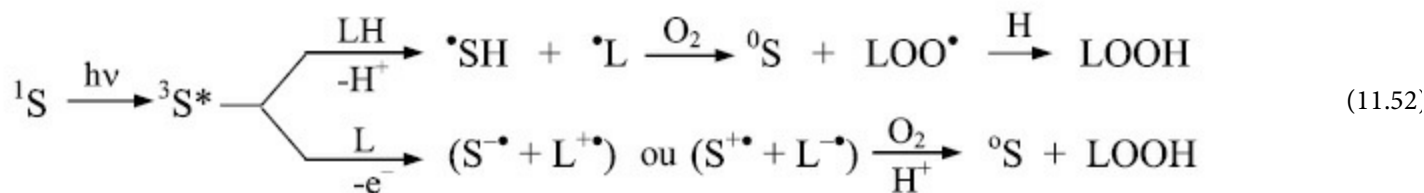
A luz está sempre presente, exceto quando é deliberadamente excluída, por exemplo, em um ambiente escuro ou no interior de uma embalagem. Em geral, esses fatores fazem da luz UV um dos catalisadores mais poderosos da oxidação lipídica. Por isso, a importância dos efeitos da luz é decisiva durante o manejo e o processamento dos lipídeos, sejam eles reagentes ou componentes de óleos e alimentos.

b. Luz visível

A luz visível (> 400 nm) não tem energia suficiente para produzir radicais diretamente, mas é capaz de dar início à oxidação lipídica de modo indireto, por intermédio de fotossensibilizadores (Tabela 11.8) – moléculas que absorvem a energia luminosa de nível baixo e a transformam em energia química suficiente para desencadear reações. Nesse processo, denominado fotossensibilização, uma molécula sensibilizadora ^1S absorve luz, é excitada até um estado elevado de energia $^3\text{S}^*$ e, em seguida, transfere essa energia de excitação para ligações moleculares de lipídeos, formando radicais livres diretamente (Tipo 1) (Foote, 1976) ou para o oxigênio, formando oxigênio

singlete ($^1\text{O}_2$), que, por sua vez, liga-se a duplas ligações dos ácidos graxos insaturados (Tipo 2) (Murray, 1979):

Sensibilização de tipo 1 (radical livre) \longrightarrow L^\bullet (reação com transferência de e^-)



Sensibilização de tipo 2 ($^1\text{O}_2$, oxigênio singlete) \longrightarrow LOOH (sem produção de radicais livres)

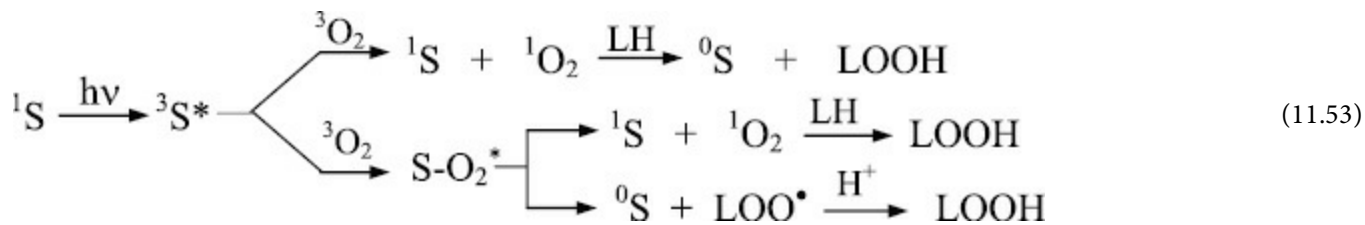


TABELA 11.8 Fotossensibilizadores encontrados em alimentos ou normalmente utilizados em pesquisas na área da química dos alimentos

Tipo 1 – Radical livre

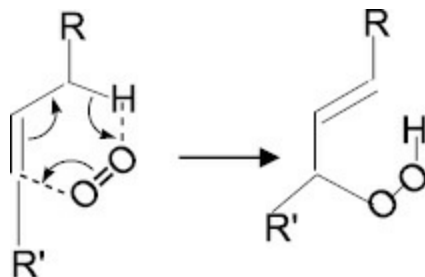
Clorofila, feofitina
 Hemes – protoporfirina
 – mioglobina
 – hemoglobina
 – flavinas (em especial, riboflavina)
 Xantenos
 Antracenos
 Antroquinonas
 Violeta de genciana
 Corantes alimentares

Tipo 2 – Oxigênio singlete

Clorofila
 Hemes
 Eritrosina
 Rosa bengala
 Flavinas
 Azul de metileno
 Proflavina
 Eosina
 Corantes alimentares (?)

A reação dominante depende do fotossensibilizador. Alguns sensibilizadores (como a clorofila) agem tanto por meio de radicais quanto do oxigênio singlete (Sastry e Lakshminarayana, 1971; Terao e Matsushita, 1977b), e os mecanismos dominantes são determinados pelas condições da reação e pelo solvente; outros sensibilizadores agem apenas por meio de um mecanismo: radical ou oxigênio singlete (Murray, 1979) (Tabela 11.8).

A fotossensibilização de tipo 1 gera reações em cadeia via radicais que são indistinguíveis das auto-oxidações normais, enquanto a fotossensibilização de tipo 2 consiste na oxigenação direta, na qual o oxigênio singlete forma hidroperóxidos 1.500 vezes mais rápidos que o oxigênio tripleto normal (Rawls e Van Santen, 1970). Em uma reação “ene” combinada, o oxigênio singlete liga-se a um dos dois carbonos de uma dupla ligação e adiciona um próton alílico, formando um hidroperóxido diretamente em uma reação “em gaiola”, sem geração de radicais:



Uma característica distinta e importante da oxidação pelo oxigênio singlete é que ele não exibe nenhuma preferência por um dos carbonos da dupla ligação; por isso, são produzidas quantidades semelhantes de hidróxidos nas posições interna e externa das duplas ligações isoladas, ou não conjugadas, dos ácidos graxos insaturados (Terao e Matsushita, 1977a). (Lembre-se que a auto-oxidação gera hidroperóxidos principalmente nas posições externas.) A ligação do oxigênio singlete com ligações duplas conjugadas (por exemplo, ácido linoleico conjugado natural ou ácido linoleico oxidado) produz endoperóxidos cíclicos em altas concentrações:



Quando expostos à ação da luz UV, do calor ou de metais, esses hidroperóxidos se decompõem em uma cascata de radicais, levando à oxidação explosiva. A sensibilização pelo oxigênio singlete é muito danosa como iniciadora da oxidação lipídica, porque a velocidade de formação dos hidroperóxidos depende, principalmente, da concentração do sensibilizador, não do oxigênio, e os sensibilizadores agem em paralelo, em vez de em série. Como consequência, altas concentrações de hidroperóxidos são geradas em um período curto.

A catálise da oxidação lipídica por ação da luz é facilmente detectada nos padrões cinéticos e nas distribuições dos produtos (Tabela 11.9). Nas etapas iniciais da auto-oxidação, a formação do radical LOO^\bullet depende do oxigênio, sendo característica a ocorrência de um período de indução com quantidades muito baixas de hidroperóxidos, ou com a ausência deles. Para estender o período de indução o máximo possível adota-se o uso de estratégias antioxidantes. Por outro lado, as oxidações fotossensibilizadas dependem da concentração dos sensibilizadores, são independentes da $p\text{O}_2$, exceto quando o teor de oxigênio é muito limitado –, não apresentam período de indução e acumulam imediatos altos teores de hidroperóxidos. Portanto, a eliminação da luz durante o manejo e o uso de embalagem têm efeitos imediatos consideráveis sobre as oxidações fotossensibilizadas, somente afetando as auto-oxidações após a ocorrência de um acúmulo de LOOH . De modo similar, conforme discutido na seção IV, A, 1, a velocidade da oxidação aumenta de forma geométrica com o número de duplas ligações na auto-oxidação, por causa da sensibilidade dos hidrogênios duplamente alílicos à abstração. Contudo, a velocidade da oxidação fotossensibilizada é diretamente proporcional ao número de duplas ligações, desde que o oxigênio singlete não mostre nenhuma preferência ao se fixar a uma dupla ligação (Terao e Matsushita, 1977a).

Quantidades maiores de 10- e 12-hidroperóxidos internos e não conjugados, bem como de produtos cíclicos, também podem ser utilizadas diagnosticamente para diferenciar a fotossensibilização da auto-oxidação (Tabela 11.9). Encontrar esses produtos é uma clara indicação dos efeitos da luz; assim, a proteção do produto contra a luz, durante o processamento, e o uso de embalagem são fundamentais para a estabilização. Além disso, é importante destacar que os hidroperóxidos internos e cíclicos se decompõem, formando produtos secundários diferentes daqueles que resultam da auto-oxidação; por isso, os óleos e alimentos “afetados pela luz” têm sabores e odores alterados e há a cooxidação de outras moléculas, quando comparados aos produtos “rançosos”. Considera-se os produtos cíclicos, em particular, os precursores importantes dos sabores desagradáveis induzidos pela luz (Neff *et al.*, 1982). A reversão de sabor do óleo de soja resulta de oxidação induzida pela luz (Chang *et al.*, 1966).

2. Aquecimento

Quando se consideram os efeitos do aquecimento sobre a oxidação dos lipídeos, as temperaturas de armazenamento são sempre as primeiras a serem lembradas. No entanto, as alterações induzidas pelo aquecimento são muito mais pronunciadas no processamento com altas temperaturas que no transporte e armazenamento, que utilizam as temperaturas habituais. Até aumentos relativamente pequenos nas temperaturas de processamento ou armazenamento encurtam de forma significativa a vida de prateleira de um produto. Por essa razão, o controle dos efeitos da temperatura sobre a oxidação dos lipídeos precisa ser considerado em cada etapa da produção, do manejo e do armazenamento dos alimentos.

TABELA 11.9 Comparação da cinética e dos produtos da auto-oxidação por radicais livres e fotossensibilização de tipo 1 versus oxidação fotossensibilizada de tipo 2 por oxigênio singlete

	Radical livre – Auto-oxidação de tipo 1	¹O₂ – Fotossensibilização de tipo 2
Mecanismo	Reação em cadeia via radical livre convencional	Reação 'ene', adição concertada de ¹ O ₂ , sem envolvimento de radicais livres Radicais gerados pela decomposição do LOOH
Cinética	Com período de indução Depende da pO ₂	Sem período de indução Não depende da pO ₂ (quando o O ₂ não é limitante) Depende da concentração do sensibilizador
Reatividade relativa	A velocidade não é proporcional ao número de duplas ligações 18:1 ~1 18:2 17 18:3 25	Velocidade diretamente proporcional ao número de duplas ligações 18:1 ~1 18:2 2 18:3 3
Produtos	LOOHs conjugados Posições dominantes externas 9, 13, 16 Produtos da cisão de LOOH externos	LOOHs conjugados e não conjugados LOOHs em todas as posições Alta porcentagem de cíclicos, endoperóxidos, epóxidos, di-hidroperóxidos e tri-hidroperóxidos em posições internas Produtos da cisão de LOOHs internos, preferências de posição da cisão alteradas

Dados obtidos de Foote (1968, 1976), Kearns e Khan (1969), Foote *et al.* (1970), Murray (1979), Neff (1980), Neff e Frankel (1984), Neff *et al.* (1982), Frankel *et al.* (1982), Frankel (1985, 1987), Pryor (1978), Umehara *et al.* (1979). Adaptado de Schaich (2005a); utilizado com permissão.

O aquecimento tem três efeitos importantes sobre a oxidação lipídica:

- Em temperaturas baixas a moderadas, em especial, o aquecimento acelera a oxidação lipídica ao aumentar a velocidade de decomposição dos LOOH e a iniciação das cadeias secundárias; por isso, os efeitos do aquecimento são mais claramente observados na cinética mais rápida da oxidação (Labuza, 1971; Marcuse e Fredriksson, 1968).
- O aquecimento medeia os desvios nas vias dominantes das reações e nos produtos resultantes:
 - abstração de hidrogênio do LOH e do LOOH, em vez do LH (Frankel, 1982)
 - menos cisão, padrões de cisão alterados (por exemplo, a partir do ácido linoleico, há a formação decadienal, em vez de hexanal) e aumento de > 90% de dímeros e polímeros (Pokorny *et al.*, 1976a)
 - dimerização e polimerização aumentadas, alterações nos tipos de dímeros formados: mais dímeros C–O–C e C–C e menos ligações cruzadas C–O–O–C (Frankel, 1984; 1991)
 - aumento de isômeros *trans* (Piretti *et al.*, 1978).
- Em temperaturas altas – por exemplo, nos processos de fritura, > 150°C – a energia térmica induz cisões de cadeias acila, fornecendo os radicais que estão na base de toda a degradação molecular e que iniciam as cadeias da auto-oxidação na presença de ar (Nawar, 1969; 1986).

Por uma questão de espaço, apenas o primeiro desses efeitos será discutido aqui.

a. Decomposição térmica dos hidroperóxidos em temperaturas baixas a moderadas

Os efeitos do aquecimento baixo a moderado sobre a decomposição dos LOOH são bastante diretos. Em qualquer sistema, é o aquecimento que dá o maior impulso às reações que têm energias de ativação altas. De todas as etapas da oxidação lipídica, apenas a decomposição dos hidroperóxidos apresenta dificuldades energéticas, necessitando de 31 e 50 kcal/mol para a decomposição monomolecular e bimolecular dos LOOH, respectivamente (Tabela 11.10). Assim, nas temperaturas baixas a moderadas utilizadas na maior parte do manuseio e armazenamento, e em parte do processamento, o aquecimento age principalmente quebrando as ligações O–O da pequena quantidade de hidroperóxido orgânico ou lipídico pré-formado por ação de metais, lipo-oxigenases, fotossensibilizadores ou de outras reações. Em seguida, os radicais reativos RO•, LO• e •OH gerados abstraem hidrogênios dos lipídeos vizinhos, formando radicais L• e dando início às cadeias de radicais. À medida que a oxidação avança e níveis apreciáveis do verdadeiro LOOH se acumulam, o principal efeito do aquecimento provoca um desvio da iniciação para a aceleração da propagação (Marcuse e Fredriksson, 1968; Labuza, 1971).

3. Água

As discussões sobre a oxidação lipídica não serão completas se não abordarem os efeitos da umidade. Como se vê no gráfico clássico dos processos de degradação *versus* atividade da água (Figura 11.14), a oxidação lipídica é a única reação de degradação dos alimentos que não pode ser interrompida pela remoção ou adição de água. A oxidação lipídica é rápida quando a umidade e a atividade da água estão elevadas, como todas as reações (região D), mas, ao contrário das outras reações de degradação, também é rápida nos sistemas muito secos (região A). A oxidação lipídica é mais lenta (região B) quando há apenas uma monocamada de moléculas de água ligada às macromoléculas dos alimentos.

TABELA 11.10 Energia de ativação das diferentes etapas da Auto-oxidação Lipídica

Reação	Energia de ativação (E_a) (kcal/mol)
$(L^\bullet + O_2)$	0
$k_p (LOO^\bullet + LH)$	~5–15
$k_t (2 ROO^\bullet)$	~4
$k_t (2 R^\bullet)$	5
$k_t (R^\bullet + ROO^\bullet)$	1
* k_{dB} (monomolecular) $LOOH \rightarrow$	31
* k_{dB} (bimolecular) $2 LOOH \rightarrow$	50 (sistema não catalisado)

Dados obtidos de Labuza (1971) e Marcuse e Fredriksson (1968).

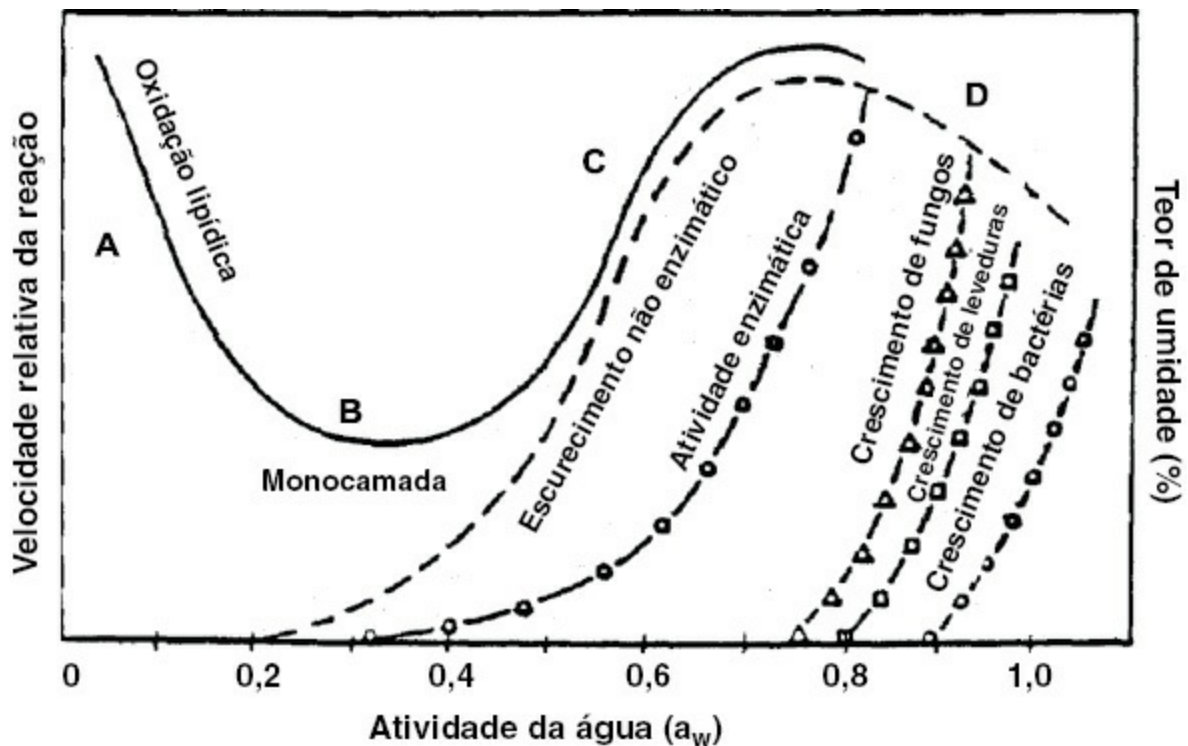


FIGURA 11.14 Gráfico clássico dos efeitos da atividade da água sobre as reações químicas em alimentos. Adaptado de Karel (1980).

A água tem efeitos pró-oxidantes e antioxidantes sobre a oxidação lipídica, como mostram as mudanças de velocidade entre as regiões do gráfico. Essa ação bifásica pode ser explicada da seguinte forma (Labuza, 1971; Karel, 1980):

- A – Sistemas muito secos – alta oxidação: os sítios de oxidação das moléculas estão sem proteção, possibilitando o acesso fácil do oxigênio aos lipídeos; os metais não estão hidratados e são reativos; os hidroperóxidos não estão na forma de complexos e são decompostos com facilidade; a matriz alimentar está aberta e porosa, permitindo o fluxo livre do oxigênio.
- A → B – A ligação da água às moléculas fornece uma proteção superficial, que diminui a oxidação: a ligação do hidrogênio da água ao LOOH retarda a decomposição; a hidratação dos metais inibe a transferência de elétrons e muda os potenciais redox; a ligação da água à superfície da matriz macromolecular retarda a difusão do oxigênio; a ligação da água a sítios potencialmente reativos exclui o oxigênio.
- B – Valor da monocamada – a menor oxidação: uma camada única, teórica, de moléculas de água, ligada à superfície molecular, protege os sítios reativos contra o oxigênio e os catalisadores, mas é insuficiente para permitir a mobilização.
- B → C – Região de umidade intermediária – oxidação crescente: a hidratação das moléculas aumenta a mobilidade e a reatividade molecular; as várias camadas de água que se acumulam nas superfícies moleculares dissolvem os catalisadores e aumentam sua difusão e interação com os lipídeos, mobilizando e ativando os metais.
- C → D – Região de água fluida – oxidação alta, mas decrescente: a água dilui os metais e outros catalisadores e reagentes; a formação de emulsão separa as fases lipídicas da maioria dos catalisadores; a alta umidade estimula o escurecimento não enzimático; os produtos são antioxidantes.

A Figura 11.14 mostra que o teor de umidade e a atividade da água (a_w) têm forte influência na velocidade da oxidação dos produtos com ácidos graxos insaturados, muito mais do que todos os outros catalisadores presentes. Embora raramente os alimentos passem de um extremo teor de umidade para outro durante o armazenamento, eles costumam secar ou absorver umidade em graus moderados ao longo do período, e cada mudança no teor de umidade pode alterar bastante a cinética e os produtos da oxidação lipídica. Por exemplo, um produto seco

estabilizado na a_w da monocamada oxidada com rapidez se perder ou ganhar umidade e modificar a a_w . Alimentos com umidade intermediária exibem reatividade moderada no processo de oxidação, sendo estabilizados por desidratação ou tendo sua vida de prateleira bastante encurtada ao ganhar umidade e aumentar a a_w . Como consequência, o teor de umidade e o grau com o qual as moléculas do sistema se ligam à água (a_w) precisam ser cuidadosamente controlados por meio da fórmula e do uso de embalagens, a fim de estabilizar os alimentos e outros materiais contra a oxidação lipídica.

4. Oxigênio

O oxigênio é, sem sombra de dúvida, um elemento importante da oxidação dos lipídeos, formando radicais peroxila ao se ligar aos radicais L^\bullet ; por essa razão, é normal esperar que a oxidação dependa da quantidade de oxigênio disponível e que seja proporcional a essa quantidade. No entanto, a ligação do oxigênio é controlada pela difusão e é quase instantânea, portanto não é a etapa limitante da velocidade da oxidação dos lipídeos. O ponto crucial da manutenção da oxidação é a necessidade de haver oxigênio suficiente para reagir com todos os radicais L^\bullet formados. Quando $O_2 < LH$, a oxidação não progride a todo vapor, e a velocidade da oxidação aumenta rapidamente com o aumento da pO_2 , desde que o oxigênio seja limitante. Para a maioria das oxidações lipídicas, a formação do radical LOO^\bullet depende do O_2 apenas até ~ 10 mm pO_2 . Contudo, quando $O_2 > LH$, o oxigênio em excesso não é aproveitado e não tem efeito adicional sobre a cinética.

Quanto às contribuições do oxigênio para a oxidação dos lipídeos, vários pontos importantes devem ser ressaltados:

- A velocidade da oxidação é determinada pela velocidade de formação dos radicais L^\bullet pelos iniciadores, e não pela concentração do oxigênio (De Groot e Noll, 1987). Como consequência, a interrupção da iniciação é tão importante quanto a limitação do oxigênio no controle da oxidação lipídica.
- O teor de oxigênio, muitas vezes, influencia a formação dos radicais L^\bullet tanto quanto a ligação do oxigênio a esses radicais. Por exemplo, o Fe^{2+} precisa do oxigênio para auto-oxidar a Fe^{3+} e produzir $O_2^{\bullet-}$ e os radicais que derivam dele; por isso, a presença ou a ausência de um agente quelante de metais afeta enormemente a dependência da oxidação lipídica subsequente em relação ao oxigênio, muito além das reações do oxigênio com os ácidos graxos.
- Em pO_2 mais elevadas, o oxigênio tem pouco efeito sobre a velocidade da oxidação, mas controla o curso da oxidação e o grau de oxigenação dos produtos. O oxigênio altera o equilíbrio entre as vias alternativas das reações (por exemplo, rearranjo interno *versus* abstração) e determina a quantidade de produtos oxigenados da recombinação que são formados, conforme discutido na seção III, A, 3.
- O oxigênio tem diferentes efeitos sobre a iniciação e a propagação e, por isso, a dependência do oxigênio observada varia com os produtos analisados.
- A catálise pelo oxigênio da oxidação lipídica é proporcional à área da superfície exposta tanto dos alimentos líquidos quanto dos sólidos. A reação dos lipídeos com o oxigênio da atmosfera é mais rápida que a difusão do oxigênio nos óleos.
- Os efeitos do oxigênio sobre a oxidação diminuem em temperaturas elevadas nas quais a iniciação térmica aumentada se torna maior que a solubilidade do oxigênio.

V. QUAIS SÃO AS CONSEQUÊNCIAS DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA?

É pouco provável que a reação de oxidação dos lipídeos recebesse tanta atenção se ela apenas produzisse odores e

sabores desagradáveis. O problema com a oxidação lipídica é que mesmo em níveis extremamente baixos, ela dissemina a oxidação para muito mais além das moléculas de lipídeo imediatamente envolvidas, de modo que quase todos os aspectos da química e da qualidade são afetados. A Figura 11.15 mostra algumas das consequências mais importantes. Todas, exceto aquelas que envolvem apenas lipídeos, resultam da cooxidação de outras macromoléculas.

A. Efeitos diretos causados por alterações nos lipídeos

1. Produção de odores e sabores desagradáveis, perda de sabor (flavor fade)

A oxidação lipídica é conhecida entre os leigos como “ranço”, por causa dos fortes e desagradáveis odores gordurosos característicos que os consumidores sentem ao abrir um pote de creme de amendoim, um pacote de batatas *chips*, uma barra de chocolate, um frasco de óleo para salada ou um pacote de ração para animais domésticos que estejam vencidos. A percepção sensorial da rancidez inclui também vários sabores desagradáveis penetrantes. Esses odores e sabores têm sua principal origem nos produtos secundários da oxidação lipídica, sobretudo nos aldeídos e cetonas, que os humanos conseguem detectar em concentrações mínimas (partes por bilhão). Os odores e sabores tornam-se rapidamente repulsivos à medida que as concentrações aumentam, de modo que a maioria dos alimentos é rejeitada quando a oxidação é inferior a 1%.

As Tabelas 11.11 e 11.12 listam alguns dos sabores e odores associados aos lipídeos oxidados, além do produto responsável e dos níveis de detecção. Um ponto importante a ser ressaltado é que a detecção dos produtos da oxidação é 10-10.000 vezes maior na água que no óleo, porque na água os compostos se tornam mais voláteis e sofrem menos competição pelos sensores da língua. Em termos práticos, isso significa que o óleo para saladas contido em uma garrafa pode ter odor e sabor um tanto inofensivos, mas torna-se não comestível quando combinado com a água e o vinagre dos molhos. Na verdade, qualquer alimento com um teor apreciável de umidade desenvolverá um “ranço” reconhecível mais rápido que os produtos secos ou com base oleosa.

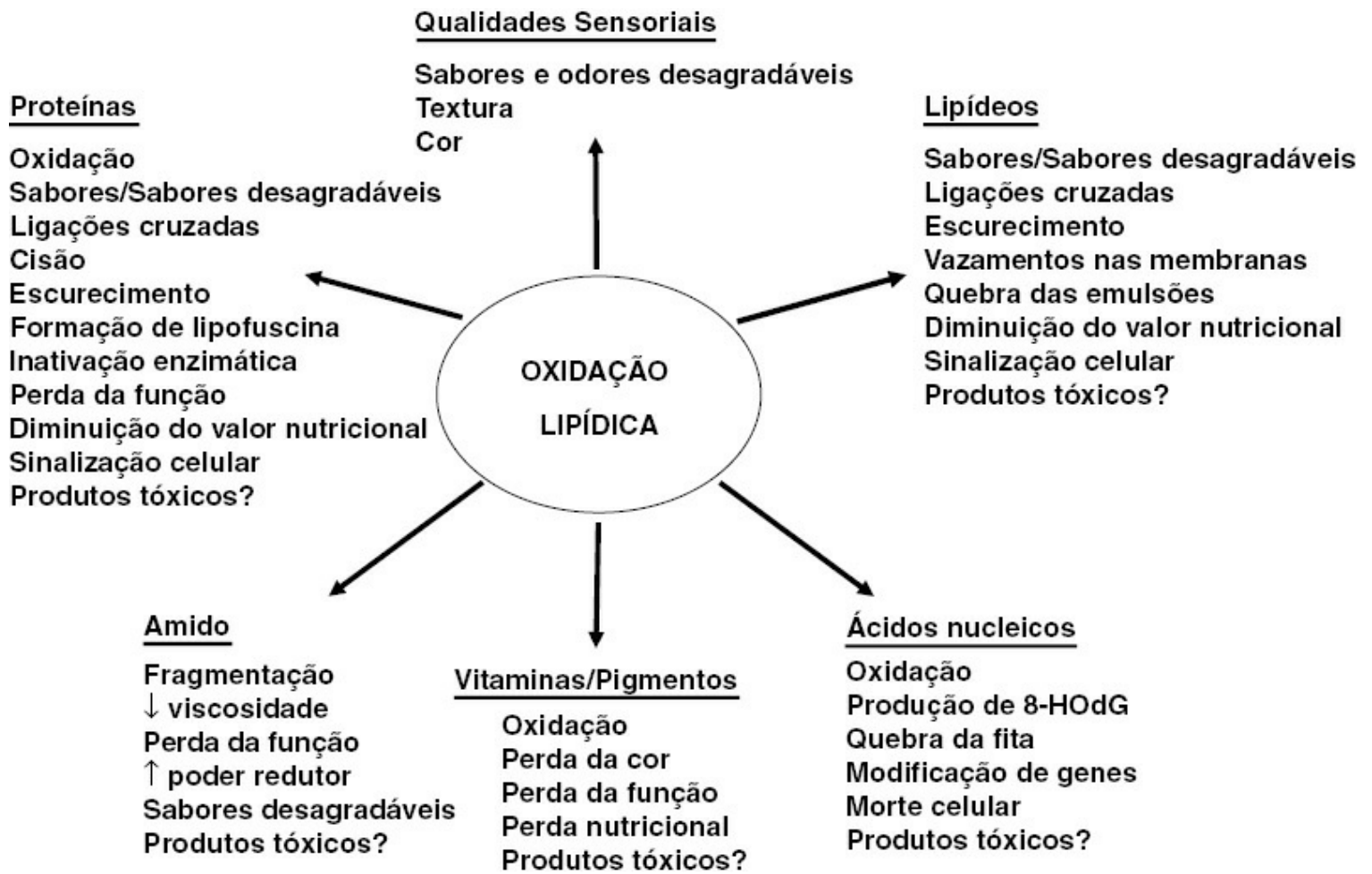


FIGURA 11.15 Consequências da oxidação lipídica relacionadas com as características sensoriais e às propriedades químicas dos alimentos.

TABELA 11.11 Sabores/Aromas desagradáveis produzidos por diferentes produtos da oxidação lipídica

Composto ^a	Sabor desagradável	Valor-limiar (ppm)		
		No óleo		Na água
		Odor	Gosto	Odor
Aldeídos				
Pentanal	De amêndoa amarga, penetrante	0,24	0,15	0,012
Hexanal	De fruta verde, de amêndoa amarga	0,32	0,08	0,008
Octanal	Gorduroso; de sabão; de fruta	0,32	0,04	0,0007
Nonanal	De sebo; de sabão; de fruta	13,5	0,2	0,001
Decanal	De casca de laranja	6,7	0,7	0,0001
Nonenal (3c)	De pepino verde	0,25	0,03	
Nonenal (2t)	De sebo; de amido; de cola	3,5	0,04	0,0008
Nonadienal (2t, 4t)	Gorduroso, oleoso	2,5	0,46	
Nonadienal (2t, 6c)	De pepino	0,01	0,0015	
Nonadienal (2t, 6t)	Gorduroso, verde	0,21	0,018	
Decadienal (2t, 4c)	Odor de fritura		0,02	
Decadienal (2t, 4t)	De fritura	2,15	0,1	
Cetonas e furanos				
1-Penteno-3-ona	Penetrante; de peixe		0,003	

1-Octeno-3-ona	Metálico			
1-Octeno-3-ol	De bolor; de cogumelo	0,077	0,0001	0,00009
2-Pentilfurano	Amanteigado; de favas	2		
2-(1-Pentenil)furano (<i>cis</i> e <i>trans</i>)	Alcaçuz	2 a 6		

Dados obtidos de Belitz e Grosch (1986).

TABELA 11.12 Valores-limiars de detecção dos principais produtos voláteis dos óleos comestíveis oxidados

Compostos	Intervalo dos valores-limiars
	(ppm)
Hidrocarbonetos	90-2150
Furanos	2-27
Alcoóis vinílicos	0,5-3
1-Alquenos	0,02-9
2-Alquenas	0,04-2,5
Alcanais	0,04-1
2,4-Alcadienais	0,04-0,3
<i>trans</i> , <i>cis</i> -Alcadienais	0,02-0,06
Cetonas vinílicas	0,00002-0,007

Dados obtidos de Frankel (1985).

Paradoxalmente, os produtos carbonílicos resultantes da oxidação lipídica, junto com aminoácidos, entram nas reações de degradação de Strecker, gerando alguns produtos com sabor desejável e característico. O creme de amendoim, por exemplo, é insípido, sem gosto, quando fresco e não oxidado.

Também ocorre um fenômeno conhecido como perda de sabor (*flavor fade*). À medida que a oxidação lipídica avança, alguns dos sabores frescos característicos são perdidos. Não está claro se isso ocorre porque os componentes que dão sabor são oxidados ou porque os níveis aumentados de aldeídos lipídicos e de outros produtos da oxidação lipídica se sobrepõem à percepção dos sabores originais.

2. Degradação das membranas e alteração da estrutura dos lipídeos

A estrutura física dos lipídeos dos alimentos depende em grande parte das associações hidrofóbicas entre as cadeias acila, mas essas são rompidas quando os lipídeos se oxidam e acumulam produtos mais polares ou formam ligações cruzadas e perdem a organização estrutural. Nos tecidos vivos, as membranas apresentam vazamentos ou endurecem e, em ambos os casos, perdem a funcionalidade quando os fosfolipídeos que as compõem sofrem oxidação. Nos alimentos, as mesmas alterações nas membranas levam à perda de turgor e à deterioração da textura. A oxidação da fase lipídica das emulsões gera produtos polares que se movem para a interface e modificam a tensão superficial. E quando o nível desses produtos atinge um valor alto o suficiente, as emulsões se quebram. A oxidação também afeta a estrutura cristalina dos lipídeos. A introdução de grupos polares rompe o empacotamento das cadeias em cristais e força a reorganização dos triacilgliceróis para reduzir as repulsões. Quando isso ocorre em gorduras, margarinas e chocolates, há sempre um desvio para as formas β -cristal mais densas, o que resulta em endurecimento, no aparecimento de arenosidade e, no caso do chocolate, em uma tendência maior para formar cristais brancos sobre a superfície (*bloom*).

B. Efeitos causados pela interação dos intermediários e produtos da oxidação lipídica com outras moléculas, com destaque para as proteínas

Embora a rancidez seja uma qualidade sensorial atribuída, em geral, apenas aos lipídeos, a maioria dos efeitos deletérios da oxidação lipídica dos alimentos listados na Figura 11.15 não resulta das alterações dos lipídeos em si, mas das reações dos radicais intermediários e dos produtos secundários da oxidação lipídica com outras moléculas. Muitos sabores desagradáveis atribuídos aos lipídeos – por exemplo, o sabor das carnes cozidas requentadas e alguns sabores “envelhecidos” – têm origem nas cooxidações. Por isso, quando se faz o rastreamento e a medição da oxidação lipídica nos alimentos, seguir os indícios da oxidação lipídica de outras moléculas é tão importante quanto determinar os produtos diretos dessa oxidação. Infelizmente, essas reações com frequência são omitidas, porque são pouco conhecidas e sua análise é mais difícil. E há ainda outro problema: quando as cooxidações ocorrem, elas têm um efeito antioxidante que remove os produtos da oxidação lipídica do material a ser analisado. Como consequência, os teores de peróxidos, carbonilas e, principalmente, de epóxidos de lipídeos (e, portanto, da oxidação global) podem estar baixos ou ser insignificantes, quando, na verdade, a oxidação ocorreu até de modo extenso, às vezes, e foi transferida para outras moléculas.

Um fator importante que complica a distinção das cooxidações é que quase todos os intermediários e produtos da oxidação lipídica – em especial, os radicais, os hidroperóxidos, os aldeídos e os epóxidos – reagem com proteínas (Schaich, 2008), amidos (Ishii *et al.*, 1976; Kawakishi *et al.*, 1983), pigmentos, DNA (Blair, 2001; Yang, 1993; Yang e Schaich, 1996) e outras moléculas. É particularmente difícil rastrear os produtos das reações com radicais, porque eles quase sempre são o resultado de oxidações e não adutos, e, com frequência, transformam-se ou se degradam ainda mais. Novas metodologias analíticas que facilitam a detecção de aminoácidos modificados específicos poderão alterar esse quadro, no futuro. As carbonilas e os epóxidos formam adutos que são mais duradouros e mais fáceis de detectar; por isso, a cooxidação é mais atribuída a reações de produtos secundários que a radicais. A questão não é saber qual é a reação correta, porque todas elas ocorrem. Em vez disso, é fundamental reconhecer que uma série longa de danos causados por diferentes espécies da oxidação lipídica surge e se modifica à medida que a oxidação (e a cooxidação) avança. No início da oxidação, predominam as cooxidações com radicais; quando a oxidação aumenta, as reações com epóxidos e aldeídos passam a prevalecer.

Apresentaremos aqui uma visão geral de como vários intermediários e produtos da oxidação lipídica causam a cooxidação de proteínas. Esse tema será abordado na forma de uma pequena introdução a um aspecto da oxidação lipídica que poderia compor um capítulo inteiro.

1. Reações dos radicais livres de lipídeos

Como já ressaltado, as proteínas reagem com quase todas as classes de intermediários e produtos da oxidação lipídica – radicais, hidroperóxidos, carbonilas e epóxidos –, com consequências variáveis. A transferência de radicais de lipídeos em oxidação para as proteínas é o processo que predomina nas etapas iniciais da oxidação. Os alvos são resíduos de aminoácidos com hidrogênios facilmente abstraíveis, que substituem as cadeias acila dos lipídeos e competem com elas – isto é, aqueles aminoácidos com grupos amino ou sulfidril em suas cadeias laterais (triptofano, histidina, arginina, lisina e cisteína) – e o resultado são radicais livres de proteínas (Schaich e Karel, 1976; Schaich, 1980b). Os elétrons livres que permanecem localizados nas cadeias laterais dos aminoácidos geram radicais livres com um átomo de nitrogênio ou de enxofre em seu centro, que produzem as ondas amplas características dos espectros da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (Figura 11.16). Os elétrons livres também migram e tornam-se deslocalizados ao longo da estrutura peptídica ou no carbono β de aminoácidos hidrofóbicos, como a valina. Esses radicais aparecem como espectros de RPE singletos mais estreitos. Todos esses tipos de radicais podem estar presentes de modo simultâneo, permanecendo bastante estáveis nos materiais secos, muitas vezes persistindo por meses a anos.

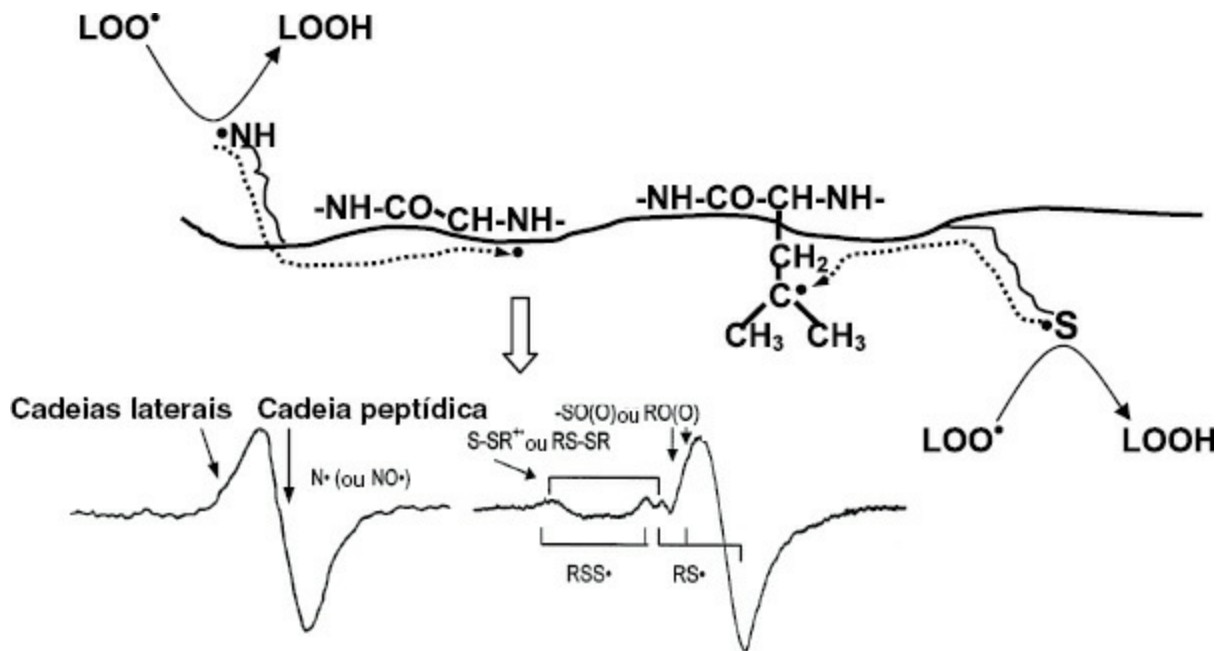


FIGURA 11.16 Transferência de radicais livres dos radicais peroxila de lipídeos para proteínas. A abstração de hidrogênio das cadeias laterais dos aminoácidos His, Lys, Trp, Arg e Cys gera radicais H^\bullet e S^\bullet . Os espectros não resolvidos sobrepostos de vários sítios de radicais são evidentes em envelopes largos dos espectros da ressonância paramagnética eletrônica. Os radicais também se tornam deslocalizados sobre os nitrogênios situados ao longo da estrutura peptídica e podem migrar para as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos, como a valina e a leucina.

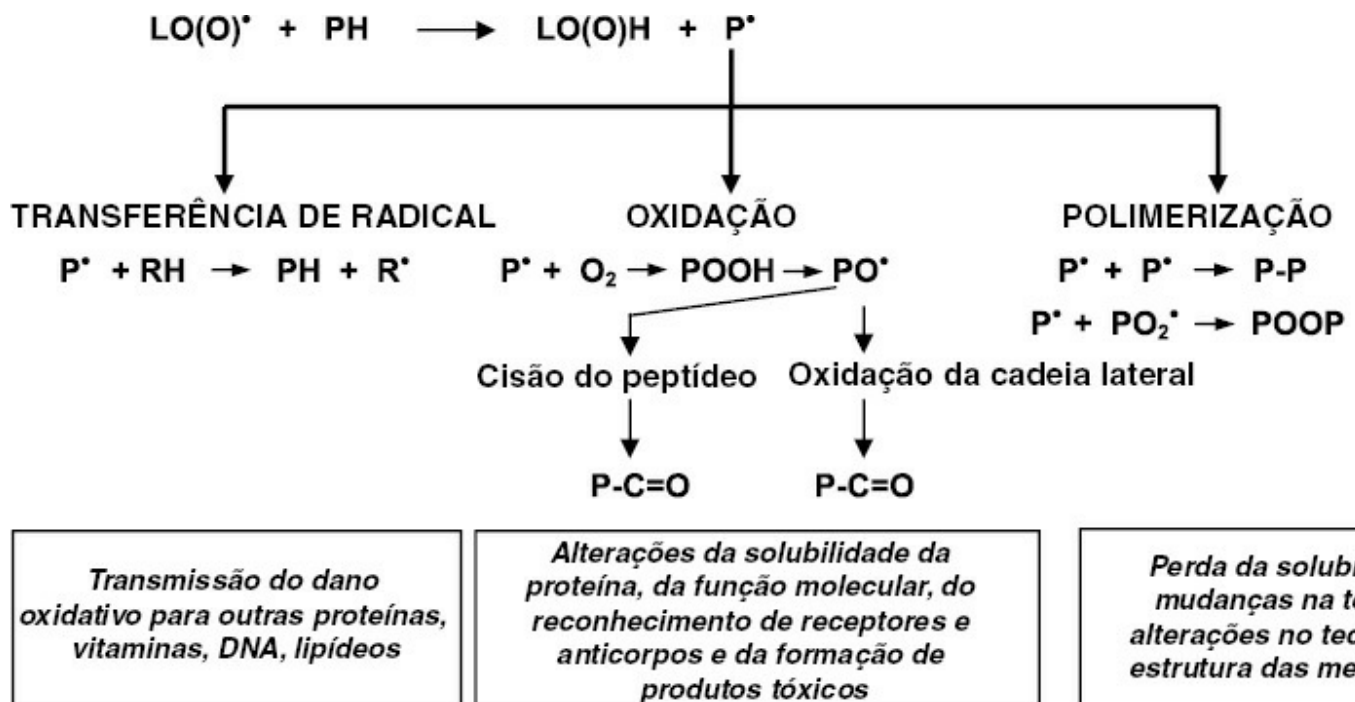


FIGURA 11.17 Vias e consequências da produção de radicais livres em proteínas. P^\bullet é um radical de proteína em qualquer carbono α da estrutura peptídica principal ou em uma cadeia lateral de aminoácido, e RH é qualquer molécula com hidrogênios abstraíveis. Obtido de Schaich (2008). Reproduzido com permissão.

As reações dos radicais de proteínas assemelham-se às reações dos radicais de lipídeos: ligação de oxigênios, formando radicais peroxila (POO^\bullet), abstração de hidrogênios, gerando hidroperóxidos ($POOH$) e decomposição de $POOH$, produzindo radicais alcóxila de proteínas (POO^\bullet) e as subsequentes carbonilas de proteínas ($P-C=O$) (Figura 11.17). No início, acreditava-se que os radicais e os hidroperóxidos de proteínas eram relativamente inativos. Contudo, as evidências atuais mostram que, na verdade, eles são reativos, transferindo radicais para outras proteínas (Soszylski *et al.*, 1996), DNA (Gebicki e Gebicki, 1999), lipídeos (Gardner e Weisleder, 1976; Gardner *et al.*, 1977; Avdulov *et al.*, 1997) e, possivelmente, outras moléculas, disseminando e perpetuando o dano oxidativo.

Nos alimentos, a formação de radicais livres, hidroperóxidos e carbonilas de proteínas prepara o terreno para uma ampla variedade de reações danosas subsequentes, que incluem alterações na estrutura e na solubilidade de proteínas, perda da atividade enzimática e de outras atividades biológicas, cisão e ligação cruzada, que levam à deterioração acentuada da textura e à perda do valor nutricional. Os aminoácidos-alvo são oxidados, transformados e degradados. Muitos dos aminoácidos essenciais, conforme listado adiante, estão entre os mais sensíveis ao dano pela transferência de radicais provenientes da peroxidação dos lipídeos (Schaich, 1980a; 2008):

Cisteína	Serina	Glicina
Triptofano	Treonina	Alanina
Histidina		Valina
Lisina		Prolina
Arginina		Leucina
Tirosina		Isoleucina
Metionina		

In vivo, essas alterações têm consequências desastrosas para o funcionamento fisiológico e estão intimamente envolvidas nos processos patológicos que foram destacados na seção I.

2. Reações dos hidroperóxidos de lipídeos

Os hidroperóxidos de lipídeos não são diretamente reativos, mas sua capacidade de ligar hidrogênios aos grupos amino das proteínas cria uma “gaiola de reações”, dentro da qual ocorre a decomposição induzida do LOOH e a reação direta do radical LO(O)[•] resultante com aminoácidos-alvo (Karel *et al.*, 1975; Schaich e Karel, 1976). O processo, denominado homólise assistida por moléculas, é muito rápido e pode ser independente de metais ou envolver metais ligados a proteínas.

Sem metais, os hidroperóxidos de lipídeos ligam-se geralmente aos grupos amino ou sulfidril da cadeia lateral, na superfície das proteínas, e o átomo nucleofílico induz a homólise do hidroperóxido e a transferência do radical do lipídeo para a proteína:

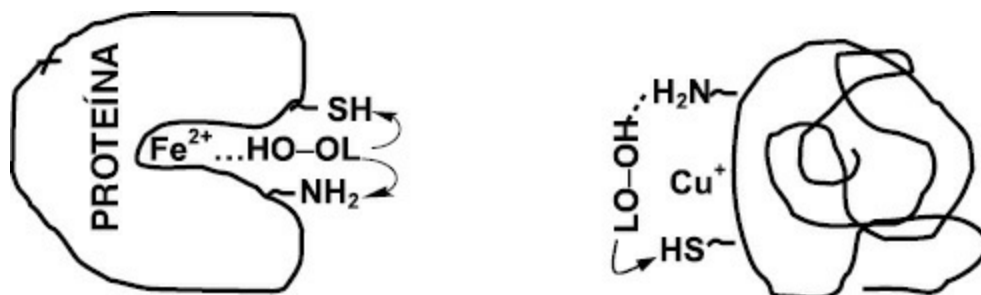
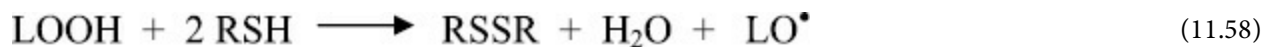


FIGURA 11.18 Transferência de radicais (mediada por metais) do LOOH para proteínas. Os hidroperóxidos de lipídeos ligados próximo a metais de sítios ativos ou à superfície de proteínas são reduzidos em reações “em gaiola”, e o LO[•] resultante abstrai um hidrogênio

de um aminoácido suscetível vizinho, antes de ser liberado.

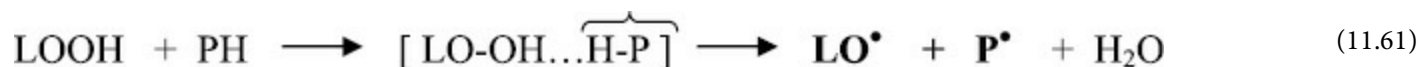
Essa reação combinada contribui para a sensibilidade dos aminoácidos histidina, arginina, lisina, triptofano, cisteína, serina e treonina ao LOOH; todos esses aminoácidos têm, em suas cadeias laterais, grupos amino, ácido carboxílico e hidroxila, que se ligam ao hidrogênio (Gardner, 1979; Schaich, 1980b). Ela também poderá estar aumentada nas proteínas que se ligam a lipídeos, como a albumina sérica bovina, na qual as cadeias laterais hidrofóbicas facilitam as associações com os lipídeos e trazem os resíduos reativos para bem perto dos LOOH.

Os metais ligados a proteínas são ainda mais reativos com os lipídeos e mais danosos, de um modo geral, que os metais livres em solução. Nas metaloproteínas, o LOOH liga-se ao sítio de ligação do metal e é reduzido pelo metal na “gaiola de reações”; o radical LO• gerado oxida os aminoácidos vizinhos, a histidina, em particular (Kowalik-Jankowska *et al.*, 2004) (Figura 11.18, à esquerda). Nas não metaloproteínas, os sítios de ligação dos metais, como as cadeias laterais da histidina, do ácido glutâmico e do ácido aspártico nas superfícies das proteínas, também fornecem locais para a redução (catalisada por metais) dos LOOH em reações “dentro de gaiola” (Figura 11.18, à direita).

Por que a decomposição induzida do LOOH é importante? Com a transferência normal de radicais por meio da abstração de hidrogênios, radicais de proteínas e LOOH são gerados, simultaneamente; Portanto, há uma conexão mensurável e direta entre os processos de iniciação e os produtos da oxidação de proteínas e lipídeos. Tanto os LOOH quanto os radicais de proteínas surgem em velocidades que são proporcionais às velocidades de aparecimento dos radicais L• e LOO•. No entanto, como são as proteínas que fornecem os hidrogênios abstraíveis para a formação dos LOOH, o processo global é antioxidativo: as cadeias de radicais livres de lipídeos são interrompidas e menos moléculas de lipídeos são oxidadas.



Por outro lado, nas reações que ocorrem “dentro de gaiola”, as moléculas de lipídeos fornecem os hidrogênios abstraíveis para a formação do LOOH; por isso, o LOOH é gerado de modo contínuo, mas também é removido, à medida que os radicais de proteínas se formam.



Esse é um processo pró-oxidante, uma vez que as cadeias de radicais de lipídeos não são interrompidas, a decomposição do LOOH possibilita a transferência rápida e direta de radicais para as proteínas e ocorre, ainda, a liberação de radicais LO• para propagar mais cadeias de radicais. É importante destacar que, quando a oxidação lipídica é acompanhada apenas pelos valores do peróxido, pode parecer que os lipídeos não sofrem oxidação, até quando proteínas são extensamente degradadas; como consequência, os lipídeos podem não ser considerados a verdadeira fonte do dano.

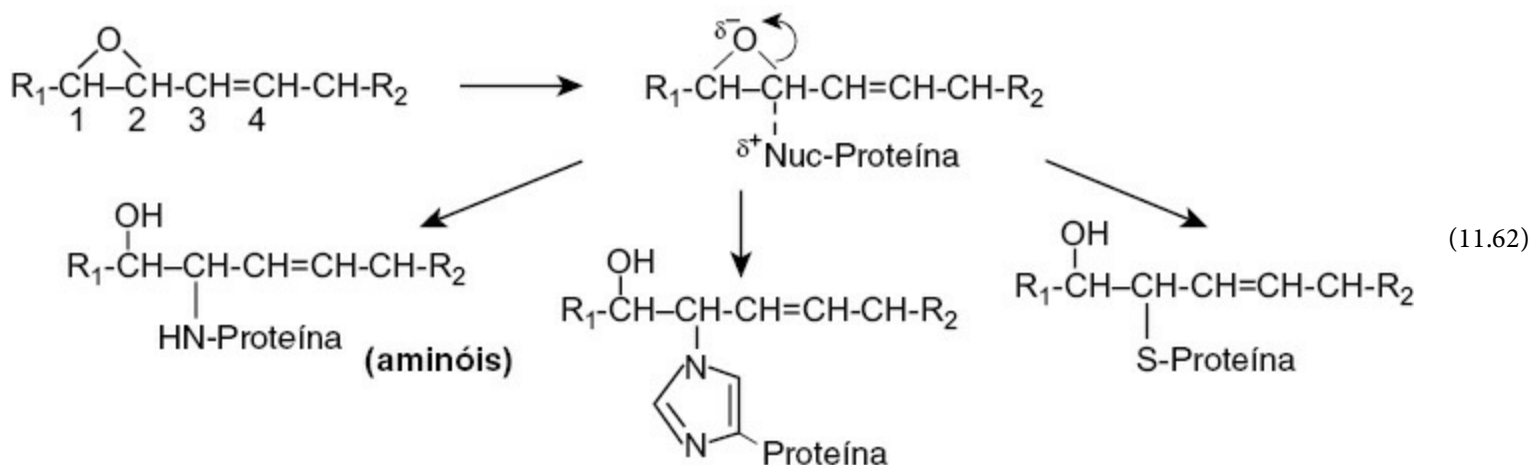
Já foram relatadas reações combinadas do LOOH com proteínas em soluções tamponadas de linoleato de metila ligado a b-lactoglobulina (Hidalgo e Kinsella, 1989; Yuan *et al.*, 2007); as emulsões liofilizadas de linoleato de metila reagiram com lisozima e outras proteínas (Schaich e Karel, 1975; Schaich, 1980a); as apoA1 e A2 do HDL reagiram com hidroperóxidos de colesterol e de fosfolipídeos (Garner *et al.*, 1998); a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e o citocromo *c* foram incubados com LOOH e, também, com hidroperóxidos de fosfolipídeos (Fruebis *et al.*, 1992); e as congulinas de tremço reagiram com LOOH (Fruebis *et al.*, 1992; Lqari *et al.*, 2003).

Contudo, é provável que essas reações ocorram na maioria dos sistemas, mas ainda não foram identificadas.

3. Reações dos epóxidos de lipídeos

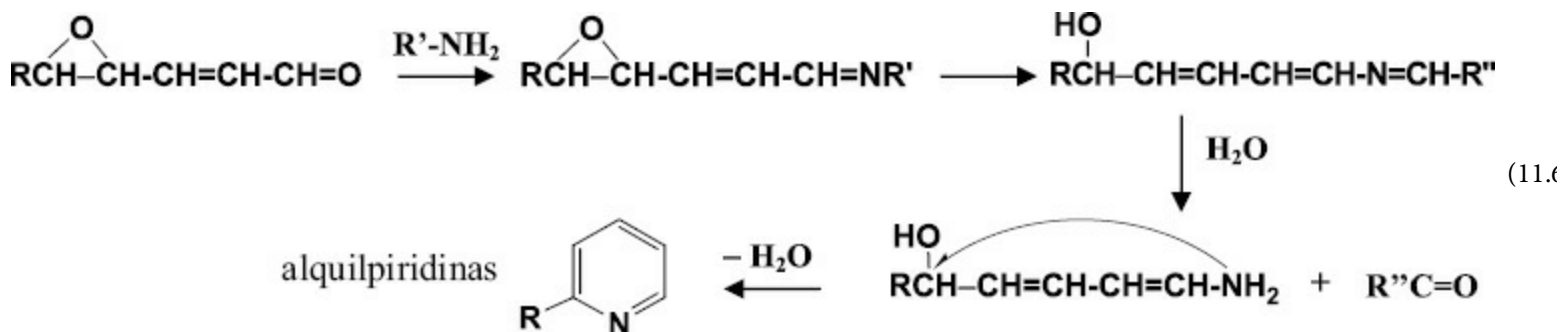
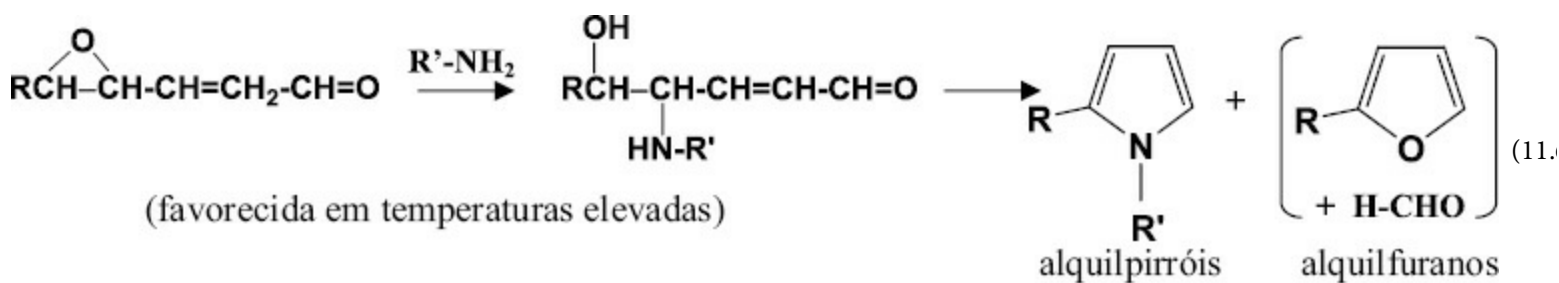
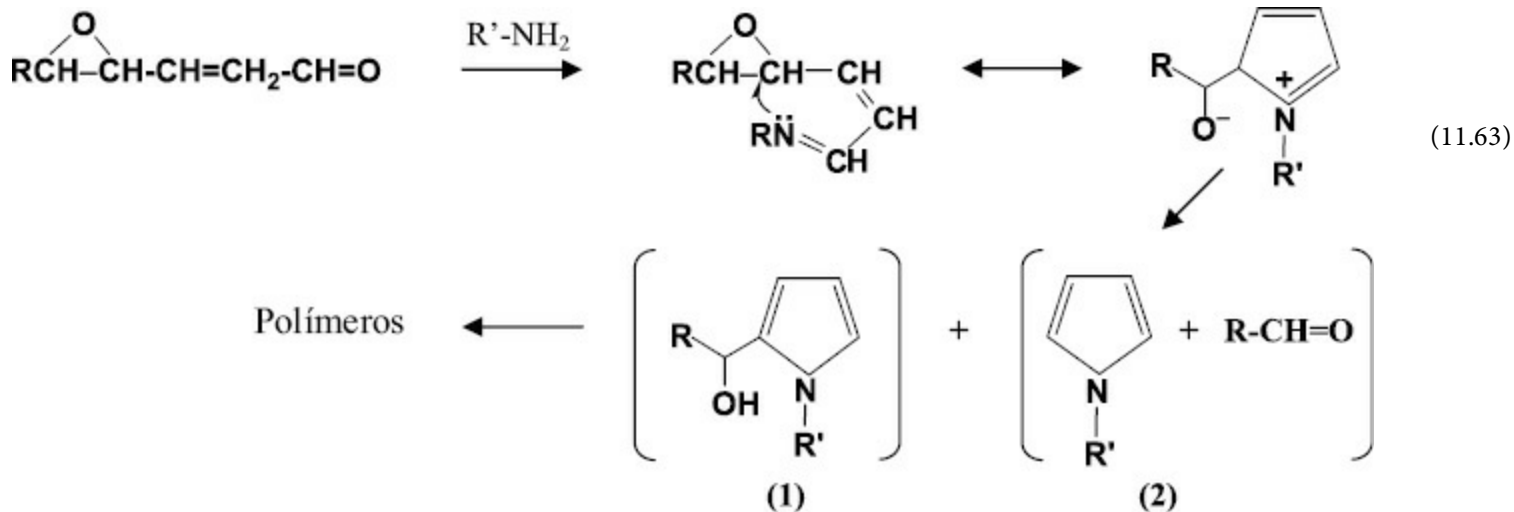
Talvez os epóxidos sejam os oxidantes derivados de lipídeos mais subestimados e menos estudados, em parte, porque são tão reativos que não é fácil rastreá-los analiticamente. É particularmente difícil vincular os epóxidos às cooxidações de proteínas, porque os epóxidos reagem com proteínas cerca de 1.000 vezes mais rápido que os aldeídos. Isso reduz muito ou mesmo elimina os epóxidos da mistura de produtos da oxidação lipídica; por essa razão, o dano proteico detectado é atribuído a outros produtos da oxidação lipídica. Portanto, seguir os rastros dos epóxidos nas proteínas oxidadas é mais revelador que analisar isoladamente os epóxidos de lipídeos.

As reações dos epóxidos com proteínas dependem muito das condições da reação e da posição do grupo epóxi na cadeia acila dos lipídeos. Quando os grupos epóxi estão próximos de duplas ligações, eles se hidrolisam com facilidade (Lederer, 1996) e também sofrem ataque nucleofílico dos grupos amino das proteínas (Ingold, 1969b). A Reação 11.62 mostra o processo fundamental, da maneira como ele ocorre, entre um epóxido do ácido linoleico e a lisina, a histidina e a cisteína (da esquerda para a direita). Os produtos, denominados aminóis, têm duas características principais: (a) um grupo hidroxila no carbono b do epóxido original e (b) uma proteína ligada de forma covalente ao carbono a do epóxido, como mostrado adiante, ou ao carbono a do lado oposto da dupla ligação.



Na presença de água, os anéis do epóxido se abrem, mas a hidrólise impede a ligação da proteína (Lederer, 1996). Portanto, essas reações do epóxido com proteínas são mais importantes em condições anidras – por exemplo, em alimentos secos e em regiões hidrofóbicas internas de biomembranas e lipoproteínas do sangue.

À medida que a oxidação lipídica avança, as cooxidações pelos epóxidos tornam-se mais complexas. É importante destacar que os grupos funcionais aldeído e epóxido no mesmo lipídeo propiciam dois sítios para a reação e preparam o terreno para a ciclização, para formar hidroxialquil pirróis e hidroxialquil furanos (Reações 11.63 e 11.64, respectivamente) (Zamora e Hidalgo, 1995; 2003; 2005; Zamora *et al.*, 1999; Hidalgo e Zamora, 2000), além de alquilpiridinas (Reação 11.65) (Zamora e Hidalgo, 2005; Zamora *et al.*, 2006). A reação que ocorre em dado sistema é determinada pelo solvente, pelo pH, pela temperatura e pela natureza dos grupos amino da proteína.



A detecção de aminóis é claramente diagnóstica da cooxidação de proteínas por epóxidos. No entanto, os pirróis e as piridinas também são os principais produtos das cooxidações de proteínas por aldeídos, como será explicado na próxima seção; por isso, pode ser extremamente difícil distinguir as reações dos epóxidos das reações dos aldeídos, exceto pela cinética, talvez. Como consequência, é muito provável que as reações dos epóxidos com proteínas tenham sido ignoradas e interpretadas de maneira errônea como um dano mediado por aldeídos.

4. Reações dos aldeídos de lipídeos

As reações dos produtos secundários da oxidação lipídica, particularmente dos aldeídos, ocorrem nas etapas mais avançadas da oxidação lipídica e dão origem a diferentes tipos de produtos da oxidação de proteínas. Os aldeídos formam adutos covalentes com proteínas, ao passo que os radicais de lipídeos geralmente não formam, e isso tem consequências importantes sobre as propriedades proteicas que são modificadas. Com exceção da ligação cruzada, o dano causado pelos radicais livres permanece em grande parte "invisível" no nível molecular. Já as reações dos aldeídos causam alterações bem perceptíveis, como a produção de sabores e odores, o escurecimento e a agregação textural. As reações dos aldeídos de lipídeos e de outros produtos secundários são responsáveis pela deterioração que leva os consumidores a rejeitar os produtos alimentícios, considerando-os não comestíveis.

Os aldeídos reagem com grupos nucleofílicos das proteínas por meio de bases de Schiff, adição de Michael ou de uma combinação de ambas para formar adutos, com três resultados gerais:

- Adutos lineares que mudam a química das superfícies e o reconhecimento das proteínas e, possivelmente, contribuem para o escurecimento. Essa é a etapa inicial para todos os aldeídos e a reação que predomina entre uma carbonila isolada e grupos amino.
- Produtos cíclicos, principalmente di-hidropiridinas e pirróis, na forma de adutos ou em ligações cruzadas, que contribuem para o escurecimento, a produção de sabores e odores e a perda da funcionalidade das proteínas. Os produtos cíclicos são os que predominam quando há vários grupos reativos disponíveis. Por exemplo: dois grupos amino em um aminoácido terminal ou dois grupos funcionais em um aldeído (como hidroxila + aldeído, dois aldeídos ou excesso de aldeídos em relação às aminas disponíveis).
- Ligações cruzadas proteicas, tanto intramoleculares quanto intermoleculares, que fortalecem a textura, diminuem a solubilidade e levam à separação das fases. As ligações cruzadas requerem a presença de vários grupos reativos no aldeído. Por exemplo: dialdeídos, como o malonaldeído e o glutaraldeído, ou hidroxilalquênais, como o 4-hidroxinonenal.

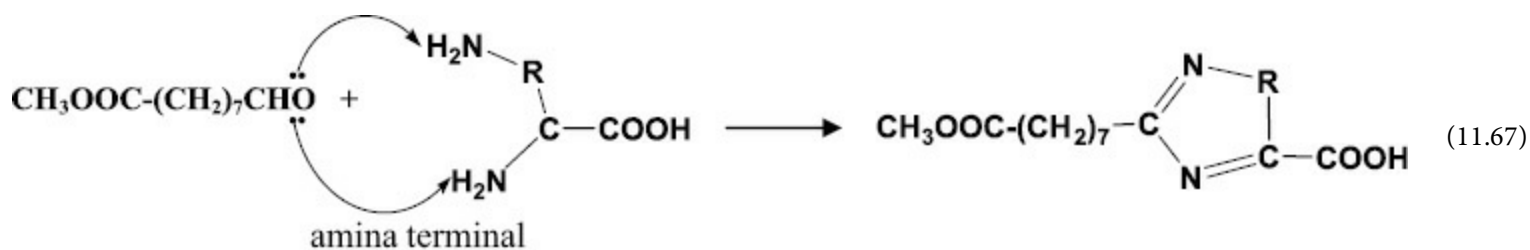
As vias exatas das reações que ocorrem ou predominam em dado sistema são influenciadas pela natureza da proteína, pelo tipo de produtos da oxidação lipídica que estão presentes, pelas concentrações relativas proteína-aldeído, pelo pH, pela fase ou solvente, pela pressão do oxigênio e por outros fatores. As reações descritas a seguir fornecem alguns exemplos dos vários produtos possíveis com diferentes aldeídos. Em sistemas alimentares reais, os produtos são muito mais complexos que os produzidos nessas reações simplificadas.

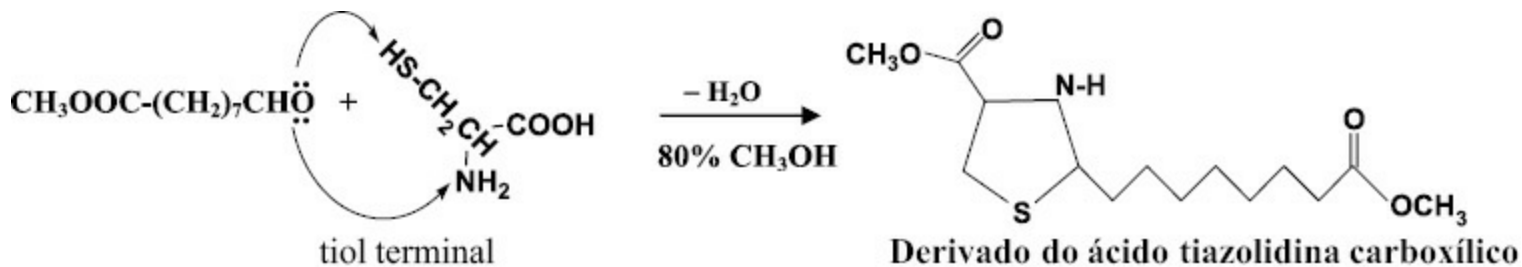
a. Aldeídos saturados

As cisões α e β dos radicais alcóxila de lipídeos liberam vários aldeídos saturados, como o hexanal, o nonanal e o 8-oxo-metiloctanoato. Embora não sejam muito reativos, esses aldeídos se ligam seletivamente a aminoácidos terminais por meio de reações-padrão com base de Schiff (McMurray, 2000):



Desde que grupos amino, de um peptídeo, e grupos amino e tiol, das cadeias laterais, estejam disponíveis, a Reação 11.66 será a primeira etapa; o par de elétrons isolado remanescente do oxigênio aldeídico sofre uma segunda reação via base de Schiff com grupos nucleofílicos das cadeias laterais, gerando produtos heterocíclicos (Fenaille *et al.*, 2003):

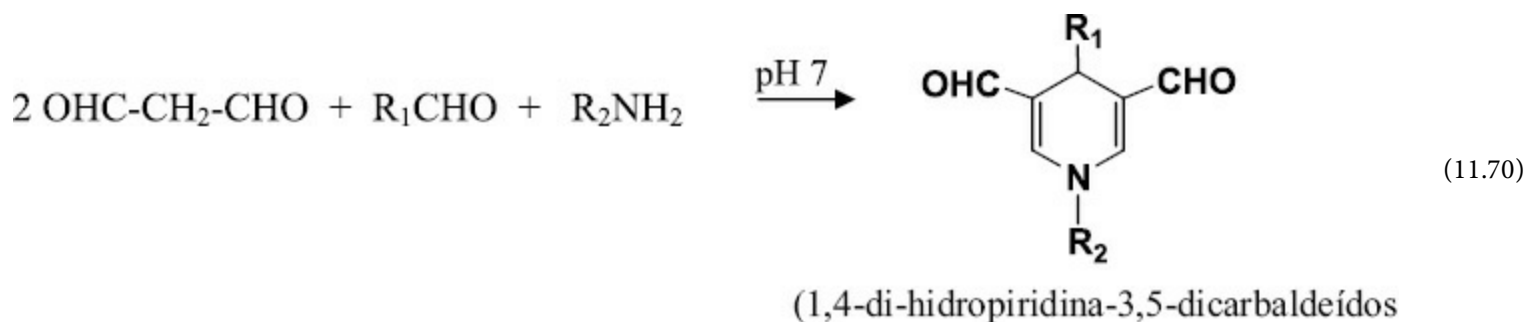




Dialdeídos, como o malonaldeído (MDA), são produzidos em oxidações secundárias de ácidos graxos poli-insaturados com três ou mais duplas ligações. Os dois grupos aldeído fornecem dois sítios para a reação com proteínas. Quando os níveis de MDA são baixos, o resultado geralmente é a formação de ligações cruzadas:



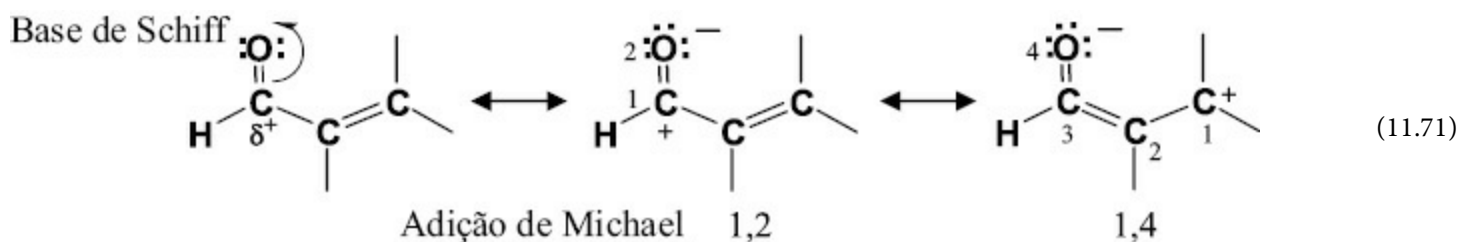
Quando a oxidação lipídica é elevada, duas moléculas de MDA se combinam com outro aldeído e um grupo amino, formando derivados piridínicos (adutos em anel da proteína) (Freeman *et al.*, 2005; Kikugawa e Ido, 1984; Nair *et al.*, 1988):



As di-hidropiridinas são importantes precursores de sabor dos alimentos (Buttery *et al.*, 1977; Suyama e Adachi, 1980; Maga, 1981).

b. Aldeídos insaturados

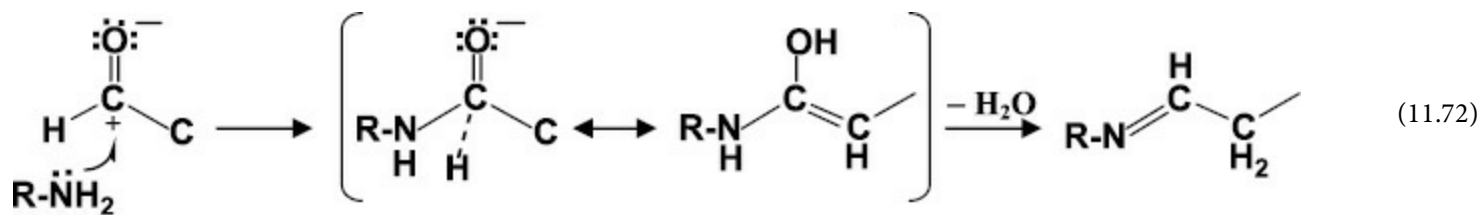
Os aldeídos insaturados – os 2-enais, em particular – são compostos de extraordinária reatividade, porque têm três formas tautoméricas em equilíbrio,



e, como consequência, três sítios de reação possíveis: a formação de base de Schiff, na carbonila e as adições 1,2 e 1,4 do tipo Michael, nos carbocátions (Esterbauer *et al.*, 1991; Ege, 1999; McMurray, 2000). Os tióis da cisteína, os grupos amino e da lisina e os nitrogênios imidazólicos da histidina são os principais alvos proteicos (Esterbauer *et al.*, 1991; Petersen e Doorn, 2004).

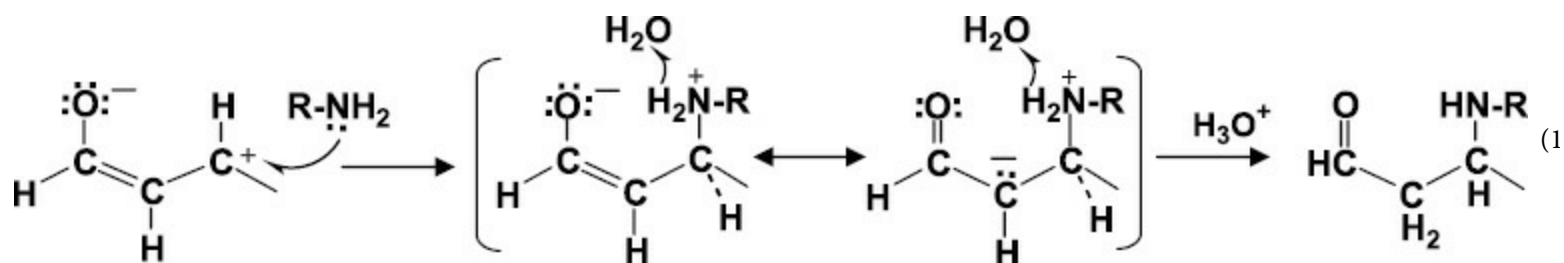
A adição direta (1,2) é semelhante à primeira etapa das reações de escurecimento de Maillard. O grupo amino

(ou tiol) liga-se ao carbono da carbonila e gera um intermediário carbinolamínico que sofre rearranjo e desidratação, formando como produto final uma base de Schiff (Ege, 1999; McMurray, 2000):



Essa é a principal reação em solventes orgânicos e microambientes hidrofóbicos; é reversível e catalisada por ácido (Esterbauer *et al.*, 1991).

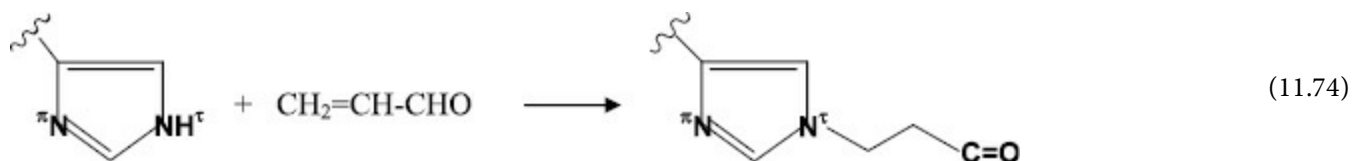
Em solução aquosa ou emulsões, a reação dominante dos alquênais de lipídeos com aminoácidos é a adição (1,4) conjugada. Nesse caso, a amina liga-se ao carbocátion formado no carbono β da dupla ligação inicialmente em conjugação com a carbonila:

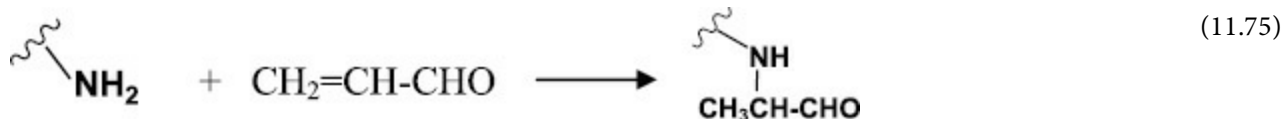


Uma diferença importante aqui é que o grupo carbonila permanece intacto. Agora formando um complexo com a proteína, essa carbonila é detectável no teste da dinitrofenil-hidrazina (DNFH) ou na análise com anticorpos para as carbonilas proteicas (produtos da oxidação). Ela também pode formar uma base de Schiff ao reagir com outra amina. Esse complexo de adição de Michael-proteína-base de Schiff-aldeído lipídico-proteína é uma fonte importante de ligações cruzadas proteína-lipídeo em sistemas mais oxidados e a sequência inicial encontrada repetidamente na formação de muitos adutos complexos. Alguns deles serão descritos a seguir.

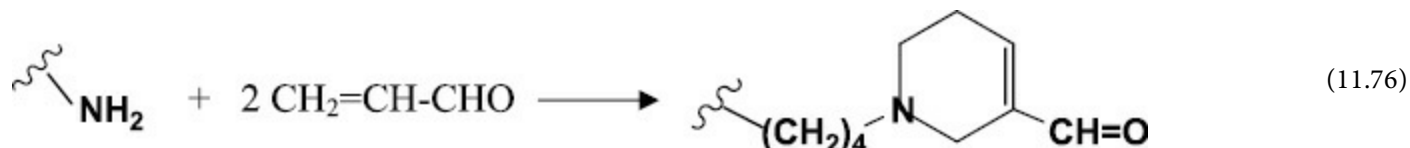
Acroleína – A acroleína ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) é um aldeído insaturado formado pela oxidação do glicerol durante a fritura; também foi identificada entre os produtos secundários da oxidação lipídica do ácido araquidônico e de ácidos graxos poli-insaturados *n-3 in vivo* (Uchida *et al.*, 1998a; 1998b; Uchida, 1999; Kehrer e Biswal, 2000). Em tempos recentes, esse composto recebeu muita atenção, por ser considerado um carcinógeno.

A acroleína é muito eletrofílica, o que propicia intensas reações com nucleófilos, como os tióis, os grupos imidazóis da histidina e o grupo amino e da lisina, por meio da base de Schiff e das adições de Michael, reações que contribuem para sua toxicidade (Uchida *et al.*, 1998a; Esterbauer *et al.*, 1991). A adição de Michael, em geral, é a reação preferida, porque é mais rápida e os produtos são mais estáveis (Esterbauer *et al.*, 1991; Uchida e Stadtman, 1992; Uchida *et al.*, 1998a; 1998b). Quando as concentrações de aldeído estão baixas, os produtos costumam ser propanais substituídos, conforme mostrado nas Reações 11.74 e 11.75.

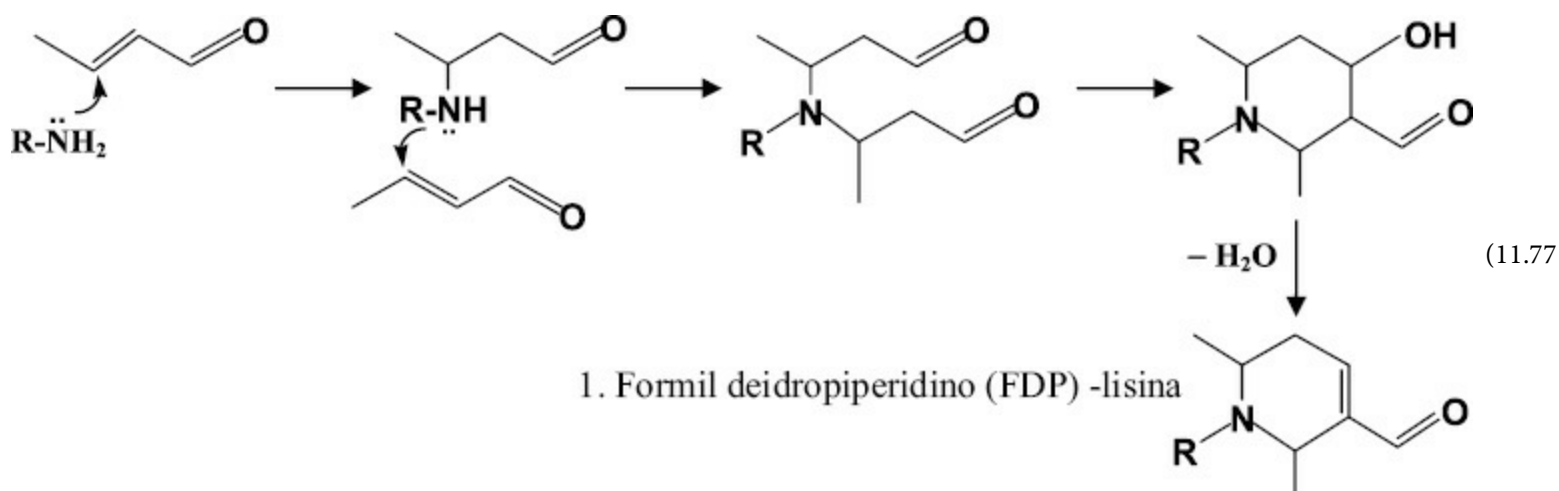




No entanto, os adutos com a lisina têm uma forte tendência a sofrer ciclização. Quando a quantidade de aldeídos é superior à de aminas, a lisina sofre múltiplas adições com a acroleína, gerando os derivados pirróis cíclicos mostrados na Reação 11.76.

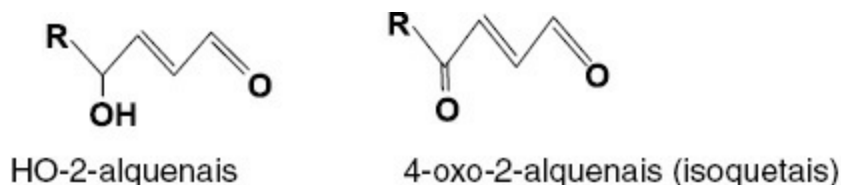


Quando o tempo de incubação é longo ou as concentrações de aldeído estão altas, os adutos de Michael de acroleína acumulados sofrem ciclização, produzindo estruturas *N*^ε-(2,5-dimetil-3-formil-3,4-deidropiperidino) (FDP) por adição 1,4 (Ichihashi *et al.*, 2001).

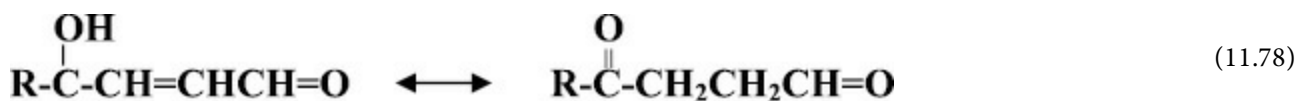


Os adutos de FDP conservam a função carbonila e, por isso, são detectados nos testes para carbonilas de proteínas oxidadas. Anticorpos para FDP-lisina já detectaram adutos de acroleína no LDL oxidado (Ichihashi *et al.*, 2001) e na albumina sérica bovina, cooxidada com araquidonato de metila (Uchida *et al.*, 1998b).

4-Hidroxi-2-alquenais e 4-oxo-2-alquenais. Alquenais oxidados como o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o 4-oxo-2-nonenal (ONE) são os aldeídos que mais reagem com proteínas (Esterbauer *et al.*, 1991).



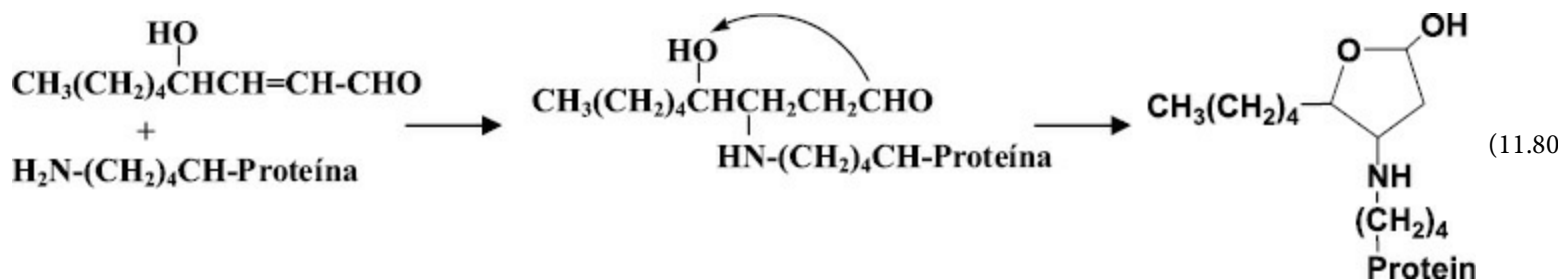
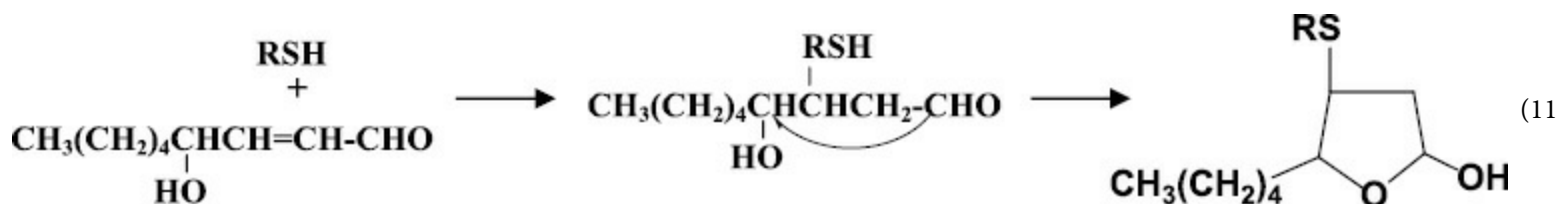
Os 4-oxo-2-alquenais, também chamados de g-cetoaldeídos, podem ser formados de modo independente, mas na verdade são tautômeros dos 4-HO-2-alquenais:



Em condições oxidantes, muitas vezes é difícil distinguir as reações desses dois oxidantes, exceto pela cinética

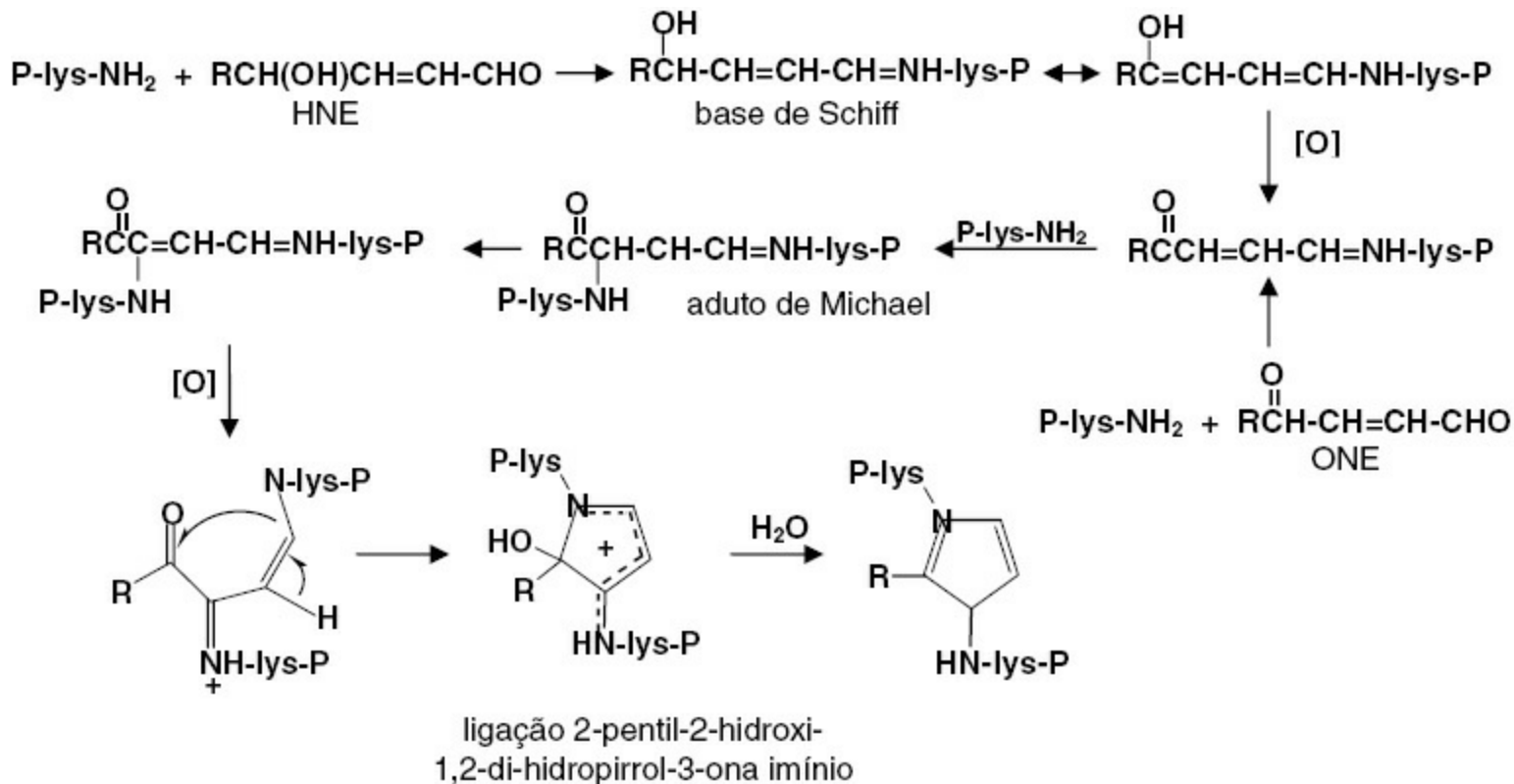
(as reações do ONE têm ordens de grandeza mais rápidas) (Lin *et al.*, 2005) e pelo equilíbrio entre as vias. Visto que ambos os compostos têm dois grupos funcionais reativos, a principal sequência de reações é igual à descrita anteriormente para os dialdeídos. A primeira etapa é geralmente a adição de Michael (1,4) às cadeias laterais do aminoácido nucleofílico (Uchida e Stadtman, 1992; Bruenner *et al.*, 1995; Schaur, 2003). O HNE reage com cisteína, histidina e lisina; o ONE reage com esses aminoácidos e também com a arginina. As reações subsequentes variam com o aldeído, os aminoácidos específicos presentes, as concentrações relativas de aldeído e proteína e as condições das reações.

A reação mais simples é a ciclização do aldeído, formando adutos do 2-hidroxi-furano, mostrados a seguir para a cisteína e a lisina (Uchida *et al.*, 1994; 1997; Uchida, 2003):



Essa reação ocorre quando as aminas e os aldeídos estão em concentrações aproximadamente iguais, mas os produtos hidrolisam-se rapidamente; por isso, nem sempre são encontrados nas misturas de produtos.

Quando há um excesso molar de aminas em relação aos aldeídos (por exemplo, no início da oxidação), a sequência da reação muda. A primeira etapa, aqui, é a formação da base de Schiff. A HO- que não reagiu se oxida e gera uma segunda carbonila (no caso do HNE), que sofre uma adição de Michael, recebendo uma segunda amina (em geral, a lisina); em seguida, o complexo sofre oxidação e ciclização, formando complexos di-hidropirrol-imínio estáveis (Sayre *et al.*, 1993; 1997; Xu *et al.*, 1999; Schaur, 2003; Zhang *et al.*, 2003):



Os complexos formados tanto pelo HNE quanto pelo ONE são produtos muito interessantes. Os adutos são fluorescentes e devem ter contribuído para a fluorescência dos produtos detectados inicialmente por Tappel e colaboradores (Chio e Tappel, 1969; Fletcher e Tappel, 1970; Fletcher *et al.*, 1973). Os pirróis são hidrolisáveis e a -OH pirrólica pode reagir ainda mais – por exemplo, com outra lisina – formando aminaís mistos cíclicos ou acíclicos; assim, os pirróis podem agir como precursores no desenvolvimento de compostos aromáticos durante o processamento e o armazenamento de alimentos. Por fim, o complexo inteiro cria ainda outro tipo de ligação cruzada peptídica, que contribui para o fortalecimento da textura dos alimentos. Esses complexos também são acentuados na doença de Alzheimer e podem estar envolvidos no envelhecimento das cadeias das proteínas amiloide b (Sayre *et al.*, 1997).

5. Conexão entre as reações de cooxidação e o dano às proteínas

Todos os produtos da oxidação lipídica reagem de alguma forma com proteínas, por isso, em nenhum momento, as proteínas estão a salvo dos efeitos da cooxidação. Na verdade, a cooxidação leva a um dano contínuo que ocorre em paralelo com a oxidação lipídica, à medida que novos produtos lipídicos são gerados e mudam o tipo de reação que predomina. Esta seção enfocou os detalhes químicos das reações para que os processos deixem de ser interpretados como eventos globais, como geralmente são relatados, e passem a ser vistos como fenômenos químicos no nível molecular. É somente por meio da compreensão detalhada da química que poderemos adquirir a capacidade de manipulá-la e controlá-la para proteger a qualidade dos alimentos.

TABELA 11.13 Espécies da oxidação lipídica, os produtos da cooxidação de proteínas e os efeitos sobre as propriedades das proteínas

Produto da oxidação lipídica	Reação	Produtos	Eventos globais afetados
Radicais LOO [•] e LO [•]	Radical	Radicais	Alterações na solubilidade; perda da atividade enzimática
	Transferência	Produtos da oxidação de aminoácidos Hidroperóxidos de proteínas;	Fragmentação; propriedades da superfície; textura

		carbonilas	Destruição de aminoácidos; perda do valor nutricional
		Dímeros de proteínas	Ligação cruzada; solubilidade; reconhecimento de anticorpos; textura
LOOH	Reação "em gaiola" → transferência de radicais, LO•	Radicais de proteínas; hidroperóxidos; carbonilas	Todos os efeitos de radicais, mas com velocidades de oxidação aumentadas
Epóxidos		Ligações cruzadas por pontes de dissulfeto	
	Nucleofílica	(Oxidação baixa) Adutos de aminóis	Alteração das propriedades da superfície; perda do reconhecimento de anticorpos
	Adição	(Oxidação alta) Hidroxilalquil pirróis Hidroxilalquil furanos Alquilpiridinas	Perda da atividade enzimática Valor nutricional; propriedades funcionais
Aldeídos saturados	Base de Schiff	(Oxidação baixa) Adutos lineares com base de Schiff (Oxidação alta) Adutos heterocíclicos	Escurecimento; perda do valor nutricional; pigmentos do envelhecimento Sabores; propriedades funcionais; solubilidade; propriedades da superfície
Dialdeídos saturados	Base de Schiff; adição de Michael	(Oxidação baixa) Ligações cruzadas com base de Schiff (Oxidação alta) Ligações cruzadas e adutos com di-hidropiridina	Escurecimento; ligação cruzada; atividade enzimática; valor nutricional Textura; sabores; odores; propriedades funcionais
Aldeídos α, β insaturados	Adição de Michael; base de Schiff	(Oxidação baixa) alcanais b-substituídos; pirróis (Oxidação alta) Adutos com de-hidropiperidino e metilpiridínio	Escurecimento; sabores; propriedades da superfície; pigmentos do envelhecimento Ligação cruzada; textura; atividade enzimática; atividade biológica
Aldeídos oxidados, por exemplo	Adição de Michael, base de Schiff	Adutos lineares; furanos; pirróis	Escurecimento; fluorescência; endurecimento da textura; sabores
4,5-Epóxi-2-alquenais		(Alto teor de amins) Adutos com di-hidropirrol-imínio; aminais	Ligação cruzada; textura; propriedades da superfície e funcionais
4-Hidroxi-2-alquenais			Atividade enzimática; reconhecimento de anticorpos; valor nutricional
Ácidos epóxi-oxoácidos		(Alto teor de aldeídos) Epóxidos; adutos com pirróis, pirrolidona, tiazolidina	Escurecimento; fluorescência; sabores; propriedades funcionais

A Tabela 11.13 traz um resumo das conexões entre os produtos específicos da oxidação lipídica, as reações de cooxidação desses produtos com proteínas e os eventos globais afetados. A sobreposição entre os efeitos das vias é clara. Por isso, a medição de um efeito isolado não é capaz de determinar sua causa e nem suficiente para correlacionar as alterações nas proteínas com os produtos da oxidação lipídica, visto que, como mencionado várias vezes, os produtos da oxidação lipídica que reagem com proteínas são removidos da amostra a ser analisada; na melhor das hipóteses, apareceriam como correlações negativas. No passado, a determinação direta da estrutura dos produtos era extremamente difícil ou impossível. No entanto, a espectrometria de massas moderna deve tornar a identificação dos produtos complexos quase rotineira. Assim, as reações e a estrutura dos produtos descritos nesta seção podem servir de guia para o rastreamento dos indícios da oxidação lipídica entre os produtos da cooxidação das proteínas.

VI. COMO A OXIDAÇÃO LIPÍDICA PODE SER CONTROLADA?

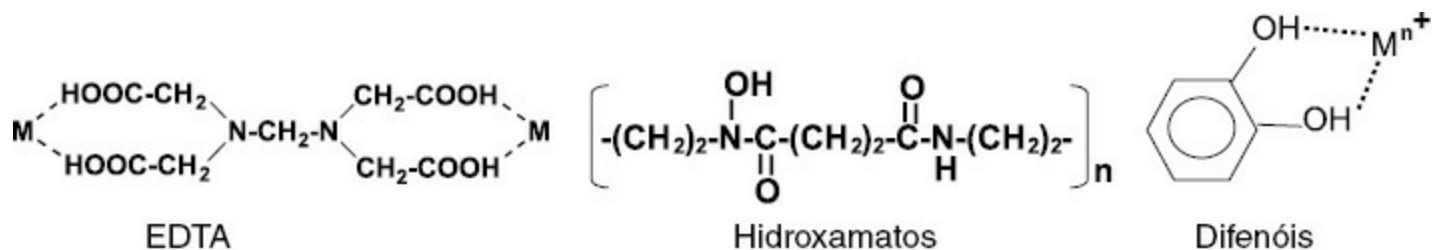
Como a oxidação lipídica causa muitos problemas, a maior preocupação é prevenir sua ocorrência nos alimentos. Os tratamentos antioxidantes se enquadram em três categorias e todas são necessárias para estabilizar os produtos contra a oxidação. Esses tratamentos podem ser utilizados isoladamente, mas em geral são combinados para limitar a oxidação lipídica de um modo mais eficaz:

- Antioxidantes do tipo 1: agentes que impedem a iniciação.
- Antioxidantes do tipo 2: compostos que eliminam radicais.
- Antioxidantes do tipo 3: fatores do ambiente e do processamento.

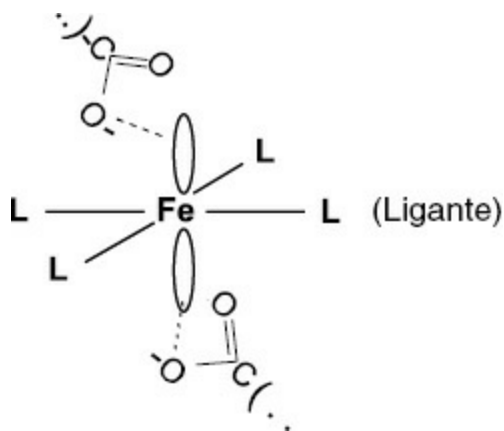
A. Antioxidantes do tipo 1: agentes que impedem a produção de radicais livres

1. Quelantes de metais e formadores de complexos com metais

Em sua maioria, esses antioxidantes são quelantes de metais (o mais importante deles é o EDTA, ácido etilendiaminotetracético, mostrado mais adiante) e formadores de complexos com metais (por exemplo, ácido cítrico, polifosfatos, diaminas, alguns aminoácidos e, em menor grau, o ácido ascórbico). Outros grupos de quelantes comuns incluem ácidos policarboxílicos, hidroxamatos e difenóis vicinais.



Há dois pontos que precisam ser destacados sobre as ações dos quelantes de metais e dos formadores de complexos com metais. Em primeiro lugar, para ser eficaz, os quelantes e os formadores de complexos precisam (a) ter uma estrutura que envolva o metal e bloqueie completamente todos os orbitais do metal, impedindo a transferência de elétrons, ou (b) estar presentes em concentrações suficientemente elevadas de maneira que várias moléculas possam agir em conjunto e do mesmo modo.

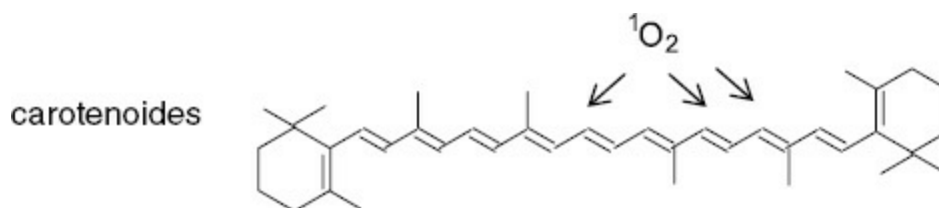


O EDTA é um exemplo do primeiro tipo de ação, e o ácido cítrico é um exemplo do segundo. Os compostos que bloqueiam de forma incompleta os orbitais dos metais podem agir como sinergistas e diminuir o fluxo de elétrons, mas não conseguem interromper as reações da iniciação. A maioria dos ácidos orgânicos e fosfatos são exemplos de compostos com ação sinérgica.

Em segundo lugar, os quelantes e os formadores de complexos não removem fisicamente os metais da reação; apenas bloqueiam os orbitais e reduzem o potencial redox, tornando-os menos ativos como agentes oxidantes que o metal original. No entanto, os complexos se tornam paradoxalmente mais reativos no sistema global, se agentes redutores com potencial redox mais baixo também estiverem presentes para o ciclo redox do metal. Um metal oxidado com E° baixo é um catalisador fraco, mas a redução desse metal gera um agente redutor muito mais poderoso, que reagirá rapidamente com o oxigênio e com todos os hidroperóxidos e será até mais danoso que o metal original. Assim, é preciso dar atenção aos possíveis agentes redutores dos sistemas alimentares quando se quer adicionar agentes quelantes.

2. Os removedores de oxigênio singlete, em particular os carotenoides

Conforme descrito na seção IV, D, 1, o oxigênio singlete liga-se às duplas ligações dos lipídeos, principalmente às duplas ligações conjugadas. Os carotenoides, que têm sistemas de duplas ligações conjugadas extensas, oferecem muitos sítios que reagem de preferência com o $^1\text{O}_2$ e poupam os ácidos graxos (Stahl e Sies, 2005). Na estrutura apresentada a seguir, somente alguns sítios estão destacados, mas todos reagem com o $^1\text{O}_2$.



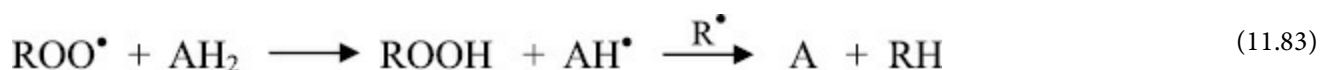
A piridoxina (vitamina B₆) e seus derivados também são removedores (*scavengers*) eficazes de oxigênio singlete (Bilski *et al.*, 2000). Muitas vezes, os inibidores da iniciação não são considerados antioxidantes, porém desempenham um papel crucial no controle da carga de radicais que precisa ser combatida pelos removedores de radicais livres. A carga de radicais é o total de radicais acumulados provenientes de todas as fontes que precisam ser eliminadas para limitar de modo eficaz o avanço da oxidação lipídica. A carga de radicais determina o tipo, a quantidade e a reatividade do antioxidante necessário para estabilizar dado sistema. Se a carga de radicais for muito alta, os eliminadores de cadeias de radicais (antioxidantes clássicos), não importa sua quantidade, não conseguirão impedir a oxidação lipídica. Por outro lado, os inibidores da iniciação não conseguem agir sozinhos. Alguns radicais de fontes diferentes são produzidos sempre e precisam ser eliminados para impedir o estabelecimento do ciclo de reações em cadeia. Assim, os antioxidantes do tipo 1 geralmente são combinados com antioxidantes do tipo 2 para se obter uma ação mais eficaz.

B. Antioxidantes do tipo 2: compostos que eliminam radicais

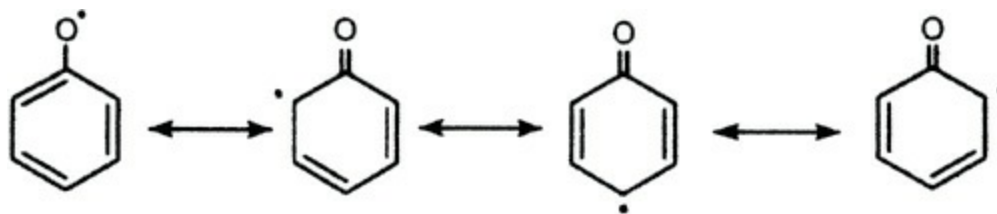
São os antioxidantes clássicos ou primários. Esses antioxidantes (AH) eliminam radicais livres por meio de vários mecanismos.

1. Transferência de átomos de hidrogênio

A transferência de átomos de hidrogênio (TAH) para eliminar radicais é a ação antioxidante mais bem conhecida (Leopoldini *et al.*, 2004):



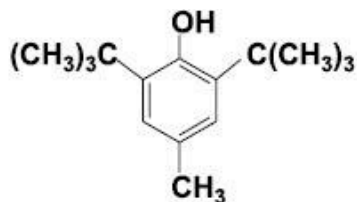
Para que um composto seja antioxidante, seu radical A^\bullet precisa ser estável e não reativo ou, então, formar produtos não radicalares, de modo que não propague cadeias de radicais. As estruturas antioxidantes mais importantes com atividade transferidora de H são os compostos fenólicos, cujos radicais A^\bullet têm reatividade reduzida pela deslocalização por ressonância do elétron livre ao longo do anel aromático.



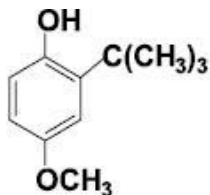
Os antioxidantes sintéticos BHA, BHT, galato de propila e TBHQ, utilizados comercialmente em alimentos, são compostos fenólicos, assim como os antioxidantes naturais tocoferóis, flavonoides de frutas e muitos componentes de ervas e condimentos, para mencionar apenas alguns. A Figura 11.19 traz a estrutura de alguns antioxidantes fenólicos comuns.

Atualmente, há um grande interesse na substituição dos antioxidantes sintéticos por compostos naturais. Alguns antioxidantes naturais são monofenóis, enquanto muitos têm mais de um grupo fenólico por anel (polifenóis). Em geral, a atividade antioxidante aumenta com o número de grupos fenólicos, embora a posição dos grupos também seja importante. Conforme ressaltado antes, os difenóis e trifenóis também formam complexos com metais (Afanas'ev *et al.*, 1989); dessa forma, têm vários mecanismos para inibir a oxidação lipídica e, portanto, são antioxidantes muito poderosos. Muitos polifenóis do alecrim, orégano e oxicoco, por exemplo, têm essa estrutura.

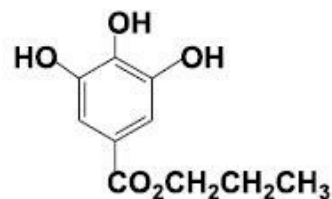
Entre outros compostos que inibem a oxidação lipídica pela TAH estão aminas aromáticas, hidroxil aminas, tiofenóis, aminofenóis, ácido ascórbico, glutathiona, ácido úrico, carotenoides, aminoácidos e proteínas.



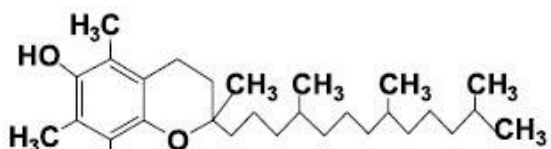
3,5-Di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno
(BHT)



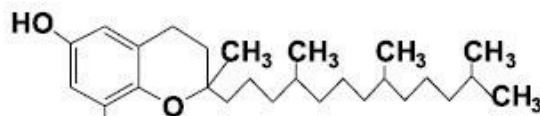
3-*t*-butil-4-hidroxi-anisól
(BHA)



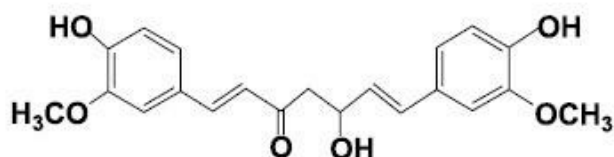
Galato de propila
(GP)



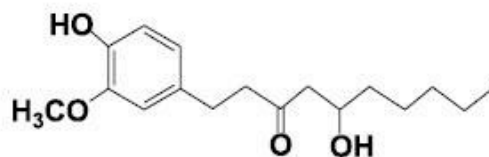
α -Tocoferol
(maior atividade biológica)



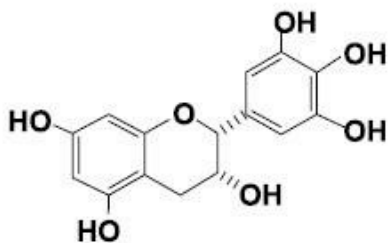
δ -Tocoferol
(maior atividade biológica)



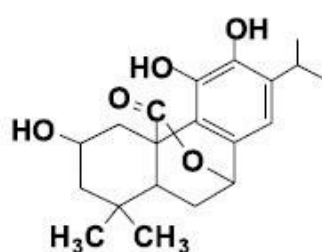
Curcumina (açafrão-da-Índia)



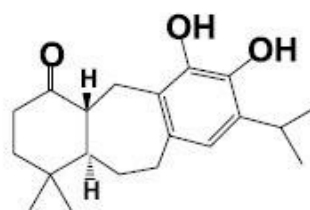
Gingerol (gingibre)



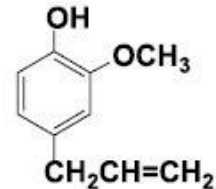
Epigalocatequina
(chá verde)



Carnosol
(alecrim)



Rosmaridifenol
(alecrim)



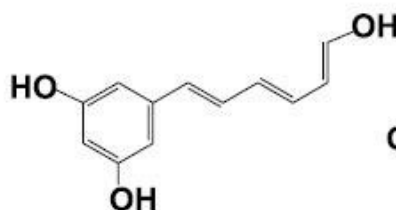
Eugenol
(cravo-da-Índia)



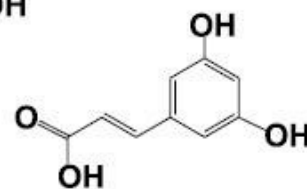
Antocianina
(oxicoco)



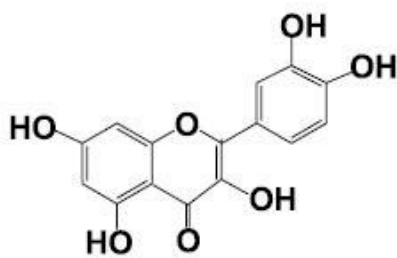
Timol
(tomilho)



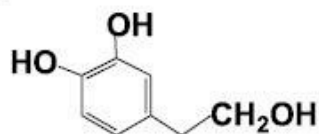
Resveratrol
(uvas)



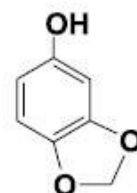
Ácido cafeico
(café)



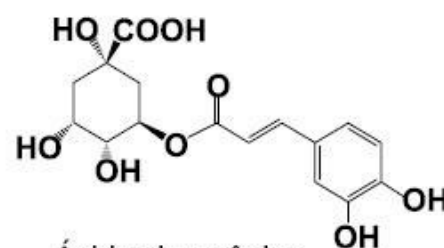
Quercetina
(maças, frutas)



Hidroxitirosol
(azeitonas)



Sesamol
(gergelim)



Ácido clorogênico
(café, folhas da planta)

FIGURA 11.19 Estruturas de alguns antioxidantes comuns. Na primeira linha, estão antioxidantes sintéticos; os demais são antioxidantes de fontes naturais (fonte entre parênteses).

2. Redução ou oxidação

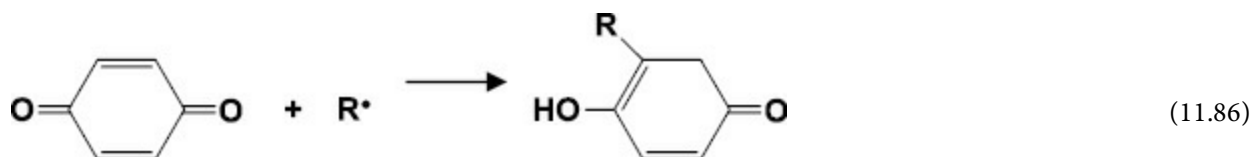
Os radicais reativos podem ser reduzidos ou oxidados, formando íons não reativos (transferência de um único elétron):



Os compostos com essa capacidade incluem o ácido ascórbico e outros agentes redutores, alguns fenóis e quinonas e altas concentrações de metal (Ganapathi *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2004). Esse efeito antioxidante das altas concentrações de metal é, com frequência, ignorado ou não reconhecido.

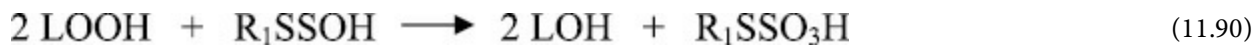
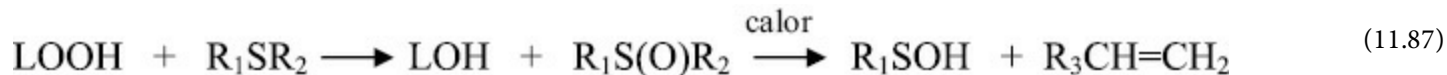
3. Terminação de cadeias

A terminação de cadeias pode ocorrer por meio da reação direta com R^\bullet ; por exemplo, quinonas, nitrocompostos e quinona iminas:

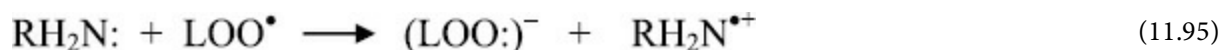
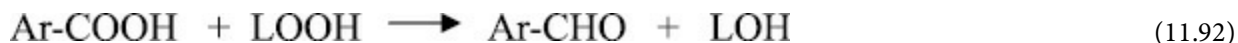


4. Decomposição de radicais ou ROOH

Os radicais ou o ROOH podem ser decompostos sem a geração de novos radicais. Os compostos com essa ação incluem os sulfetos e dissulfetos (Kulich e Shelton, 1991), os fosfatos e tiofosfatos, os ácidos carboxílicos (inclusive os ácidos fenólicos e os ácidos graxos livres), as enzimas (superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase), as aminas (Fueno *et al.*, 1959) e as fosfatidilcolinas (O'Brien, 1969). Nas reações mostradas a seguir, ArH é um ácido e Ar é um grupo arila.



Ácidos e nucleófilos (por exemplo, N^+ da colina):



C. Antioxidantes do tipo 3: fatores ambientais que limitam a oxidação

Fatores macroambientais como refrigeração, branqueamento, escuro, gás inerte ou vácuo, teor de umidade e pH não conseguem interromper a oxidação lipídica, embora forneçam os microambientes nos quais a oxidação lipídica ocorre. Quando manejados de maneira apropriada, certamente, desaceleram a velocidade da oxidação lipídica e, também, mudam as vias das reações. Assim, desempenham as importantes funções de (a) reduzir a carga de radicais para que os antioxidantes primários possam ser mais eficazes e (b) controlar os produtos oxidativos para minimizar os efeitos que prejudicam a qualidade dos alimentos. Na verdade, se esses fatores ambientais não forem controlados, os quelantes e os eliminadores de radicais, independentemente de sua quantidade, não conseguirão manter com sucesso a oxidação lipídica em níveis baixos o suficiente para conservar a aceitabilidade sensorial e a segurança dos produtos alimentícios. O controle dos fatores ambientais é particularmente importante quando vários mecanismos de reação estão ativos, porque possibilitam um modo de direcionar a oxidação para (ou de) vias específicas.

Os fatores ambientais afetam os produtos desde a formulação até o processamento e o armazenamento. Os fatores ambientais relacionados com a formulação incluem o teor de umidade e as enzimas pró-oxidantes, como a lipo-oxigenase e a lipase, que precisam ser submetidas ao processo de branqueamento para serem inativadas. Os fatores ambientais mais importantes relacionados com o processamento englobam tudo, desde a possível contaminação por metais provenientes do equipamento e da água para processamento até a temperatura, a luz e a exposição ao oxigênio durante o processamento. Os fatores associados ao acondicionamento e ao armazenamento incluem a $p\text{O}_2$ no interior da embalagem e ao redor dela, a presença de vácuo *versus* a atmosfera inerte *versus* o ar do espaço vazio do interior das embalagens, a umidade no interior da embalagem e a migração da umidade para dentro ou para fora dela, a exposição à temperatura e à luz etc.

Simplificando, o tratamento mais fácil para estabilizar os alimentos contra a oxidação lipídica poderia ser o acondicionamento à vácuo de todos os alimentos, com o uso de embalagens à prova de luz e, então, o congelamento. No entanto, outros aspectos, como o custo, a proteção de outras qualidades do alimento e as condições para o armazenamento, precisam estar em concordância com os procedimentos necessários para limitar a oxidação lipídica em cada produto alimentar. Além disso, os alimentos reais sempre têm mais de um catalisador e matrizes complexas; por isso, os efeitos do fator catalítico descritos neste capítulo nunca são tão simples como uma equação escrita em uma página. Assim, na prática, é necessário combinar de maneira criativa vários tratamentos antioxidantes, e até vários antioxidantes, para bloquear de modo eficaz a oxidação lipídica nos alimentos.

Esperamos que as informações aqui apresentadas permitam ao leitor ter uma visão mais completa de como os lipídeos são oxidados nos sistemas isolados, quais fatores conduzem à oxidação e quais produtos causam os

maiores problemas. Essas informações poderão ser aplicadas na combinação de tratamentos antioxidantes que conservem de modo econômico e eficaz a qualidade sensorial dos alimentos e que mantenham a qualidade e a segurança alimentar nos níveis mais altos possíveis.

REFERÊNCIAS

- Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., Potapovitch, A.I., 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.
- Anonymous, 1981. Fatty acids' spontaneous oxidation clarified. *Chem. Eng. News* 26 (Oct.), 18-20.
- Aoshima, H., Kajiwara, T., Hatanaka, A., Hatano, H., 1977. Electron spin resonance studies on the lipoxygenase reaction by spin trapping and spin labelling methods. *J. Biochem.* 82, 1559-1565.
- Aoshima, H., Kajiwara, T., Hatanaka, A., 1981. Decomposition of lipid hydroperoxide by soybean lipoxygenase-1 under aerobic conditions studied by high performance liquid chromatography and the spin trapping method. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2245-2251.
- Atkins, P.W., Beran, J.A., 1990. *General Chemistry*. Scientific American Books, W.H. Freeman & Co., New York.
- Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Igbavboa, U., O'Hare, E.O., Schroeder, F., Cleary, J.P., Wood, W.G., 1997. Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *J. Neurochem.* 68, 2086-2091.
- Avila, D.V., Brown, C.E., Ingold, K.U., Luszyk, J., 1993. Solvent effects on the competitive β -scission and hydrogen atom abstraction reactions of the cumyloxyl radical. Resolution of a long-standing problem. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 466-470.
- Barclay, L.R.C., Ingold, K.U., 1981. Autoxidation of biological membranes. 2. The autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and chlorobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6478-6485.
- Baron, C.P., Andersen, H.J., 2002. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3887-3897.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., 1986. *Food Chemistry*. , p. 130Springer, Berlin p. 130.
- Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., Sutherland, M.W., 1983. A study of the reactivity of HO_2/O_2^- ion with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258, 4759-4761.
- Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E., Arudi, R.L., Ross, A.B., 1985. Reactivity of HO_2/O_2^- radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14, 1041-1100.
- Bilski, P., Li, M.Y., Ehrenshaft, M., Daub, M.E., Chignell, C.F., 2000. Vitamin B_6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* 71, 129-134.
- Bishov, S.J., Henick, A.S., Koch, R.B., 1960. Oxidation of fat in model systems related to dehydrated foods. *Food Res.* 25, 174-181.
- Blair, I.A., 2001. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp. Gerontol.* 36, 1473-1481.
- Bolland, J.L., 1945. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part IX. The primary thermal oxidation products of ethyl linoleate. *J. Chem. Soc.*, 445-447.
- Bolland, J.L., 1949. Kinetics of olefin oxidation. *Q. Rev.* 3, 1-21.
- Borg, D.C., Schaich, K.M., 1983. Reactions connecting autoxidation with oxy radical production, lipid peroxidation, and cytotoxicity. In: Cohen, G., Greenwald, R.A. (Eds.), *Oxy Radicals and their Scavenger Systems*, Vol. I: Molecular Aspects. Elsevier, New York, p. 122-129.
- Borg, D.C., Schaich, K.M., 1984. Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. *Isr. J. Chem.* 24, 38-53.
- Borg, D.C., Schaich, K.M., Elmore Jr., J.J., 1981. Autoxidation and cytotoxicity. In: Rodgers, M.A.J., Powers, E.L. (Eds.), *Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology*. Academic Press, New York, p. 177-186.
- Bors, W., Tait, D., Michel, C., Saran, M., Erben-Russ, M., 1984. Reactions of alkoxy radicals in aqueous solutions. *Isr. J. Chem.* 24, 17-24.
- Bothe, E., Schuchmann, M.N., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., 1978. HO_2 elimination from α -hydroxyalkylperoxy radicals in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* 28, 639-644.
- Bruenner, B.A., Jones, A.D., German, J.B., 1995. Direct characterization of protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal using electrospray mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 552-559.
- Bruice, T.C., Balasubramanian, P.N., Lee, R.W., Lindsay Smith, J.R., 1988. The mechanism of hydroperoxide O-O bond scission on reaction of hydroperoxides with iron(III) porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7890-7892.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., Taeranishi, R., Mon, T.R., 1977. Roasted fat: basic volatile components. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1227-1229.
- Campbell, I.M., Caton, R.B., Crozier, D.N., 1974. Complex formation and reversible oxygenation of free fatty acids. *Lipids* 9, 916-920.
- Carless, J.E., Nixon, J.R., 1960. The oxidation of solubilized and emulsified oils. Part III. The oxidation of methyl linoleate in potassium laurate and cetomacrogol dispersions. *J. Pharm. Pharmacol.* 12, 348-359.
- Chan, H.W.-S., Matthew, J.A., Coxon, D.T., 1980. A hydroperoxy-epidioxide from the autoxidation of a hydroperoxide of methyl linolenate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 235-236.
- Chang, S.S., Smouse, T.H., Krishnamurthy, R.G., Mookherjee, R.D., Reddy, R.B., 1966. Isolation and identification of 2-pentyl-furan as contributing to the flavor reversion of soyabean oil. *Chem. Ind.*, 1926-1927.
- Chen, Z.Y., Nawar, W.W., 1991. The role of amino acids in the autoxidation of milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 47-50.
- Chio, K.S., Tappel, A.L., 1969. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malondialdehyde and amino acids. *Biochemistry* 8, 2821-2827.
- Corliss, G.A., Dugan Jr., L.R., 1971. Phospholipid oxidation in emulsions. *Lipids* 5, 846-853.
- Cosgrove, J.P., Church, D.F., Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299-304.
- Dahle, L.K., Hill, E.G., Holman, R.T., 1962. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 253-261.
- De Groot, H., Noll, T., 1987. The role of physiological oxygen partial pressures in lipid peroxidation. Theoretical considerations and experimental evidence. *Chem. Phys. Lipids* 44, 209-226.
- deGroot, J.J.M.C., Garssen, G.J., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., 1973. Detection of linoleic acid radicals in the anaerobic reaction of lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 326, 279-284.
- deGroot, J.J.M.C., Garssen, G.J., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., 1975. Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean 1-lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 377, 71-79.
- Dix, T.A., Marnett, L.J., 1983. Hematin-catalyzed rearrangement of hydroperoxylinoleic acid to epoxy alcohols via an oxygen rebound. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7001-7002.
- Dix, T.A., Marnett, L.J., 1985. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin. *J. Biol. Chem.*

- Ebrahem, Q., Ranganathan, K., Sears, J., Vasanji, A., Gu, X., Lu, L., Salomon, R.G., Crabb, J.W., Anand-Apte, B., 2006. Carboxyethylpyrrole oxidative protein modifications stimulate neovascularization: implications for age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13480-13484.
- Ege, S.N., 1999. *Organic Chemistry: Structure and Reactivity*. Houghton Mifflin, Boston, MA, p. 517-518, 631-654, 692-693, 725-733.
- Egmond, M.R., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., 1973. C-11 H abstraction from linoleic acid, the rate limiting step in lipoxygenase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1178-1184.
- Egmond, M.R., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., 1972. Stereospecificity of the hydrogen abstraction in carbon atom n-8 in the oxygenation of linoleic acid by lipoxygenases from corn germs and soya beans. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 48, 1055-1060.
- Elson, I.H., Mao, S.W., Kochi, J.K., 1975. Electron spin resonance study of addition of alkoxy radicals to olefins. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 335-341.
- Erben-Russ, M., Michael, C., Bors, W., Saran, M., 1987. Absolute rate constants of alkoxy radical reactions in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 91, 2362-2365.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81-128.
- Fadeel, B., Quinn, P., Xue, D., Kagan, V., 2007. Fat(al) attraction: oxidized lipids act as "eat-me" signals. *HFSP J.* 1, 225-229.
- Farmer, E.H., Sutton, D.A., 1943. Course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. IV. The isolation and constitution of photochemically-formed methyl oleate peroxide. *J. Chem. Soc.*, 119-122.
- Farmer, E.H., Koch, H.P., Sutton, D.A., 1943. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. VII. Rearrangement of double bonds during autoxidation. *J. Chem. Soc.*, 541-547.
- Fenaille, F., Guy, P.A., Tabet, J.-C., 2003. Study of protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal and other short chain aldehydes analyzed by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 14, 215-226.
- Fletcher, B.L., Tappel, A.L., 1970. Fluorescent modification to serum albumin by lipid peroxidation. *Lipids* 6, 172-175.
- Fletcher, B.L., Dillard, C.J., Tappel, A.L., 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 52, 1-9.
- Foote, C.S., 1968. Photosensitized oxygenation and the role of singlet oxygen. *Acc. Chem. Res.* 1, 104-110.
- Foote, C.S., 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: Pryor, W.A. (Ed.), *Free Radicals in Biology*. Academic Press, New York, p. 85-134.
- Foote, C.S., Denny, R.W., Weaver, L., Chang, Y., Peters, J., 1970. Quenching of singlet oxygen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 171, 139-148.
- Frankel, E.N., 1982. Volatile lipid oxidation products. *Prog. Lipid Res.* 22, 1-33.
- Frankel, E.N., 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products, and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1908-1917.
- Frankel, E.N., 1985. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog. Lipid Res.* 23, 197-221.
- Frankel, E.N., 1987. Secondary products of lipid oxidation. *Chem. Phys. Lipids* 44, 73-85.
- Frankel, E.N., 1991. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 54, 495-511.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., 1983. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim. Biophys. Acta* 754, 264-270.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Selke, E., Weisleder, D., 1982. Photosensitized oxidation of methyl linoleate: secondary and volatile thermal decomposition products. *Lipids* 17, 11-18.
- Freeman, T.L., Haver, A., Duryee, M.J., Tuma, D.J., Klassen, L.W., Hamel, F.G., White, R.L., Rennard, S.I., Thiele, G.M., 2005. Aldehydes in cigarette smoke react with the lipid peroxidation product malonaldehyde to form fluorescent protein adducts on lysines. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 817-824.
- Fruebis, J., Parsasarathy, S., Steinberg, D., 1992. Evidence for a concerted reaction between lipid hydroperoxides and polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10588-10592.
- Fueno, T., Ree, T., Eyring, H., 1959. Quantum-mechanical studies on oxidation potentials and antioxidizing action of phenolic compounds. *J. Phys. Chem.* 63, 1940-1948.
- Fukushige, H., Wang, C., Simpson, T.D., Gardner, H.W., Hildebrand, D.F., 2005. Purification and identification of linoleic acid hydroperoxides generated by soybean seed lipoxygenases 2 and 3. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5691-5694.
- Gaddis, A.M., Ellis, R., Currie, G.T., 1961. Carbonyls in oxidizing fats. V. The composition of neutral volatile monocarbonyl compounds from autooxidized oleate, linoleate, linolenate esters and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38, 371-375.
- Ganapathi, M.R., Hermann, R., Naumov, S., Brede, O., 2000. Free electron transfer from several phenols to radical cations of non-polar solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4947-4955.
- Gardner, H.W., 1979. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J. Agric. Food Chem.* 27, 220-229.
- Gardner, H.W., 1986. Lipoxygenase pathway in cereals. In: Pomeranz, Y. (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, p. 161-215.
- Gardner, H.W., Weisleder, D., 1970. Lipoxygenase from *Zea mays*: 9-d-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-octadecadienoic acid from linoleic acid. *Lipids* 5, 678-683.
- Gardner, H.W., Weisleder, D., 1976. Addition of *N*-acetylcysteine to linoleic acid hydroperoxide. *Lipids* 11, 127-134.
- Gardner, H.W., Kleiman, R., Weisleder, D., Inglett, G.E., 1977. Cysteine adds to lipid hydroperoxide. *Lipids* 12, 655-660.
- Gardner, H.W., Plattner, R.D., Weisleder, D., 1985. The epoxyallylic radical from homolysis and rearrangement of methyl linoleate hydroperoxide combines with the thiyl radical of *N*-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta* 834, 65-74.
- Garner, B., Waldeck, A.R., Witting, P.K., Rye, K.-A., Stocker, R., 1998. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins A1 and A2. *J. Biol. Chem.* 273, 6088-6095.
- Gebicki, J.M., Bielski, B.H.J., 1981. Comparison of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7020-7022.
- Gebicki, S., Gebicki, J.M., 1999. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochem. J.* 338, 629-636.
- Grosch, W., 1987. Reactions of hydroperoxides - products of low molecular weight. In: Chan, H.W.-S. (Ed.), *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Academic Press, London, p. 95-139.
- Grosch, W., Laskawy, G., Weber, F., 1976. Formation of volatile carbonyl compounds and co-oxidation of β -carotene by lipoxygenase from wheat, potato, flax, and beans. *J. Agric. Food Chem.* 24, 456-459.
- Gu, X., Meer, S.G., Miyagi, M., Rayborn, M.E., Hollyfield, J.G., Crabb, J.W., Salomon, R.G., 2003. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 42027-42035.
- Gutierrez, J., Ballinger, S.W., Darley-USmar, V.M., Landar, A., 2006. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction. *Circ. Res.* 99, 924-932.
- Hamberg, M., Samuelsson, B., 1967. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 242, 5329-5335.
- Hasegawa, K., Patterson, L.K., 1978. Pulse radiolysis studies in model lipid systems: formation and behavior of peroxy radicals in fatty acids. *Photochem. Photobiol.* 28, 817-823.
- Haynes, R.K., Vonwiller, S.C., 1990. Iron(III) and copper(II) catalysed transformation of fatty acid hydroperoxides: efficient generation of peroxy radicals with copper(II) trifluoromethane sulphate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1102-1104.

- Heaton, F.W., Uri, N., 1961. The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters: cobalt stearate-catalyzed oxidation of linoleic acid. *J. Lipid Res.* 2, 152-160.
- Hecht, E., 2000. *Physics: Calculus*. Brooks/Cole, Pacific Grove, CA.
- Heijman, M.G.J., Nauta, H., Levine, Y.K., 1985. A pulse radiolysis study of the dienyl radical in oxygen-free linoleate solutions: time and linoleate concentration dependence. *Radiat. Phys. Chem.* 26, 73-82.
- Hiatt, R., McCarrick, T., 1975. On "bimolecular initiation" by hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 5234-5237.
- Hiatt, R., Traylor, T.G., 1965. Cage recombination of *t*-butoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3766-3768.
- Hidalgo, F.J., Kinsella, J.E., 1989. Changes in β -lactoglobulin B following interactions with linoleic acid 13-hydroperoxide. *J. Agric. Food Chem.* 37, 860-866.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2000. Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(*E*)-epoxy-2-(*E*)-heptenal. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 501-508.
- Horner, J.H., Choi, S.-Y., Newcomb, M., 2000. Laser flash photolysis studies of alkoxy radical kinetics using 4-nitrobenzenesulfonate esters as radical precursors. *Org. Lett.* 2, 3369-3372.
- Howard, J.A., Ingold, K.U., 1967. Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. VI. Alkyl aromatic and olefinic hydrocarbons. *Can. J. Chem.* 45, 793-802.
- Hyde, S.M., 1968. Oxidation of methyl oleate induced by cobalt-60 γ -radiation. II. Emulsions of methyl oleate in water. *Trans. Faraday Soc.* 64, 155-162.
- Hyde, S.M., Verdin, D., 1968. Oxidation of methyl oleate induced by cobalt-60 γ -irradiation. I. Pure methyl oleate. *Trans. Faraday Soc.* 64, 144-154.
- Ichihashi, K., Osawa, T., Toyokuni, S., Uchida, K., 2001. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes. *J. Biol. Chem.* 276, 23903-23913.
- Igene, J.O., Pearson, A.M., Dugan Jr., L.R., Price, J.F., 1980. Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. *Food Chem.* 5, 263-276.
- Ingold, K.U., 1969a. Peroxy radicals. *Acc. Chem. Res.* 2, 1-9.
- Ingold, K.U., 1969b. *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Ishii, K., Shimada, A., Yoshimatsu, J., 1976. Effects of the oxidized linseed oil on the physico-chemical properties of starch. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 23, 82-90.
- Kamiya, Y., Beaton, S., Lafortune, A., Ingold, K.U., 1963. The metal-catalyzed autoxidation of tetralin. I. Introduction. The cobalt-catalyzed autoxidation in acetic acid. *Can. J. Chem.* 41, 2020-2032.
- Karel, M., 1980. Lipid oxidation, secondary reactions, and water activity of foods. In: Simic, M.G., Karel, M. (Eds.), *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Plenum Press, New York, p. 191-206.
- Karel, M., Schaich, K.M., Roy, R.B., 1975. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 23, 159-164.
- Kawakishi, S., Satake, A., Komiyama, T., Namiki, M., 1983. Oxidative degradation of β -cyclodextrin induced by lipid peroxidation. *Starch/Stärke* 35, 54-57.
- Kearns, D.R., Khan, A.U., 1969. Sensitized photooxygenation reactions and the role of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 10, 193-210.
- Kearns, D.R., Hollins, R.A., Khan, A.U., Radlick, P., 1967. Evidence for the participation of $^1\sigma_{g+}$ and $^1\delta_g$ oxygen in dye-sensitized photooxygenation reactions. II. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5456-5457.
- Kehrer, J.P., Biswal, S.S., 2000. The molecular effects of acrolein. *Toxicol. Sci.* 57, 6-15.
- Kellogg, E.W., Fridovich, I., 1975. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250, 8812-8817.
- Kerr, J.A., 1966. Bond dissociation energies by kinetic methods. *Chem. Rev.* 66, 465-500.
- Kikugawa, K., Ido, Y., 1984. Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* 19, 600-608.
- Kim, S.S., Kim, S.Y., Ryou, S.S., Lee, C.S., Yoo, K.H., 1993. Solvent effects in the hydrogen abstractions by *tert*-butoxy radical: veracity of the reactivity/selectivity principle. *J. Org. Chem.* 58, 192-196.
- Koch, R.B., 1962. Dehydrated foods and model systems. In: Schultz, H., Day, E.A., Sinnhuber, R.O. (Eds.), *Symposium on Foods: Lipids and their Oxidation*. Avi, Westport, CT, p. 230-249.
- Kochi, J.K., 1962. Chemistry of alkoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1193-1197.
- Kochi, J.K., 1973a. Oxygen radicals. In: Kochi, J.K. (Ed.), *Free Radicals*, Vol. 2. John Wiley, New York, p. 665-710.
- Kochi, J.K., 1973b. *Free Radicals* Vol. 1. John Wiley and Sons, New York.
- Koga, T., Terao, J., 1995. Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1450-1454.
- Kowalik-Jankowska, T., Ruta, M., Winiewska, K., Lankiewicz, L., Dyba, M., 2004. Products of Cu(II)-catalyzed oxidation in the presence of hydrogen peroxide of the 1-10, 1-16 fragments of human and mouse β -amyloid peptide. *J. Inorg. Biochem.* 98, 940-950.
- Kruidenier, L., Verspaget, H.W., 2002. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radicals or ridiculous? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997-2015.
- Kulich, D.M., Shelton, J.R., 1991. Organosulfur antioxidants: mechanisms of action. *Polymer Degrad. Stabil.* 3, 397-410.
- Labuza, T.P., 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2, 355-405.
- Ladikos, D., Lougovois, V., 1990. Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chem.* 35, 295-314.
- Lederer, M.O., 1996. Reactivity of lysine moieties toward *g*-hydroxy- α , β -unsaturated epoxides: a model study on protein-lipid oxidation product interaction. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2531-2537.
- Leermakers, P.A., Thomas, H.T., Weis, L.D., James, P.C., 1966. Spectra and photochemistry of molecules adsorbed on silica gel. IV. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5075-5083.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M., 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J. Phys. Chem.* 108, 4916-4922.
- Lin, D., Lee, H., Liu, Q., Perry, G., Smith, M.A., Sayre, L.M., 2005. 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1219-1231.
- Lindsay, D.A., Howard, J.A., Horswill, E.C., Iton, L., Ingold, K.U., Cobbley, T., Li, A., 1973. The bimolecular self-reaction of secondary peroxy radicals, product studies. *Can. J. Chem.* 51, 870-880.
- Logani, M.K., Davies, R.E., 1980. Lipid oxidation: biological effects and antioxidants – a review. *Lipids* 15, 485-495.
- Love, J.D., Pearson, A.M., 1974. Metmyoglobin and non-heme iron as prooxidants in cooked meat. *J. Agric. Food Chem.* 22, 1031-1034.
- Lqari, H., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Vloque, J., Millan, F., 2003. Interaction of *Lupinus angustifolius* L. α and β g-conglutins with 13-hydroperoxide-11,9-octadienoic acid. *Food Chem.* 80, 517-523.
- Lundberg, W.O., Chipault, J.R., 1947. The oxidation of methyl linoleate at various temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* 69, 833-836.
- Maga, J.A., 1981. Pyridines in foods. *J. Agric. Food Chem.* 29, 895-898.
- Marcuse, R., Fredriksson, P.-O., 1968. Fat oxidation at low oxygen pressure. I. Kinetic studies on the rate of fat oxidation in emulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 400-407.
- McBrien, D.C.H., Slater, T.F. (Eds.), 1982. *Free Radicals, Lipid Peroxidation, and Cancer*. Academic Press, New York.

- McMurray, J., 2000. Organic Chemistry. Brooks/Cole, Pacific Grove, CA.
- Mead, J.F., 1980. Membrane lipid peroxidation and its prevention. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57, 393-397.
- Mikula, M., Khayat, A., 1985. Reaction conditions for measuring oxidative stability of oils by thermogravimetric analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 1694-1698.
- Miyashita, K., Takagi, T., 1986. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 1380-1384.
- Murray, 1979. Chemical sources of 1O_2 . In: Wasserman, H., Murray, R.W. (Eds.), Singlet Oxygen, Chapter 3. Academic Press, New York.
- Nair, V., Offerman, R.J., Turner, G.A., Pryor, A.N., Baenziger, N.C., 1988. Fluorescent 1,4-dihydropyridines – the malondialdehyde connection. *Tetrahedron* 44, 2793-2803.
- Nam, W., Han, H.J., Oh, S.-Y., Lee, Y.J., Choi, M.-H., Han, S.-Y., Kim, C., Woo, S.K., Shin, W., 2000. New insights into the mechanism of O-O bond cleavage of hydrogen peroxide and *tert*-alkyl hydroperoxides by iron(III) porphyrin complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 8677-8684.
- Nam, W., Lim, M.H., Lee, H.J., Kim, C., 2000. Evidence for the participation of two distinct reactive intermediates in iron(III) porphyrin complex-catalyzed epoxidation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6641-6647.
- Nam, W., Park, S.-E., Lim, I.K., Lim, M.H., Hong, J., Kim, J., 2003. First direct evidence for stereospecific olefin epoxidation and alkane hydroxylation by an oxoiron(IV) porphyrin complex. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14674-14675.
- Nawar, W.W., 1969. Thermal degradation of lipids. *J. Agric. Food Chem.* 17, 18-21.
- Nawar, W.W., 1986. Lipids. In: Fennema, O.R. (Ed.), Food Chemistry. Academic Press, New York, p. 225-320.
- Neff, W.E., 1980. Quantitative analyses of hydroxystearate isomers from hydroperoxides by high pressure liquid chromatography of autoxidized and photosensitized-oxidized fatty esters. *Lipids* 15, 587-590.
- Neff, W.E., Frankel, E.N., 1984. Photosensitized oxidation of methyl linolenate monohydroperoxides: hydroperoxy cyclic peroxides, dihydroperoxides and hydroperoxy bis-cyclic peroxides. *Lipids* 19, 952-957.
- Neff, W.E., Frankel, E.N., Fujimoto, K., 1988. Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 616-623.
- Neff, W.E., Frankel, E.N., Weisleder, D., 1982. Photosensitized oxidation of methyl linolenate. Secondary products. *Lipids* 17, 780-790.
- Nwosu, C.V., Boyd, L.C., Sheldon, B., 1997. Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 293-297.
- O'Brien, P.J., 1969. Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Can. J. Biochem.* 47, 485-493.
- Parr, L.J., Swoboda, P.A.T., 1976. The assay of conjugable oxidation products applied to lipid deterioration in stored foods. *J. Food Technol.* 11, 1-12.
- Pattee, H.E., Singleton, J.A., 1979. Evidence of enzymic production of 9-hydroperoxy- *trans*-12, *cis*-12-octadecadienoic acid by peanut lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* 27, 216-220.
- Patterson, L.K., Hasegawa, K., 1978. Pulse radiolysis studies in model lipid systems. The influence of aggregation on kinetic behavior of OH induced radicals in aqueous sodium linoleate. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 82, 951-956.
- Petersen, D.R., Doorn, J.A., 2004. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 937-945.
- Piretti, M.V., Cavani, C., Zeli, F., 1978. Mechanism of the formation of hydroperoxides from methyl oleate. *Rev. Franc. Corps Gras.* 25, 73-78.
- Pokorny, J., Kundu, M.K., Pokorny, S., Bleha, M., Coupek, J., 1976. Lipid oxidation. 4. Products of thermooxidative polymerization of vegetable oils. *Nahrung* 20, 157-163.
- Pokorny, J., Rzepa, J., Janicek, G., 1976. Lipid oxidation. Part 1. Effect of free carboxyl group on the decomposition of lipid hydroperoxide. *Nahrung* 20, 1-6.
- Porter, N.A., 1990. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). *Membrane Lipid Oxidation*. Vol. I. C. Vigo-Pelfrey. CRC Press, Boca Raton, FL p. 33-62.
- Porter, N.A., Lehman, L.S., 1982. Xanthine oxidase initiated oxidation of model membranes. Effect of position of abstractable hydrogen atoms in the bilayer on the distribution of products. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4731-4732.
- Porter, N.A., Wagner, C.R., 1986. Phospholipid autoxidation. *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2, 283-323.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290.
- Porter, N.A., Lehman, L.S., Wujek, D.G., 1984. Oxidation mechanisms of poly-unsaturated fatty acids. In: Bors, W., Saran, M., Tait, D. (Eds.), *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*. D. Walter de Gruyter, Berlin, p. 235-237.
- Porter, W.L., Levasseur, L.A., Jeffers, J.I., Henick, A.S., 1971. UV spectrophotometry of autoxidized lipid monolayers while on silica gel. *Lipids* 6, 16-25.
- Privett, O.S., 1959. Autoxidation and autoxidative polymerization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 36, 507-512.
- Pryor, W.A., 1978. The formation of free radicals and the consequences of their reactions *in vivo*. *Photochem. Photobiol.* 28, 787-801.
- Pryor, W.A., 1985. Free radical involvement in chronic diseases and aging: the toxicity of lipid hydroperoxides and their decomposition products. In: Finley, J.W., Schwass, D.E. (Eds.), *Xenobiotic Metabolism: Nutritional Effects*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 76-96.
- Pryor, W.A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657-667.
- Pryor, W.A., 1989. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 177-178.
- Pryor, W.A., Stanley, J.P., Blair, E., 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Part II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11, 370-379.
- Raghuveer, K.G., Hammond, E.G., 1967. The influence of glyceride structure on the rate of autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 239-243.
- Rao, S.I., Wilks, A., Hamberg, M., Ortiz de Montellano, P.R., 1994. The lipoxygenase activity of myoglobin. Oxidation of linoleic acid by the ferryl oxygen rather than the protein radical. *J. Biol. Chem.* 269, 7210-7216.
- Rawls, H.R., Van Santen, P.J., 1970. A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47, 121-125.
- Rossi-Olson, A., 2011. The impact of nut inclusions on properties and stability of dark chocolate. Dissertation, Food Science. Rutgers University, New Brunswick, NJ.
- Russell, C.A., 1959. Solvent effects in the reaction of free radicals and atoms. V. Effects of solvents on the reactivity of *t*-butoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 21, 300-302.
- Sargis, R.M., Subbaiah, P.V., 2003. *Trans* unsaturated fatty acids are less oxidizable than *cis* unsaturated fatty acids and protect endogenous lipids from oxidation in lipoproteins and lipid bilayers. *Biochemistry* 42, 11533-11543.
- Sastry, Y.S.R., Lakshminarayana, G., 1971. Chlorophyll-sensitized peroxidation of saturated fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48, 452-454.
- Sayre, L.M., Arora, P.K., Iyer, R.S., Salomon, R.G., 1993. Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 19-22.
- Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G., Smith, M.A., 1997. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68, 2092-2097.
- Schaich, K.M., 1980a. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation. Part III: Free radical transfer from oxidizing lipids. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 189-244.
- Schaich, K.M., 1980b. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation. Part III: Free radical transfer from oxidizing lipids. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 189-244.
- Schaich, K.M., 1992. Metals and lipid oxidation: contemporary issues. *Lipids* 27, 209-218.

- Schaich, K.M., 2005. Lipid oxidation in fats and oils: an integrated view. In: Shahidi, F. (Ed.), 6th ed. Bailey's Industrial Fats and Oils, Vol.1. John Wiley, New York, p. 269-355.
- Schaich, K.M., 2006. Lipid oxidation in specialty oils. In: Shahidi, F. (Ed.), Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-Products. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 401-448.
- Schaich, K.M., 2008. Co-oxidations of oxidizing lipids: reactions with proteins. In: Kamal-Eldin, A., Min, D.B. (Eds.), Lipid Oxidation Pathways, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 183-274.
- Schaich, K.M., Karel, M., 1975. Free radicals in lysozyme reacted with peroxidizing methyl linoleate. J. Food Sci. 40, 456-459.
- Schaich, K.M., Karel, M., 1976. Free radical reactions of peroxidizing lipids with amino acids and proteins: an ESR study. Lipids 11, 392-400.
- Schauenstein, E., 1967. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. J. Lipid Res. 8, 417-428.
- Schaur, R.J., 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Mol. Aspects Med. 24, 149-159.
- Scott, G., 1965. Atmospheric Oxidation and Antioxidants. Elsevier, London.
- Shamberger, R.J., Shamberger, B.A., Willis, C.E., 1977. Malonaldehyde content of food. J. Nutr. 107, 1404-1409.
- Sims, R.P., Hoffman, W.H., 1962. Oxidative polymerization. In: Lundberg, W.O. (Ed.), Autoxidation and Antioxidants, Vol. II. Interscience, London, p. 629-694.
- Slawson, V., Adamson, A.W., Mead, J.F., 1973. Autoxidation of polyunsaturated fatty esters on silica. Lipids 8, 129-134.
- Sliwiok, J., Kowalska, T., Kowalski, W., Biernat, A., 1974. The influence of hydrogen-bond association on the destruction of hydroperoxides in the autoxidation process of oleyl alcohol, oleic acid, and methyl oleate. Microchem. J. 19, 362-372.
- Soszyłski, M., Filipiak, A., Bartosz, G., Gebicki, J.M., 1996. Effect of amino acid peroxides on the erythrocyte. Free Radic. Biol. Med. 20, 45-51.
- Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta 1740, 101-107.
- Sugino, H., Ishikawa, M., Nitoda, T., Koketsu, M., Juneja, L.R., Kim, M., Yamamoto, T., 1997. Antioxidative activity of egg yolk phospholipids. J. Agric. Food Chem. 45, 551-554.
- Sun, Y.-E., Wang, W.-D., Chen, H.-W., Li, C., 2011. Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51, 453-466.
- Suyama, K., Adachi, A., 1980. Origin of alkyl-substituted pyridines in food flavor: formation of the pyridines from the reaction of alkanals with amino acids. J. Agric. Food Chem. 28, 546-549.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J., Sevanian, A., 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic. Biol. Med. 22, 269-285.
- Swern, D., 1961. Primary products of olefinic autoxidation. In: Lundberg, W.O. (Ed.), Autoxidation and Antioxidants, Vol. 1. Interscience, New York, p. 1-54.
- Tappel, A.L., 1953a. Oxidative rancidity in food products. I. Linoleate oxidation catalyzed by hemin, hemoglobin, and cytochrome c. Food Res. 18, 560-573.
- Tappel, A.L., 1953b. The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. Arch. Biochem. Biophys. 44, 378-394.
- Tappel, A.L., 1955. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. J. Biol. Chem. 217, 721-733.
- Tappel, A.L., 1961. Biocatalysts: lipoxidase and hematin compounds. In: Lundberg, W.O. (Ed.), Autoxidation and Antioxidants, Vol. 1. Interscience, New York, p. 326-366.
- Tappel, A.L., 1962. Hematin compounds and lipoxidase as biocatalysts. In: Schultz, H., Day, E.D., Sinnhuber, W.O. (Eds.), Symposium on Foods: Lipids and their Oxidation. Avi, Westport, CT, p. 122-138.
- Tappel, A.L., 1995. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. J. Biol. Chem. 217, 721-733.
- Terao, J., Matsushita, S., 1977a. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. J. Am. Oil Chem. Soc. 54, 234-238.
- Terao, J., Matsushita, S., 1977b. Structures of monohydroperoxides produced from chlorophyll sensitized photooxidation of methyl linoleate. Agric. Biol. Chem. 41, 2467-2468.
- Terao, J., Ogawa, T., Matsushita, S., 1975. Degradation process of autoxidized methyl linoleate. Agric. Biol. Chem. 39, 397-402.
- Thomas, J.R., 1965. The self-reaction of *t*-butylperoxy radicals. J. Am. Chem. Soc. 87, 3935-3940.
- Thomas, M.J., Mehl, K.S., Pryor, W.A., 1982. The role of superoxide in xanthine oxidase-induced autoxidation of linoleic acid. J. Biol. Chem. 257, 8343-8347.
- Traylor, T.G., Russell, C.A., 1965. Mechanism of autoxidation. Terminating radicals in cumene autoxidation. J. Am. Chem. Soc. 87, 3698-3706.
- Traylor, T.G., Xu, F., 1990. Mechanism of reactions of iron(III) porphyrins with hydrogen peroxide and hydroperoxides: solvent and solvent isotope effects. J. Am. Chem. Soc. 112, 178-186.
- Treibs, W., 1948. Bei der Autoxydation von Lind- und Linolensäureestern werden durch 2 Mol Sauerstoff. Chem. Ber. 81, 472-477.
- Tsentlovich, Y.P., Kulik, L.V., Gritsan, N.P., Yurkovskaya, A.V., 1998. Solvent effect on the rate of β -scission of the tert-butoxyl radical. J. Phys. Chem. A. 102, 7975-7980.
- Uchida, K., 1999. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. Trends Cardiovasc. Med. 9, 109-113.
- Uchida, K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic. Biol. Med. 28, 1685-1696.
- Uchida, K., Stadtman, E.R., 1992. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 4544-4548.
- Uchida, K., Hasui, Y., Osawa, T., 1997. Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins. J. Biochem. (Tokyo) 122, 1246-1251.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Morimutsu, Y., Osawa, T., Noguchi, N., Niki, E., 1998. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. J. Biol. Chem. 273, 16058-16066.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., Matsuda, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Suzuki, D., Miyata, T., Noguchi, N., Niki, E., Osawa, T., 1998. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 4882-4887.
- Uchida, K., Toyokuni, S., Nishikawa, K., Kawakishi, S., Oda, H., Hiai, H., Stadtman, E.R., 1994. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. Biochemistry 33, 12487-12494.
- Umehara, T., Terao, J., Matsushita, S., 1979. Photosensitized oxidation of oils with food colors. J. Agric. Chem. Soc. Jpn 53, 51-56.
- Uri, N., 1961. Physico-chemical aspects of autoxidation. In: Lundberg, W.O. (Ed.), Autoxidation and Antioxidants, Vol. 1. Interscience, New York, p. 55-106.
- van Sickle, D.E., Mayo, F.R., Gould, E.S., Arluck, R.M., 1967. Effects of experimental variables in oxidations of alkenes. J. Am. Chem. Soc. 89, 977-984.
- Veldink, G.A., Garssen, G.J., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., 1972. Positional specificity of corn germ lipoxigenase as a function of pH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 22-26.
- Walling, C., Padwa, A., 1963. Positive halogen compounds. VI. Effects of structure and medium on the B-scission of alkoxy radicals. J. Am. Chem. Soc. 85, 1593-1597.
- Walling, C., Thaler, W., 1961. Positive halogen compounds, III. Allyl chlorination with *t*-butyl hypochlorite. The stereochemistry of allylic radicals. J. Am. Chem. Soc. 83, 3877-3884.
- Walling, C., Wagner, P.J., 1963. Effects of solvents on transition states in the reactions of *t*-butoxy radicals. J. Am. Chem. Soc. 85, 2333-2334.
- Walling, C., Waits, H.P., Milanovic, J., Pappiaonnu, C.G., 1970. Polar and radical paths in the decomposition of diacyl peroxides. J. Am. Chem. Soc. 92, 4927-4932.
- Watts, B.M., 1954. Oxidative rancidity and discoloration in meat. Adv. Food Res. 1, 1-52.
- Watts, B.M., 1962. Meat products. In: Schultz, H., Day, E.D., Sinnhuber, W.O. (Eds.), Symposium on Foods: Lipids and their Oxidation. Avi, Westport, CT, p. 202-214.
- Weenan, H., Porter, N.A., 1982. Autoxidation of model membrane systems: cooxidation of polyunsaturated lecithins with steroids, fatty acids, and α -tocopherol.

- J. Am. Chem. Soc. 104, 5216-5221.
- Witting, I.A., Chang, S.S., Kummerow, F.A., 1957. The isolation and characterization of the polymers formed during the autoxidation of ethyl linoleate. J. Am. Oil Chem. Soc. 34, 470-473.
- Wu, G.-S., Stein, R.A., Mead, J.F., 1977. Autoxidation of fatty acid monolayers adsorbed on silica gel: II. Rates and products. Lipids 12, 971-978.
- Wu, G.-S., Stein, R.A., Mead, J.F., 1978. Autoxidation of fatty acid monolayers adsorbed on silica gel: III. Effects of saturated fatty acids and cholesterol. Lipids 13, 517-524.
- Xu, G., Liu, Y., Sayre, L.M., 1999. Independent synthesis, solution behavior, and studies on the mechanism of formation of the primary amine-derived fluorophore representing cross-linking of proteins by (*E*)-4-hydroxy-2-nonenal. J. Org. Chem. 64, 5732-5745.
- Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y., Shimasaki, H., 1984. Oxidation of lipids. 7. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion. Biochim. Biophys. Acta 795, 332-340.
- Yang, M.-H., 1993. Damage of DNA and its Constituents by Oxidizing Lipids. Rutgers University, New Brunswick, NJ.
- Yang, M.-H., Schaich, K.M., 1996. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. Free Radic. Biol. Med. 20, 225-236.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., Tsai, H.-L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chem. 79, 307-313.
- Yong, S.H., Karel, M., 1978. Reaction of histidine with methyl linoleate: characterization of the histidine degradation products. J. Am. Oil Chem. Soc. 55, 352-357.
- Yong, S.H., Karel, M., 1979. Cleavage of the imidazole ring in histidyl residue analogs reacted with peroxidizing lipids. J. Food Sci. 22, 568-574.
- Yoshida, K., Terao, J., Suzuki, T., Takama, K., 1991. Inhibitory effect of phosphatidylserine on iron-dependent lipid peroxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1077-1081.
- Younathon, M.T., Watts, B.M., 1959. Relation of meat pigments to lipid oxidation. Food Res. 24, 728-734.
- Yuan, Q., Zhu, X., Sayre, L.M., 2007. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. Chem. Res. Toxicol. 20, 129-139.
- Zamora, R., Hidalgo, F.J., 1995. Linoleic acid oxidation in the presence of amino compounds produces pyrroles by carbonylamine reactions. Biochim. Biophys. Acta 1258, 319-327.
- Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2003. Phosphatidylethanolamine modification by oxidative stress product 4,5(*E*)-epoxy-2(*E*)-heptenal. Chem. Res. Toxicol. 16, 1632-1641.
- Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2005. 2-Alkylpyrrole formation from 4,5-epoxy-2-alkenals. Chem. Res. Toxicol. 18, 342-348.
- Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F.J., 1999. Modification of histidine residues by 4,5-epoxy-2-alkenals. Chem. Res. Toxicol. 12, 654-660.
- Zamora, R., Gallardo, E., Hidalgo, F.J., 2006. Amine degradation by 4,5-epoxy-2-decenal in model systems. J. Agric. Food Chem. 54, 2398-2404.
- Zhang, W.-H., Liu, J., Xu, G., Yuan, Q., Sayre, L.M., 2003. Model studies on protein side chain modification by 4-oxo-2-nonenal. Chem. Res. Toxicol. 16, 512-523.

Defeitos de sabor do leite

Juan He⁺⁺⁺, Pedro Vazquez-Landaverde[†], Michael C. Qian^{*} e N. A. Michael Eskin^{**}

I. INTRODUÇÃO

Os benefícios nutricionais do leite de vaca, descritos no Capítulo 4, fazem dessa substância uma fonte importante de nutrientes presentes na dieta diária de bebês e adultos jovens. Além de satisfazer as necessidades nutricionais, os consumidores apreciam o sabor suave do leite e de outros produtos lácteos. O sabor do leite torna-se um parâmetro-chave da qualidade desse produto, na medida em que sua aceitação depende em grande parte deste parâmetro (Drake *et al.*, 2006). O leite fresco é um produto bastante suave: tem aroma e sabor agradáveis, levemente adocicados, e a sensação que provoca na boca e seu gosto residual também são prazerosos. Como o leite fresco tem sabor muito suave, qualquer desequilíbrio em seu perfil de sabor pode se manifestar como um “defeito de sabor”, facilmente detectável pelo consumidor. O sabor do leite é influenciado por diversos fatores envolvidos em sua produção, os quais incluem a genética da vaca, suas condições físicas e fisiológicas, o tipo de alimento consumido, o ambiente que cerca o animal e a área de ordenha, além de alterações biológicas, químicas e enzimáticas do leite durante a produção e distribuição (Franklin, 1951). A composição do sabor do leite é complexa; já foram registrados pelo menos 400 compostos voláteis, que abrangem uma ampla variedade de classes químicas, entre elas lactonas, ácidos, ésteres, cetonas, aldeídos, alcoóis, furanos, carbonilas, pirazinas, compostos com enxofre e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Moio *et al.*, 1994). O desequilíbrio desses compostos voláteis do leite, bem como a geração de alguns novos compostos de sabor indesejado, podem levar ao surgimento de defeitos de sabor. De acordo com o Committee on Flavor Nomenclature and Reference Standards of the American Dairy Science Association, os defeitos de sabor do leite podem ser classificados como: aquecido, induzido pela luz, lipolisado, microbiano, oxidado, transmitido e miscelânea, conforme mostrado na Tabela 12.1 (Shipe *et al.*, 1978). Este capítulo abordará os defeitos de sabor mais comuns enfrentados pela indústria de laticínios e os métodos empregados para minimizá-los ou eliminá-los.

TABELA 12.1 Tipos de defeitos de sabor do leite

Causa	Termos descritivos ou associados
Aquecido	Cozido, caramelizado, queimado
Induzido pela luz	De luz, de luz solar, ativado
Lipolisado	Rançoso, butírico, amargo, de cabra ^a
Microbiano	Ácido, amargo, de fruta, de malte, pútrido, de sujo
Oxidado	De papel, de papelão, metálico, oleoso, de peixe
Transmitido	De ração, de erva, de vaca, de celeiro
Miscelânea	Insípido, químico, estranho, sem frescor, salgado

^aO sabor amargo pode ter origem em várias causas diferentes. Se a causa específica for desconhecida, ele deverá ser classificado no grupo “miscelânea”. Reproduzido de Shipe et al. (1978), com permissão da Elsevier.

II. DEFEITOS DE SABOR DO LEITE

A. Sabores lipolisados

Os sabores lipolisados, um dos tipos de defeito de sabor mais comuns do leite e dos produtos lácteos, são produzidos pela hidrólise enzimática dos triglicerídeos da gordura do leite. Essa hidrólise leva ao acúmulo de ácidos graxos (AGs) livres (os principais produtos da degradação), monoglicerídeos e diglicerídeos, e, possivelmente, de glicerol (Figura 12.1). No passado, esse tipo de defeito de sabor era descrito como “rançoso”, o que causava grande confusão, por causa da associação do termo com a oxidação lipídica. Com o tempo, isso foi resolvido, ao se diferenciar a rancidez hidrolítica, dos “sabores lipolisados”, da rancidez oxidativa, específica dos “sabores oxidados”. Os sabores lipolisados foram associados às lipases resistentes ao aquecimento, oriundas de bactérias psicrotólicas, predominantemente do gênero *Pseudomonas* (Saxby, 1992).

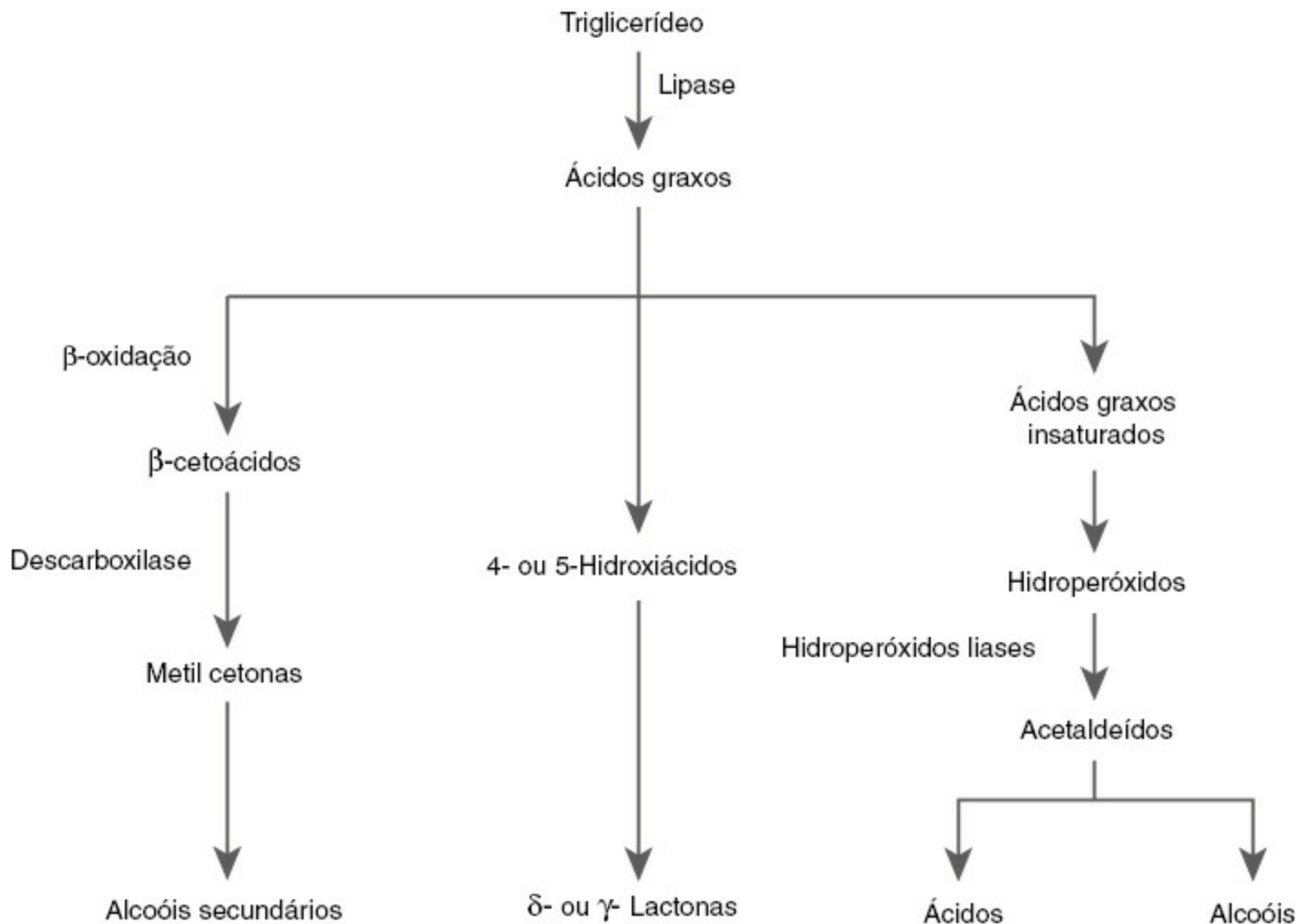


FIGURA 12.1 Vias gerais do metabolismo dos triglicerídeos e ácidos graxos do leite. Extraído de Singh *et al.* (2003). Com a gentil permissão de Springer Science and Business Media.

Os AGs livres podem derivar da lipólise, da proteólise e também da fermentação da lactose durante a maturação dos queijos. Tanto a esterase quanto a lipase têm atividade lipolítica e podem hidrolisar os lipídeos do leite, originando AGs livres. A maioria dos AGs livres, com cadeias de 4 a 20 carbonos, provém da hidrólise de triglicerídeos pelas lipases do leite e de micro-organismos durante a maturação dos queijos. Uma porcentagem menor de AGs livres, com cadeia de 2 a 6 carbonos, pode provir da fermentação da lactose e também da degradação de aminoácidos. A fermentação da lactose produz ácido acético, ácido propiônico e ácido butanoico. A degradação dos aminoácidos, principalmente a desaminação catalítica, pode gerar ácidos graxos de cadeia ramificada, como o ácido isobutanoico e o ácido isovalérico (Kuzdzal-Savoie, 1980). A oxidação de alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres também pode gerar uma pequena quantidade de AGs livres.

1. Métodos para a determinação dos ácidos graxos livres

A determinação da lipólise é muito importante na avaliação da qualidade do leite. O grau de lipólise pode ser determinado com o emprego de vários métodos. O grau de acidez é bastante utilizado para monitorar a liberação de AGs livres no leite, na nata e no queijo (Richardson, 1985; Lin e Jeon, 1987; Ikins *et al.*, 1988). No entanto, esse método mede apenas os AGs livres liberados totais, por meio de titulação. Ele não fornece nenhuma informação sobre a concentração ou o tipo de cada um dos AGs livres. Vários pesquisadores questionaram a capacidade do grau de acidez de prever corretamente a rancidez do leite (Duncan *et al.*, 1990; 1991), uma vez que nem sempre o leite com grau de acidez elevado está rançoso. Essa discrepância foi atribuída à diferença de solubilidade dos ácidos graxos do leite (Duncan *et al.*, 1990). Os métodos que determinam o grau de acidez recuperam apenas

parcialmente os ácidos graxos de cadeia média solúveis em gordura (10C-16C), já que os ácidos graxos de cadeia mais curta, implicados no sabor rançoso (4C-12C), são mais hidrofílicos e permanecem na fase aquosa do leite. Assim, é importante determinar as concentrações individuais dos ácidos graxos, em particular dos AGs livres de cadeia curta (entre C4:0 e C12:0), uma vez que eles têm sabor forte, frequentemente indesejável, e são os que mais contribuem para o sabor lipolizado do leite.

Cada AG livre pode ser determinado de modo preciso com o uso da cromatografia gasosa (CG), com ou sem derivação. A determinação de cada um dos AGs livres pela CG consiste na extração dos lipídeos e no isolamento e quantificação dos AGs livres (Deeth *et al.*, 1983). Consegue-se uma extração com alta eficiência utilizando-se éter dietílico acidificado, quando se ajusta o pH da amostra para 1,5 com ácido sulfúrico (Needs *et al.*, 1983). Antes de analisar cada um dos AGs livres por CG, os AGs livres extraídos precisam ser separados da gordura. A técnica de separação deve separar quantitativamente os AGs livres da gordura, sem que haja contaminação com a gordura.

Entre as várias técnicas empregadas para isolar os AGs livres, a que faz uso de uma coluna de ácido silícico e KOH foi amplamente utilizada em trabalho anterior (Woo e Lindsay, 1982). Nesse trabalho, os AGs livres e os lipídeos foram dissolvidos em éter de petróleo-éter dietílico (80:20), e os triglicerídeos, passados através de uma coluna de KOH-ácido silícico. Os AGs livres foram aprisionados pela coluna, na forma de sais de potássio, e eluídos da coluna com ácido fórmico a 2% em éter dietílico. No entanto, além de a preparação da coluna de KOH-ácido silícico ser cansativa, o desempenho da coluna carece de reprodutibilidade. A possibilidade de formação de canais na coluna pode reduzir demais a eficiência da separação. Além disso, o contato prolongado da gordura com a coluna de KOH pode aumentar muito a hidrólise da gordura e causar variabilidade na análise.

Uma coluna de alumina já foi utilizada para separar AGs livres de triglicerídeos (Deeth *et al.*, 1983; De Jong e Badings, 1990). Com esse método, os lipídeos neutros foram eluídos de uma coluna de alumina desativada com éter dietílico-heptano (1:1), enquanto os AGs livres foram extraídos com éter dietílico contendo ácido fórmico a 3%. A recuperação de AGs livres de amostras de queijo foi elevada (De Jong e Badings, 1990).

Resinas de troca de aniônica também já foram utilizadas para isolar AGs livres do leite (Needs *et al.*, 1983; Spangelo *et al.*, 1986). Depois de os triglicerídeos terem sido eluídos, os AGs livres absorvidos foram metilados, misturando-se a resina seca com HCl-metanol. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram extraídos com éter dietílico e analisados por cromatografia gasosa (CG). No entanto, o contato prolongado com a resina alcalina forte pode causar a hidrólise dos triglicerídeos (Needs *et al.*, 1983). Os AGs livres isolados, normalmente, são metilados para a análise por CG. A metilação dos AGs livres é catalisada por ácido ou base.

Os AGs livres podem ser metilados e analisados sem que estejam separados dos triglicerídeos. A resina forte trocadora de ânions Dowex já foi utilizada como catalisador heterogêneo para metilar AGs livres extraídos diretamente de leite (Spangelo *et al.*, 1986). A metilação foi realizada em dimetilformamida, CH_3I e piridina a 40°C. Em seguida, os ésteres metílicos foram extraídos com hexano e analisados por meio da CG. O catalisador permite a metilação completa dos AGs livres sem a hidrólise dos triglicerídeos e a transesterificação com outros lipídeos. No entanto, a reprodutibilidade da determinação do ácido butírico é muito baixa, por causa da perda potencial por evaporação do butirato de metila durante as etapas da metilação.

O hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) já foi adicionado diretamente a um extrato de lipídeos para converter os AGs livres nos sabões de tetrametilamônio, transformados em ésteres metílicos no injetor do CG e, em seguida, analisados (Metcalf e Wang, 1981; Martinez-Castro *et al.*, 1986; Martin-Hernandez *et al.*, 1988; Chavarri *et al.*, 1997). Os ésteres metílicos resultantes da transesterificação dos triglicerídeos ficaram na camada superior de éter, enquanto os sabões de amônio de AGs livres permaneceram na camada de metanol. Depois do ajuste do pH, a camada de metanol foi injetada no cromatógrafo a gás e a pirólise/metilação, realizada na câmara de injeção do cromatógrafo. O método não exige que os AGs livres sejam separados dos triglicerídeos. No entanto, os ésteres dos ácidos graxos de cadeia curta do glicerol podem ser dissolvidos na fase metanólica inferior e fornecer melhores resultados (Chavarri *et al.*, 1997). Além disso, a pirólise gera quantidades excessivas de trimetilamina,

que leva à evaporação dos ésteres de ácidos graxos de cadeia curta do divisor de fluxo (*splitter*) e altera os resultados (Martin-Hernandez *et al.*, 1988).

Uma coluna de aminopropila trocadora fraca de ânions já foi adotada com sucesso para isolar os AGs livres de um extrato de lipídeos (De Jong e Badings, 1990; Chavarri *et al.*, 1997). Os lipídeos neutros foram lavados da coluna com clorofórmio-isopropanol (2:1) e, em seguida, os AGs livres foram eluídos com éter dietílico contendo ácido fórmico a 2%. Os AGs livres foram injetados diretamente no cromatógrafo a gás e separados com uma coluna FFAP. Esse método é simples e rápido e possibilita recuperações de quase 100% da maioria dos AGs livres. Com ele, a hidrólise dos triglicerídeos e a contaminação pelo ácido láctico não são observadas. Todos os ácidos graxos podem ser analisados com boa repetibilidade. O método também foi utilizado para analisar os AGs livres de queijos (Qian e Reineccius, 2002).

Os métodos baseados na cromatografia líquida foram desenvolvidos a partir de um protocolo que utilizava a derivatização dos AGs livres (Garcia *et al.*, 1990). Recentemente, surgiram relatos de vários métodos novos que permitem a análise quantitativa rápida dos AGs livres de cadeia curta. A eletroforese capilar e a absorção indireta na região do UV (Vallejo-Cordoba *et al.*, 1998) foram utilizadas para a quantificação dos AGs livres da nata lipolisada. A microextração em fase sólida (MEFS) e a CG foram empregadas para determinar quantitativamente os AGs livres de cadeia curta do leite (Gonzalez-Cordova e Vallejo-Cordoba, 2001). Nesse método, a extração dos AGs livres consistiu na colocação de 40 ml de leite contendo 28% de NaCl em pH 1,5 em um frasco lacrado; a amostra foi equilibrada durante 30 minutos a 70°C. Em seguida, os AGs livres foram extraídos com uma fibra de MEFS e dessorvidos termicamente para a análise por CG. Utilizando a análise de regressão múltipla, Gonzalez-Cordova e Vallejo-Cordoba (2003) relataram um coeficiente de correlação (R^2) altamente significativo ($p < 0,001$) de 0,84 entre seu método de MEFS associado à cromatografia gasosa para a detecção de AGs livres de cadeia curta e os índices de rancidez determinados por meio de avaliação sensorial de 19 leites comercializados. Utilizando esse método, eles puderam detectar e prever a rancidez hidrolítica no leite com base na formação dos ácidos graxos de cadeia curta.

2. Propriedades sensoriais dos ácidos graxos livres

Vários autores pesquisaram os limiares para a detecção sensorial dos AGs livres, tanto na água quanto no óleo (Patton, 1964; Siek *et al.*, 1969; Urbach *et al.*, 1972; Brennand, 1989), e os valores relatados variaram amplamente por causa dos diferentes métodos utilizados nos estudos (Tabela 12.2). Os limiares sensoriais para os AGs livres de cadeia curta são mais elevados na água que no óleo, provavelmente em razão de sua solubilidade mais alta (e, portanto, da pressão de vapor mais baixa) na água. O leite é uma emulsão ou um coloide de glóbulos de gordura do leite, que pode ser considerado um fluido diluído em água. O aroma dos ácidos butanoico (4C), hexanoico (6C) e octanoico (8C) com frequência é descrito como de ranço, de suor, semelhante ao odor de cabra e, em geral, desagradável, enquanto os ácidos decanoico (10C) e dodecanoico (12C) são descritos como tendo aromas de sabão e de cera. Do ácido butanoico (C4:0) ao ácido octanoico (C8:0), os limiares sensoriais na água crescem com o aumento do comprimento da cadeia. No leite fresco comum, as concentrações de ácidos – butanoico (4C), hexanoico (6C), octanoico (8C), decanoico (10C), dodecanoico (12C) – costumam estar abaixo de seus limiares sensoriais (De Jong e Badings, 1990; Gonzalez-Cordova e Vallejo-Cordoba, 2001). Portanto, é bem provável que esses compostos não contribuam de modo significativo para a composição do aroma global do leite fresco comum. No entanto, a alta atividade lipolítica no leite pode aumentar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta a teores que ultrapassam seus limiares sensoriais e, dessa forma, causar defeito de sabor lipolisado no leite.

B. Lipases do leite

O leite bovino contém uma atividade lipolítica muito alta, predominantemente oriunda de esterases do tipo b. Essas enzimas englobam as glicerol tricarboxil esterases, as esterases alifáticas, as diesterases e as lipases (EC 3.1.1.3), e o pH ótimo está em torno de 8-9. A maior parte da atividade das lipases está associada à caseína, e 70% da lipase, ligada às micelas de caseína (Downey e Andrews, 1966). Essa associação é em grande parte eletrostática, já que a enzima pode ser liberada da micela pela ação do cloreto de sódio ou da heparina. O restante da lipase está presente na forma de um complexo solúvel caseína-enzima no soro do leite (Hoynes e Downey, 1973; Anderson, 1982).

TABELA 12.2 Características do aroma e limiares sensoriais dos ácidos graxos livres voláteis

Composto	Características do aroma	Limiar (ppm)	Meio	Referências
Ácido acético	Vinagre, azedo, penetrante	22–100	Água	Patton (1964), Siek <i>et al.</i> (1971), Manning e Robinson (1973)
		0,12–7	Óleo	Patton (1964), Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972); Reiners e Grosch (1998)
Ácido propanoico	Azedo, penetrante	20–40	Água	Amoore <i>et al.</i> (1968); Salo (1970)
Ácido butírico	Rançoso, de queijo, forte	0,3–6,8	Água	Patton (1964), Amoore <i>et al.</i> (1968); Siek <i>et al.</i> (1971); Baldwin <i>et al.</i> (1973)
		0,14–3	Óleo	Patton (1964), Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972); Schieberle <i>et al.</i> (1993)
Ácido 2-metilpropanoico	De queijo, rançoso, de caramelo	0,05–8,1	Água	Salo (1970); Brennand (1989); Larsen e Poll (1992)
Ácido pentanoico	De queijo, azedo, de carne, de suor	1,1–6,5	Água	Amoore <i>et al.</i> (1968); Brennand (1989)
Ácido 2-metilbutanoico	De queijo, azedo, rançoso, de suor	0,07	Água	Brennand (1989)
		0,02	Óleo	Reiners e Grosch (1998)
Ácido hexanoico	De queijo, de cabra, forte	0,29–27	Água	Amoore <i>et al.</i> (1968); Siek <i>et al.</i> (1971); Baldwin <i>et al.</i> (1973); Buttery (1993)
		2,5–10	Óleo	Patton (1964); Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972); Schieberle <i>et al.</i> (1993)
Ácido heptanoico	De queijo, de cabra, rançoso	0,28–10,4	Água	Amoore <i>et al.</i> (1968); Brennand (1989)
Ácido octanoico	De queijo, de suor	3–19	Água	Patton (1964); Amoore <i>et al.</i> (1968); Baldwin <i>et al.</i> (1973); Buttery (1993)
		10–350	Óleo	Patton (1964); Urbach <i>et al.</i> (1972)
Ácido nonanoico	Gorduroso, verde	2,4–8,8	Água	Amoore <i>et al.</i> (1968); Brennand (1989)
Ácido decanoico	De sabão, de cera	1,4–10	Água	Patton (1964); Amoore <i>et al.</i> (1968); Baldwin <i>et al.</i> (1973); Buttery (1993)
		5–200	Óleo	Patton (1964); Urbach <i>et al.</i> (1972)
Ácido dodecanoico	De sabão, metálico	2,2–16	Água	Brennand (1989)
		700	Óleo	Patton (1964); Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972)

Uma lipase – em particular, a lipase lipoproteica (LLP) (EC 3.1.1.34) – é uma glicoproteína com dois oligossacarídeos ligados a átomos de nitrogênio, os quais parecem ser necessários para a atividade enzimática (Egelrud e Olivecrona, 1972). Essa enzima é responsável pela maior parte da atividade lipolítica do leite bovino, se não toda, e existe na forma de um homodímero com massa molecular de aproximadamente 100 kDa (Kinnunen *et al.*, 1976). A LLP desempenha um papel importante na remoção dos lipídeos do sangue para a glândula mamária, e sua presença no leite pode resultar de vazamento proveniente do tecido (Shirley *et al.*, 1973; Mendelson *et al.*, 1977). No entanto, a LLP do leite bovino não tem nenhuma finalidade biológica conhecida no leite. A LLP é relativamente instável ao calor e ácido e costuma ser desativada no estômago. A pasteurização por meio de alta temperatura e tempo curto (HTST) (72°C mantidos por 15 segundos) é capaz de desativar a maioria das enzimas do leite e de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia curta e longa, glicerídeos parciais e fosfolipídeos (Egelrud e Olivecrona, 1973; Scow e Egelrud, 1976).

Outra fonte de lipase do leite são as bactérias psicrotróficas, como as *Pseudomonas*, que têm um efeito importante sobre a lipólise do leite e de laticínios (Sørhaug e Stepaniak, 1997). Essas lipases bacterianas têm características diferentes da LLP. A principal diferença é a capacidade dessas lipases de atravessar a membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) sem romper o glóbulo (Fitz-Gerald e Deeth, 1983). Outra diferença significativa é que as lipases bacterianas são estáveis à pasteurização HTST e até ao tratamento com temperatura ultra-alta (UHT) (~140°C por 4 segundos) (Christen *et al.*, 1986).

1. Lipólise do leite

As enzimas endógenas do leite estão presentes em quantidade suficiente para causar uma ampla hidrólise das gorduras com a deterioração concomitante do sabor (Herrington, 1954). A quantidade de enzimas não é o fator crucial na determinação da suscetibilidade do leite à lipólise, e sim a MGGL, que protege os triacilgliceróis da micela contra o ataque lipolítico. No leite recém-secretado, essa membrana biológica está intacta e forma uma barreira eficaz ao redor da gordura. Contudo, essa proteção é reduzida ou completamente eliminada em certas situações, como no dano físico à membrana do leite cru. A lipólise do leite pode ser classificada, de maneira geral, em dois tipos: espontânea e induzida. A lipólise espontânea é iniciada pelo simples ato de resfriar o leite cru a temperaturas abaixo de 10°C logo após a secreção. Por outro lado, a lipólise induzida é iniciada pelo dano físico à MGGL, que permite o acesso da lipase à gordura (substrato) (Deeth, 2006). Tanto a lipólise espontânea quanto a lipólise induzida continuam durante o armazenamento, sobretudo no primeiro dia de refrigeração (Ouattara *et al.*, 2004).

2. Defeitos de sabor produzidos por micro-organismos

O leite é um meio ideal para o crescimento microbiano. Como consequência, é de suma importância utilizar os procedimentos de sanitização mais completos, o resfriamento apropriado e a manutenção das temperaturas para otimizar a qualidade do leite cru na fazenda. Os sabores indesejados surgem no leite processado, quase sempre, quando a contagem de bactérias é 3×10^7 UFC/ml (Schroder *et al.*, 1982). Esses sabores surgem em três etapas: perda do frescor; percepção aumentada de que o alimento está “envelhecido”; e produção dos sabores de ranço, de fruta e amargo. Os sabores amargos em geral acompanham a degradação das proteínas. Os sabores de sabão e de ranço são resultado da degradação dos lipídeos (Cousin, 1982). A maior parte da deterioração microbiana e os defeitos de sabor associados resultam da contaminação pós-pasteurização, que normalmente envolve bactérias psicotróficas. As bactérias psicotróficas são capazes de crescer em temperaturas $\pm 7^\circ\text{C}$ (44,6°F). O resfriamento rápido e o armazenamento refrigerado do leite cru favorecem o crescimento dessas bactérias. Durante o armazenamento refrigerado, elas dominam a flora e produzem enzimas extracelulares (principalmente proteases e lipases), que são as que mais contribuem para a deterioração dos produtos lácteos (Sørhaug e Stepaniak, 1997). Por exemplo, a digestão da caseína por proteases pode gerar um sabor amargo e causar a gelificação do leite. As lipases hidrolisam a gordura do leite, produzindo AGs livres, que provocam um sabor rançoso, amargo, de sujo e de sabão. A lecitinase degrada as MGGLs e aumenta a suscetibilidade da gordura do leite à ação das lipases. No entanto, mais estudos são necessários para compreender a deterioração induzida pelas bactérias.

Bactérias psicotróficas pertencentes a inúmeros gêneros já foram isoladas do leite. Entre elas, há tanto bactérias Gram-negativas (como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* spp.) como bactérias Gram-positivas (como *Bacillus* [Meer *et al.*, 1991], *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* spp.) (Champagne *et al.*, 1994; Shah, 1994). Entre elas, a *Pseudomonas* é a bactéria psicotrófica encontrada com mais frequência no leite cru. O crescimento das linhagens de *Pseudomonas* e a produção de proteases por essas bactérias foram considerados a causa da liberação de plasmina e plasminogênio da micela de caseína para a fração do soro (Fajardo-Lira e Nielsen, 1998; Nielsen, 2002). Oito aromas específicos do leite deteriorado foram utilizados para diferenciar o leite estragado pela ação de cepas de *Pseudomonas*: odor pútrido; de celeiro; de camarão; medicinal; de fruta; de queijo; “cozido”; e de deterioração global. Comprovou-se que a *P. fragi* produz um aroma de fruta no leite, enquanto a *P. putida* produz aroma de fruta, de queijo, pútrido e de celeiro. Constatou-se que as características desses aromas são influenciadas não apenas pela espécie, mas também pelo teor de gordura e pelo tempo de reação (Hayes *et al.*, 2002). Dogan e Boor (2003) concluíram que os padrões de atividade enzimática extracelular, observados em vários isolados de *Pseudomonas*, parecem estar associados com ribotipos. Já Magan *et*

al. (2001) estudaram um possível sistema de detecção precoce da deterioração microbiana causada por bactérias (*Pseudomonas aureofaciens*, *P. fluorescens*, *Bacillus cereus*) e leveduras (*Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*). Esse sistema utiliza um nariz eletrônico e 14 sensores compostos de polímeros condutores.

3. Defeito de sabor – Sabor proteolísado

As enzimas proteolíticas degradam proteínas e liberam uma variedade de compostos nitrogenados. Essas proteases, que atacam a caseína e as proteínas do soro, levam à coagulação do leite e à produção de sabores amargos. Enquanto as bactérias podem ser eliminadas pelo tratamento térmico, certas enzimas resistentes ao aquecimento, que são produzidas no leite cru por bactérias psicrotóxicas, podem ter uma ação proteolítica e lipolítica. A proteólise pode ser determinada pelo aumento dos grupos amino livres solúveis no ácido tricloroacético e, na sequência, pela reação colorimétrica com o ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) (Cogan, 1977). McKellar (1981) investigou a relação entre a proteólise determinada pela reação com o TNBS e o surgimento dos defeitos de sabor. O estudo demonstrou a possibilidade de esse método ser utilizado como indicador do tempo de vida de prateleira, já que a proteólise pode ser detectada antes do surgimento dos sabores indesejados. A proteólise também há como ser medida pelo teor de tirosina, que, segundo relatos, está associado a contagens elevadas de células somáticas no leite (Senyk *et al.*, 1985). Os produtos com aroma derivados da proteólise já registrados incluem o *p*-cresol, o metional, o fenetanol, o fenilacetaldéido, o 3/2-metilbutanal e o 2-metilpropanal (Dunn e Lindsay, 1985). O defeito de sabor associado à proteólise pode ser afetado pela atividade proteolítica, que varia com a espécie (Stead, 1986) e as condições ambientais (Matselis e Roussis, 1998).

C. Defeito de sabor – Sabor oxidado

A oxidação lipídica influencia a qualidade dos produtos alimentícios ao alterar o aroma e o sabor e reduzir o valor nutritivo. Os sabores produzidos pela oxidação dos produtos lácteos são descritos como oxidado, semelhante a papelão, de grão de soja, verde, metálico, de gordura, de peixe, amargo, de fruta, de sabão, de tinta, rançoso, de grama, de manteiga e de sebo. “Sabor oxidado” é o termo geral recomendado para descrever todos esses sabores (Shipe *et al.*, 1978). A oxidação lipídica, normalmente, envolve a reação do oxigênio molecular com ácidos graxos insaturados, por meio de radicais livres ou da ação da luz, e é influenciada por fatores como o grau de insaturação dos ácidos graxos e a presença de íons de metais de transição e de antioxidantes, como os tocoferóis e os carotenoides. Os produtos iniciais da oxidação lipídica, os hidroperóxidos de lipídeos, são bastante instáveis e podem se desfazer com rapidez, dando origem a compostos voláteis de cadeia curta, como hidrocarbonetos, ácidos, alcoóis, aldeídos e cetonas, que produzem sabores indesejáveis.

Como a oxidação só ocorre quando há um desequilíbrio entre os oxidantes reativos e a defesa antioxidante (Halliwell, 1996), a sensibilidade à oxidação também pode ser monitorada pela medida da capacidade antioxidante do produto. Em um artigo de revisão, Antolovich *et al.* (2002) descreveram um resumo abrangente sobre os métodos utilizados para medir a estabilidade oxidativa, por meio da capacidade antioxidante, tais como: o índice de peróxidos; a conjugação de dienos; as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; a formação de hexanal; o parâmetro antioxidante total, por meio da captura de radicais; e a ressonância de *spin* eletrônico (ESR) (*spin-trap test*). Recentemente, os métodos do poder antioxidante redutor do ferro férrico (FRAP) e do radical difenil picril hidrazil (DPPH) foram utilizados para medir a capacidade antioxidante, a fim de monitorar a sensibilidade do leite à oxidação (Smet *et al.*, 2008). Esses métodos mostraram uma sensibilidade maior à oxidação que o método mais convencional de determinação do peróxido durante as primeiras horas e dias de armazenamento.

Os ácidos graxos poli-insaturados, entre eles os ácidos oleico, linoleico, linolênico e araquidônico, são os principais precursores da formação dos compostos aldeídicos, em razão de sua prevalência nos produtos lácteos. A

Tabela 12.3 lista as possíveis origens dos aldeídos produzidos por auto-oxidação. No processo de auto-oxidação, o oxigênio reage com um grupo metileno adjacente a uma dupla ligação, a reação é catalisada por metais presentes em pequenas quantidades (como o cobre) e enzimas (Forss, 1979), e ocorre a formação de hidroperóxidos, que se decompõem em aldeídos de cadeia reta.

A remoção do oxigênio pode impedir de maneira eficaz a auto-oxidação. A injeção de nitrogênio no espaço livre (*headspace*) da amostra reduz a oxidação lipídica. O uso de embalagem com absorvedor de oxigênio pode diminuir o teor de oxigênio dissolvido no leite UHT e, dessa forma, reduzir a formação dos compostos voláteis que geram o sabor de “envelhecido”, entre eles as metil cetonas e os aldeídos; o mesmo não ocorre quando o leite é acondicionado em uma embalagem sem um filme com absorvedor de oxigênio (Perkins *et al.*, 2007).

A auto-oxidação produz, ainda, metil cetonas e hidrocarbonetos, embora a maior parte das metil cetonas seja gerada pela degradação térmica dos ácidos graxos. As metil cetonas com um número ímpar de átomos de carbono (7C, 9C, 11C, 12C), como a 2-pentanona, a 2-heptanona, a 2-nonanona e a 2-undecanona, são as principais cetonas encontradas no leite. Essas metil cetonas são formadas pela descarboxilação dos β -cetoácidos, que resultam da oxidação dos AGs livres presentes no leite (Moio *et al.*, 1993). A Figura 12.1 mostra uma via proposta para a formação das cetonas; os limiares de percepção dessas cetonas estão listados na Tabela 12.4.

D. Defeito de sabor – Sabor de peixe

O surgimento do sabor de peixe, sugestivo de peixe em decomposição, foi relatado no leite puro de vacas suecas da raça leiteira *Red and White* (Lunden *et al.*, 2002a). Acreditava-se que o fenômeno, confundido com frequência com sabor oxidado, estava associado à formação do óxido de trimetilamina (OTMA). A conexão entre o odor de peixe e a trimetilamina (TMA) já está bem estabelecida e o limiar olfativo para sua detecção está ao redor de 1-2 ppm (Mehta *et al.*, 1974; von Gunten *et al.*, 1976).

TABELA 12.3 Possíveis origens do aldeído obtido de ácidos graxos insaturados específicos

Ácido graxo insaturado	Aldeído obtido
Ácido oleico	Octanal, nonanal, decanal, 2-decenal, 2-undecenal
Ácido linoleico	Hexanal, 2-octenal, 3-nonenal, 2,4-decadienal
Ácido linolênico	Propanal, 3-hexenal, 2,4-heptadienal, 3,6-nonadienal, 2,4,7-decatrienal
Ácido araquidônico	Hexanal, 2-octenal, 3-nonenal, 2,4-decadienal, 2,5-undecadienal, 2,5,8-tridecatrienal

TABELA 12.4 Características do aroma e limiares sensoriais de algumas cetonas voláteis

Composto	Características do aroma	Limiar (ppm)	Meio	Referências
Acetona	Semelhante à acetona, penetrante	500	Água	Manning e Robinson (1973)
		125	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1969)
2-Butanona	Semelhante à acetona	50	Água	Wick (1966)
		30	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1969)
2-Pentanona	Floral, de fruta, de vinho, semelhante à acetona	2,3	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
		61	Manteiga	Siek <i>et al.</i> (1969)
2-Hexanona	Floral, de fruta	0,93	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
2-Heptanona	De queijo azul, de fruta, doce	0,14	Água	Buttery <i>et al.</i> (1988)
		1,5–15	Manteiga	Siek <i>et al.</i> (1969); Preininger e Grosch (1994)
2-Octanona	De fruta, de mofo, de maçã verde, verde	2,5–3,4	Manteiga	Siek <i>et al.</i> (1969)
2-Nonanona	De fruta, de mofo, de rosa, semelhante a chá	0,2	Água	Buttery <i>et al.</i> (1988)
		7,7	Queijo	Siek <i>et al.</i> (1969)

2-Decanona	De fruta, de mofo	0,19	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
2-Undecanona	Floral, herbáceo, de fruta	0,007-5,4	Água	Karahadian <i>et al.</i> (1985); Buttery <i>et al.</i> (1988)
		3,4	Óleo	Kubicková e Grosch (1998)

A TMA é oxidada por uma enzima hepática, a mono-oxigenase que contém flavina (FMO) em óxido de TMA, que não tem sabor nem cor (Hlavica e Kehl, 1977). É a oxidação deficiente da TMA que causa o odor de peixe (Pearson *et al.*, 1979; Spellacy *et al.*, 1979). A alimentação do gado com pasto de trigo foi particularmente associada ao surgimento do odor/sabor de peixe no leite (Mehta *et al.*, 1974; von Gunten *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 1980). Utilizando a técnica do *headspace* dinâmico, seguida da análise por CG, Lunden *et al.* (2002a) mostraram que as amostras de leite com odor/sabor de peixe tinham > 1 mg de TMA/kg de leite, quando comparadas com as amostras de leite normal nas quais a TMA não foi detectada (Figura 12.2). Parece haver uma relação dependente de dose entre os teores de TMA e o surgimento do sabor de peixe.

O odor de peixe ou a trimetilaminúria é um erro inato do metabolismo com herança autossômica recessiva que afeta humanos. Nessa condição, há uma secreção anormal de TMA no ar expirado, na urina, no suor, na saliva e nas secreções vaginais. Esse fenômeno parece ter origem na oxidação deficiente da TMA, que resulta de mutações com perda de função no gene *FMO3* que codifica uma isoforma da FMO (mono-oxigenase que contém flavina) (Dolphin *et al.*, 1997; Treacy *et al.*, 1998; Ackerman *et al.*, 1999; Basarab *et al.*, 1999; Forrest *et al.*, 2001). Lunden *et al.* (2002b) mostraram que a presença desse fenômeno no leite de vaca resulta de uma mutação *nonsense* (R238X) no gene ortólogo *FMO3* bovino. A substituição R238X não foi encontrada nas vacas suecas das raças *Holstein*, *Polled* ou *Jersey*, mas é surpreendentemente comum nas da raça *Red and White*.

E. Defeitos de sabor induzidos pela luz

Aurand *et al.* (1966) mostraram que a riboflavina é o principal fator responsável pelo surgimento, no leite, do sabor oxidado induzido pela luz e que o ácido ascórbico desempenha um papel secundário. No leite, a riboflavina atua como um fotossensibilizador ao acelerar a oxidação de aminoácidos, DNAs e ácidos graxos insaturados (Choe *et al.*, 2005). O uso de luzes fluorescentes nos expositores comerciais de produtos lácteos é responsável pela deterioração do sabor e pela perda da qualidade nutritiva do leite (Bradley, 1980; Dimick, 1982; Hoskin e Dimick, 1979; Sattar e deMan, 1975). A Figura 12.3 mostra os efeitos da luz fluorescente “branca”, que tem uma emissão espectral entre 350 e 750 nm, e picos em 470 e 600 nm, e é amplamente utilizada em supermercados. A energia radiante emitida pela luz fluorescente é absorvida pelos componentes do leite, como a riboflavina, e interage com eles (Dunk *et al.*, 1962). Quando exposta à luz, a riboflavina forma oxigênio singleto e ânions superóxido, a partir do oxigênio tripleto (Jernigan, 1985; Bradley e Min, 1992; Naseem *et al.*, 1993).

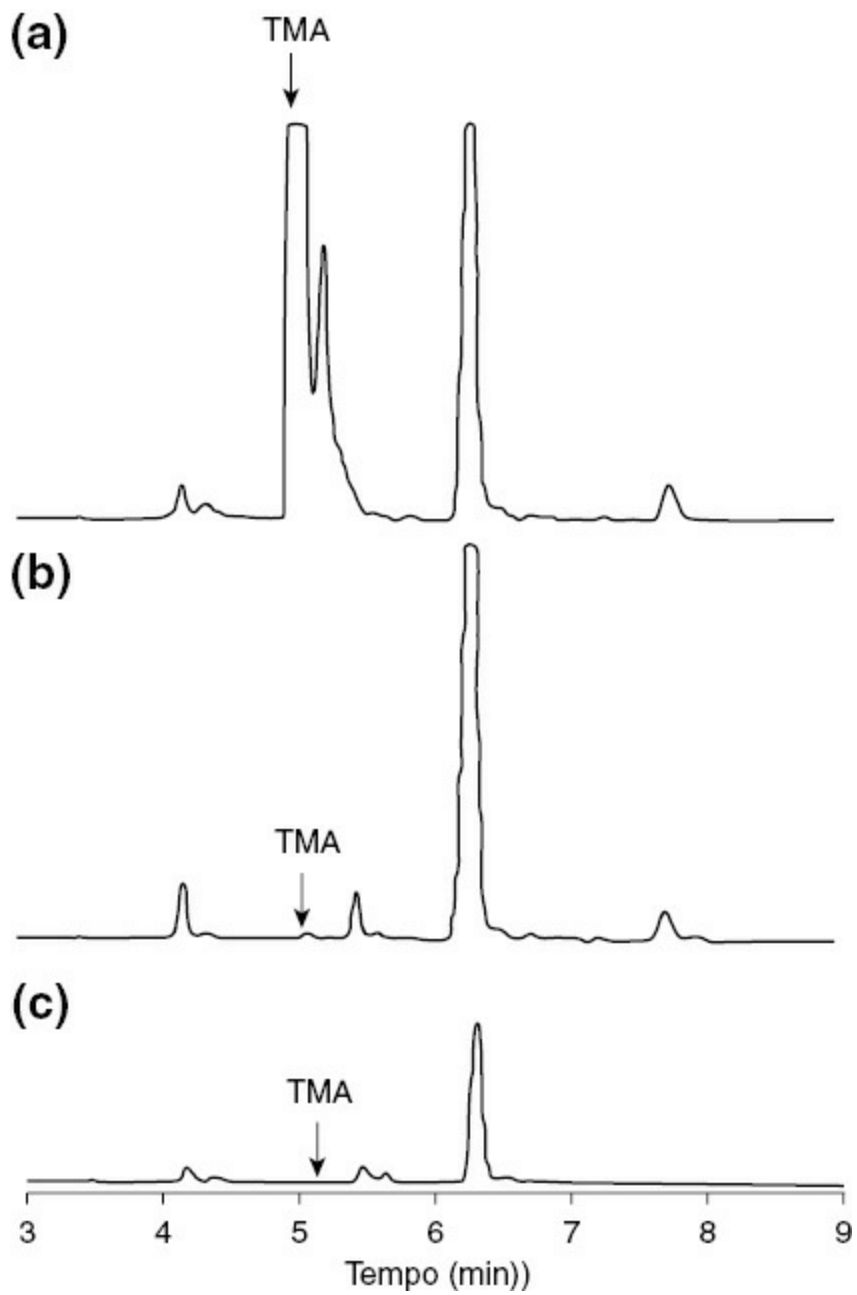


FIGURA 12.2 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama: (a) amostra de leite com forte sabor de peixe; (b) leite sueco normal; e (c) leite UHT suíço de referência. As amostras foram tratadas com o uso de um sistema de purga e armadilha (*purge-and-trap*) (análise do *headspace* dinâmico) e de cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama. TMA: trimetilamina. Lunden *et al.* (2002a).

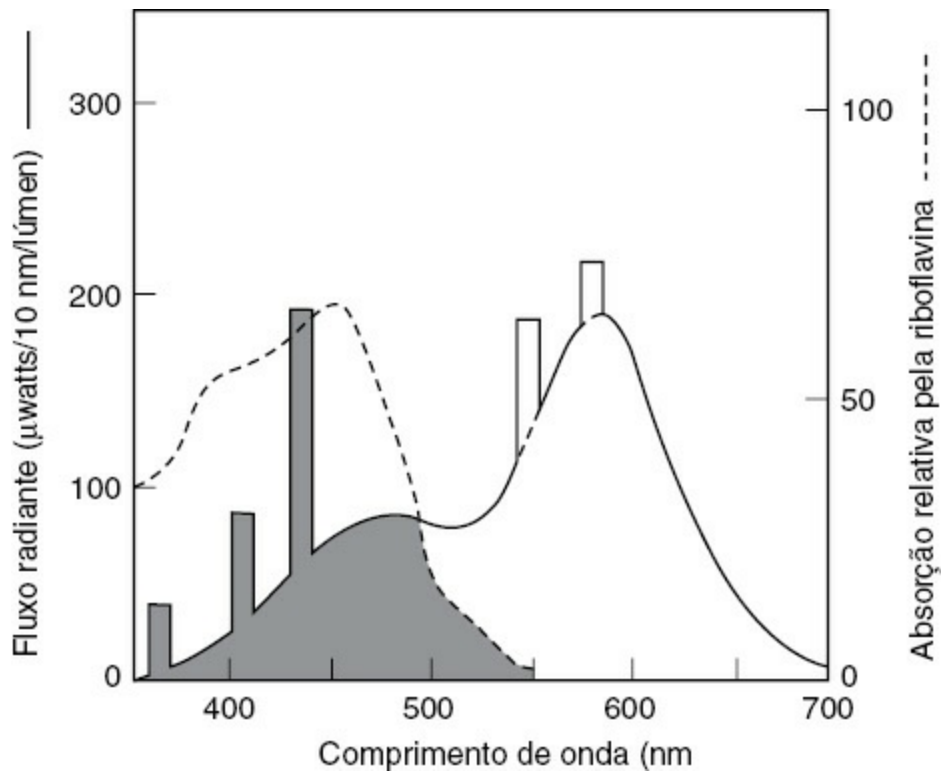


FIGURA 12.3 Espectros de emissão de uma lâmpada fluorescente branca, fria, comparados com a absorção da riboflavina. Dunkley *et al.* (1962).

A ativação da riboflavina foi extensamente estudada e envolve vários mecanismos, denominados tipo I e tipo II (de la Rochette *et al.*, 2003). A excitação da molécula de riboflavina pela luz leva à formação do estado ativo tripleto da riboflavina, um dirradical (Choe *et al.*, 2005). O mecanismo de tipo I envolve a formação de radicais livres, por meio da transferência de hidrogênios ou elétrons entre o estado ativado tripleto da riboflavina ($^1\text{RF}^*$) e os substratos (Edwards e Silva, 2001). O tipo II envolve a formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2^*$), por meio da transferência de energia do $^1\text{RF}^*$ para o oxigênio molecular (Boff e Min, 2002). A Figura 12.4 mostra um esquema com os dois mecanismos (Choe *et al.*, 2005).

Os radicais da riboflavina são espécies oxidantes muito fortes, de modo que o surgimento no leite de defeitos de sabor induzidos pela luz (DSIL) depende da disponibilidade de oxigênio e luz ultravioleta. Os DSILs resultam da fotossensibilização de lipídeos e de grupos sulfurados de aminoácidos e dependem do comprimento de onda e da intensidade da luz, do tempo de exposição, da temperatura do produto e das propriedades da embalagem relativas à transmissão da luz. Os dois defeitos de sabor mais importantes e característicos do leite induzidos pela irradiação da energia luminosa são o sabor decorrente de luz solar e o sabor de papelão. O sabor decorrente de luz solar corresponde a um odor de queimado e oxidado que o leite adquire depois de ser exposto à luz por mais de dois dias. A metionina foi a primeira substância implicada por Patton e Josephson (1953) no surgimento do DSIL; sua oxidação leva à formação do dimetil dissulfeto (DMDS) e do metional. O mecanismo envolvido na formação do DSIL é um tanto controverso. Jung *et al.* (1998) relataram que o oxigênio singleto formado no leite a partir do oxigênio tripleto, na presença da riboflavina e sob a luz do sol reage com o metional, originando um hidroperóxido. A Figura 12.5 mostra que o hidroperóxido se decompõe, formando metional e radicais tiometila, e estes últimos produzem o dimetil sulfeto (DMS) (Choe *et al.*, 2005). Segundo Jung *et al.* (1998), a formação do DMDS possui alta correlação com os níveis sensoriais dos DSILs. Como o ácido ascórbico é um bom eliminador de oxigênios singletos, sua presença reduz a formação do DMDS. O sabor semelhante a papelão e o sabor metálico, que surgem depois da exposição prolongada do leite à luz, são causados por produtos secundários da oxidação lipídica, que incluem aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos (Gaafar e Gaber, 1992). A técnica do *headspace* dinâmico já foi utilizada para avaliar os compostos voláteis hexanal, pentanal, DMDS, 2-butanona e 2-propanol (Kim e Morr, 1996).

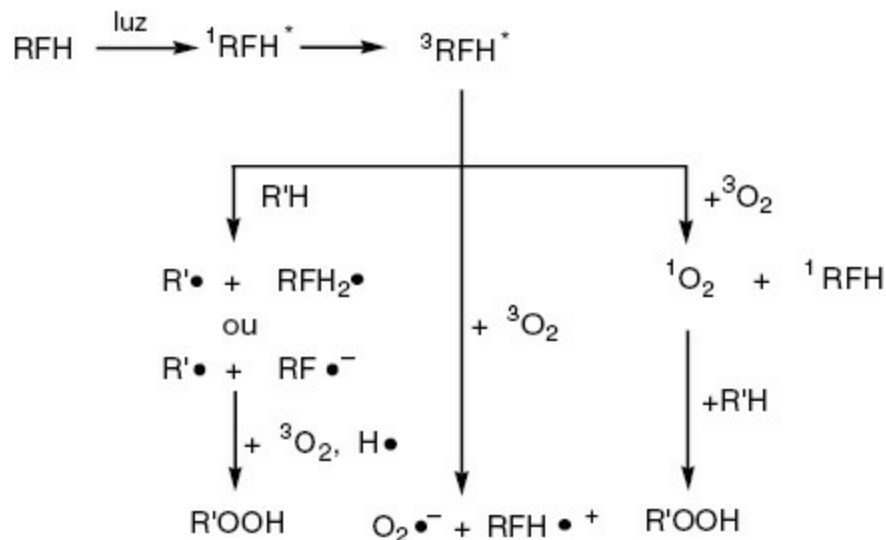


FIGURA 12.4 Fotossensibilização da riboflavina e os mecanismos de tipo I e tipo II. Choe *et al.* (2005).

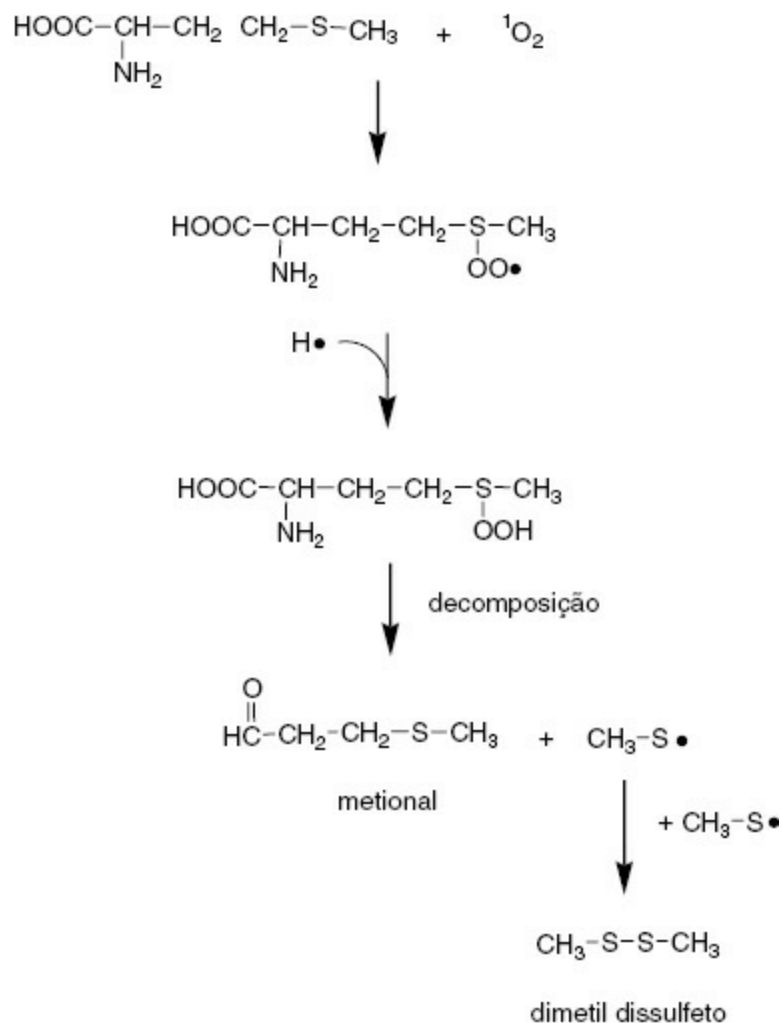


FIGURA 12.5 Oxidação da metionina pelo oxigênio singlete. Choe *et al.* (2005).

A embalagem pode impedir de maneira direta o surgimento de DSILs, ao proteger o produto tanto da luz quanto do oxigênio. Todas as embalagens plásticas, como as de tereftalato de polietileno (PET) e de polietileno de alta densidade (HDPE), podem ser bastante convenientes, ao permitir a abertura e o fechamento fáceis, minimizando assim a recontaminação. As garrafas de PET pigmentado têm propriedades mecânicas excelentes e oferecem uma boa proteção contra o oxigênio e a luz. As garrafas de HDPE pigmentado, de monocamada ou multicamadas, com uma espessura maior que a das atuais garrafas de PET, são as mais adequadas para o mercado de embalagens para leite fresco (Cladman *et al.*, 1998). Moyssiadi *et al.* (2004) estudaram as características químicas

e sensoriais do leite pasteurizado com baixo teor de gordura, envasado em garrafas de materiais diferentes. Garrafas de HDPE pigmentado com TiO_2 e em multicamadas, de HDPE em monocamada, de PET transparente e de PET pigmentado foram comparadas com embalagens de papelão durante sete dias. Quanto aos parâmetros microbiológicos e químicos analisados, os resultados mostraram que todos os materiais para embalagem forneceram uma boa proteção para o sabor do leite durante o período do teste. A garrafa de HDPE em multicamadas forneceu a melhor proteção total para o produto, seguida da garrafa de HDPE em monocamada. A degradação de compostos voláteis por reações químicas poderia explicar os resultados encontrados, como a oxidação causada pela difusão do oxigênio e pela transmissão da luz para o interior da embalagem. Em um trabalho não publicado dos autores, amostras de 2% de leite pasteurizado foram acondicionadas em garrafas de HDPE, de três modos diferentes: garrafas de HDPE translúcidas armazenadas no escuro, garrafas de HDPE translúcidas armazenadas sob uma luz fluorescente e garrafas de HDPE cobertas com pigmento bloqueador de luz e armazenadas sob uma luz fluorescente; o objetivo foi determinar a causa da oxidação. A técnica do *headspace* dinâmico demonstrou, claramente, que o leite envasado em garrafa de HDPE translúcida armazenado sob uma luz fluorescente apresentou concentrações muito mais altas de hexanal, heptanal e octanal que o leite armazenado no escuro ou envasado em garrafas que bloquearam a luz UV (dados não publicados dos autores). O teor de hexanal no leite envasado em garrafa de HDPE translúcida foi cinco vezes mais alto que o teor no leite armazenado no escuro ou envasado em garrafas que bloquearam a luz (Figura 12.6). Essa tendência também foi observada no queijo cremoso. Sua superfície apresentou uma formação muito maior de aldeídos que o centro do queijo cremoso (Figura 12.7), por causa da proteção deficiente oferecida pela embalagem (dados não publicados dos autores). Boccacci Mariani *et al.* (2006) realizaram um estudo similar para avaliar as diferenças sensoriais do leite acondicionado em materiais distintos. Não foi encontrado nenhum defeito de sabor no leite acondicionado em papelão durante o período de armazenamento estudado; no entanto, foi detectado um defeito de sabor no leite envasado em garrafa de PET (resultante das alterações oxidativas induzidas pela luz) depois de 1-2 dias de armazenamento (conforme avaliado por uma equipe treinada) e depois de 2-3 dias de armazenamento (conforme avaliado pelos consumidores). Além de oferecer proteção contra micro-organismos e contra a luz, o material da embalagem pode ser capaz de absorver um aroma ou um defeito de aroma da matriz alimentar; dependendo do produto, essa propriedade de remoção de um aroma pode ajudar a manter a qualidade do produto. A embalagem de polietileno apresenta uma adsorção muito mais forte de lactonas, aldeídos e AGs livres do leite UHT, quando comparada com as garrafas de vidro (Czerny e Schieberle, 2007).

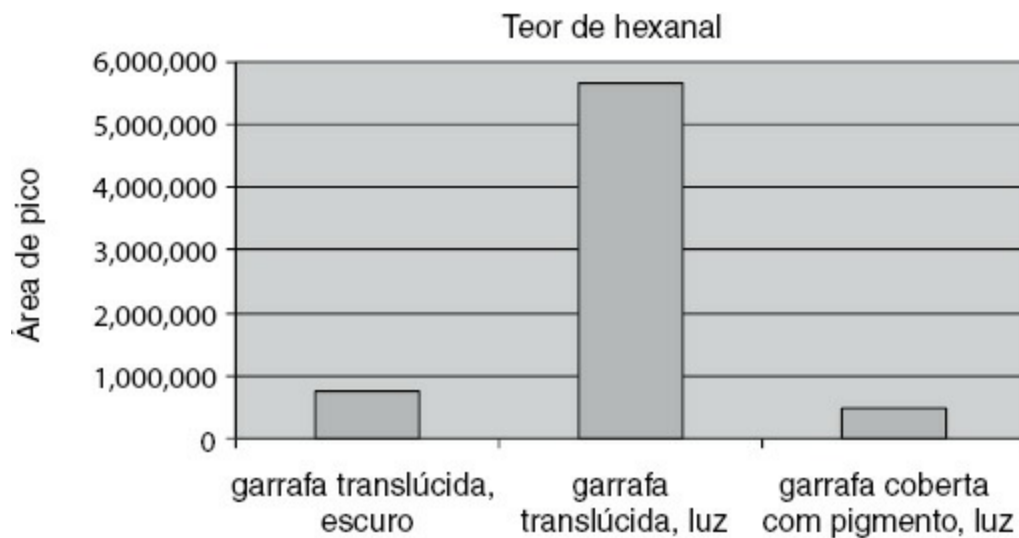


FIGURA 12.6 Teor de hexanal no leite armazenado em garrafas diferentes. Qian *et al.* (dados não publicados).

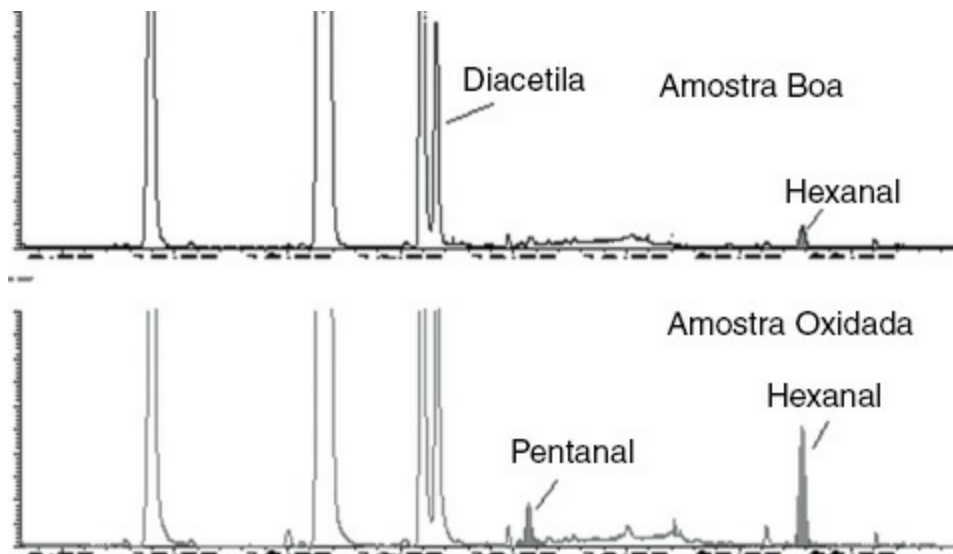


FIGURA 12.7 Registro de cromatografia gasosa que mostra a oxidação do queijo cremoso. Qian *et al.* (dados não publicados).

No entanto, muitos consumidores preferem uma embalagem que permite a visão do alimento que estão comprando (Sattar *et al.*, 1976; Rosenthal, 1992; Cladman *et al.*, 1998; Doyle, 2004). Por essa razão, o leite ainda é envasado em garrafas de HDPE ou PET, que transmitem entre 62% e 85% da luz com comprimentos de onda entre 300 e 700 nm. Absorvedores de luz UV, como os filmes iridescentes, podem ser adicionados aos materiais de embalagem à base de polímeros para bloquear os comprimentos de onda UV, sem afetar a transparência do material da embalagem. Webster *et al.* (2009) demonstraram a capacidade de proteção desses filmes contra o surgimento de DSILs em 2% do leite exposto a comprimentos de onda visíveis que excitam a riboflavina (400, 446 e 570 nm). No entanto, as pesquisas deixaram claro que o bloqueio da transmissão de todos os comprimentos de onda que excitam a molécula de riboflavina não foi suficiente para proteger totalmente contra o surgimento de DSILs. Esse resultado sugeriu o envolvimento de outros componentes do leite, como as clorinas e as porfirinas, identificadas previamente por Wold *et al.* (2005) na foto-oxidação do queijo.

F. Defeitos de sabor induzidos pelo aquecimento

O tratamento térmico pode destruir as bactérias da decomposição e inativar enzimas, aumentando assim a vida de prateleira do leite. Os tratamentos térmicos mais populares, a pasteurização e o UHT, levam ao aparecimento de novos compostos voláteis que produzem sabores desejáveis e indesejáveis e afetam o gosto e a textura do leite. Os principais compostos voláteis que contribuem para o surgimento do sabor “aquecido” são produtos da reação de Maillard. A degradação térmica dos lipídeos gera um sabor de “envelhecido” ou “oxidado” durante o armazenamento. As reações térmicas que envolvem as cadeias laterais dos aminoácidos geram compostos sulfurados que são responsáveis pelo sabor indesejado do leite UHT. Outras reações induzidas pelo calor, como a hidrólise de ligações peptídicas, a desfosforilação de proteínas e a interação entre a oxidação lipídica e a reação de Maillard, também podem, até certo ponto, afetar o sabor. Os tratamentos térmicos, em particular o UHT, podem estimular o surgimento de compostos com sabor indesejado, como aldeídos, metil cetonas e diversos compostos sulfurados (Scanlan *et al.*, 1968; Jeon *et al.*, 1978; Moio *et al.*, 1994; Contarini *et al.*, 1997; Contarini e Povolo, 2002).

Contarini e Povolo (2002) estudaram o efeito do aquecimento sobre os compostos voláteis de amostras de leite processado para uso comercial. Para isso, utilizaram a técnica da microextração em fase sólida do espaço livre (*headspace*) das amostras associada à CG. Eles identificaram 11 compostos, e 5 deles (2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, benzaldeído e 2-undecanona) exibiram uma correlação com a intensidade do aquecimento. Vazquez-Landaverde *et al.* (2005) quantificaram alguns componentes aromáticos voláteis do leite submetido a diferentes

tipos de aquecimento. As concentrações de cetonas encontradas no leite cru e no leite pasteurizado não foram diferentes; porém, as concentrações de cetonas no leite UHT foram consideravelmente mais altas. Quando analisaram leites com o mesmo teor de gordura, o leite UHT apresentou quase 12 vezes a quantidade de cetonas do leite cru e do leite pasteurizado. Os componentes que mais contribuíram foram a 2-heptanona e a 2-nonanona, seguidas pela 2,3-butanediona, 2-pentanona e 2-undecanona. As concentrações de 2-heptanona e 2-nonanona no leite UHT foram 34 e 52 vezes mais altas, respectivamente, que as das amostras de leite cru e pasteurizado. Os valores da atividade do odor (VAOs – razão entre a concentração e o limiar sensorial) relativos à 2-heptanona e à 2-nonanona foram inferiores a 1 no leite cru e no leite pasteurizado, indicando que elas não contribuem de maneira significativa para a composição do aroma. No entanto, os VAOs no leite UHT ficaram na faixa de 4-10, sugerindo que talvez tais compostos possam ser contribuintes muito importantes para o aroma do leite aquecido. Contarini *et al.* (1997) e Contarini e Povolò (2002) relataram que as concentrações de 2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona aumentaram em uma proporção direta com a intensidade do aquecimento e estavam associadas ao surgimento do sabor de “envelhecido” no leite UHT. Moio *et al.* (1994) identificaram a 2-heptanona e a 2-nonanona como os compostos aromáticos voláteis mais abundantes no leite UHT.

Embora as metil cetonas estejam naturalmente presentes no leite cru, elas podem ser formadas durante o aquecimento, por meio da b-oxidação de ácidos graxos saturados, seguida de descarboxilação (Nawar, 1996). A gordura do leite contém 10% (m/m) de ácidos graxos com 6C, 8C, 10C e 12C, que são os precursores das metil cetonas com número ímpar de carbonos (5C, 7C, 9C e 11C), produzidas durante o tratamento por calor. O teor de gordura parece ter um impacto sobre a concentração de metil cetonas do leite UHT, sendo constatado que a concentração de metil cetonas no leite com 3% de gordura é quase o dobro daquela encontrada no leite com 1% de gordura (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2005). As metil cetonas também podem ser formadas pela descarboxilação direta dos b-cetoácidos presentes no leite cru. A gordura do leite contém cerca de 1% de lipídeos, no qual os ácidos graxos oxo com diferentes comprimentos de cadeia estão esterificados com glicerol. Esses ácidos graxos oxo podem ser liberados como b-cetoácidos e descarboxilados, originando metil cetonas de 6C-16C quando a gordura é aquecida na presença de água (Grosch, 1982; Jensen *et al.*, 1995).

Vazquez-Landaverde *et al.* (2005) constataram que a concentração de 2,3-butanediona no leite UHT era mais alta que no leite cru, enquanto sua concentração variou amplamente no leite pasteurizado. O VAO relativo aos leites UHT e pasteurizado foi superior a 1, sugerindo que a 2,3-butanediona contribui para a composição do aroma do leite aquecido. A 2,3-butanediona foi descrita como um composto muito importante que contribui para o intenso sabor de aquecido do leite UHT, dando um aroma amanteigado, semelhante à pastelaria (Scanlan *et al.*, 1968). Embora tenha sido sugerido que a formação dessa substância seja induzida pelo aquecimento do leite (Scanlan *et al.*, 1968), ela também é atribuída à atividade microbiana existente (Badis *et al.*, 2004); por essa razão, essa substância é um indicador ambíguo do tratamento por calor.

A concentração dos aldeídos também é afetada pelo aquecimento. Os compostos que contribuem para a composição do aroma e os limiares sensoriais estão resumidos na Tabela 12.5. Todos esses compostos voláteis estão associados ao odor de “verde” e ao odor semelhante a grama; o odor dos aldeídos de cadeia mais curta também é considerado penetrante e semelhante a malte; os aldeídos com cadeia mais longa têm uma nota de odor de gordura. De acordo com Vazquez-Landaverde *et al.* (2005), o leite UHT tem uma concentração mais alta de aldeídos totais que os leites cru e pasteurizado. As concentrações de hexanal, octanal e nonanal são mais altas no leite UHT com 3% de gordura, enquanto as concentrações de 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-furaldeído, heptanal e decanal são mais altas tanto no leite com 1% de gordura quanto no UHT leite com 3% de gordura. A concentração total de aldeídos do leite cru não foi diferente daquela do leite pasteurizado.

Composto	Características do aroma	Limiar (ppm)	Meio	Referências
Acetaldeído	Penetrante, de fruta penetrante	0,025	Água	Guth e Grosch (1994)
		0,0002	Óleo	Buttery <i>et al.</i> (1995)
Propanal	Penetrante, acre, solvente	0,037	Água	Boelens e Van Gemert (1987)
		0,009	Óleo	Reiners e Grosch (1998)
2-Metilpropanal	De malte, cacau, verde, penetrante	0,002	Água	Amoore <i>et al.</i> (1976)
2-Metilbutanal	Cacau, café, amêndoa, de malte	0,002–0,14	Óleo	Guadagni <i>et al.</i> (1972); Reiners e Grosch (1998)
3-Metilbutanal	De malte, cacau	0,013	Óleo	Guadagni <i>et al.</i> (1972); Kubicková e Grosch (1998)
Butanal	Penetrante, de malte, verde	0,018	Água	Boelens e Van Gemert (1987)
Pentanal	De malte, maçã, verde	0,012–0,07	Água	Siek <i>et al.</i> (1971); Buttery <i>et al.</i> (1988)
Hexanal	De grama, verde, sebo	0,009–0,05	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978); Larsen e Poll (1992)
		0,19–0,3	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971); Guth e Grosch (1990)
(E)-2-Hexenal	Verde, doce, de folha, maçã	0,017–0,05	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978); Buttery <i>et al.</i> (1988); Larsen e Poll (1992)
		0,42	Óleo	Reiners e Grosch (1998)
Heptanal	De gordura, verde, de madeira, de fruta	0,031–0,25	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971); Guadagni <i>et al.</i> (1972)
Octanal	De gordura, cítrico	0,001	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978); Buttery <i>et al.</i> (1988)
		0,056	Óleo	Reiners e Grosch (1998)
Nonanal	Cítrico, verde, de gordura, floral	0,002	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978)
		1	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1969)
Decanal	De cera, floral, cítrico	0,002	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978); Boelens e Van Gemert (1987)
Dodecanal	Cítrico, forte	0,0005–0,002	Água	Ahmed <i>et al.</i> (1978); Boelens e Van Gemert (1987)
Furfural	Doce, amêndoa, penetrante	3	Água	Guadagni <i>et al.</i> (1972)
Fenil acetaldeído	Floral, jacinto, verde	0,002	Água	Whetstine <i>et al.</i> (2005)

Com base nos VAOs, o nonanal e o decanal parecem ser compostos importantes que contribuem para o aroma dos leites cru, pasteurizado e UHT, enquanto o octanal, o hexanal, o 2-metilbutanal, o 3-metilbutanal e o 2-metilpropanal são importantes somente para o aroma do leite UHT. Contarini e Povolo (2002) constataram que o 3-metilbutanal aumentou com a intensidade do aquecimento, enquanto o hexanal e o heptanal não. A presença de 2-metilpropanal, 2-metilbutanal e 3-metilbutanal no leite aquecido se deve à degradação de Strecker dos aminoácidos, durante as reações de Maillard (Damodaran, 1996). Os aldeídos hexanal, heptanal, octanal, nonanal e decanal resultam da auto-oxidação dos ácidos graxos insaturados (C18:1 e C18:2) e também da decomposição espontânea dos hidroperóxidos estimulada pelo aquecimento (Grosch, 1982). O hexanal também pode ser transferido para o leite pela alimentação da vaca (Scanlan *et al.*, 1968) ou se originar da oxidação dos lipídeos induzida pela luz (Marsili, 1999). Rerkrai *et al.* (1987) afirmaram que o aumento da concentração dos aldeídos saturados com 2C e 7C-9C é a principal causa do sabor de “envelhecido” do leite UHT, em razão de seus limiares baixos. O 2-furaldeído foi encontrado no leite UHT (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2005), mas o VAO era baixo demais para que fosse considerado um contribuinte importante para o aroma do leite. No entanto, ele é considerado um bom indicador do tratamento pelo calor, porque é o precursor das melanoidinas das reações de Maillard entre os açúcares e o grupo amino livre das proteínas e dos aminoácidos do leite (BeMiller e Whistler, 1996).

Vazquez-Landaverde *et al.* (2005) constataram que a concentração do acetato de etila aumenta até 10 vezes no leite UHT, quando comparado com o leite cru. Foi apurado ainda que o acetato de etila é formado pela esterificação do etanol e do ácido acético, por meio da reação de Fisher, catalisada pelo calor (Hart, 1991). No entanto, seu VAO muito baixo nas amostras analisadas sugere que esse composto não contribui muito para a composição do aroma do leite.

O processamento térmico pode gerar no leite um defeito de sabor “cozido”, sulfuroso, semelhante a repolho

(Shipe, 1980). Pesquisadores descobriram que o sulfeto de hidrogênio (H_2S), o metanetiol (MeSH), o dissulfeto de carbono (CS_2), o sulfeto de dimetila (DMS), o dissulfeto de dimetila (DMDS) e o trissulfeto de dimetila (DMTS) estão relacionados com o defeito de sabor “cozido” (Shipe, 1980; Christensen e Reineccius, 1992; Simon e Hansen, 2001; Datta *et al.*, 2002). Vários outros compostos sulfurados, entre eles o benzotiazol, o dimetil sulfóxido (DMSO), a dimetil sulfona (Me_2SO_2), o sulfeto de carbonila (COS), o dióxido de enxofre, o butanetiol e o tiofeno, foram encontrados no leite aquecido, mas seus papéis na composição do sabor do leite ainda não foram bem esclarecidos (Scanlan *et al.*, 1968; Shibamoto *et al.*, 1980; Shipe, 1980; Moio *et al.*, 1994).

A concentração dos compostos sulfurados está relacionada com a intensidade do tratamento do leite pelo calor. Vazquez-Landaverde *et al.* (2006a) constataram que o leite UHT contém concentrações significativamente mais altas de H_2S , MeSH, CS_2 , DMTS e DMSO que os leites cru e pasteurizado. O H_2S foi o composto sulfurado que apresentou o maior aumento na concentração, de até sete vezes. O MeSH aumentou cerca de cinco vezes, e a concentração do DMSO aumentou quase três vezes mais no leite UHT que no leite cru (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2005).

Os compostos sulfurados têm um limiar sensorial muito baixo. Os VAOs calculados sugerem que muitos dos compostos sulfurados contribuem de modo significativo para a composição do sabor tanto do leite aquecido quanto do leite cru. Os VAOs relativos ao MeSH e ao DMTS de amostras de leite UHT foram muito maiores que 1, indicando que eles contribuem para o aroma. Tendo em vista a magnitude de seu VAO, talvez o MeSH seja o composto sulfurado que mais contribui para a composição do aroma do leite UHT; sua concentração nesse tipo de leite é 80-119 vezes mais alta que seu limiar registrado. O MeSH tem um aroma forte e desagradável de repolho, semelhante a enxofre (Rychlik *et al.*, 1998). Foi encontrada uma correlação entre o aumento da concentração desse composto e o aumento do defeito de sabor “cozido”, resultante do tratamento do leite pelo calor (Badings *et al.*, 1981; Christensen e Reineccius, 1992; Simon e Hansen, 2001). Acredita-se que o MeSH seja liberado durante o aquecimento, por meio da degradação da cadeia lateral sulfurada da metionina (Damodaran, 1996), porém a verdadeira via ainda não foi esclarecida. Apesar da importância do MeSH para a composição do sabor do leite e dos produtos lácteos, seu estudo é limitado, em razão de sua alta reatividade e volatilidade. Somente alguns pesquisadores relataram técnicas de quantificação confiáveis para o composto (Burbank e Qian, 2005; Fang e Qian, 2005).

A concentração de H_2S no leite aumenta linearmente com a intensidade do calor (Hutton e Patton, 1952; Christensen e Reineccius, 1992). Além disso, o log da concentração do H_2S tem uma forte relação linear com a intensidade do sabor “aquecido” do leite (Badings, 1978). Esse composto também é responsável, de modo indireto, pela formação de outros compostos sulfurados (Zheng e Ho, 1994). O H_2S é produzido principalmente a partir de grupos sulfidríla ativados pela temperatura de aminoácidos sulfurados (cisteína) da b-lactoglobulina (Badings *et al.*, 1981; Damodaran, 1996); esses grupos são oxidados, formando H_2S . Sugeriu-se que talvez o H_2S seja o composto com a contribuição mais importante para o sabor “cozido” do leite, por ser o principal composto sulfurado formado nos leites aquecidos (Badings *et al.*, 1978; Jaddou *et al.*, 1978; Badings *et al.*, 1981; Rerkrai *et al.*, 1987; Christensen e Reineccius, 1992) e ter um aroma característico semelhante a enxofre (Rychlik *et al.*, 1998). No entanto, Vazquez-Landaverde *et al.* (2006a) mostraram que a concentração de H_2S no leite UHT é apenas um pouco mais alta que seu limiar registrado, e os VAOs calculados indicam que talvez o H_2S seja menos importante para a composição do aroma do leite aquecido do que se acreditava.

Embora o DMS esteja presente naturalmente no leite cru (Toso *et al.*, 2002), ele também pode ser formado a partir do grupo sulfidríla das proteínas do leite submetido à desnaturação térmica (Datta *et al.*, 2002). É provável que a formação do DMDS resulte da oxidação do MeSH (Ferreti, 1973; Chin e Lindsay, 1994). Jaddou *et al.* (1978) relataram que a concentração do DMDS aumentou no leite UHT, mas diminuiu nas amostras esterilizadas. O DMDS tem aroma de enxofre, semelhante a repolho (Rychlik *et al.*, 1998) e limiares baixos. A concentração do

DMTS é baixa no leite, mas seu limiar sensorial também é muito baixo, o que indica que esse composto talvez contribua para a composição do aroma sulfuroso do leite aquecido, conquanto seja provável que não tenha a importância do MeSH.

Embora sua origem não seja bem conhecida, o dissulfeto de carbono (CS_2) foi identificado como um produto da degradação de outros compostos sulfurados (Urbach, 1993). Visto que há uma correlação entre o CS_2 e os tratamentos pelo calor (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2006a), esse composto poderia ser um bom indicador do tratamento pelo calor. Ele tem um aroma doce, etéreo, levemente verde e semelhante ao enxofre (Rychlik *et al.*, 1998). Por causa de seu limiar sensorial alto, é provável que não contribua para a composição do sabor do leite.

Propôs-se que a dimetil sulfona ($DMSO_2$) seja produzida no leite pela oxidação induzida pelo calor do DMS e que, nessa reação, o DMSO atue como intermediário (Shibamoto *et al.*, 1980). Em condições oxidativas, a metionina é facilmente oxidada por sulfóxido de metionina e sulfona de metionina, as quais sofrem degradação produzindo DMSO e $DMSO_2$, respectivamente (Damodaran, 1996). Shibamoto *et al.* (1980) constataram que a concentração de $DMSO_2$ diminui quando o leite é submetido a tratamentos entre 60°C e 90°C, e que começa a aumentar de maneira considerável para temperaturas acima de 90°C. Moio *et al.* (1994) constataram que a concentração de $DMSO_2$ é menor no leite UHT que nas amostras de leite cru e pasteurizado. O $DMSO_2$ tem um aroma definido como semelhante a leite quente, a couro e a suor bovino (Rychlik *et al.*, 1998).

Pesquisadores observaram uma tendência geral: a concentração de H_2S , MeSH e DMTS no leite aquecido aumenta com o teor de gordura do leite (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2006a), sugerindo que a formação (induzida pelo calor) de compostos sulfurados no leite é afetada por tal teor, mas o mecanismo ainda não é claro. De Koning *et al.* (1990) propuseram que as proteínas da membrana dos glóbulos de gordura do leite contribuem para a formação dos sulfetos.

As lactonas podem ser importantes contribuintes para o sabor do leite aquecido. São ésteres cíclicos que têm aromas pronunciados de frutas, como pêssegos, damascos e cocos (Tabela 12.6). Da g-hexalactona à g-dodecalactona, ou da d-hexalactona à d-dodecalactona, os limiares sensoriais dessas substâncias na água geralmente diminuem com o aumento do comprimento da cadeia. As lactonas podem ser formadas na glândula mamária dos ruminantes, a partir da hidrólise de ácidos graxos saturados e da subsequente ciclização dos hidroxiácidos livres (Dumont e Adda, 1978). Por essa razão, estão presentes em quantidades muito pequenas no leite fresco não aquecido. As lactonas também podem ser formadas durante o tratamento do leite por calor, por degradação térmica dos g- e d-hidroxiácidos mediante esterificação intramolecular, na qual a perda de água resulta na formação do anel (Fox *et al.* 2000). Trabalho recente realizado pelos autores deste capítulo demonstrou que a concentração de lactonas é muito mais alta no leite UHT do que no leite pasteurizado, contendo igual teor de gordura (Figura 12.8).

G. Processamento não térmico e formação de sabores indesejados

Há necessidade de uma nova tecnologia de processamento para aumentar a vida de prateleira do leite sem comprometer seu sabor natural. O processamento térmico é o método habitual para obter a segurança microbiana e a estabilidade da vida de prateleira do leite. Embora a pasteurização do leite por HTST (normalmente a 72°C durante 15 segundos) seja aceitável para a maioria dos consumidores, o processo confere um leve sabor “cozido”, com notas de enxofre, e a vida de prateleira do produto final é de apenas 20 dias nas temperaturas de refrigeração. O processamento por UHT (135°C-150°C durante 3-5 segundos) gera um produto que é estável em temperatura ambiente por até 6 meses; no entanto, esse processo pode levar ao surgimento de um forte aroma indesejado de “cozido” no leite (Shipe, 1980), o que limita sua comercialização nos Estados Unidos e em muitos outros países (Steely, 1994).

TABELA 12.6 Características do aroma e limiares sensoriais de algumas lactonas importantes

Composto	Características do aroma	Limiar (ppm)	Meio	Referências
γ -Hexalactona	Coco, de fruta, doce	1,6–13	Água	Siek <i>et al.</i> (1971); Engel <i>et al.</i> (1988)
		8	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971)
γ -Heptalactona	Coco, de fruta, de noz	0,52	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
		3,4	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971)
δ -Octalactona	Coco, animal	0,4–0,57	Água	Siek <i>et al.</i> (1971); Engel <i>et al.</i> (1988)
		0,1–3	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972)
γ -Octalactona	Coco, de fruta	0,095	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
		3,5	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971)
γ -Nonalactona	Coco, pêssego	0,065	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
		2,4	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971)
δ -Decalactona	Coco, damasco	0,1–0,16	Água	Siek <i>et al.</i> (1971); Urbach <i>et al.</i> (1972); Engel <i>et al.</i> (1988)
		0,4–1,4	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971); Preininger <i>et al.</i> (1994)
γ -Decalactona	Coco, damasco, de gordura	0,005–0,09	Água	Siek <i>et al.</i> (1971); Engel <i>et al.</i> (1988); Larsen <i>et al.</i> (1992)
		1	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971)
δ -Dodecalactona	De fruta fresca, pêssego	0,1–1	Água	Siek <i>et al.</i> (1971)
		0,12–10	Óleo	Siek <i>et al.</i> (1971); Schieberle <i>et al.</i> (1993)
γ -Dodecalactona	Pêssego, manteiga, doce, floral	0,007	Água	Engel <i>et al.</i> (1988)
		1	Óleo	Urbach <i>et al.</i> (1972)

Métodos não térmicos promissores, que incluem a filtração por membrana, o processamento por alta pressão (HPP) e o tratamento com campo elétrico pulsado, são utilizados para obter uma vida de prateleira microbiana similar à do leite UHT, minimizando a geração de compostos de sabor indesejado. Para conservar o sabor “fresco” do leite, o HPP é estudado como uma alternativa para a pasteurização do leite. Obteve-se uma redução microbiológica semelhante àquela do leite pasteurizado com o uso de tratamentos com pressão de 400 MPa por 15 minutos ou de 500 MPa por 3 minutos em temperatura ambiente (Rademacher e Kessler, 1996). Em uma temperatura moderada (55°C), o HPP (586 MPa por 5 minutos) pode prolongar de modo significativo a vida de prateleira do leite para 45 dias, bem mais que a vida de prateleira do leite pasteurizado (Tovar-Hernandez *et al.*, 2005). Embora, de modo geral, acredite-se que o HPP em baixa temperatura não modifique o aroma nem o sabor do produto (Cheftel, 1995; Berlin *et al.*, 1999; Velazquez *et al.*, 2002), há relatos de que, sob certas condições, o HPP altera a concentração de alguns componentes importantes do sabor. Hofmann *et al.* (2005) relataram que o HPP pode influenciar a formação de compostos derivados da reação de Maillard em uma solução modelo de açúcar e aminoácido.

Em outro estudo usando leite, Vazquez-Landaverde *et al.* (2006b) constataram que a pressão, a temperatura e o tempo, bem como suas interações, têm efeitos significativos ($p < 0,001$) sobre a geração de sabores indesejados no leite. Os maiores efeitos da pressão e do tempo foram observados a 60°C, enquanto os efeitos da pressão e do tempo foram quase insignificantes a 25°C. Observou-se que a geração de sabores indesejados nas amostras aquecidas a 60°C, mas com pressão, foi diferente naquelas amostras que foram apenas aquecidas. O tratamento pelo aquecimento a 60°C tendeu a promover principalmente a formação de metanetiol, H₂S e metil cetonas, enquanto o tratamento com pressão alta na mesma temperatura formou, de maneira predominante, H₂S e aldeídos, como o hexanal e o octanal. Os resultados demonstraram que a geração de sabores indesejados, com alta pressão e temperatura moderada, diferiu daquela sob o efeito da pressão atmosférica.

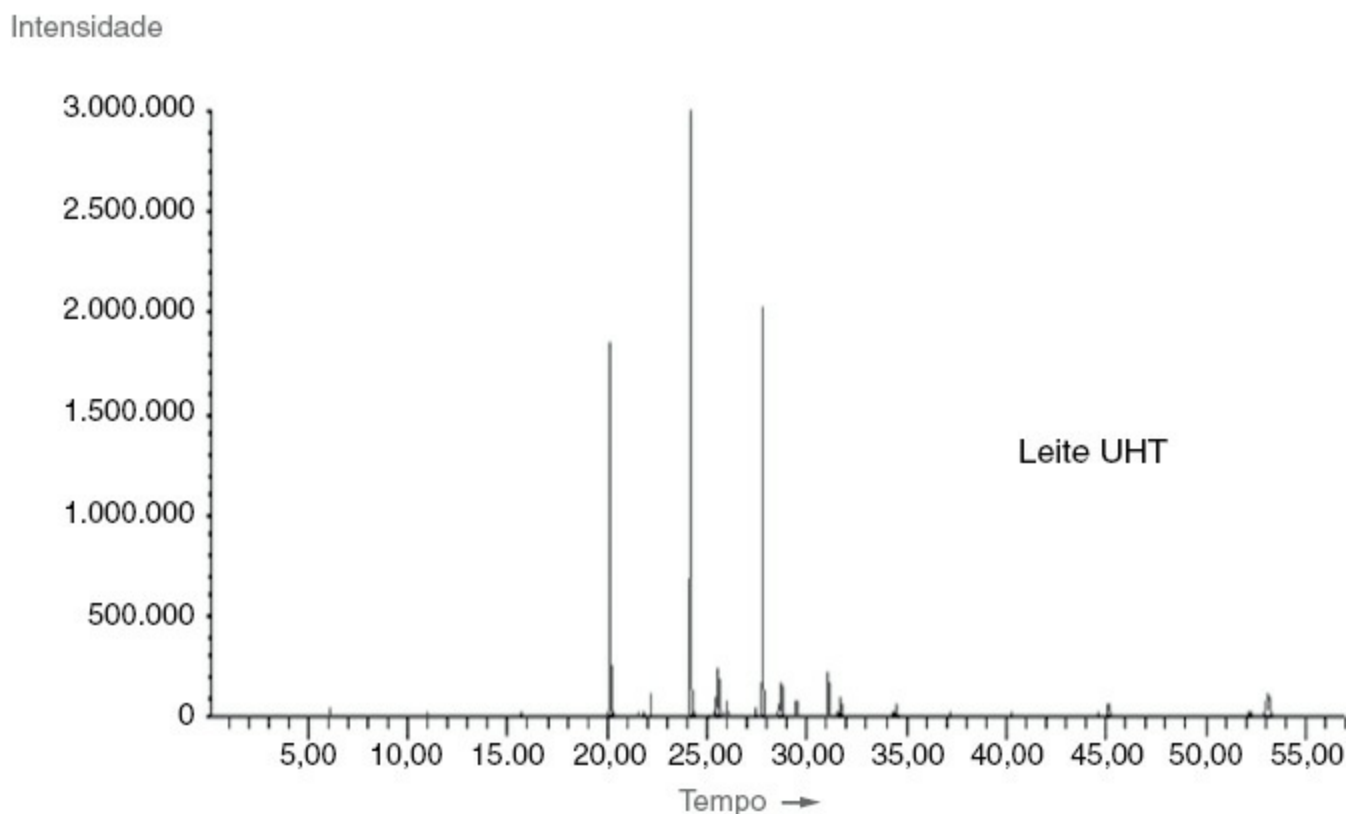
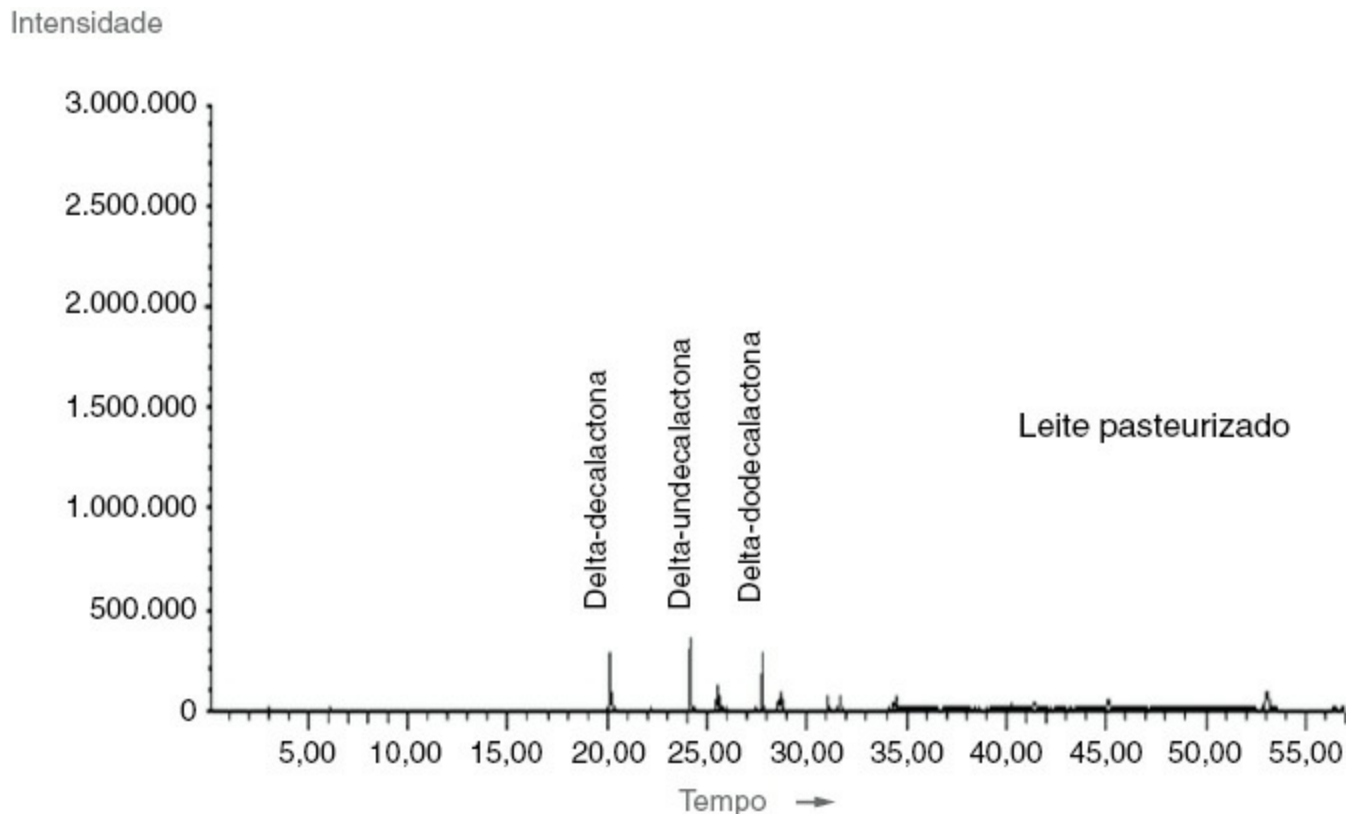


FIGURA 12.8 Cromatografia gasosa- espectrometria de massas (monitoramento de íons selecionados, 99 m/z) de amostras de leite UHT e leite pasteurizado, por meio de extração sortiva em barra de agitação. Qian *et al.* (dados não publicados).

Embora os verdadeiros mecanismos de formação de compostos de sabor com tratamento com alta pressão não sejam conhecidos, a pressão elevada torna o oxigênio mais solúvel, o que aumenta potencialmente a formação de hidroperóxidos, levando à produção de mais aldeídos. De acordo com o princípio de Le Chatelier (Galazka e Ledward, 1996), se a formação de hidroperóxidos a partir de oxigênio e ácidos graxos envolver reações em equilíbrio com redução de volume, a pressão alta favorecerá essa reação e, assim, haverá a formação de mais aldeídos. Outra possibilidade bastante provável é que a pressão hidrostática afete a velocidade de formação de

acordo com o volume da reação de ativação (ΔV^*), definido como a diferença entre o volume molar parcial do estado de transição, ou ativado, e aquele do reagente sob mesma temperatura e pressão (McNaught e Wilkinson, 1997). Quando uma pressão é aplicada, $\Delta V^* < 0$ leva a um aumento na velocidade da reação, ao passo que $\Delta V > 0$ tem o efeito oposto. A sensibilidade de uma reação química à pressão aumentará com o valor absoluto de ΔV^* (Mussa e Ramaswamy, 1997). A formação de H_2S parece ser afetada tanto pela pressão quanto pelo tempo de processamento (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2006b). Observou-se um aumento considerável de H_2S nos tratamentos que envolvem pressão alta, inclusive a 25°C. A concentração de MeSH também aumentou a 25°C e pressão alta. No entanto, quando a pressão aumentou para 620 MPa, a concentração de MeSH diminuiu (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2006b). Embora pareça que a formação do metanetiol tenha sido inibida pela pressão, é provável que ele tenha sido convertido em outros compostos. Além disso, é possível que a formação e a conversão do metanetiol sejam dependentes do pH, por causa das mudanças de pH induzidas pela pressão.

Um estudo cinético realizado por Vazquez-Landaverde *et al.* (2007) possibilitou uma compreensão melhor dos mecanismos da formação dos compostos voláteis do leite, submetido a uma pressão hidrostática elevada. A formação do hexanal, heptanal, octanal, nonanal e decanal seguiu a cinética de primeira ordem, com constantes de velocidade que aumentaram com a pressão e a temperatura. As energias de ativação relativas a esses cinco aldeídos de cadeia reta diminuíram com a pressão, o que sugere que a pressão tenha efeito catalítico sobre as reações de formação desses compostos no leite. A formação dos compostos 2-metilpropanal, 2,3-butanediona e H_2S seguiu a cinética de ordem zero, com constantes de velocidade que aumentaram com a temperatura, mas o efeito da pressão não ficou claro. As energias de ativação relativas ao 2-metilpropanal e à 2,3-butanediona aumentaram com a pressão, ao passo que os valores relativos ao H_2S permaneceram constantes no intervalo de pressão estudado. As concentrações dos outros compostos de sabor indesejado estudados, inclusive do poderoso composto metanetiol, permaneceram inalteradas em todas as amostras tratadas com pressão. No caso das metil cetonas 2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona e 2-undecanona, a concentração dessas substâncias não dependeu do tempo nem da pressão. Os resultados corroboraram uma sugestão prévia (Vazquez-Landaverde *et al.*, 2007) de que a pressão hidrostática alta afeta de modo diferente a cinética da formação dos compostos com sabor indesejado do leite: ela inibe alguns, enquanto estimula outros. O tratamento convencional de produtos alimentícios pelo calor produz respostas diferentes, dependendo da energia livre (DG) ou da energia livre de ativação (DG*) das diferentes reações. Mas as reações que normalmente são observadas durante o tratamento pelo calor não serão percebidas durante o HPP, a menos que haja uma via de reação opcional que envolva a aplicação de uma redução mecânica do volume, definida como a principal diferença entre a pressão alta e o processamento térmico (Galazka e Ledward, 1996). Embora seja necessário controlar a temperatura durante os tratamentos com HPP para que o sabor do leite não se altere, Vazquez-Landaverde e Qian (2007) sugeriram que a combinação de pressão alta, calor e antioxidantes poderia ser utilizada para desenvolver um produto comercial muito mais estável nas prateleiras e, ao mesmo tempo, possivelmente reduzir – ou até eliminar por completo – o defeito de sabor “cozido”.

REFERÊNCIAS

- Ackerman, B.R., Forrest, S., Chow, L., Youil, R., Knight, M., Treacy, E.P., 1999. Two novel mutations of the *FM03* gene in a proband with trimethyl-aminuria. *Hum. Mutat.* 13, 376-379.
- Ahmed, E., Dennison, P.A., Dougherty, R.H., Shaw, I.E., 1978. Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *J. Agric. Food Chem.* 26, 187-191.
- Amoore, J.E., Forrester, L.J., Pelosi, P., 1976. Specific anosmia to isobutyraldehyde – malty primary odor. *Chem. Senses Flavour* 2, 17-25.
- Amoore, J., Venstrom, D., Davis, A.R., 1968. Measurement of specific anosmia. *Percept. Mot. Skills* 26, 143-164.
- Anderson, M., 1982. Factors Affecting the distribution of lipoprotein-lipase activity between serum and casein micelles in bovine-milk. *J. Dairy Res.* 49, 51-59.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.
- Aurand, L.W., Singleton, J.A., Noble, B.W., 1966. Photooxidation reactions in milk. *J. Dairy Sci.* 49, 138-143.
- Badings, H.T., 1978. Reduction of cooked flavor in heated milk and milk products. In: Land, D.G., Nursten, H.E. (Eds.), *Progress in Flavor Research*. Applied

- Science Publishers, London, p. 263-265.
- Badings, H.T., Neeter, R., Van der Pol, J.J.G., 1978. Reduction of heated flavor in heated milk and milk products by l-cystine. *Lebensm. Wiss. Technol.* 11, 237-242.
- Badings, H.T., Van der Pol, J.J.G., Neeter, R., 1981. Aroma compounds which contribute to the difference in flavor between pasteurized milk and UHT milk. In: Schreider, P. (Ed.), *Flavor '81*. Walter de Gruyter, Berlin, p. 683-692.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.G., Kihal, M., 2004. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21, 343-349.
- Baldwin, R., Cloninger, M., Lindsay, R.C., 1973. Flavor thresholds for fatty acids in buffered solutions. *J. Food Sci.* 38, 528-530.
- Basarab, T., Ashton, G.H., Menage, H.P., McGrath, J.A., 1999. Sequence variations in the flavin-containing mono-oxygenase 3 gene (*FM03*) in fish odour syndrome. *Br. J. Dermatol.* 140, 164-167.
- BeMiller, J.M., Whistler, R.L., 1996. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York.
- Berlin, D.L., Herson, D.S., Hicks, D.T., Hoover, D.G., 1999. Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2776-2780.
- Boccacci Mariani, M., Chiaccierini, E., Bucarelli, F.M., Quaglia, G.B., Menesatti, C., 2006. Comparative study of milk packaging materials. Note 2. Sensorial quality change in fresh milk during storage. *Ind. Aliment.* 45, 6-10.
- Boelens, M., Van Gemert, L., 1987. Organoleptic properties of aliphatic aldehydes. *Perfum. Flavor.* 12, 31-43.
- Boff, J.M., Min, D.B., 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1, 58-72.
- Bradley, D.G., Min, D.B., 1982. Singlet oxygen detection in skim milk by electron spin resonance spectroscopy. *J. Food Sci.* 68, 491-494.
- Bradley, R.L., 1980. Effect of light on alteration of nutritional value and flavor of milk. A review. *J. Food Prot.* 43, 314-320.
- Brennand, H., 1989. Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milk fat and meat lipids. *J. Sens. Stud.* 4, 105-120.
- Burbank, H.M., Qian, M., 2005. Quantification of volatile sulfur compounds in Cheddar cheeses of various age. IFT Annual Meeting, New Orleans, LA.
- Buttery, R., 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. In: Acree, T.E., Teranishi, R. (Eds.), *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 259-286.
- Buttery, R., Takeoka, G., Ling, C.L., 1995. Furanol: odor threshold and importance to tomato aroma. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1638-1640.
- Buttery, R., Turnbaugh, J., Ling, C.L., 1988. Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.* 36, 1006-1009.
- Champagne, C., Laing, R., Roy, D., Mafu, A.A., Griffiths, M.W., White, C., 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 1-30.
- Chavari, F., Virto, M., Martin, C., Najera, A.I., Santisteban, A., Barron, L.J.R., de Renobales, M., 1997. Determination of free fatty acids in cheese: comparison of two analytical methods. *J. Dairy Res.* 64, 445-452.
- Cheftel, J.C., 1995. High pressure, microbial inactivation and food preservation. *C.R. Acad. Sci. Agric. France* 81, 13-38.
- Chin, H.-W., Lindsay, R.C., 1994. Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. *Food Chem.* 49, 387-392.
- Choe, E., Huang, R., Min, D.B., 2005. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J. Food Sci.* 70, R28-R36.
- Christen, G., Wang, W., Ren, T.-J., 1986. Comparison of the heat resistance of bacterial lipases and proteases and the effect on ultra-high temperature milk quality. *J. Dairy Sci.* 69, 2769-2778.
- Christensen, K.R., Reiniccus, G.A., 1992. Gas chromatographic analysis of volatile sulfur compounds from heated milk using static headspace sampling. *J. Dairy Sci.* 75, 2098-2104.
- Cladman, W., Scheffer, S., Goodrich, N., Griffiths, W., 1998. Shelf-life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. *Int. Dairy J.* 8, 629-636.
- Cogan, T., 1977. A review of heat resistant lipases and proteinases and the quality of dairy products. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 1, 95-105.
- Contarini, G., Povoletto, M., 2002. Volatile fraction of milk: comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7350-7355.
- Contarini, G., Povoletto, M., Leardi, R., Toppino, P.M., 1997. Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3171-3177.
- Cousin, M.A., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy-products – a review. *J. Food Prot.* 45, 172-207.
- Czerny, M., Schieberle, P., 2007. Influence of the polyethylene packaging on the adsorption of odour-active compounds from UHT-milk. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 215-223.
- Damodaran, S., 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, p. 412-413.
- Datta, N., Elliot, A.J., Perkins, M.L., Deeth, H.C., 2002. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. *Aust. J. Dairy Technol.* 57, 211-227.
- De Jong, C.D., Badings, H.T., 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese: procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 94-98.
- de Koning, P.J., Badings, H.T., van der Pol, J.G., Kaper, J., vos-Klampmaker, E.A.J., 1990. Effect of heat treatment and fat content on UHT milk. *Voedingsmiddelentechnologie* 23, 11-14.
- de la Rochette, A., Birlouez-Argon, I., Silva, E., Morliere, P., 2003. Advanced glycation endproducts as UVA photosensitizers of tryptophan and ascorbic acid: consequences for the lens. *Biochim. Biophys. Acta* 1621, 235-241.
- Deeth, H.C., 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *Int. Dairy J.* 16, 555-562.
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., Snow, A.G., 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* 18, 13-20.
- Dimick, P.S., 1982. Photochemical effects on flavor and nutrients of fluid milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15, 247-256.
- Dogan, B., Boor, K., 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 130-138.
- Dolphin, C.T., Janmohamed, A., Smith, R.L., Shepard, E.A., Phillips, J.R., 1997. Missense mutation of flavin-containing monooxygenase 3-gene, *FM03*, underlies fish-odor syndrome. *Nat. Genet.* 17, 491-494.
- Downey, W., Andrews, P., 1966. Studies on the properties of cow's-milk tributyrinases and their interaction with milk proteins. *Biochem. J.* 101, 651-660.
- Doyle, M., 2004. Consumers have a long list of packaging wishes and pet peeves. *Food Drug Pack.* 68, 24-28.
- Drake, M.A., Miracle, R.E., Caudle, A.D., Cadwallader, K.R., 2006. Relating sensory and instrumental analyses. In: Marsaluis, R. (Ed.), *Sensory-Directed Flavor Analysis*. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, p. 23-55.
- Dumont, J.-P., Adda, J., 1978. Flavour formation in dairy products. In: Land, D.G., Nursten, H.E. (Eds.), *Progress in Flavour Research*. Applied Science Publishers, London, p. 245-262.
- Duncan, S.E., Christen, G.L., Penfield, M.P., 1990. Acid degree value – does it really predict rancid flavor in milk?. *Dairy Food Environ. Sanit.* 10, 715-718.
- Duncan, S.E., Christen, G.L., Penfield, M.P., 1991. Rancid flavor of milk – relationship of acid degree value, fatty acids, and sensory perception. *J. Food Sci.* 36,

- Dunkley, W.L., Franklin, J.D., Pangborn, R.M., 1962. Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid and riboflavin of milk. *Food Technol.* 16, 112-118.
- Dunn, H., Lindsay, R., 1985. Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 68, 2859-2874.
- Edwards, A.M., Silva, E., 2001. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 126-131.
- Egelrud, T., Olivecrona, T., 1972. The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk. *J. Biol. Chem.* 247, 6212-6217.
- Egelrud, T., Olivecrona, T., 1973. Purified bovine milk (lipoprotein) lipase: activity against lipid substrates in the absence of exogenous serum factors. *Biochim. Biophys. Acta* 306, 115-127.
- Engel, K.H., Flath, R.A., Buttery, R.G., Man, T.R., Ramming, D.W., Teranishi, R., 1988. Investigation of volatile constituents in nectarines. 1. Analytical and sensory characterization of aroma components in some nectarine cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 36, 549-553.
- Fajardo-Lira, C., Nielsen, S., 1998. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *J. Dairy Sci.* 81, 901-908.
- Fang, Y., Qian, M., 2005. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *J. Chromatogr. A* 1080, 177-185.
- Ferreti, A., 1973. Inhibition of cooked flavor in heated milk by use of additives. *J. Agric. Food Chem.* 21, 939-942.
- Fitz-Gerald, C.H., Deeth, H.C., 1983. Factors influencing lipolysis by skim milk cultures of some psychrotrophic microorganisms. *Aust. J. Dairy Technol.* 38, 97-103.
- Forrest, S.M., Knight, M., Ackerman, B.R., Cashman, J.R., Treacy, E.P., 2001. A novel deletion in the flavin-containing monooxygenase gene (*FM03*) in a Greek patient with trimethylaminuria. *Pharmacogenetics* 11, 169-174.
- Forss, D.A., 1979. Review of the progress of dairy science – mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk-products. *J. Dairy Res.* 46, 691-706.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen, Gaithersburg, MD.
- Franklin, U., 1951. Some factors affecting the flavor of milk and milk products. *J. Med. Assoc. State Alabama* 20, 383-384.
- Gaarar, A., Gaber, F., 1992. Volatile flavour compounds of sunlight-exposed milk. *Egypt. J. Dairy Sci.* 20, 111-115.
- Galazka, V.B., Ledward, D.A., 1996. Effects of high pressure on protein polysaccharide interactions. In: Parris, N., Kato, A., Creamer, L.K., Pearce, J. (Eds.), *Macromolecular Interactions in Food Technology*. American Chemical Society, Washington DC, p. 113-123.
- Garcia, H.S., Reyes, H.R., Malcata, F.X., Hill, C.G., Amundson, C.H., 1990. Determination of the major free fatty acids in milkfat using a three-component mobile phase for HPLC analysis. *Milchwissenschaft* 45, 747-759.
- Gonzalez-Cordova, A., Vallejo-Cordoba, B., 2001. Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4603-4608.
- Gonzalez-Cordova, A., Vallejo-Cordoba, B., 2003. Detection and prediction of hydrolytic rancidity in milk by multiple regression analysis of short-chain free fatty acids determined by solid phase microextraction gas chromatography and quantitative flavor intensity assessment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7127-7131.
- Grosch, W., 1982. Lipid degradation products and flavour. In: Morton, I.D., Macleod, A.J. (Eds.), *Food Flavours. Part A. Introduction*. Elsevier, Oxford, p. 325-385.
- Guadagni, D.G., Buttery, R.G., Turnbaugh, J.G., 1972. Odour thresholds and similarity ratings of some potato chip components. *J. Sci. Food Agric.* 23, 1435-1444.
- Guth, H., Grosch, W., 1990. Deterioration of soya-bean oil: quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.* 23, 513-522.
- Guth, H., Grosch, W., 1994. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2862-2866.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease [review]. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- Hart, H., 1991. *Organic Chemistry: A Short Course*. Houghton Mifflin, Boston, MA.
- Hayes, W., White, C.H., Drake, M.A., 2002. Sensory aroma characteristics of milk spoilage by *Pseudomonas* species. *J. Food Sci.* 67, 861-867.
- Herrington, B., 1954. Lipase: a review. *J. Dairy Sci.* 37, 775-789.
- Hlavica, P., Kehl, M., 1977. Studies on the mechanism of hepatic microsomal N-oxide formation, the role of cytochrome P450 and mixed function amine oxidase in the N-oxidation of N, N-dimethylamine. *Biochem. J* 164, 487-496.
- Hofmann, T., Deters, F., Heberle, I., Schieberle, P., 2005. Influence of high hydrostatic pressure on the formation of Maillard-derived key odorants and chromophores. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 893.
- Hoskin, J.C., Dimick, P.S., 1979. Evaluation of fluorescent light on flavor and riboflavin content of milk held in gallon returnable containers. *J. Food Prot.* 42, 105-109.
- Hoynes, M., Downey, W., 1973. Relationship of the lipase and lipoprotein lipase activities of bovine milk. *Biochem. Soc. Trans.* 1, 256-259.
- Hutton, J.T., Patton, S., 1952. The origin of sulfhydryl groups in milk proteins and their contributions to "cooked" flavor. *J. Dairy Sci.* 35, 699-705.
- Ikons, W.G., Kwak, H.S., Zink, G.S., Jean, I.J., 1988. Comparison of methods for quantitation of free fatty acids in cheese. *J. Food Sci.* 53, 1915-1916.
- Jaddou, H.A., Pavey, J.A., Manning, D.J., 1978. Chemical analysis of flavor volatiles in heat-treated milks. *J. Dairy Res.* 45, 391-403.
- Jensen, R.G., Bitman, J., Carlson, S.E., Couch, S.C., Hamosh, M., Newberg, D.S., 1995. Milk lipids. In: Jensen, R.G. (Ed.), *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, San Diego, CA, p. 571-572.
- Jeon, I.J., Thomas, E.L., Reinneccius, C.A., 1978. Production of volatile flavor compounds in ultrahigh-temperature processed milk during aseptic storage. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1183-1188.
- Jernigan, H.M.J., 1985. Role of hydrogen peroxide in riboflavin-sensitized photodynamic damage to cultured rat lenses. *Exp. Eye Res.* 41, 121-129.
- Jung, M., Yoon, S., Lee, H., Min, D., 1998. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. *J. Food Sci.* 63, 408-412.
- Karahadian, C., Josephson, D.B., Lindsay, R.C., 1985. Contribution of *Penicillium* sp. to the flavors of Brie and Camembert cheese. *J. Dairy Sci.* 68, 1865-1877.
- Kim, H.S., Gilliland, S.E., von Gunten, R.L., Morrison, R.D., 1980. Chemical test for detecting wheat pasture flavor in cow's milk. *J. Dairy Sci.* 63, 368-374.
- Kim, Y., Morr, C., 1996. Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. *Int. Dairy J.* 6, 185-193.
- Kinnunen, P., Huttunen, J.K., Ehnholm, C., 1976. Properties of purified bovine milk lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 450, 342-351.
- Kubicková, J., Grosch, W., 1998. Quantification of potent odorants in Camembert cheese and calculation of their odour activity values. *Int. Dairy J.* 8, 17-23.
- Kuzdzal-Savoie, S., 1980. Determination of free fatty acids in milk and milk products. *Int. Dairy Fed. Bull.* 118, 53-66.
- Larsen, M., Poll, L., 1992. Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Z. Lebensmitteluntersuch. Forsch. A* 195, 120-123.
- Lin, J.C.C., Jeon, I.J., 1987. Effect of commercial food grade enzymes on free fatty acid profiles in granular Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 52, 78-87.
- Lunden, A., Gustafsson, V., Imhof, M., Gauch, R., Bosset, J.-O., 2002. High trimethylamine concentration in milk from cows on standard diets is expressed as fishy off flavor. *J. Dairy Res.* 69, 383-390.
- Lunden, A., Marklund, S., Gustafsson, V., Andersson, L., 2002. A nonsense mutation in the FM03 gene underlies fishy off-flavor in cow's milk. *Genome Res.* 12, 1885-1888.
- Magan, N., Pavlou, A., Chrysantakis, I., 2001. Milk-sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sens. Actuators B: Chem.* 72,

- Manning, D.J., Robinson, H.M., 1973. Analysis of volatile substances associated with cheddar-cheese aroma. *J. Dairy Res.* 40, 63-75.
- Marsili, R.T., 1999. Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *J. Chromatogr. Sci.* 37, 17-23.
- Martinez-Castro, I., Alonso, L., Juarez, M., 1986. Gas chromatographic analysis of free fatty acids and glycerides of milk fat using tetramethylammonium hydroxide as catalyst. *Chromatographia* 21, 37-40.
- Martin-Hernandez, M.C., Alonso, L., Jubrez, N., Fontecha, J., 1988. Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. *Chromatographia* 25, 87-90.
- Matselis, E., Roussis, I., 1998. Proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk. *Food Control* 9, 251-259.
- McKellar, R., 1981. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J. Dairy Sci.* 64, 2138-2145.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A., 1997. *Compendium of Chemical Terminology, the Gold Book*, 2nd ed.. Blackwell Science, Oxford.
- Meer, R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W., 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J. Food Prot.* 54, 969-979.
- Mehta, R.S., Bassette, R., Ward, G., 1974. Trimethylamine responsible for fishy flavor in milk from cows on wheat pasture. *J. Dairy Sci.* 57, 285-289.
- Mendelson, C., Zinder, O., Blanchette-Mackie, E.J., Chemick, S.S., Scow, C.O., 1977. Lipoprotein lipase and lipid metabolism in mammary gland. *J. Dairy Sci.* 60, 666-676.
- Metcalfe, L.D., Wang, C.N., 1981. Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification. *J. Chromatogr. Sci.* 19, 530-535.
- Moio, L., Dekimpe, J., Etievant, P., Addeo, F., 1993. Neutral volatile compounds in the raw milks from different species. *J. Dairy Res.* 60, 199-213.
- Moio, L., Etievant, P., Langlois, D., Dekimpe, J., Addeo, F., 1994. Detection of powerful odorants in heated milk by use of extract dilution sniffing analysis. *J. Dairy Res.* 61, 385-394.
- Moysiadi, T., Badeka, A., Kondyli, E., VaKirtzi, T., Sawaidis, T., Kontominas, M.G., 2004. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. *Int. Dairy J.* 14, 429-436.
- Mussa, D., Ramaswamy, H., 1997. Ultra high pressure pasteurization of milk: kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. *Lebensm. Wiss. Technol.* 30, 551-557.
- Naseem, J., Ahmed, M.S., Bhat, R., Hadi, S.M., 1993. Copper(II)-dependent degradation of DNA by riboflavin. *Food Chem. Toxicol.* 31, 589-597.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, p. 290-291.
- Needs, E.C., Ford, G.D., Owen, A.J., Tuckley, B., Anderson, M., 1983. A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography. *J. Dairy Res.* 50, 321-329.
- Nielsen, S., 2002. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6628-6634.
- Ouattara, G.C., Jeon, I.J., Hart-Thakur, P., Schmidt, K., 2004. Fatty acids released from milk fat by lipoprotein lipase and lipolytic psychrotrophs. *J. Food Sci.* 69, C659-C664.
- Patton, S., 1964. Flavor thresholds of volatile fatty acids. *J. Food Sci.* 29, 679-680.
- Patton, S., Josephson, D.V., 1953. Methionine – origin of sunlight flavor in milk. *Science* 118, 211.
- Pearson, A.W., Butler, E.J., Curtis, R.F., Fenwick, G.R., Hobson-Frohock, A., Land, D.G., 1979. Effect of rapeseed meal on trimethylamine metabolism in the domestic fowl in relation to egg taint. *J. Sci. Food Agric.* 30, 799-804.
- Perkins, M.L., Zerdin, K., Rooney, M.L., D'Arcy, B.R., Deeth, H.C., 2007. Active packaging of UHT milk to prevent the development of stale flavour during storage. *Pack. Technol. Sci.* 20, 137-146.
- Preininger, M., Grosch, W., 1994. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27, 237-244.
- Qian, M., Reineccius, G.A., 2002. Importance of free fatty acids in Parmesan cheese. In: Reineccius, G.A., Reineccius, T.A. (Eds.), *Heteroatomic Aroma Compounds*, ACS Symposium Series 826. American Chemical Society, Washington, DC, p. 243-256.
- Rademacher, B., Kessler, H.G., 1996. High pressure inactivation of microorganisms and enzymes in milk and milk products. European High Pressure Research Conference, Leuven, Belgium.
- Reiners, J., Grosch, W., 1998. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2754-2763.
- Rerkrai, S., Jeon, I.J., Bassette, R., 1987. Effect of various direct ultra-high temperature heat treatments on flavor of commercially prepared milks. *J. Dairy Sci.* 70, 2046-2054.
- Richardson, G.H. (Ed.), 1985. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, (15th ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
- Rosenthal, I., 1992. *Electromagnetic Radiations in Food Science*. Springer, Berlin.
- Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W., 1998. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Garching, Germany.
- Salo, P., 1970. Variability of odour thresholds for some compounds in alcoholic beverages. *J. Sci. Food Agric.* 21, 597-600.
- Sattar, A., deMan, J.M., 1975. Photooxidation of milk and milk products: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 13-35.
- Sattar, A., deMan, J.M., Alexander, J.C., 1976. Light-induced oxidation of edible oils and fats. *Lebensm. Wiss. Technol.* 9, 149-152.
- Saxby, M.J., 1992. A survey of chemicals causing taints and off-flavours in food. *Food Taints and Off-Flavours*. Blackie, London, p. 23-25.
- Scanlan, R.A., Lindsay, R., Libby, L.M., Day, E.A., 1968. Heat-induced volatile compounds in milk. *J. Dairy Sci.* 51, 1001-1007.
- Schieberle, P., Gassenmeier, K., Guth, H., Sen, A., Grosch, W., 1993. Character impact odour compounds of different kinds of butter. *Lebensm. Wiss. Technol.* 26, 347-356.
- Schroder, M.J.A., Cousins, C.M., McKinnon, C.H., 1982. Effect of psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keeping quality at 11 and 5 degrees C of HTST-pasteurized milk in the UK. *J. Dairy Res.* 49, 619-630.
- Scow, R.O., Egelrud, T., 1976. Hydrolysis of chylomicron phosphatidylcholine *in vitro* by lipoprotein lipase, phospholipase A₂ and phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* 431, 538-549.
- Senyk, G., Barbano, D., Shipe, W., 1985. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 68, 2189-2194.
- Shah, N.P., 1994. Psychrotrophs in milk – a review. *Milchwissenschaft. Milk Sci. Int.* 49, 432-437.
- Shibamoto, T., Mihara, S., Nishimura, O., Kamiya, Y., Aitoku, A., Hayashi, J., 1980. Flavor volatiles formed by heated milk. In: Charalambous, G. (Ed.), *The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages*. Academic Press, New York, p. 260-263.
- Shipe, W.F., 1980. Analysis and control of milk flavor. In: Charalambous, G. (Ed.), *The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages*. Academic Press, New York, p. 201-239.
- Shipe, W.F., Bassette, R., Deane, D.D., Dunkley, W.L., Hammond, E.G., Harper, W.J., Kleyn, D.H., Morgan, M.E., Nelson, J.H., Scanlan, R.A., 1978. Off flavors of milk: nomenclature, standards, and bibliography. *J. Dairy Sci.* 61, 855-869.
- Shirley, J., Emery, R., Convey, E., Oxender, W., 1973. Enzymic changes in bovine adipose and mammary tissue, serum and mammary tissue hormonal changes with initiation of lactation. *J. Dairy Sci.* 56, 569-574.
- Siek, T., Albin, I.A., Sather, L.A., Lindsay, R.C., 1969. Taste thresholds of butter volatiles in deodorized butteroil medium. *J. Food Sci.* 34, 265-267.

- Siek, T., Albin, I.A., Sather, L.A., Lindsay, R.C., 1971. Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones. *J. Dairy Sci.* 54, 1-4.
- Simon, M., Hansen, A.P., 2001. Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavor of ultrapasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 84, 784-791.
- Singh, T.K., Drake, M.A., Cadwallader, K.R., 2003. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.* *J. Dairy Sci.* 2, 166-189.
- Smet, K., Raes, K., De Block, J., Herman, L., Dewerrinck, K., Condijs, K., 2008. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 18, 520-530.
- Sørhaug, T., Stepaniak, L., 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 35-41.
- Spangelo, A., Karijord, O., Svensen, A., Abrahamsen, R.K., 1986. Determination of individual free fatty acids in milk by strong anion-exchange resin and gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 69, 1787-1792.
- Spellacy, E., Watts, R.W.E., Gollamali, S.K., 1979. Trimethylaminuria. *J. Inherit. Metabol. Dis.* 2, 85-88.
- Stead, D., 1986. Microbial lipases – their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.* 53, 481-505.
- Steele, J.S., 1994. Chemiluminescence detection of sulfur compounds in cooked milk. In: Mussinan, C.J., Keelan, M.E. (Eds.), *Sulfur Compounds in Foods*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 22-35.
- Toso, B., Procida, G., Stafanon, B., 2002. Determination of volatile compounds in cows' milk using headspace GC-MS. *J. Dairy Res.* 69, 569-577.
- Tovar-Hernandez, G., Peña, H.R.V., Velasquez, G., Ramirez, J.A., Torres, J.A., 2005. Effect of combined thermal and high pressure processing on the microbial stability of milk during refrigerated storage. IFT Annual Meeting, New Orleans, LA.
- Tracey, E.P., Akerman, B.R., Chow, L.M.L., Youil, R., Bibeau, C., Lin, J., Bruce, A.G., Knight, M., Danks, D.M., Cashman, J., 1998. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum. Mol. Genet.* 7, 839-845.
- Urbach, G., 1993. Relations between cheese flavor and chemical composition. *Int. Dairy J.* 3, 389-422.
- Urbach, G., Stark, W., Forss, D.A., 1972. Volatile compounds in butter oil. 11. Flavor and flavor thresholds of lactones, fatty-acids, phenols, indole and skatole in deodorized synthetic butter. *J. Dairy Res.* 39, 35-47.
- Vallejo-Cordoba, B., Mazonra-Manzano, M.A., Gonzalez-Cordova, A.F., 1998. Determination of short-chain free fatty acids in lipolyzed milk fat by capillary electrophoresis. *J. Capill. Electrophor.* 5, 111-114.
- Vazquez-Landaverde, P.A., Qian, M.C., 2007. Antioxidant impacts on volatile formation in high-pressure-processed milk. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9183-9188.
- Vazquez-Landaverde, P.A., Qian, M.C., Torres, J.A., 2007. Kinetic analysis of volatile formation in milk subjected to pressure-assisted thermal treatments. *J. Food Sci.* 72, 389-398.
- Vazquez-Landaverde, P.A., Torres, J.A., Qian, M.C., 2006a. Quantification of trace-volatile sulfur compounds in milk by solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *J. Dairy Sci.* 89, 2919-2927.
- Vazquez-Landaverde, P.A., Torres, J.A., Qian, M.C., 2006b. Effect of high pressure-moderate temperature processing on the volatile profile of milk. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9184-9192.
- Vazquez-Landaverde, P.A., Velazquez, G., Torres, J.A., Qian, M.C., 2005. Quantitative determination of thermally derived volatile compounds in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 88, 3764-3772.
- Velazquez, G., Gandhi, K., Torres, J.A., 2002. High hydrostatic pressure: a review. *Biotam* 12, 71-78.
- von Gunten, R.L., Bush, L.J., Odell, G.V., Wells, M.E., Adams, G.D., 1976. Factors related to the occurrence of trimethylamine in milk. *J. Milk Food Technol.* 39, 526-529.
- Webster, J., Duncan, S., Marcy, J., O'Keefe, S., 2009. Controlling light oxidation flavor in milk by blocking riboflavin excitation wavelengths by interference. *J. Food Sci.* 74 (9), S390-S398.
- Whetstone, M.E.C., Cadwallader, K.R., Drake, M.A., 2005. Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3126-3132.
- Wick, E., 1966. Flavor update: one opinion. *Food Technol.* 20, 1549-1554.
- Wold, J.P., Veberg, A., Nilsen, A., Iani, V., Juzenas, P., Moan, J., 2005. The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *Int. Dairy J.* 15, 343-353.
- Woo, A.H., Lindsay, R.C., 1982. Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 65, 1102-1109.
- Zheng, Y., Ho, C., 1994. Kinetics of the release of hydrogen sulfide from cysteine and glutathione during thermal treatment. In: Mussinan, C.J., Keelan, M.E. (Eds.), *Sulfur Compounds in Foods*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 138-146.

Parte IV

Biotechnologia

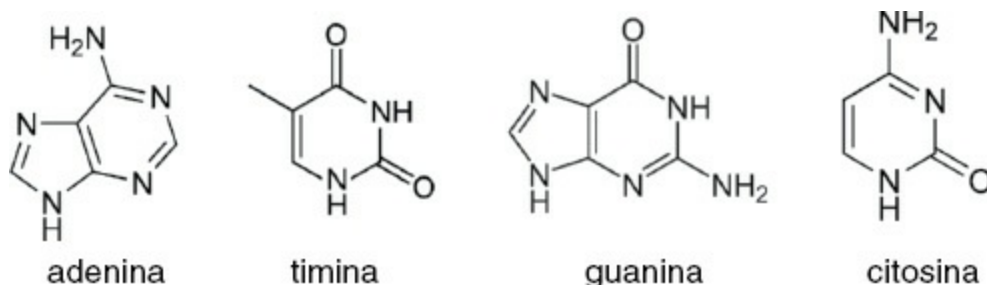
As tecnologias do DNA recombinante nos alimentos

Peter Eck⁺⁺⁺

I. INTRODUÇÃO

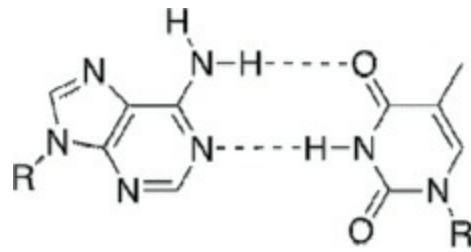
Há pelo menos 10.000 anos, os humanos utilizam a modificação genética por meio da reprodução seletiva de plantas, animais e micro-organismos para aumentar a resistência a doenças e produtividade e para melhorar a qualidade dos alimentos. Durante os últimos 25 a 30 anos, os avanços no campo da biotecnologia possibilitaram a transferência de certas características selecionadas entre espécies ou de uma espécie para outra em um período mais curto, usando técnicas da biologia molecular que manipulam o código genético da vida, o ácido desoxirribonucleico (DNA).

Todas as informações necessárias para a criação de um organismo estão codificadas no DNA. Ele é o material genético encontrado, principalmente, no núcleo das células eucarióticas. O DNA contém quatro bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C):



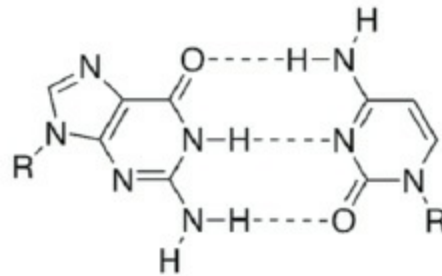
O DNA é composto de um arcabouço de moléculas de desoxirribose unidas entre si por grupos fosfato, com cada molécula de açúcar unida também a uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas são encontradas aos pares,

sendo que A forma par com T, e G com C:



Adenina

Timina



Guanina

Citosina

As bases nitrogenadas são idênticas em todos os organismos, mas a ordem da sequência e o número de bases geram uma enorme diversidade. Cada base nitrogenada está unida a uma molécula de açúcar, sendo que as moléculas de açúcar estão unidas entre si por meio de grupos fosfato. O conjunto formado por uma base, um açúcar e um fosfato é denominado nucleotídeo. É o arcabouço composto de moléculas de desoxirribose ligadas entre si por grupos fosfato que dá ao DNA a forma de “dupla hélice” (Figura 13.1).

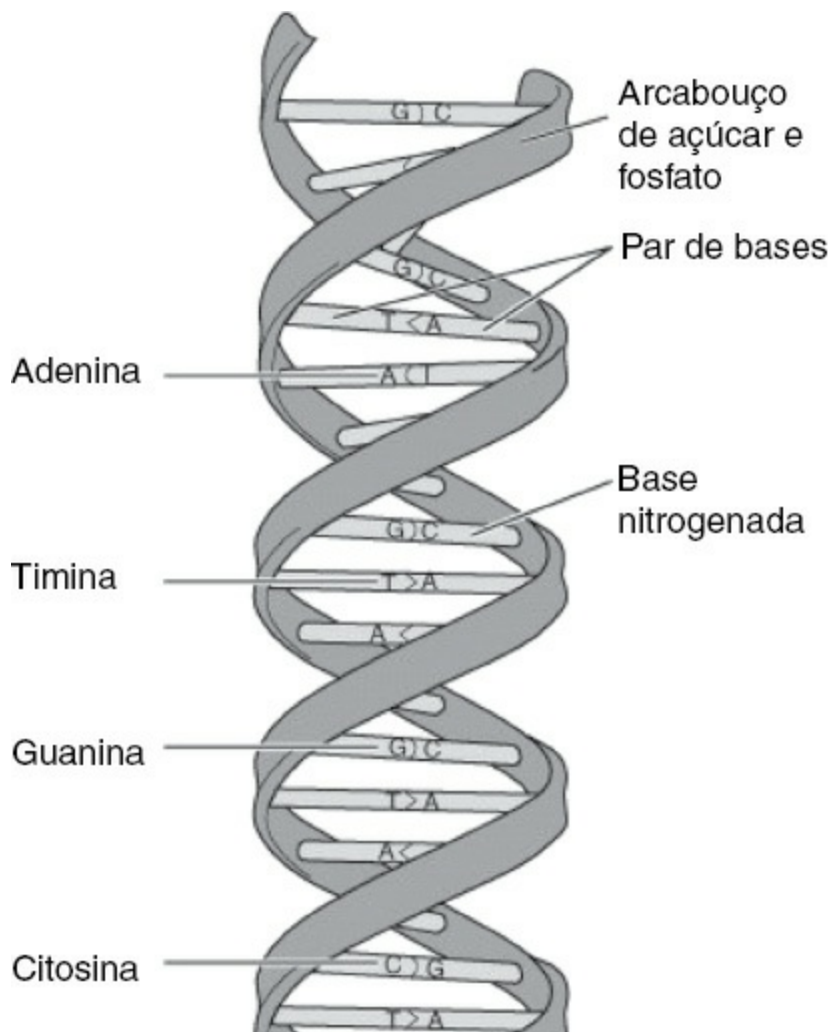


FIGURA 13.1 Estrutura em dupla hélice do DNA. Suportadas por um arcabouço principal, composto de resíduos de carboidratos alternados com grupos fosfato, as bases nitrogenadas complementares adenina-timina e guanina-citosina, ligam-se formando uma estrutura helicoidal. *Fonte:* US National Library of Medicine.

Cada sequência de DNA, que ocupa um local específico em um cromossomo e determina uma característica específica em um organismo, é denominada gene. O tamanho de um gene pode variar muito: de cerca de 1.000 bases a 1 milhão de bases nos humanos. O DNA codifica a sequência de aminoácidos das proteínas e outras sequências não codificadoras de proteínas, essenciais para a regulação do genoma. O DNA é transcrito para o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), uma molécula de fita única sintetizada no núcleo da célula com o uso do DNA genômico como molde e, em seguida, exportada para o citoplasma, onde seu código genético é traduzido para as sequências de aminoácidos que constituem as proteínas. No RNA, a base timina é substituída pela uracila (U).

O DNA recombinante (rDNA) é uma molécula única criada artificialmente por meio da combinação de duas ou mais fontes externas aos organismos vivos. O DNA recombinante é criado para ser introduzido em um novo organismo hospedeiro, a fim de transferir uma ou mais características desejáveis ou remover genes de características indesejáveis. Existem muitas razões para se criar um DNA recombinante; entre elas, o estudo científico dos produtos de genes e a inserção de genes de outro organismo, com a finalidade de modificar características comercialmente importantes.

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) e os micro-organismos geneticamente modificados (MGMs) podem ser definidos como organismos nos quais o material genético foi alterado de um modo que não ocorre naturalmente por cruzamento ou por recombinação natural. Diz-se que o organismo resultante é geneticamente modificado, criado por engenharia genética ou transgênico. A tecnologia é, com frequência, denominada biotecnologia moderna, engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante. As técnicas para

produzir DNA recombinante consistem em procedimentos laboratoriais de rotina com resultados altamente específicos. As técnicas modernas de engenharia genética recombinante podem ser usadas para transferir genes de micro-organismos, plantas ou animais em células de cada uma dessas formas vivas.

A década passada presenciou um aumento rápido das modificações genéticas de alimentos. O advento da tecnologia do DNA recombinante e a possibilidade da transferência de genes entre organismos de espécies diferentes, ou até de reinos filogenéticos distintos, abriram uma ampla variedade de aplicações para o DNA recombinante no campo da tecnologia dos alimentos. Grande parte dos alimentos que consumimos hoje contém ingredientes geneticamente modificados ou é produzida com a ajuda da engenharia genética. Os alimentos podem ser ou conter organismos transgênicos vivos/viáveis, como milho, soja e culturas de leveduras. Os alimentos podem conter ingredientes derivados de OGMs, como farinhas, produtos proteicos alimentícios ou óleos provenientes de culturas geneticamente modificadas. Ingredientes isolados, utilizados no processamento de alimentos ou como aditivos alimentares, podem ser produzidos por MGMs, como enzimas e proteínas.

A principal razão para o uso da tecnologia dos transgênicos em materiais alimentícios consiste em superar as limitações existentes nos processos de reprodução e seleção convencionais. Se, por um lado, os métodos de cruzamento entre espécies distintas e de seleção aumentaram de modo significativo a produtividade das lavouras, do gado e até de micro-organismos, ao longo de muitos séculos, por outro, o potencial futuro desses métodos é limitado pelas fronteiras da compatibilidade sexual entre as espécies. A tecnologia do DNA recombinante supera a limitação imposta pela incompatibilidade entre as espécies ao transferir, de modo seletivo, sequências de DNA que codificam características genéticas específicas (como resistência a insetos, crescimento intensificado, melhor atividade enzimática) para um organismo receptor, de modo que ele expresse essa característica. Esses produtos, criados por engenharia genética, têm uma presença substancial na cadeia alimentar, na qual, mais especificamente, micro-organismos e vegetais assim criados têm um valor comercial significativo. Este capítulo destacará as aplicações comerciais dos micro-organismos e vegetais que foram criados por engenharia genética e são encontrados nos alimentos. Em razão da ausência no mercado de produtos oriundos de gado geneticamente modificado, esses não serão discutidos aqui.

II. CULTIVOS DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

As plantas transgênicas comerciais foram cultivadas, pela primeira vez, em 1996 e, hoje, estão completamente integradas ao sistema agrícola. A área de cultivo mundial expandiu de 1,7 milhão de hectares, em 1996, para 148 milhões de hectares, em 2010. A quantidade acumulada de hectares cultivados de 1996 a 2010 ultrapassa a marca de 1 bilhão, o que mostra a ampla aceitação das novas culturas. Essas lavouras, chamadas de biotecnológicas, estão contribuindo de maneira significativa para a segurança, autossuficiência, sustentabilidade, redução da pobreza e da fome e para a atenuação das alterações climáticas; e o potencial das lavouras biotecnológicas para o futuro é relevante. Atualmente, as lavouras biotecnológicas são plantadas, de modo legal, em 29 países, com impacto sobre mais da metade da população mundial; por essa razão, elas são um elemento importante da cadeia alimentar. Esta seção traz uma breve introdução à tecnologia das plantas transgênicas e um resumo da genética e da bioquímica relativas às culturas transgênicas mais importantes disponíveis no mercado (James, 2010).

A. Transformação genética de plantas para cultivo

Há vários fatores que precisam ser estabelecidos no processo de desenvolvimento de plantas transgênicas:

- Devem existir sistemas seguros de cultura e regeneração de tecidos.
- Construções genéticas eficazes devem ser criadas com o uso de vetores adequados.

- Podem ser aplicadas técnicas eficientes de transformação para a introdução de genes em plantas para cultivo.
- As plantas transgênicas podem ser recuperadas e multiplicadas.
- A expressão estável do gene pode ser caracterizada.
- Os transgenes podem ser transferidos para cultivares de elite, por meio do cruzamento convencional.
- As plantas transgênicas serão avaliadas com relação à eficácia e ao risco ambiental (Birch, 1997; Sharma *et al.*, 2004).

Embora várias abordagens para integrar o DNA recombinante às lavouras tenham sido tentadas com sucesso (Potrykus, 1991), somente quatro delas são amplamente utilizadas na introdução de genes em plantas para cultivo (Dale *et al.*, 1993):

- Transferência de genes mediada pelo *agrobacterium*.
- Bombardeamento de microprojéteis com DNA (biobalística).
- Microinjeção de DNA no núcleo de células.
- Transferência direta de DNA para protoplastos isolados.

A transferência de genes mediada pelo *Agrobacterium tumefaciens* é muito usada para produzir transformações em plantas para cultivo. O *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria que vive no solo e que foi implicada na formação de tumores (galhas) nos locais de lesão de muitas plantas dicotiledôneas. Essa capacidade de induzir tumores resulta da presença de um grande plasmídeo *Ti* (indutor de tumor) em linhagens virulentas de *Agrobacterium*. Do mesmo modo, os megaplasmídeos *Ri* (indutores de raízes) são encontrados em linhagens virulentas de *Agrobacterium rhizogenes*, o agente causador da doença da “raiz em cabeleira”. Os plasmídeos *Ti* e *Ri* e a biologia molecular da indução da galha-da-coroa e da “raiz em cabeleira” foram estudados minuciosamente (para mais informações, consultar Zambryski *et al.*, 1983; Zambryski, 1992). A transformação mediada pelo *Agrobacterium* é realizada por meio da incorporação de genes de interesse, oriundos do plasmídeo *Ti* (que se multiplica de modo independente), na célula do *A. tumefaciens*, a qual, por sua vez, infecta a célula da planta e transfere o *Ti*-DNA que contém o gene de interesse para os cromossomos das células da planta hospedeira, as quais se dividem ativamente (Sharma *et al.*, 2004).

No método do bombardeamento de partículas (biobalística), microprojéteis de tungstênio ou ouro são cobertos com o DNA a ser inserido e bombardeados em células ou tecidos capazes de regeneração subsequente da planta. A aceleração dos microprojéteis pesados (partículas de tungstênio ou ouro com diâmetro de 0,5-5,0 μm) cobertos com DNA transporta os genes para o interior de quase todos os tipos de células e tecidos (Klein *et al.*, 1987; Sanford, 1990). As partículas cobertas de DNA penetram nas células da planta, o DNA é incorporado em uma pequena proporção de células tratadas e as células transformadas são selecionadas para posterior regeneração das plantas (Sharma *et al.*, 2004).

O DNA modificado por engenharia genética também é injetável em núcleos de células embriogênicas isoladas, que podem ser induzidas a regenerar plantas em culturas de células (Neuhaus *et al.*, 1987). Isso requer a micromanipulação de células isoladas ou de pequenas colônias de células sob o microscópio e a injeção precisa de pequenas quantidades de solução de DNA com uma micropipeta fina de vidro. As células ou grupos de células que receberam a injeção são, depois, cultivados em sistemas de cultura *in vitro* e regenerados em plantas (Sharma *et al.*, 2004).

Na transformação por protoplastos, a parede celular das células-alvo é removida por meio de tratamento enzimático e as células permanecem delimitadas apenas pela membrana plasmática (protoplastos) (Zhang e Wu, 1988). O DNA exógeno pode ser adicionado à suspensão de protoplastos e introduzido nessas células, alterando-se a membrana plasmática com polietilenoglicol ou com a passagem de uma corrente elétrica através da suspensão de protoplastos. O DNA é incorporado ao genoma de algumas células. É preciso inserir também um marcador

adequado para permitir a seleção dos protoplastos transformados e das colônias de células que se desenvolvem a partir deles (Sharma *et al.*, 2004).

B. Expressão eficaz de genes em plantas para cultivo

A engenharia genética eficaz baseia-se na capacidade de gerar um produto de gene específico com o nível de expressão desejado, nos tecidos apropriados e no momento certo. Isso pode ser conseguido por meio da criação de construções para expressão de genes (também denominadas cassetes de expressão), que incluem promotores e/ou elementos reguladores da transcrição que controlam o nível, a localização e o momento da expressão dos genes. Um cassete de expressão típico inclui as regiões flanqueadoras 5' e 3' homólogas às sequências genéticas do hospedeiro, possibilitando, assim, a integração do cassete por recombinação homóloga. O promotor determinará a força e a distribuição temporal e espacial da expressão dos quadros de leitura abertos (*open reading frames*). O quadro de leitura aberto contém o código para a proteína heteróloga. Um elemento terminador regula a terminação adequada da transcrição do RNA:

Região flanqueadora 5'	Promotor	Quadro de leitura aberto	Terminador	Região flanqueadora 3'
------------------------	----------	--------------------------	------------	------------------------

A principal limitação do processo de desenvolvimento de produtos transgênicos eficazes é a falta de promotores capazes de oferecer um alto nível de expressão do gene, em um alto grau de especificidade, na planta de interesse. Tradicionalmente, a expressão transgênica é direcionada por promotores constitutivos fortes, como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV35S*) (Benfey e Chua, 1989; 1990) e do gene *actin 1* (McElroy *et al.*, 1990). Embora o *CaMV35S* seja amplamente utilizado em vários sistemas de transformação de plantas dicotiledôneas, ele tem baixa atividade nos sistemas de monocotiledôneas (Wilmink *et al.*, 1995). Além disso, é difícil prever o padrão da atividade do promotor *CaMV35S* nos diferentes tecidos das plantas transgênicas (Benfey e Chua, 1990). Constatou-se que, de modo geral, os promotores de monocotiledôneas são mais ativos nos tecidos de monocotiledôneas que nos tecidos de dicotiledôneas (Wilmink *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2004).

Mais recentemente, promotores específicos para tecidos foram utilizados, com sucesso, para direcionar a expressão transgênica apenas para o tecido medular. Elementos reguladores da fosfoenolpiruvato carboxilase (*PEPC*) do milho podem ser utilizados para direcionar a expressão do gene para o tecido verde (Hudspeth e Guala, 1989). Do ponto de vista da produtividade potencial de um cultivo, muitos transgenes devem ser expressos somente naqueles órgãos nos quais são necessários. Por exemplo, a característica resistente a insetos deve ser expressa apenas nos órgãos propensos a serem atacados por insetos. Por outro lado, as plantas poderão ser altamente resistentes, mas o custo metabólico poderá reduzir substancialmente a produtividade da lavoura. A expressão específica para tecidos também reduz a probabilidade da ocorrência de efeitos negativos inesperados sobre os organismos que não são alvos. Parece ser impossível extrapolar os resultados dos níveis da expressão do gene de uma espécie para outra, e cada cultivo precisa ser testado com um conjunto de promotores para a otimização dos resultados. Embora os promotores constitutivos, como o *CaMV35S*, sejam eficazes em proporcionar níveis altos de expressão do gene, essas expressões, em alguns casos, são não apenas desnecessárias como trariam consequências negativas inesperadas para os organismos que não são alvos. Uma expressão mais direcionada de genes inseticidas, por meio do uso de promotores específicos para tecidos e órgãos, pode ser um fator importante para o desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a insetos (Wong *et al.*, 1992; Svab e Maliga, 1993; McBride *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2004).

C. Plantas geneticamente modificadas da cadeia alimentar

Desde setembro de 2011, 194 eventos transgênicos para plantas/cultivos foram aprovados em todo o mundo para

plântio ou uso em alimentos para humanos e animais. Vinte e quatro espécies, a maioria delas adequadas para consumo, foram geneticamente modificadas para expressar uma variedade de características, principalmente tolerância a herbicidas e resistência a insetos (ISAAA GM Approval Database). As plantas geneticamente modificadas, também chamadas de plantas biotecnológicas, são produtos comuns da agricultura da atualidade e, com isso, componentes essenciais da cadeia alimentar. Em 2010, 148 milhões de hectares de lavouras biotecnológicas foram cultivadas em 29 países, representando 10% de 1,5 bilhão de hectares de terra para cultivo no mundo. O valor global de comércio, somente dessas sementes, foi avaliado em US\$11,2 bilhões, em 2010, sendo que os produtos biotecnológicos comerciais milho, soja e algodão foram estimados em cerca de US\$150 bilhões por ano (James, 2010; Gatehouse *et al.*, 2011).

Os avanços na modificação transgênica das lavouras são, muitas vezes, conhecidos pela expressão “revolução verde”. Em muitos países desenvolvidos, e em desenvolvimento, numerosas variedades de lavouras geneticamente modificadas apresentaram maior produtividade e um aumento da resistência a doenças e pestes. No entanto, a intensificação e a expansão da agricultura que se seguiram trouxeram novos desafios à saúde e ao ambiente; por exemplo, o uso maior de substâncias químicas na agricultura e o cultivo intensificado, que leva à erosão do solo. Esses fatos destacam que estamos no início dessa revolução verde e que todas as modificações genéticas devem ser avaliadas de forma minuciosa quanto à sustentabilidade, por meio de pesquisa sistemática (James, 2010; Gatehouse *et al.*, 2011).

A resistência a insetos e a tolerância a herbicidas são as características transgênicas que causaram maior impacto e que tiveram maior aceitação na agricultura, até o momento; plantas com essas características são responsáveis por mais de 99% da área global de cultivo de GMs (James, 2010; Gatehouse *et al.*, 2011). Além disso, existem variedades limitadas que exibem resistência a vírus, amadurecimento retardado, teor alterado de nutrientes, aplicações médicas, melhorias no processamento e alteração da fertilidade vegetal. No processo da engenharia genética, genes que determinam a resistência aos antibióticos ampicilina, canamicina e estreptomicina foram cointroduzidos para permitir a seleção dos espécimes geneticamente modificados.

D. Plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos

*1. Plantas que expressam a toxina do *Bacillus thuringiensis**

Atualmente, as plantas que contêm toxinas do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) são as únicas culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos comercializadas. As plantas que produzem a toxina do *B. thuringiensis* compõem uma das lavouras geneticamente modificadas dominantes cultivadas em grande escala e em muitas regiões do mundo (James, 2009; Then, 2010). O desenvolvimento dessas culturas avançou rapidamente desde as primeiras plantas de tabaco geneticamente modificadas, em 1985 (Höfte *et al.*, 1986; Vaeck *et al.*, 1987). Em 1995, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos aprovou como seguros os tomateiros que produziam a toxina do *B. thuringiensis*; dessa forma, tomates constituíram a primeira colheita produtora de pesticida aprovada no país norte-americano. Desde 1996, o milho *Bt*, a batata *Bt* e o algodão *Bt* são cultivados por fazendeiros nos Estados Unidos (James, 2010).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria patogênica formadora de esporos que se diferencia dos outros membros do grupo *Bacillus* por produzir inclusões cristalinas conhecidas como δ -endotoxinas Cry. As plantas transgênicas resistentes a insetos comercializados pela primeira vez na metade da década de 1990 expressavam todos os genes que codificam δ -endotoxinas inseticidas do *B. thuringiensis*, também conhecidas como proteínas Cry (Soberón *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Gatehouse *et al.*, 2011). A ideia de utilizar as proteínas Cry não era nova, visto que formulações em *spray* à base de *B. thuringiensis* já haviam sido utilizadas comercialmente por

cerca de quatro décadas para controlar pestes causadas por insetos – em particular, insetos da ordem lepidóptera (Cannon, 1996). Toxinas *Bt* individuais definiram a atividade inseticida, restrita, em geral, a algumas espécies de determinada ordem, como a lepidóptera (borboletas e mariposas), a díptera (moscas e mosquitos), a coleóptera (besouros e carunchos) e a himenóptera (vespas e abelhas), além dos nematódeos (de Maagd *et al.*, 2001). As primeiras variedades comerciais de plantas transgênicas resistentes a insetos expressavam proteínas Cry isoladas, com atividade específica contra pestes causadas por lepidópteros; por exemplo, um algodão que expressava a Cry1Ac ou um milho que expressava a Cry1Ab. Em seguida, outras toxinas *Bt* ativas contra lepidópteros, como a Cry1F e a Cry2Ab2, foram introduzidas e, com frequência, apresentadas na forma de genes de grande tamanho em uma única variedade (um algodão que expressava Cry1F + Cry1Ac ou um algodão que expressava Cry1Ac + Cry2Ab2). As toxinas Cry3 com atividade contra pestes causadas por coleópteros também são utilizadas em lavouras transgênicas comerciais, em particular nas de milho, para proteger contra as larvas (de crisomelídeos) que atacam as raízes (por exemplo, milho que expressa a Cry3Bb1, milho que expressa a Cry34Ab1 e Cry35Ab1, e milho que expressa uma versão modificada da Cry3A). Mais recentemente, variedades liberadas de milho transgênico expressam genes que codificam proteínas Cry ativas contra insetos das ordens lepidóptera e coleóptera. Na China, cultivares de algodão *Bt* que expressavam a proteína Cry1Ac junto com um inibidor modificado da tripsina do feijão-fradinho (CpTI), que intensifica a eficácia, foram liberados para o comércio, em 2000 (Gatehouse *et al.*, 2011).

2. Proteínas Cry: modo de ação

Embora o uso comercial das toxinas Cry seja considerável, detalhes relativos a seu modo de ação ainda são controversos; no entanto, é provável que sua ação tóxica ocorra em várias etapas (Figura 13.2). A toxicidade das toxinas *Bt* nos organismos-alvo depende de fatores muito específicos, como pH intestinal, proteases e receptores desses organismos (Oppert, 1999; de Maagd *et al.*, 2001).

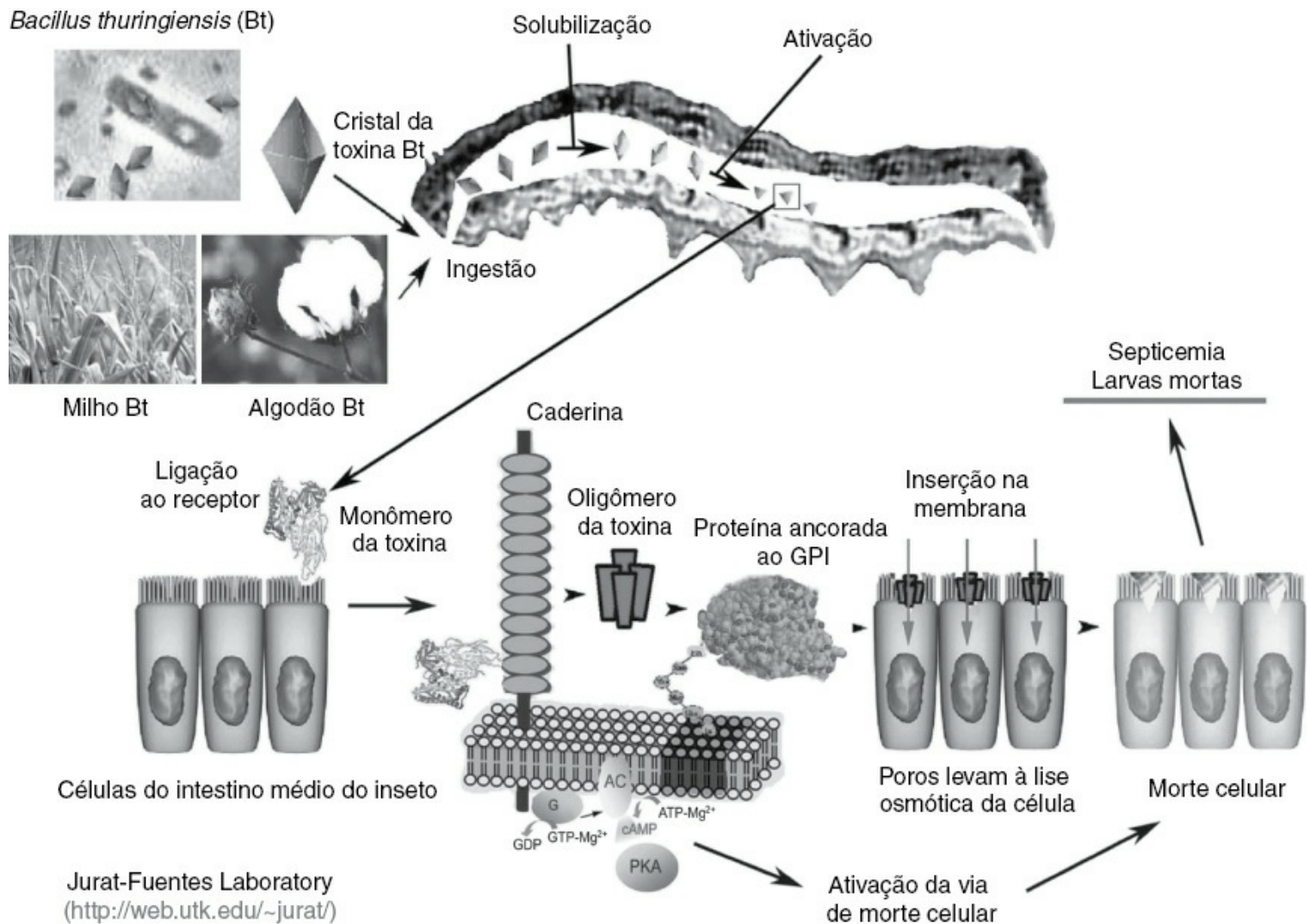


FIGURA 13.2 Modo de ação sugerido para as proteínas Cry. O processo de várias etapas da toxicidade das proteínas Cry inclui a ingestão pelo inseto, a solubilização das proteínas, a ativação pela clivagem do peptídeo, a ligação ao receptor celular específico – caderina – e às proteínas ancoradas ao GPI, o que resulta na ativação de uma via de morte celular e/ou na oligomerização e na formação de poros, que permitem a saída do conteúdo intracelular, resultando na lise celular. Fonte: Jurat-Fuentes Laboratory: <http://web.utk.edu/~jurat/>.

Nos esporos do *B. thuringiensis*, as toxinas Bt são produzidas na forma de protoxinas cristalinas inativas. Depois de ingeridas por uma larva de inseto suscetível, o ambiente alcalino do intestino médio estimula a solubilização das inclusões cristalinas, liberando as protoxinas. A subsequente clivagem das protoxinas nas extremidades amino-terminal e carboxi-terminal, pelas proteases do intestino do inseto, dá origem a uma proteína truncada de 65-70 kDa, a d-endotoxina ativa (Höfte e Whiteley, 1989).

A toxina proteoliticamente ativada liga-se a receptores (algumas caderinas foram identificadas) localizados na membrana apical dos microvilos das células epiteliais do intestino (de Maagd *et al.*, 2001; Soberón *et al.*, 2010). A ligação da toxina às proteínas caderinas resulta na ativação de uma via de morte celular por oncose e/ou na formação de oligômeros da toxina, que se ligam às proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) em regiões da membrana celular denominadas balsas lipídicas (Figura 13.2). A ligação ao receptor provoca uma mudança estrutural, que permite a inserção das proteínas na membrana celular (Vadlamudi *et al.*, 1995). No ambiente da membrana, várias proteínas se unem como oligômeros, formando um poro que leva à lise osmótica da célula, seguida pela morte do inseto (de Maagd *et al.*, 2001; Likitvivatanavong *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2011). Ainda não se sabe se a morte do enterócito resulta de oncose, da formação do poro ou de ambos os mecanismos (Figura 13.2). Para obter mais informações sobre a ligação específica, consultar Soberón *et al.* (2010) e Likitvivatanavong *et al.* (2011).

Na maioria das variedades para cultivo de uso comercial, as proteínas Cry são expressas na forma ativa e, assim,

diferem daquelas utilizadas nas fórmulas de biopesticidas em que as proteínas Cry estão presentes como protoxinas (Gatehouse *et al.*, 2011).

O potencial de aplicação significativo dessas proteínas, no futuro, é demonstrado pelo fato de 634 variações diferentes de toxinas já terem sido identificadas, até agora, em diferentes linhagens de *B. thuringiensis* (Crickmore, 2011).

3. Toxinas do *Bacillus thuringiensis*: impacto sobre o ambiente e a saúde

Por causa de fatores característicos, como pH, proteases específicas e ligação a receptores específicos – necessária para a ativação das toxinas *Bt* –, os efeitos dessas substâncias estão limitados aos insetos-alvo, com pouco ou nenhum impacto sobre os humanos, a vida selvagem, os polinizadores e a maioria dos demais insetos (Gill *et al.*, 1992; Oppert, 1999; de Maagd *et al.*, 2001). As toxinas *Bt* comercializadas atualmente não exibem toxicidade aguda nos mamíferos. Durante os 70 anos em que as toxinas *Bt* foram utilizadas, não se detectaram efeitos tóxicos em humanos; por essa razão, seu uso é considerado uma medida aceitável para o controle de pestes que afetam a indústria de alimentos orgânicos (Whalon e Wingerd, 2003).

4. Plantas comerciais com proteínas do *Bacillus thuringiensis*

As proteínas Cry do *Bacillus thuringiensis* são integradas a uma variedade cada vez maior de plantas para cultivos comerciais, como mostrado na Tabela 13.1.

TABELA 13.1 Seleção de plantas transgênicas comerciais

Nome comum do produto alimentício	Nome comum do organismo parental e identificador único da OECD	Detalhes da característica modificada	Gene(s) responsável(is) pela característica modificada
Milho			
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Milho Yieldgard (MON810) MON-00810-6	Protegido contra insetos	Gene <i>cry1A(b)</i> do <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Milho Bt-176 SYN-EV176-9	Protegido contra insetos	Gene <i>cry1A(b)</i> do <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Milho Bt-11 SYN-BT011-1	Protegido contra insetos e tolerante ao glufosinato de amônio	Gene <i>cry1A(b)</i> do <i>B. thuringiensis</i> , gene <i>pat</i> derivado das bactérias <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Linhagem DBT418 do milho Bt – Liberty Link DKB-89614-9	Protegido contra insetos e tolerante ao glufosinato de amônio	Gene para CryIAC de <i>B. thuringiensis</i> . O gene para Bar deriva do <i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Herculex Insect Protection DAS-01507-1	Protegido contra as principais pragas de insetos lepidópteros, inclusive a broca de milho europeia, e tolerante ao glufosinato de amônio	Gene <i>cry1F</i> , versão sintética de um gene do <i>B. thuringiensis</i> . Gene <i>pat</i> , derivado do <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Milho Insect Resistant MON863 MON-00863-5	Protegido contra larvas que atacam as raízes do milho	Variante <i>cry3Bb1</i> derivada do <i>B. thuringiensis</i>
Óleo, farinha, açúcar ou xarope de milho	Milho Bt Cry34/35Ab1 DAS-59122-7	Protegido contra a larva que ataca as raízes do milho e tolerante ao glufosinato de amônio	Genes <i>cry34Ab1</i> e <i>cry35Ab1</i> do <i>B. thuringiensis</i> e gene <i>pat</i> de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Alimentos derivados do milho, como xarope, farinha e óleo de milho	Milho MIR604	Protegido contra a larva que ataca as raízes do milho	Gene <i>Cry3A</i> modificado de <i>B. thuringiensis</i> . Também contém gene <i>pmi</i> de <i>E. coli</i> (codifica a fosfomanose isomerase, um marcador de seleção)

Alimentos derivados do milho, como xarope, farinha e óleo de milho	SYN-IR604-5	Tolerância ao glifosato e protegido contra a larva que ataca as raízes do milho	<i>Cry3Bb1</i> do <i>B. thuringiensis</i> e CP4 EPSPS derivado da linhagem de <i>Agrobacterium species</i> CP4
	Roundup Ready, milho MON88017, protegido contra insetos MON-88017-3		
Algodão			
Óleos e fibras de algodão	Algodão Ingard MON-00531-6	Protegido contra insetos	Gene <i>cry1Ac</i> do <i>B. thuringiensis</i>
	MON-00757-7		
	MON-89924-2		
Óleos e fibras de algodão	Algodão Bollgard II MON-15985-7	Protegido contra insetos	Genes <i>cry1Ac</i> e <i>cry2Ab</i> do <i>B. thuringiensis</i>
Óleos de semente e fibras de algodão	Algodão COT102 SYN-IR102-7	Protegido contra insetos	Gene <i>vip3a</i> do <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> e gene <i>hph</i> (resistência à higromicina) de <i>E. coli</i>
Óleos de semente e fibras de algodão	Algodão MXB-13 DAS-24236-5 <i>versus</i> DAS-21023-5	Protegido contra insetos e tolerante ao glufosinato de amônio	Genes <i>cry1Ac</i> e <i>cry1F</i> do <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> e <i>aizawai</i> , respectivamente, e gene <i>pat</i> de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Batatas			
Batatas	Batatas New Leaf NMK-89812-3	Protegido contra uma gama de insetos, inclusive o besouro da batata do Colorado	Gene <i>cry3Aa</i> de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (<i>B.t.t.</i>)
	NMK-89170-9		
	NMK-89879-1		
	NMK-89576-1		
Batatas	Batatas New Leaf Plus NMK-89185-6	Proteção contra CPB e PLRV	Gene <i>cry3Aa</i> da bactéria do solo <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (<i>B.t.t.</i>) e gene <i>PLRVrep</i> de PLRV
	NMK-89684-1		
	NMK-89896-6		
Batatas	Batatas New Leaf Y NMK-89653-6	Protegido contra uma gama de insetos, inclusive CPB e contra o vírus Y da batata	Gene <i>cry3Aa</i> da bactéria do solo <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (<i>B.t.t.</i>) e gene da proteína da capa (<i>PVYcp</i>) do vírus Y da batata
	NMK-89935-9		
	NMK-89930-4		
Soja			
Alimentos à base de soja, óleo ou farinha de proteína de soja	MON-87701-2	Protegido contra insetos das larvas de lepidópteros	Gene <i>cry1Ac</i> de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>

CPB: besouro da batata do Colorado; PLRV: vírus do enrolamento da folha da batata; *B. thuringiensis*: *Bacillus thuringiensis*.

E. Plantas tolerantes a herbicidas

De 1996 a 2010, as plantas tolerantes a herbicidas ocuparam de forma constante a maior área de plantio de colheitas biotecnológicas. Apenas em 2010, as plantas tolerantes a herbicidas ocuparam 89,3 milhões de hectares ou 61% dos

148 milhões de hectares de colheitas biotecnológicas cultivadas, em todo o mundo. Em 2010, 93% de toda a soja plantada nos Estados Unidos era resistente a herbicidas, assim como 78% de todas as variedades de algodão e 70% das variedades de milho (USDA, 2011). As variedades mais comuns são aquelas tolerantes ao glifosato e ao glufosinato.

Muitos herbicidas matam plantas, interferindo no funcionamento das enzimas do vegetal. Em geral, as plantas exibem um grau de sensibilidade aos herbicidas utilizados na agricultura, e algumas espécies exibem uma tolerância considerável a um único herbicida. Existem vários mecanismos por meio dos quais as plantas conseguem tolerar a exposição aos herbicidas:

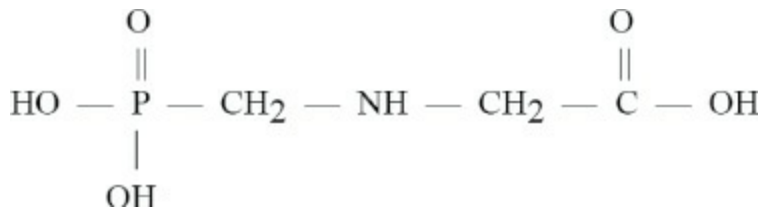
- A planta produz uma enzima que detoxifica o herbicida.
- A planta produz uma enzima-alvo alterada que não é afetada pelo herbicida.
- A planta produz barreiras físicas e fisiológicas para captar o herbicida e levá-lo para dentro de suas células e tecidos (OECD, 1999; Devine e Shukla, 2000).

As estratégias para criar plantas com tolerância a herbicidas concentram-se nos dois primeiros mecanismos. Os transgenes são introduzidos para expressar enzimas que detoxificam o herbicida ou para substituir a enzima intrínseca, alvo do herbicida por uma variante resistente à inibição.

Esta seção traz um resumo das informações disponíveis sobre a fonte dos genes utilizados para criar as plantas transgênicas tolerantes a herbicidas, a natureza das enzimas que esses genes codificam e o papel que elas desempenham no metabolismo desses vegetais. Não será discutida a profusão de informações disponíveis sobre os herbicidas ou o uso dos herbicidas na agricultura e em outras áreas. Os aspectos relativos à segurança alimentar das plantas transgênicas tolerantes a herbicidas não serão discutidos de modo extenso. Informações complementares sobre os aspectos não discutidos estão disponíveis em outras fontes, inclusive nas respectivas organizações governamentais que regulam o uso dos herbicidas.

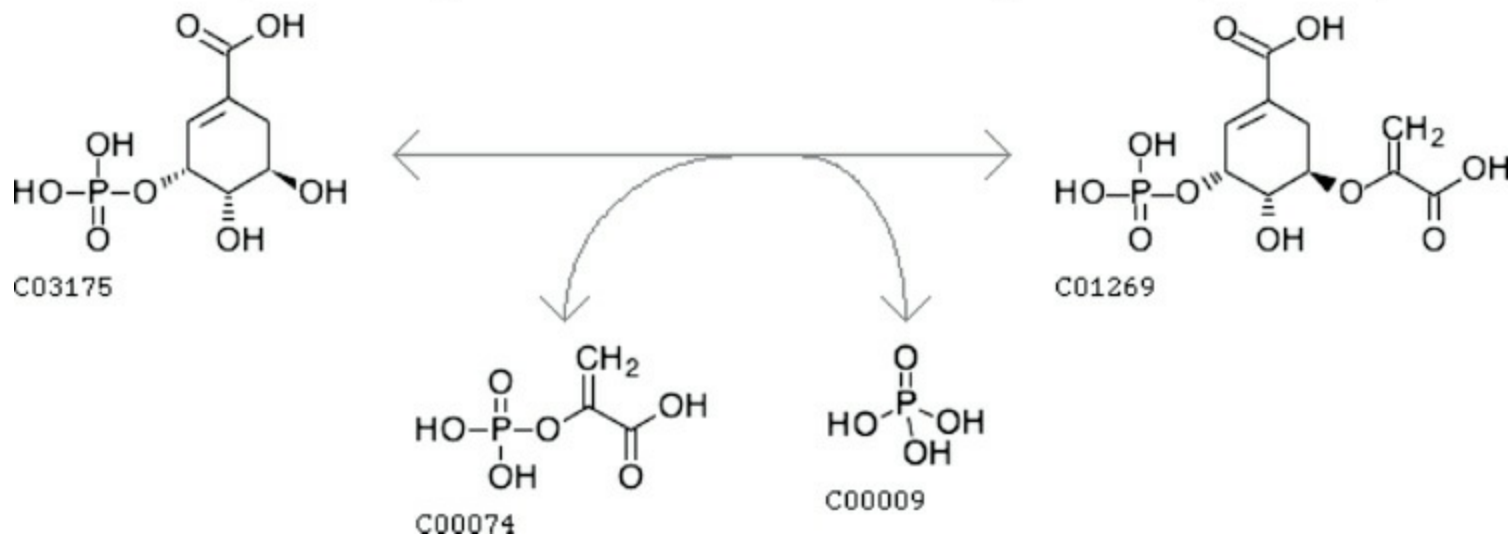
1. Tolerância ao herbicida glifosato

O glifosato (*N*-fosfonometil-glicina) é o agente controlador de plantas daninhas de amplo espectro mais utilizado, com toxicidade humana e ambiental mínima (Duke e Powles, 2008; Pollegioni *et al.*, 2011). Não é um produto natural – é obtido por síntese química – e é o ingrediente ativo do herbicida Roundup (Monsanto):



O glifosato é um inibidor competitivo reversível altamente específico da enzima ácido 5-enolpiruvil-3-fosfochiquímico sintase (EPSPS, EC 2.5.1.19), que catalisa a transferência da fração enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o 5-hidroxil do chiquimato 3-fosfato (S3P), para produzir o 5-enolpiruvil chiquimato 3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (KEGG R03460):

Fosfoenolpiruvato + Chiquimato 3-fosfato <=> Ortofosfato + 5-O-(1-Carboxivinil)-3-fosfochiquimato



Nessa reação, o glifosato compete com o ácido fosfoenolpirúvico, mas não inibe outras reações enzimáticas dependentes do ácido fosfoenolpirúvico. Essa reação constitui a sexta etapa da via do chiquimato que leva à síntese de aminoácidos aromáticos e de outros compostos aromáticos em plantas, fungos, bactérias e parasitas do grupo apicomplexa. O esquema apresentado a seguir (Figura 13.3) ilustra a via do chiquimato que leva à biossíntese de aminoácidos aromáticos e o modo de ação do glifosato na reação catalisada pela EPSPS (Pollegioni *et al.*, 2011):

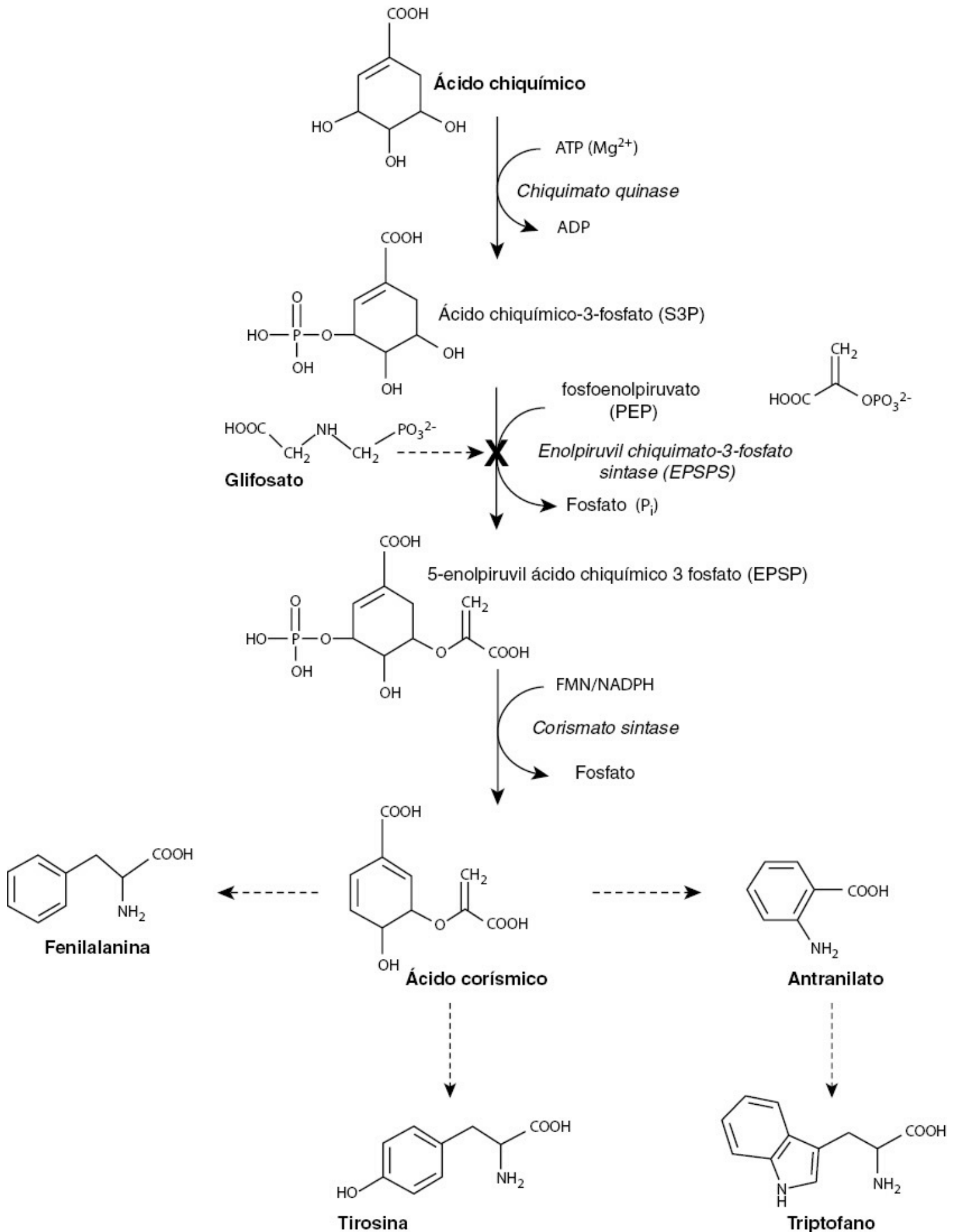


FIGURA 13.3 A via do chiquimato da biossíntese dos aminoácidos aromáticos e sua inibição pelo glifosato, que age sobre a enzima

enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase. Pollegioni *et al.* (2011).

Como consequência da inibição da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, a síntese proteica é interrompida, resultando na morte da planta (Kishore e Shah, 1988). Não foram encontrados ortólogos do gene EPSPS nos animais (Steinrucken e Amrhein, 1980).

A alta sensibilidade das plantas para cultivo ao glifosato limitou seu uso como herbicida pré-emergente, nas estratégias de manejo do plantio direto, e como herbicida e dessecante de plantas, quando aplicado um pouco antes da colheita. As técnicas de mutagênese e de seleção tradicionais falharam em produzir um nível útil de tolerância nas plantas para cultivo (OECD, 2010). Com o surgimento de plantas para cultivo geneticamente modificadas resistentes ao glifosato, esse herbicida pode ser aplicado depois que as plantas cultivadas e as plantas daninhas tenham emergido, com pouco ou nenhum dano na cultura (James, 2009).

Com base no conhecimento do modo de ação do glifosato, duas estratégias transgênicas importantes foram bem-sucedidas em conferir tolerância ao herbicida, isto é, em produzir plantas tolerantes ao glifosato: a introdução de uma enzima EPSPS tolerante ao glifosato e a introdução da enzima inativadora do glifosato – a glifosato oxidoreductase (GOX). As técnicas do DNA recombinante foram utilizadas para expressar genes que codificam apenas a enzima EPSPS tolerante ao glifosato, ou a combinação dos genes das enzimas EPSPS e GOX, nas plantas suscetíveis (Nida *et al.*, 1996; Padgett *et al.*, 1995; 1996).

2. Transgenes da 5-Enolpiruvil-3-Ácido fosfochiquímico sintase tolerante ao glifosato

O novo e revolucionário padrão de uso do glifosato começou em 1996, com a introdução de uma soja transgênica resistente ao glifosato, lançada e comercializada sob a marca Roundup Ready, nos Estados Unidos. Dois genes da enzima EPSPS, que proporcionam tolerância ao glifosato em nível de campo, foram introduzidos em cultivares comerciais.

A linhagem da bactéria *Agrobacterium sp.* CP4, isolada de uma coluna de resíduos de uma fábrica de glifosato, produziu uma enzima EPSPS resistente ao glifosato e cineticamente eficiente (a chamada CP4 EPSPS), apropriada para a obtenção de plantas transgênicas tolerantes ao glifosato. A enzima CP4 tem propriedades estruturais e cinéticas surpreendentes que a tornam única entre as EPSPSs conhecidas, sendo, por essa razão, considerada uma EPSPS prototípica da classe II (para mais informações, ver Pollegioni *et al.*, 2011). Uma característica intrigante é que sua atividade catalítica tem forte dependência de cátions monovalentes – em particular, do K^+ e do NH_4^+ . A falta do potencial inibidor ($K_i > 6$ mM) é atribuída, principalmente, à alanina (Ala)¹⁰⁰ e à leucina (Leu)¹⁰⁵ no lugar dos resíduos conservados glicina (Gly)⁹⁶ e prolina (Pro)¹⁰¹ da planta (Figura 13.4). A presença da Ala¹⁰⁰ na enzima CP4 não afeta a ligação do ácido fosfoenolpirúvico, mas o glifosato só consegue se ligar em uma conformação condensada, de alta energia e não inibidora. A sensibilidade ao glifosato é parcialmente restaurada pela mutação que troca a Ala¹⁰⁰ pela glicina, permitindo ao glifosato se ligar na conformação estendida, inibidora (Pollegioni *et al.*, 2011).

Quando a enzima EPSPS do *Agrobacterium* está presente em plantas transgênicas, ela satisfaz as necessidades de aminoácidos aromáticos da planta, na presença do glifosato, enquanto a versão dessa enzima encontrada em plantas (ubíqua na natureza) é sensível ao glifosato. A bactéria *Agrobacterium spp.* não é patogênica para humanos e animais, mas algumas espécies são patogênicas para plantas (Holt, 1984; Croon, 1996).

Recentemente, o gene da EPSPS do milho (*Zea mays*) foi submetido a mutações *in vitro* para a obtenção de uma enzima tolerante ao glifosato. Na versão tolerante da enzima – denominada mEPSPS – a treonina (Thr)¹⁰² é substituída pela isoleucina (Ile) e a prolina (Pro)¹⁰⁶ é substituída pela serina (Ser) (Monsanto, 1997). A localização dos aminoácidos alterados assemelha-se à situação observada na isoforma do *Agrobacterium* e, portanto, confere tolerância ao glifosato, por meio do mecanismo descrito na Figura 13.4.

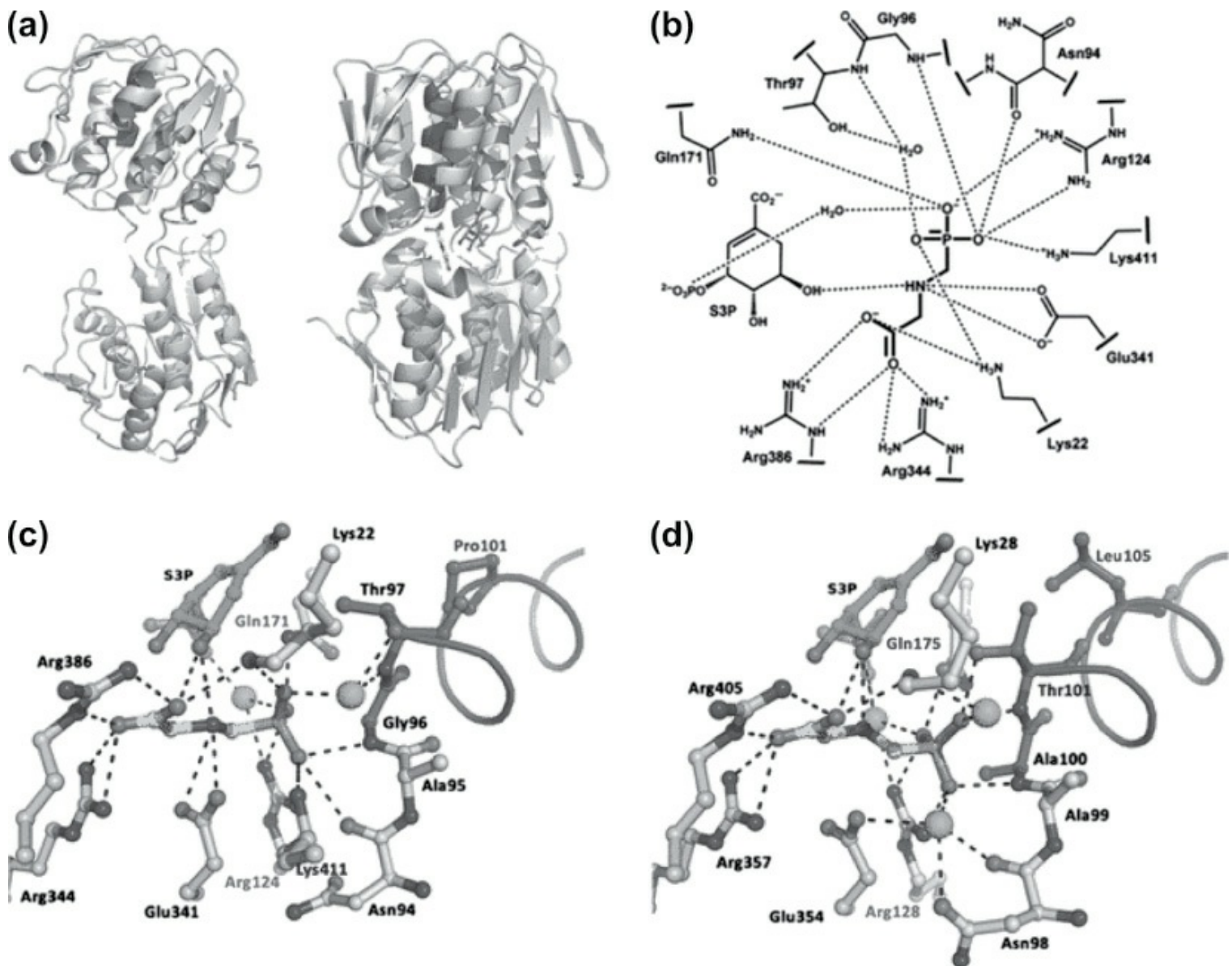


FIGURA 13.4 Modo de ação molecular do glifosato e base estrutural para a resistência ao glifosato. (a) Em seu estado livre de ligante, a 5-enolpiruvil-3-ácido fosfochiquímico sintase (EPSPS) apresenta conformação aberta (à esquerda; PDB: 1eps). A ligação do S3P induz na enzima uma grande mudança conformacional para o estado fechado, ao qual o glifosato ou o substrato PEP se liga (à direita; PDB: 1g6s). A figura mostra as respectivas estruturas cristalinas da enzima de *E. coli*. (b) Representação esquemática das possíveis ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o glifosato e os resíduos do sítio ativo, inclusive das pontes de moléculas de água, da EPSPS de *E. coli* (PDB: 1g6s). (c) Sítio de ligação do glifosato na EPSPS de *E. coli* (PDB: 1g6s). As moléculas de água estão representadas na forma de esferas e os resíduos conhecidos por conferir resistência ao glifosato depois da mutação são Pro¹⁰¹, Thr⁹⁷ e Gly⁹⁶. (d) Sítio de ligação do glifosato na CP4 EPSPS (PDB: 2gga). O arranjo espacial dos resíduos altamente conservados do sítio ativo é quase idêntico nas enzimas das classes I (*E. coli*) e II (CP4), com exceção de uma alanina na posição 100 (Gly⁹⁶ na *E. coli*). Outra diferença significativa é a substituição da Pro¹⁰¹ (*E. coli*) por uma leucina (Leu¹⁰⁵) na enzima CP4. Note a conformação condensada muito diferente do glifosato, como resultado do espaço reduzido determinado pela ligação da enzima CP4. Modificado de Pollegioni *et al.* (2011).

A enzima EPSPS é sintetizada no citoplasma e, em seguida, transportada para o cloroplasto (Kishore e Shah, 1988). A translocação da proteína para o cloroplasto é executada por uma sequência proteica *N*-terminal denominada peptídeo de trânsito para o cloroplasto. Os peptídeos de trânsito para o cloroplasto, normalmente, surgem da clivagem de uma proteína madura e são degradados após a transferência da enzima para o plastídio (Della-Cippa *et al.*, 1986). A sequência codificadora derivada da planta que expressa o peptídeo de trânsito para o cloroplasto, com frequência, está ligada a cada um dos genes que conferem tolerância ao glifosato. Esse peptídeo facilita a importação de enzimas recém-traduzidas para o interior dos cloroplastos – o local da via do chiquimato e, também, do modo de ação do glifosato (OECD, 2010).

A composição do cassete de expressão para a enzima CP4 EPSPS integrado à linhagem de beterraba-sacarina H7-1 ilustra os diferentes elementos genéticos necessários para a expressão e o direcionamento ótimos do

transgene. O cassete contém uma região de T-DNA que é delimitada por sequências nas extremidades esquerda e direita, e contém um único gene – o CP4 EPSPS – e elementos reguladores essenciais, necessários para a expressão nos cloroplastos da beterraba-sacarina. A organização do T-DNA, que corresponde a cerca de 3,4 kb, está representada na Figura 13.5 (FSANZ A525). O tamanho e a função de cada um dos elementos genéticos presentes no cassete de expressão estão na Tabela 13.2 (FSANZ A525).

TABELA 13.2 Tamanho e função dos elementos genéticos presentes no cassete de expressão para o gene CP4 EPSPS

Elemento genético	Tamanho (kb)	Descrição e referência
Extremidade direita	0,025	Sequência de nucleotídeos, com 21-25 pares de bases, que atua como ponto inicial da transferência do DNA para o interior das células vegetais. Ela foi inicialmente isolada do plasmídeo pTiT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
P-FMV	0,672	Promotor 35S do gene do vírus modificado do mosaico da escrofulária (FMV)
CTP2	0,31	Sequência N-terminal do peptídeo de trânsito para o cloroplasto da região codificadora EPSPS da <i>Arabidopsis thaliana</i>
CP4 EPSPS	1,363	Região codificadora da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) da linhagem de <i>Agrobacterium sp</i> CP4.
E93'	0,63	Extremidade 3' do gene <i>rbcS E9</i> de <i>Pisum sativum</i> , que contém sítios de poliadenilação que direcionam o processamento e a poliadenilação do mRNA
Extremidade esquerda	0,025	Sequência de nucleotídeos, com 21-25 pares de bases, que delimita o T-DNA de transferência para as células vegetais, originalmente isolado do plasmídeo pTi 15955, oriundo de <i>A. tumefaciens</i> , um derivado do plasmídeo do tipo octopina, pTIA6



FIGURA 13.5 Organização do cassete T-DNA para o gene da CP4 EPSPS integrado na linhagem H7-1 da beterraba-sacarina.

Para conseguir uma expressão eficaz do gene e a tradução eficiente das proteínas dos genes bacterianos inseridos em plantas, o uso dos códons precisa ser otimizado. Isso é feito com os códons do gene da EPSPS (da *Agrobacterium*) tolerante ao glifosato, por meio da síntese química do DNA, para a otimização dos códons nas plantas. A sequência dos aminoácidos das enzimas resultantes não é alterada. Nos cassetes de expressão, as sequências codificadoras dos genes normalmente estão ligadas a sequências reguladoras – tais como promotores, terminadores, intensificadores e íntrons – que também são otimizadas, visando a expressão no vegetal (Parrish *et al.*, 1995).

Durante o ciclo de vida das plantas tolerantes ao herbicida, a exposição da planta ao herbicida só ocorre raramente. Exceto pela produção da(s) enzima(s) que codifica(m) a tolerância ao glifosato, não deve haver outras mudanças no metabolismo da planta. Depois da aplicação do glifosato, as atividades enzimáticas expressas pelos transgenes capacitam a planta a sobreviver à exposição ao herbicida. No caso da EPSPS introduzida, nenhum produto metabólico novo é formado, já que a única diferença em relação à enzima natural é sua insensibilidade ao glifosato. No entanto, quando a expressão é muito alta, os teores dos metabólitos formados podem mudar (OECD, 1999).

A expressão da enzima EPSPS tolerante ao glifosato não é prejudicial para o crescimento da planta, já que essas culturas têm um desempenho agrônômico similar ao das plantas parentais. As agências reguladoras governamentais dos Estados Unidos (US Department of Agriculture, 1994; 1995; 1997), do Canadá (Agriculture and Agrifood Canada, 1995; 1996), do Japão (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1996) e da União Europeia (European Commission, 1998a; 1998b) decidiram que a presença da proteína EPSPS nas plantas não torna essas plantas perigosas para seus ambientes. Várias linhas de evidência corroboram a conclusão de que essas enzimas apresentam baixa toxicidade para os mamíferos:

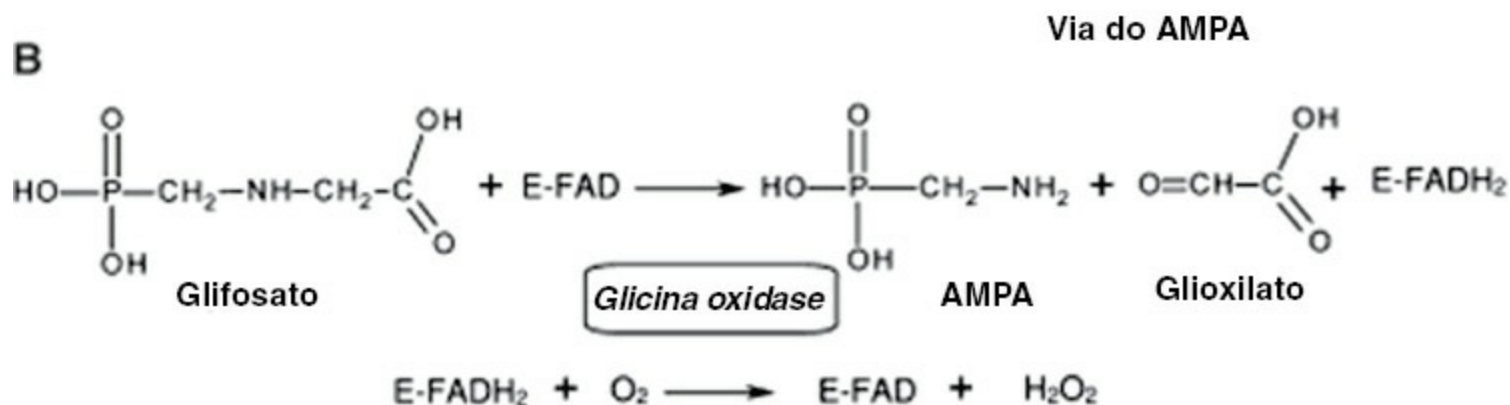
- Nenhuma das enzimas mostra homologia quanto a aminoácidos de alérgenos conhecidos ou toxinas para mamíferos.
- Os dados obtidos nos testes de toxicidade oral aguda com altas concentrações das enzimas não mostraram

nenhuma toxicidade (Harrison *et al.*, 1996). Nos testes de toxicidade oral aguda da proteína CP4 EPSPS derivada de bactéria não ocorreu nenhum efeito adverso na dose de 572 mg/kg de peso corporal dos animais testados.

- A enzima é rapidamente inativada pelo calor ou por condições de leve acidez; ela também foi rapidamente degradada em um ensaio de digestibilidade *in vitro*, o que é compatível com a falta de toxicidade oral (US EPA, 1996; 1997). Esses dados são compatíveis com a observação de que a maioria das enzimas não é considerada tóxica para os vertebrados (Kessler *et al.*, 1992).

3. Glifosato oxidorredutase

A glifosato oxidorredutase (GOX) catalisa a clivagem oxidativa da ligação carbono-nitrogênio situada perto da carboxila da molécula de glifosato. Como resultado, há a formação de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glioxilato, e desativação eficaz do substrato (herbicida) (Pollegioni *et al.*, 2011):



O gene que codifica a glifosato oxidorredutase foi isolado da linhagem *Achromobacter* LBAA, uma bactéria do solo ubíqua na natureza (Barry e Kishore, 1997). A GOX requer a presença de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e magnésio para agir; por isso, a designação apoenzima é mais apropriada.

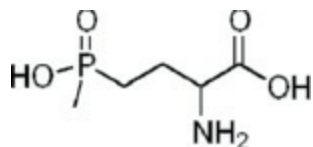
Para facilitar a expressão da GOX em plantas, a sequência gênica foi redesenhada para eliminar trechos com cinco – ou mais – G e C, regiões ricas em A+T que poderiam atuar como sítios de poliadenilação, ou regiões desestabilizadoras de RNA, e códons não encontrados com frequência em genes de plantas. Quando esse gene é transfetado para plantas, a expressão da GOX resulta em tolerância ao glifosato (Pollegioni *et al.*, 2011).

Não se espera que a presença da GOX cause algum impacto no metaboloma da planta, já que ela apenas converte o glifosato em AMPA e glioxilato, quando o herbicida glifosato é aplicado. Uma vez que o ácido aminometilfosfônico é um metabólito vegetal de ocorrência natural envolvido no ciclo do carbono, ele é ainda mais metabolizado, fornecendo intermediários para o ciclo de Krebs. A GOX é altamente específica para seu substrato – o glifosato; por isso, na ausência de glifosato, nenhum metabólito é esperado. A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos decidiu que apenas os resíduos do glifosato devem ser regulamentados nos produtos de origem vegetal e animal e que o principal metabólito do AMPA não tem importância toxicológica, independente de seu nível nos alimentos (US EPA, 1997). A expressão da GOX não é prejudicial para o crescimento da planta, visto que tais cultivos têm desempenho agrônômico similar ao das plantas parentais. A presença da proteína GOX nas plantas não torna essas plantas perigosas para o ambiente ou mesmo tóxicas para os mamíferos (US EPA, 1997).

4. Tolerância ao herbicida glufosinato

O glufosinato [fosfotricina; ácido DL-homoalanina-4-il(metil)fosfínico] é um aminoácido fosfínico racêmico

(Hoerlein, 1994):



Seu sal de amônio (glufosinato de amônio), amplamente utilizado como herbicida não seletivo, é ingrediente ativo de muitas fórmulas comerciais de herbicidas. O isômero L do glufosinato é um análogo estrutural do glutamato e, por isso, um inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase (GS) de bactérias e plantas. O isômero D não é um inibidor da glutamina sintetase e não tem ação herbicida (OECD, 2002).

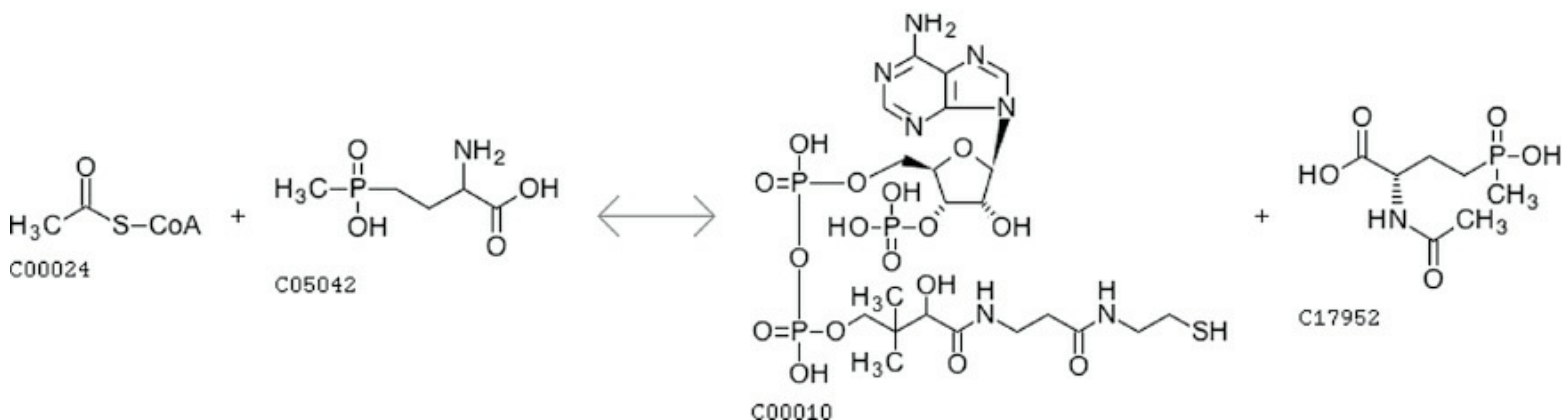
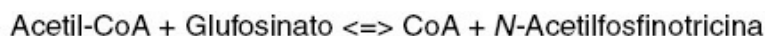
Por causa da inibição da glutamina sintetase, as células vegetais não tolerantes acumulam grandes quantidades de amônia tóxica produzida pela assimilação de nitratos e pela fotorrespiração (Tachibana *et al.*, 1986) e o nível de glutamina disponível cai (Sauer *et al.*, 1987). A lesão das membranas celulares e a inibição da fotossíntese são seguidas pela morte das células da planta. A ação do glufosinato depende das condições ambientais. Temperaturas abaixo de 10°C, bem como o estresse causado pela seca, reduzem a eficácia do herbicida, porque limitam a atividade metabólica da planta (OECD, 2002).

O glufosinato é um herbicida de contato absorvido, principalmente, pelas folhas da planta. Não ocorre captação pelas raízes, por causa, talvez, da degradação rápida do glufosinato por micro-organismos do solo. A translocação do glufosinato dentro da planta é limitada. Pesquisadores observaram que, após a aplicação de L-glufosinato, N-acetil-L-glufosinato e outros metabólitos em diferentes folhas, ocorrem um transporte preferencial para as folhas superiores e um nível baixo de translocação para as partes inferiores do vegetal, tanto nas plantas de tabaco geneticamente modificadas quanto naquelas não modificadas (Dröge-Laser *et al.*, 1994).

A atividade do glufosinato tem um amplo espectro, abrangendo espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Por causa de sua ação sistêmica limitada, não há um efeito duradouro sobre as plantas daninhas perenes. As plantas daninhas que emergem após a aplicação do herbicida não são afetadas (OECD, 2002).

5. Fosfinotricina acetiltransferase

A fosfinotricina acetiltransferase (EC 2.3.1.183) catalisa a acetilação da L-fosfinotricina (KEGG R08938):



As proteínas fosfinotricina acetiltransferases (PAT), codificadas pela sequência codificadora *bar*, oriunda do *Streptomyces hygroscopicus*, ou pela sequência codificadora *pat*, oriunda do *Streptomyces viridochromogenes*, estão presentes em variedades tolerantes ao glufosinato de amônio de diversas plantas, como milho, algodão, arroz, colza e soja. As enzimas PAT acetilam a L-fosfinotricina – isômero ativo do herbicida glufosinato de amônio – e, como resultado, as plantas transgênicas tornam-se tolerantes à aplicação pós-emergente do herbicida não seletivo

(Hérouet *et al.*, 2005).

O gene original *pat* do *S. hygroscopicus* foi ressintetizado para modificar o uso dos códons, a fim de obter uma expressão melhorada das proteínas nas células vegetais. Considerando-se a sequência de nucleotídeos, o gene sintético apresenta uma homologia de 70% com o gene original *pat*, oriundo do *S. viridochromogenes*. As sequências de aminoácidos da enzima PAT, codificada pelos genes original e sintético, são idênticas.

Utilizando as tecnologias do DNA recombinante, cada uma das sequências codificadoras – *bar* e *pat* – é fundida em um promotor e em um terminador apropriados para a expressão gênica no vegetal e introduzida no genoma da planta.

Muitas vezes, o gene *bar* está sob o controle do promotor da planta (*Pssu-Ara*), que direciona a expressão da PAT predominantemente nos tecidos verdes (folhas e caules). Por outro lado, em construções que envolvem o gene *pat* sintético, o promotor viral *P35S* é utilizado na expressão constitutiva da proteína PAT em todos os tecidos da planta.

Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glufosinato que expressam a enzima PAT, parece haver uma competição entre duas vias metabólicas:

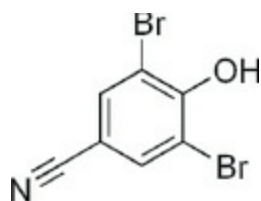
- A desaminação do glufosinato e a subsequente conversão do ácido 4-metilfosfínico-2-oxo-butanoico (PPO) em ácido 3-metilfosfínico-propiónico (MPP), ou em ácido 4-metilfosfínico-2-hidroxi-butanoico.
- A *N*-acetilação do L-glufosinato pela PAT (Dröge-Laser *et al.*, 1994). A segunda via predomina quando a atividade específica da PAT é relativamente alta (OECD, 2002).

Em todas as plantas tolerantes ao glufosinato, os principais resíduos metabólicos são o *N*-acetil-L-glufosinato, o glufosinato de amônio e o ácido 3-metilfosfínico-propiónico. Além desses resíduos, também foram identificados em cultivos de soja teores muito baixos de outros metabólitos, entre eles o ácido 2-metilfosfínico-acético (MPA) e o ácido 4-metilfosfínico-butanoico (MPB). O D-glufosinato que não tem ação herbicida parece ser estável nas plantas, como resultado da ação da enzima PAT que acetila, especificamente, a forma L (Dröge-Laser *et al.*, 1994).

As sequências codificadoras *pat* e *bar*, bem como suas respectivas proteínas PAT, não são tóxicas e não têm nenhuma das características associadas aos alérgenos alimentares. Existe um grau razoável de certeza de que a inclusão das proteínas PAT nos alimentos para humanos e animais não causa nenhum dano (Hérouet *et al.*, 2005).

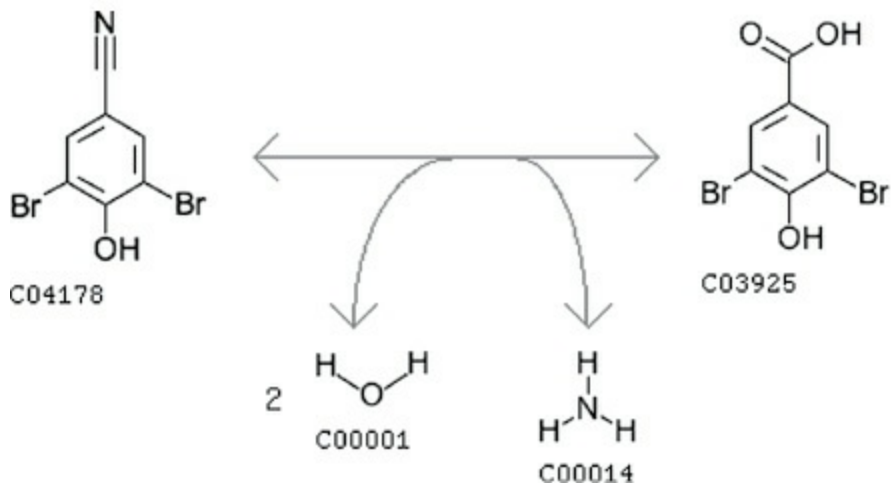
6. Tolerância ao herbicida bromoxinil

O bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrila) é um herbicida sistêmico de ampla utilização no controle pós-emergência de plantas daninhas anuais de folhas largas, principalmente mudas muito pequenas que crescem em culturas de cereais e azevém, em gramados e em terras não cultiváveis:



Muitas vezes, o bromoxinil é utilizado em combinação com outros herbicidas para ampliar o espectro de controle de plantas daninhas. Ele inibe o transporte de elétrons da fotossíntese e também desacopla a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, interrompendo, assim, a produção de energia e afetando de forma negativa a respiração do vegetal (EPA 738-R-98-013). A inibição do transporte de elétrons leva à produção de superóxido, que destrói as membranas celulares e inibe a formação de clorofila, resultando na morte da planta. Os ésteres dos ácidos octanoico e heptanoico do bromoxinil também são aplicados como herbicidas.

A bromoxinil nitrilase (EC 3.5.5.6) hidrolisa as ligações carbono-nitrogênio, com exceção das ligações peptídicas (KEGG R04349):



Essa degradação inativa de maneira eficaz o herbicida e possibilita à planta normalmente sensível ao bromoxinil sobreviver e crescer quando tratada com aplicações desse herbicida.

A bromoxinil nitrilase é codificada pelo gene *oxy* da bactéria do solo *Klebsiella pneumoniae* subsp. *oxaenae* (Stalker e McBride, 1987). Quando integrado a um cassete de expressão e transferido para plantas, o gene, por meio da proteína codificada por ele, confere tolerância à família oxinil de herbicidas, a qual inclui o bromoxinil e o ioxinil.

Em um cassete de expressão típico, o gene *oxy* é flanqueado por sequências específicas, como encontrado no pBrx75, responsável pela característica nas linhagens de algodão BXN (FSANZ A379) (Figura 13.6, Tabela 13.3).

A região do promotor 35s do vírus do mosaico da couve-flor assegura que a tradução tenha uma iniciação forte. A região não traduzida 3' do gene *tml* de *A. tumefaciens* contém sinais para a terminação da transcrição e direciona a poliadenilação. O gene *nptII* codifica a neomicina fosfotransferase do transposon Tn5 de *Escherichia coli* e confere resistência aos antibióticos canamicina e neomicina. Ele é utilizado como marcador de seleção na transformação de plantas (Tabela 13.3).

F. Esterilidade masculina: o sistema dos genes *barstar* e *barnase*

A esterilidade de cultivos transgênicos pode ser regulada por meio da expressão seletiva de dois genes, denominados *barnase* e *barstar*, que controlam o desenvolvimento do pólen.

O gene *barnase* codifica a enzima barnase, uma ribonuclease derivada do *Bacillus amyloliquefaciens* que interrompe a produção de RNA. Quando o gene *barnase* é expresso seletivamente na camada de células tapetais da antera – uma camada de células que desempenha um papel nutritivo vital durante a formação do pólen – ele destrói a camada de células tapetais, tornando as anteras incapazes de produzir grãos de pólen viáveis. A incapacidade para produzir grãos de pólen viáveis torna a planta masculina estéril e possibilita o controle seguro da polinização (FDA BNF N. 000031).

A fertilidade é restaurada pela expressão do gene *barstar*, que também provém do *B. amyloliquefaciens* e codifica um inibidor da proteína barnase. Quando a proteína barnase é expressa nas células tapetais, esse inibidor leva à restauração da fertilidade ao se ligar fortemente à enzima barnase, inativando-a. A coexpressão é obtida pelo cruzamento tradicional de duas linhagens de cultivo isoladas, cada uma com um dos genes. As linhagens de plantas que expressam o gene *barstar* são conhecidas como restauradoras da fertilidade.

Assim, o sistema híbrido consiste no cruzamento de uma linhagem masculina estéril (parental feminino) com uma linhagem específica restauradora da fertilidade e no surgimento de descendentes férteis. O principal objetivo dessas modificações é a produção de uma série de linhagens parentais, com desempenho agrônomico superior, que devem ser utilizadas em um sistema de reprodução para a formação de híbridos que produzem quantidades significativamente maiores de sementes (FSANZ A372).

G. Plantas com resistência a vírus patógenos

Os vírus que afetam plantas causam perdas significativas na agricultura, demonstradas principalmente pelos efeitos de alguns vírus simples em um hospedeiro específico de uma região geográfica particular (para mais informações, consultar Bos, 1982; Waterworth e Hadidi, 1998). Por exemplo, estima-se que o impacto anual global do vírus TSWV (*tomato spotted wilt virus*) e dos vírus que causam a doença do mosaico africano da mandioca, que têm uma importância agrônomicamente excepcional, seja próximo de US\$1 bilhão cada (Taylor *et al.*, 2004).

O conceito de resistência derivada de patógenos (PDR) oferece uma nova abordagem para o desenvolvimento de plantas para cultivo resistentes a vírus. A resistência é criada em hospedeiros susceptíveis, por meio da introdução de sequências de DNA, codificadoras ou não codificadoras, oriundas do genoma de um patógeno (Sanford e Johnston, 1985). Com relação aos vírus que afetam plantas, o conceito de resistência derivada de patógenos foi validado pela primeira vez com o desenvolvimento de um tabaco que expressava a proteína da capa do vírus do mosaico do tabaco (TMV), o que levou a uma redução da infecção ou até a aboliu (Powell Abel *et al.*, 1986). Essa descoberta inovadora preparou o terreno para a criação de numerosas plantas transgênicas resistentes a vírus, inclusive para horticultura. As plantas para cultivo que expressavam elementos genéticos virais foram testadas com sucesso no campo e algumas foram comercializadas. A utilização das plantas transgênicas resistentes a vírus tornou-se uma estratégia importante para o controle eficaz e sustentável das principais doenças virais (Gottula e Fuchs, 2009).

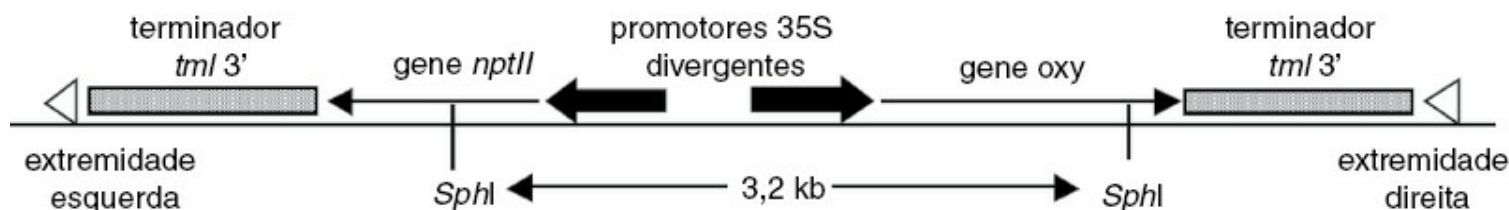


FIGURA 13.6 Cassete de expressão pBrx75 que confere resistência ao bromoxinil.

TABELA 13.3 Descrição dos elementos do cassete de expressão pBrx75 que confere resistência ao bromoxinil

Elemento genético	Fonte	Função
promotor 35S	Região do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV)	Promotor para alta expressão constitutiva em tecidos vegetais
oxy	Gene isolado da <i>Klebsiella pneumoniae</i> subespécie <i>oxaenae</i> , que codifica a enzima nitrilase	Inativa o herbicida bromoxinil e confere tolerância ao bromoxinil quando expresso em plantas
tml 3'	Região não traduzida 3' do gene <i>tml</i> do plasmídeo pTiA6 do <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Contém os sinais para a terminação da transcrição e direciona a poliadenilação
nptII	Gene que codifica a neomicina fosfotransferase II do transposon Tn5 de <i>Escherichia coli</i>	Confere resistência aos antibióticos canamicina e neomicina. Utilizado como marcador de seleção na transformação de plantas

1. Mecanismo da resistência das plantas a vírus patógenos

A resistência a numerosos vírus que atacam plantas foi criada inicialmente com o uso de genes da proteína da capa dos vírus, depois da descoberta de que o tabaco transgênico que expressava o gene da proteína da capa do vírus

TMV exibia resistência à infecção (Powell Abel *et al.*, 1986; Register e Beachy, 1988; Prins *et al.*, 2008; Tepfer, 2002). No entanto, demonstrou-se também que outras sequências virais, como o domínio de transleitura (*readthrough*) da RNA polimerase dependente de RNA do TMV, induzem resistência (Golembowski *et al.*, 1990), bem como proteína de transporte (Malysenko *et al.*, 1993), proteinase (Maiti *et al.*, 1993; Vardi *et al.*, 1993), RNA satélite (Gerlach *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1987), RNA interferente defeituoso (Kollar *et al.*, 1993) e regiões não codificadoras 5' (Stanley *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1987) e 3' (Zaccomer *et al.*, 1993). Logo se tornou evidente que quase todos os elementos genéticos virais poderiam ser utilizados para conferir resistência a uma infecção viral em plantas (Gottula e Fuchs, 2009).

O produto proteico viral do transgene não é necessário para a resistência criada geneticamente, mas existe uma correlação inversa entre a expressão do transgene e a resistência a uma infecção viral (Dougherty *et al.*, 1994). Por isso, a sequência do mRNA é responsável pelo fenótipo da resistência, e não a proteína em si (Gottula e Fuchs, 2009), e a maioria dos fenômenos de resistência derivada de patógenos parece funcionar por meio de mecanismos mediados pelo RNA (Baulcombe, 2007; Eamens *et al.*, 2008; Prins *et al.*, 2008; Voinnet, 2008). Foi proposto que as atividades da RNA polimerase dependente de RNA e da RNase de fita dupla nos vegetais fossem parte do mecanismo da resistência, ao produzirem, a partir dos RNAs do transgene, um RNA curto com 10 a 20 nucleotídeos de comprimento e sequência complementar à do RNA a ser degradado (Lindbo *et al.*, 1993). Esses RNAs curtos direcionariam RNAs específicos rumo à degradação pela atividade de uma dsRNase (Dougherty e Parks, 1995). Esses achados prepararam o terreno para a descoberta do silenciamento do RNA como um poderoso mecanismo de defesa contra vírus que atacam plantas (Baulcombe, 2004; 2007; Eamens *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2007; Prins *et al.*, 2008; Voinnet, 2001; 2005; 2008; Waterhouse *et al.*, 1999; 2001).

O silenciamento do RNA se inicia pelas estruturas do RNA de fita dupla (dsRNA), que são idênticas às do RNA a ser degradado (Waterhouse *et al.*, 1998). Ele se associa à produção de 21-25 pares de nucleotídeos, denominados RNAs interferentes pequenos (siRNAs) (Hamilton e Baulcombe, 1999; Hamilton *et al.*, 2002). A ação de uma endonuclease, conhecida como *Dicer*, sobre os precursores do dsRNA dá origem aos siRNAs, que são incorporados e convertidos em RNAs de fita única (ssRNAs) em um complexo de silenciamento induzido por RNA, denominado RISC (*Argonaute-containing ribonuclease complex*), que direciona o RNA para a clivagem (Deleris *et al.*, 2006; Hannon, 2002; Obbard *et al.*, 2009; Voinnet, 2001; 2005; 2008). O trabalho pioneiro de Baulcombe e Waterhouse, e seus respectivos colegas, mostrou que o silenciamento do RNA é uma resposta inata e potente da planta a uma infecção viral e um exemplo natural do conceito de resistência a vírus derivada de patógenos (Gottula e Fuchs, 2009).

2. Comercialização de plantas transgênicas resistentes a vírus

a. Abóbora summer resistente a vírus

Em 1994, a abóbora *summer*, que expressa o gene da proteína da capa do vírus do mosaico amarelo da abobrinha e do vírus do mosaico da melancia, foi considerada sem restrições nos Estados Unidos e liberada para o comércio, logo em seguida. Esse foi o primeiro cultivo transgênico resistente a doenças a ser comercializado nos EUA. Diferentemente da abóbora convencional, as plantas da linhagem ZW-20 continuavam vigorosas após terem sido expostas ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha e ao vírus do mosaico da melancia, transmitidos por um afídeo, e produziam frutos comercializáveis. A abóbora *summer* que expressa o gene da proteína da capa do vírus do mosaico do pepino, do vírus do mosaico da melancia e do vírus do mosaico amarelo da abobrinha foi desregulamentada e comercializada, em 1996. Na sequência, numerosos tipos e cultivares de abóbora foram desenvolvidos, por meio de cruzamentos e retrocruzamentos com as duas linhagens inicialmente desregulamentadas. Atualmente, há cinco cultivares de abobrinha e seis cultivares de abóboras amarelas de pescoço reto ou curvado para os quais as combinações de resistência ao vírus do mosaico amarelo da abobrinha e ao vírus

do mosaico da melancia, ou de resistência aos três vírus, estão disponíveis (Gottula e Fuchs, 2009).

Nos Estados Unidos, a adoção de cultivares de abóbora *summer* resistente a vírus aumentou gradualmente, desde 1996. Em 2006, a taxa de adoção foi estimada em 22% (3.250 ha), e o lucro dos agricultores foi estimado em US\$24 milhões (Gottula e Fuchs, 2009).

b. Mamão resistente a vírus

O mamão que expressa o gene da proteína da capa do vírus da mancha anelar do mamão foi desregulamentado, em 1998, e comercializado no Havaí. O vírus da mancha anelar do mamão (PRSV) é um fator limitante importante para a produção de mamão, no Havaí e ao redor do mundo. Depois de muitos testes experimentais, o mamão resistente ao vírus da mancha anelar do mamão foi liberado para o comércio, em 1998, quando a devastação causada pelo vírus atingiu proporções recordes, na principal região produtora do arquipélago (Gonsalves, 1998). O impacto do mamão resistente ao vírus da mancha anelar do mamão sobre a indústria mamoeira do Havaí foi evidenciado por sua rápida taxa de adoção. Em 2000, a primeira onda de mamão transgênico deu frutos em mais de 42% do total de acres (Johnson *et al.*, 2007). A retomada das colheitas de frutas reativou as empresas de embalagem e processamento pós-colheita (*packing houses*) do mamão e proporcionou um impacto de US\$4,3 milhões, no decorrer de um período de seis anos (Gottula e Fuchs, 2009). Em 2006, os cultivares de mamão transgênico foram plantados em mais de 90% da área total destinada ao mamão, no Havaí (780 ha de um total de 866 ha) (Johnson *et al.*, 2007).

Outro mamão resistente ao vírus PRSV foi desregulamentado por dois dos três órgãos reguladores de biotecnologia dos Estados Unidos. A linhagem X17-2 difere do mamão havaiano previamente desregulamentado, porque expressa o gene da proteína da capa do vírus da mancha anelar do mamão isolado na Florida, sendo adequada para cultivo nessa região (Davis, 2004). O Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Serviço de Inspeção da Saúde Pública e Animal (APHIS) e o FDA consideraram a variedade de mamão X17-2 desregulamentada, ou autorizada (Shea, 2009).

c. Batata resistente a vírus

Duas linhagens de batatas resistentes a vírus foram desregulamentadas, em 1998 e 2000, nos Estados Unidos. Depois das tentativas fracassadas de criar uma linhagem de batatas resistentes ao vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV), por meio da expressão do gene da proteína da capa viral, conseguiu-se criar linhagens que expressavam um gene da replicase do vírus PLRV. Essas linhagens foram testadas em campo, desregulamentadas e, em seguida, comercializadas (Kaniewski e Thomas, 2004). Posteriormente, essa resistência foi vinculada a um gene *Bt* sintético que conferia resistência ao besouro da batata do Colorado. Outro cultivar de batatas foi desenvolvido, por meio da adição do gene da proteína da capa do vírus PLRV. Embora muitos agricultores do noroeste do Pacífico, do centro-oeste dos Estados Unidos e do Canadá estivessem plantando batata transgênica sem nenhum registro de quebra de resistência ou de impacto prejudicial sobre o ambiente ou a saúde humana, as batatas resistentes ao vírus foram retiradas do mercado, após o período de cultivo de 2001, por causa da relutância de vários processadores e exportadores de grande porte em adotar esses produtos (Kaniewski e Thomas, 2004).

A variedade resistente ao vírus PLRV, denominada batata New Leaf Plus, foi criada geneticamente para expressar a proteína Cry3a, oriunda do *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (*B.t.t.*) e o gene *orf1/orf2*, oriundo do vírus PLRV. O mecanismo da resistência conferida pelo gene *orf1/orf2* ainda não foi bem esclarecido. As hipóteses levantadas para a inibição da multiplicação viral incluem:

- Inibição induzida por proteínas (multiplicação viral inibida pelas três proteínas que poderiam ser codificadas pelo gene *orf1/orf2*).

- Inibição induzida pelo RNA.

A ideia de uma inibição induzida por proteínas como mecanismo de ação do gene *orf1/orf2* é questionável, porque não há evidências conclusivas de que alguma dessas possíveis proteínas codificadas pelo gene *orf1/orf2* seja expressa.

d. Ameixa resistente a vírus

Em 7 de maio de 2010, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos registrou o produto pesticida C5 HoneySweet Plum, que contém o novo *ingrediente ativo protetor incorporado à planta* (PIP) – o gene da proteína da capa do *vírus pox da ameixa* (CPG-PPV) (EPA 2010 PC Code: 006354).

O *vírus pox da ameixa* (PPV) é um vírus que afeta plantas e reduz a qualidade dos frutos com caroço; com o tempo, as árvores infectadas tornam-se incapazes de produzir frutos. Esse vírus foi descrito pela primeira vez em 1915, na Europa, sendo considerado o causador da mais devastadora doença viral dos frutos com caroço. O vírus PPV também é encontrado nos Estados Unidos e no Canadá. Surtos recentes em Nova York e no Michigan revelaram que o vírus PPV está se tornando endêmico, apesar das medidas de contenção (remoção da terra e eliminação da vegetação infectada, interrupção temporária do movimento/transporte de materiais vegetais infectados e controle dos insetos vetores).

O vírus PPV é uma praga agrícola que causa perdas econômicas significativas para a indústria dos frutos com caroço. Os principais efeitos da infecção são a redução da qualidade dos frutos e da produtividade do cultivo. Os frutos com caroço (inclusive espécies de *Prunus* nativas ou selvagens) que são afetados pelo vírus PPV incluem as ameixas, os pêssegos, as amêndoas, as nectarinas, os damascos e as cerejas doces e azedas. Muitas outras plantas dicotiledôneas não pertencentes ao gênero *Prunus* já foram infectadas em condições experimentais.

Quando o vírus PPV infecta uma planta, seu material genético (uma fita única de RNA) é introduzido nas células da planta. Essa fita de RNA contém os genes necessários para produzir novos vírions. Um desses genes codifica a proteína da capa do vírus PPV: o gene CPG-PPV. A célula infectada produz a proteína da capa do vírus do mesmo modo como produz suas próprias proteínas. O RNA que codifica a proteína da capa do vírus é traduzido nas sequências de aminoácidos que constituem a proteína. Durante a multiplicação do vírus, ocorre a produção de segmentos de dsRNA e, no fim, formam-se cópias exatas do cromossomo de RNA de fita única original do vírus, que são acondicionadas junto com as proteínas da capa viral no interior dos novos vírions PPV. Durante o processo, formam-se pequenos segmentos de dsRNA, que são reconhecidos por um mecanismo de defesa da planta hospedeira, o silenciamento gênico pós-transcricional. Esse mecanismo bloqueia a transcrição, bem como a produção de proteínas e RNA virais. Essa sequência de eventos resulta no desenvolvimento da resistência natural a futuras infecções pelo vírus PPV, mas não antes da degradação dos frutos, da clorose das folhas e de outros danos graves causados pelo vírus terem ocorrido (EPA 2010 PC Code: 006354).

As ameixeiras não infectadas podem ser geneticamente modificadas para expressar o gene CPG-PPV. Como o gene CPG-PPV é responsável por apenas um dos componentes necessários para a produção de novos vírions, essas ameixeiras modificadas não conseguem produzir o vírus. O Serviço de Pesquisa Agrícola do Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) desenvolveu uma ameixeira geneticamente modificada, denominada C5 HoneySweet Plum (C5 ou ameixa C5), que expressa o gene CPG-PPV e é resistente à infecção pelo vírus PPV. Para criar a ameixa C5, o gene CPG-PPV foi isolado e inserido no genoma da ameixa, na forma de um transgene. Durante os processos celulares de ocorrência natural da planta, ocorre a transcrição do gene CPG-PPV transgênico. O mRNA, copiado dos genes das proteínas da capa viral que foram inseridos, forma regiões anormais de dsRNA, e o mecanismo resistente ao vírus derivado do patógeno reconhece a anormalidade, destruindo os segmentos que exibem a mesma sequência. Esse processo determina a capacidade da planta de responder rapidamente a uma infecção pelo vírus PPV, bloqueando a produção de novos vírions e a disseminação da doença (EPA 2010 PC

Code: 006354).

O ingrediente ativo do cassete inserido é um derivado da transcrição reversa do RNA da proteína da capa viral, que é inserido com uma região não traduzida 3' e um códon de iniciação unido a uma sequência líder curta e a um terminador NOS, oriundo de *A. tumefaciens*, sob a direção do promotor 35s do vírus CaMV. Há uma cópia completa do gene PPV-CP, um pequeno fragmento do promotor 35s do gene PPV-CP em outro inserto e um terceiro inserto, que é uma cópia 3'-3' cauda a cauda do gene PPV-CP com o promotor 35S para cada cópia e uma porção da sequência GUS flanqueando cada cópia do gene PPV-CP. O inserto é flanqueado pelo DNA da ameixa.

e. Possíveis questões de segurança alimentar das plantas transgênicas resistentes a vírus

Como os ácidos nucleicos são universais nos organismos vivos, as únicas moléculas novas que se espera encontrar nas plantas transgênicas resistentes a vírus, e que poderiam causar algum impacto sobre a segurança alimentar, são as proteínas sintetizadas pelos transgenes. Do ponto de vista prático, trata-se principalmente das proteínas da capa do vírus, já que a grande maioria das plantas transgênicas resistentes a vírus desenvolvidas até o momento e todas as plantas transgênicas resistentes a vírus – com exceção de uma – que foram desregulamentadas ou autorizadas para liberação comercial em grande escala expressam transgenes das proteínas da capa viral. Argumenta-se que há muito tempo as proteínas da capa do vírus são consumidas, pois elas estão nos alimentos compostos por plantas não transgênicas infectadas pelo vírus ingeridos com regularidade. Assim, embora possam ser codificadas por um transgene, as proteínas da capa são, na realidade, elementos comuns das dietas humana e animal (Prins *et al.*, 2008), e não há evidências de efeitos adversos relacionados com o consumo de cultivares de abóbora e mamão resistentes a vírus atualmente desregulamentados (Fuchs e Gonsalves, 2007).

Os transgenes que não expressam nenhuma proteína, como no caso daqueles utilizados nos métodos de silenciamento pós-transcricional de genes e do microRNA artificial, não devem, em teoria, suscitar esse tipo de questão (Fuchs e Gonsalves, 2007).

A presença de marcadores da resistência a antibióticos nas plantas transgênicas resistentes a vírus parece não apresentar riscos para a saúde. O mamão transgênico resistente ao *vírus da mancha anelar do mamão* contém dois dos genes marcadores de seleção para a resistência a antibióticos, *nptII* e *gus*, e o consumo de milhões de quilogramas de mamões transgênicos, nos últimos anos, não forneceu nenhuma evidência de comprometimento da segurança. Postula-se que a utilidade do gene *nptII* supera, de longe, quaisquer riscos que poderiam advir de sua presença em plantas transgênicas (Fuchs e Gonsalves, 2007).

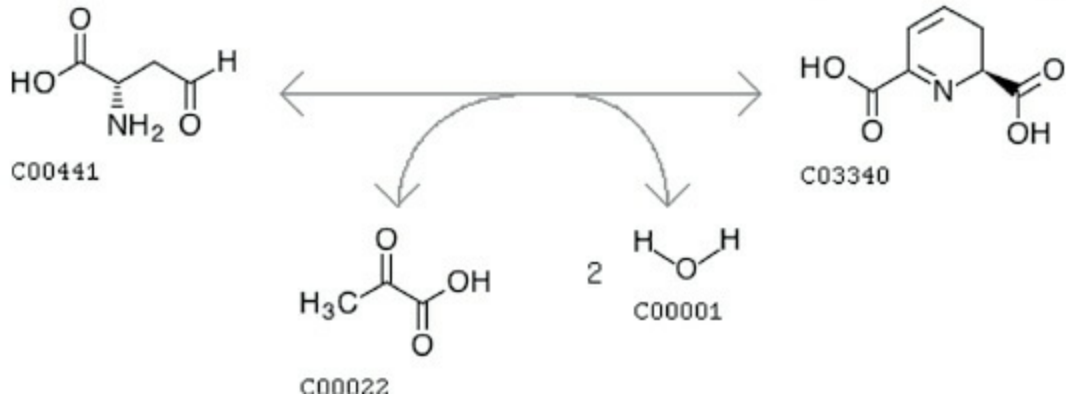
3. Perfis nutricionais alterados em plantas transgênicas

a. Milho com alto teor de lisina

O milho não contém uma quantidade significativa de lisina quando comparado a outras fontes alimentares. As dietas convencionais, baseadas em milho e soja, destinadas a suínos e galináceos são, por característica, deficientes em lisina e requerem sua adição para que o crescimento e o desempenho dos animais sejam ótimos. Por isso, pesquisadores desenvolveram uma variedade de milho geneticamente modificada que apresenta níveis mais altos de lisina no grão. Essa variedade de milho é utilizada para alimentação humana e animal.

A di-hidroipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52) é a enzima-chave da biossíntese da lisina (Figura 13.7). Essa enzima cliva as ligações carbono-oxigênio da reação apresentada a seguir (KEGG R02292):

L-Aspartato 4-semialdeído + Piruvato \rightleftharpoons L-2,3-Di-hidro-dipicolinato + 2 H₂O



O gene *cordapA*, oriundo de *Corynebacterium glutamicum*, que codifica a enzima bacteriana di-hidro-dipicolinato sintase, foi incorporado ao milho. A variedade de milho resultante é conhecida como LY038 ou “MAVERA HVC com lisina” (HVC significa *high-value corn*, ou milho de alto valor). A enzima bacteriana DHDPS, diferentemente da enzima vegetal DHDPS, não é sensível à inibição pela lisina por retroalimentação; assim, a biossíntese da lisina continua, ainda que na presença de altos teores de lisina livre (FSANZ A549).

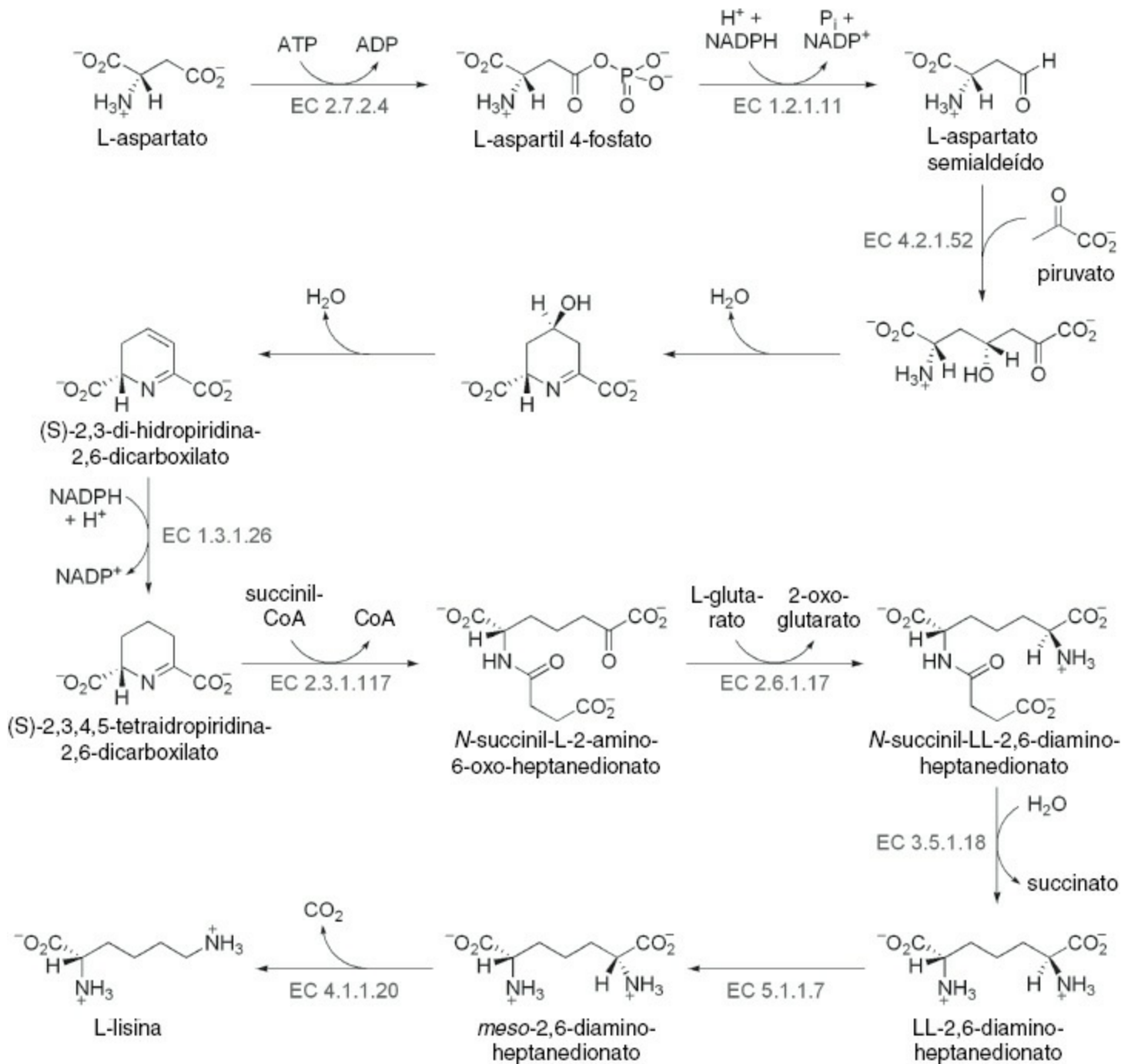


FIGURA 13.7 Via da biossíntese da lisina. No milho, uma enzima-chave da via, a di-hidrodipicolinato sintase (EC 4.2.1.52) é inibida pela lisina por retroalimentação. Quando uma di-hidrodipicolinato sintase não sensível adicional, oriunda de *Corynebacterium glutamicum*, é expressa no milho, o teor de lisina cresce. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lysine_Biosynthesis.png.

A modificação genética elevou, de fato, os teores de lisina no milho; no entanto, quando o milho LY038 é comparado com seu controle, observa-se que quatro aminoácidos estão bastante reduzidos e, com exceção do ácido glutâmico, os demais são aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina e fenilalanina). Contudo, demonstrou-se que, quando comparadas aos valores do milho convencional, as reduções desses aminoácidos permanecem dentro da variação normal observada no grão de milho.

A variedade de milho LY038 com alto teor de lisina é destinada, principalmente, para uso em campo para alimentação animal. Alguns dos produtos alimentícios com ingredientes derivados da linhagem LY038 de milho, no caso de uma co-mistura inadvertida, poderiam ser: margarina, óleo de cozinha e gorduras para cocção e fritura; diversos adoçantes com quantidades elevadas de frutose, dextrose e maltodextrinas; grãos de milho; partículas em flocos, de uso quase exclusivo na fabricação de flocos de milho; partículas finas, utilizadas pelas indústrias de salgadinhos, cereais matinais e cerveja; partículas grossas, utilizadas como alimento no café da manhã; farinha de

milho; produtos à base de milho seco e moído, utilizados como substratos na fabricação da cerveja; e partículas e grãos de milho inteiros, utilizados na produção de diversas bebidas alcoólicas destiladas. Como consequência da alteração nos níveis de lisina, há também a possibilidade de ocorrerem reações de Maillard diferentes, que podem tornar a lisina indisponível, por meio da formação de complexos.

O gene *cordapA* bacteriano está sob o controle do promotor do gene da globulina 1 (*Glb1*) do milho, que, no milho selvagem, direciona a expressão da proteína específica para embriões mais abundante do grão. A utilização do promotor do gene *Glb1* na transcrição do gene *cordapA* resulta na expressão da enzima bacteriana DHDPS (cDHDPS) e no acúmulo de lisina, de modo predominante, na porção germinativa do grão. Depois do promotor, há uma sequência íntron, oriunda do gene da actina 1 do arroz, o íntron rAct1, que intensifica a transcrição do DNA. O gene *cordapA* é precedido pelo peptídeo de trânsito da enzima di-hidrodipicolinato sintase (mDHDPS CTP) do cloroplasto de *Zea mays*, que transloca a enzima cDHDPS para o interior do plastídio, onde ocorre a maior parte da biossíntese dos aminoácidos. Depois do gene *cordapA*, está a região não traduzida 3' do gene da globulina 1; essa região contém o sinal da poliadenilação que direciona a terminação e a maturação do transcrito do gene *cordapA* (FSANZ A549) (Figura 13.8).



FIGURA 13.8 Organização do cassete T-DNA para o gene *cordapA*, oriundo de *Corynebacterium glutamicum*; esse gene codifica a enzima bacteriana di-hidrodipicolinato sintase. Esse cassete é integrado ao genoma do milho para intensificar a biossíntese da lisina, com promotor *Glb1*: promotor da globulina 1 de *Zea mays*; íntron de *Act1*: íntron do gene da actina 1 do arroz; DHDPS CTP: peptídeo de trânsito para o cloroplasto da di-hidrodipicolinato sintase de *Zea mays*, que direciona o produto gênico para o plastídio; *cordapA*: gene que codifica a di-hidrodipicolinato sintase do *Corynebacterium glutamicum*; *Glb1* 3'UTR: região não traduzida 3' para terminar a transcrição.

III. MICRO-ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS E PRODUTOS DERIVADOS DESTINADOS A USO ALIMENTAR

Micro-organismos geneticamente modificados (MGMs) são encontrados em alimentos, fazem parte da produção desses ou são aditivos. Esses micro-organismos podem ser arquea, bactéria ou eucarioto. Os eucariotos incluem fungos filamentosos, leveduras, protozoários e microalgas. Como a manipulação genética dos micro-organismos é fácil, existe uma grande diversidade de MGMs e seus produtos em alimentos. A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2011) define quatro categorias:

- Categoria 1: Compostos purificados quimicamente definidos e suas misturas, dos quais tanto MGMs quanto genes recém-introduzidos foram removidos (por exemplo, aminoácidos, vitaminas).
- Categoria 2: Produtos complexos, nos quais tanto os MGMs quanto genes recém-introduzidos não estão mais presentes (por exemplo, extratos de células, a maioria das preparações enzimáticas).
- Categoria 3: Produtos derivados de MGMs nos quais os MGMs capazes de multiplicação ou de transferência de genes não estão presentes, mas os genes recém-introduzidos ainda estão presentes (por exemplo, culturas iniciadoras [*starter*] inativadas pelo calor).
- Categoria 4: Produtos que consistem em MGMs ou que contêm MGMs capazes de multiplicação ou de transferência de genes (por exemplo, culturas iniciadoras vivas para alimentos fermentados, destinados a humanos e animais).

As diferentes categorias mostram a natureza complexa dos produtos elaborados com a tecnologia recombinante, os quais variam de um único composto isolado, produzido por um MGM, a culturas puras de MGMs viáveis. Os aminoácidos e as vitaminas, que foram purificados por cristalização, representariam exemplos de uma das extremidades desse espectro, e as culturas de micro-organismos utilizadas na alimentação, como os

probióticos ou as culturas iniciadoras para laticínios, exemplos da outra. Como os MGMs são as “máquinas” da biologia molecular, há uma quantidade enorme de informações sobre os sistemas heterólogos de expressão com aplicação potencial em alimentos que não é possível ser abordada aqui. Por isso, esta seção se concentrará nos MGMs viáveis presentes em alimentos e nos principais produtos proteicos derivados dos sistemas heterólogos, que, hoje em dia, são reconhecidos como seguros pelos principais órgãos reguladores, como a FDA dos Estados Unidos, a EFSA e a agência Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) (Tabela 13.4). Supõe-se que se um produto foi aprovado, ele será utilizado em alimentos.

A. Produtos que contêm ou que são os próprios micro-organismos geneticamente modificados com capacidade de multiplicação

1. Levedura modificada para reduzir o sulfeto de hidrogênio de alimentos e bebidas fermentados

A produção de compostos sulfurados voláteis, como o sulfeto de hidrogênio (H_2S), durante a fermentação alcoólica, é um problema que afeta as indústrias da cerveja, do vinho e do saquê. O sulfeto de hidrogênio é um subproduto indesejável da via de assimilação do sulfato que ocorre no *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação (Figura 13.9).

Uma das características indesejáveis do H_2S é o odor de ovo podre que a bebida fermentada adquire e que pode tornar o produto não vendável. Essa substância também tem o potencial de formar mercaptanas e tióis que, além de serem compostos reativos perigosos, conferem um aroma de cebola ou de verdura enlatada. A remoção desses compostos sulfurados indesejados é tecnicamente difícil e retira do vinho compostos aromáticos desejáveis. Essas características sensoriais são extremamente importantes para o produtor. O método atualmente utilizado na indústria do vinho para remover os sulfetos da bebida consiste na adição de cobre para tentar quelar o enxofre. O cobre pode levar à catálise, com alterações indesejáveis na composição, e ao aumento da quantidade de resíduos produzidos pelas vinícolas. O uso do cobre como agente clarificador do vinho também pode aumentar o teor de cobre residual, permitido até o valor de 0,5 mg/l para o vinho (FDA-GRN 350).

A linhagem comercial *S. cerevisiae* P1Y0, que não produz H_2S como subproduto da fermentação, foi desenvolvida por meio da substituição do gene original *MET10* pelo alelo *MET10* “com baixo teor de H_2S ”, oriundo da linhagem de levedura para vinho *S. cerevisiae* UCD932. O gene *MET10* codifica a subunidade a da sulfito redutase assimiladora (EC 1.8.1.2), que catalisa a redução de seis elétrons do sulfito em sulfeto (KEGG R00858):

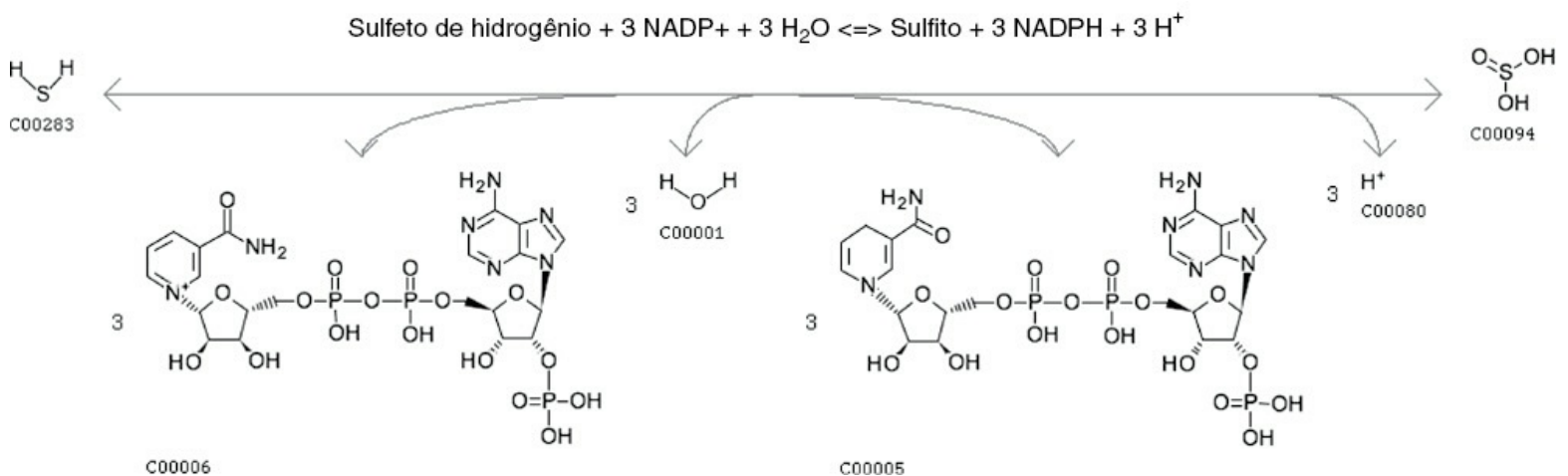


TABELA 13.4 Micro-organismos e enzimas recombinantes regulamentados pelas principais agências internacionais como a FDA dos Estados Unidos, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a Food Standards Australia New Zealand

(FSANZ)

Micro-organismo – fonte	Enzima	Referência e nome comercial
<i>Aspergillus niger</i>	Asparaginase/ <i>Aspergillus niger</i>	FDA-GRN 214, FSANZ A1003, PreventASe™
	Carboxipeptidase/ <i>Aspergillus niger</i>	FDA-GRN 345, Accelerzyme CPG
	Quimosina B/ <i>Bos taurus</i>	FDA-GRN 230, 21 CFR 184.1685
	Lipase (triacilglicerol)/construção sintética de várias espécies de <i>Fusarium</i>	FDA-GRN 296, Panamore™
	Lipase (triacilglicerol)/ <i>Candida antarctica</i>	FDA-GRN 158, Lipozyme
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fosfolipase A ₂ / <i>Sus scrofa</i> (suína)	FDA-GRN 183, Bakezyme, Cakezyme, Maxapal A2
	Asparaginase/ <i>Aspergillus oryzae</i>	FDA-GRN 201, Acrylaway
	Proteinase aspártica/ <i>Rhizomucor miehei</i>	FDA-GRN 34, NovoCarne Tender
	Glicose oxidase/ <i>Aspergillus niger</i>	FDA-GRN 106, Gluzyme
	Lacase/ <i>Myceliophthora thermophila</i>	FDA-GRN 122
	Lipase (triacilglicerol)/ <i>Thermomyces lanuginosus</i>	FDA-GRN 43
	Lipase (triacilglicerol)/ <i>Fusarium oxysporum</i>	FDA-GRN 75
	Lipase (triacilglicerol)/lipase híbrida de <i>Thermomyces lanuginosus</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	FDA-GRN 103
	Lipase (triacilglicerol)/ <i>Rhizomucor miehei</i>	FSANZ A402, Palatase
	Pectina esterase/ <i>Aspergillus aculeatus</i>	FDA-GRN 8
	Fosfolipase A ₁ / <i>Fusarium venenatum</i>	FDA-GRN 142, Novozyme 46016
	Fitase/ <i>Peniophora lycii</i>	FSANZ A371
	Xilanase/ <i>Thermomyces lanuginosus</i>	FDA-GRN 54
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -Amilase/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	FDA-GRN 24
	α -Amilase/ <i>Bacillus licheniformis</i> + gene modificado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
	Termamyl LC	FDA-GRN 22
	α -Amilase/gene modificado do <i>Bacillus licheniformis</i>	FDA-GRN 79, Novozym 28035
	Exo-maltotetraose-hidrolase, amilase G4/ <i>Pseudomonas saccharophila stutzeri</i>	FDA-GRN 277
	Glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase/ <i>Aeromonas salmonicida</i>	FDA-GRN 265, FoodPro, LysoMaxa Oil
	Pululanase/ <i>Bacillus deramificans</i>	FDA-GRN 72
<i>Bacillus subtilis</i>	α -Acetolactato descarboxilase/ <i>Bacillus brevis</i>	21 CFR 173.115
	Amilase maltogênica/ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	GRASP 7G0326
	Pululanase/ <i>Bacillus naganoensis</i>	FDA-GRN 20, GRASP 4G0293
	Pululanase/ <i>Bacillus acidopullulyticus</i>	FDA-GRN 205
<i>Escherichia coli</i> K-12	Glicosiltransferase ramificante/ <i>Rhodothermus obamensis</i>	FDA-GRN 274
	Quimosina	21 CFR 184.1685
	Ciclodextrina glucanotransferase/ <i>Klebsiella oxytoca</i>	FDA-GRN 155, FDA0GRN 64
<i>Fusarium venenatum</i>	Xilanase/ <i>Thermomyces lanuginosus</i>	FDA-GRN 54
Levedura <i>Hansenula polymorpha</i>	Hexose oxidase/ <i>Chondrus crispus</i>	FSANZ A475, FDA-GRN 238
	Lipase (triacilglicerol)/ <i>Fusarium heterosporum</i>	FDA-GRN 238, FSANZ A569, GRINDAMYLO POWERBake
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Quimosina B/ <i>Bos taurus</i>	21 CFR 184.1685
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Celulase/ <i>Myceliophthora thermophila</i>	FDA-GRN 292
<i>Pichia pastoris</i>	Fosfolipase C/fragmento de DNA de organismo indeterminado, oriundo do solo	FDA-GRN 204
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar I	α -Amilase/gene modificado híbrido de <i>Thermococcales</i>	FDA-GRN 126
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteína estruturadora de gelo/ <i>Macrozoarces americanus</i> (peixe)	FDA-GRN 117
	Ureia amidolase/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FDA-GRN 175
	Subunidade α da redutase assimiladora de sulfitos, MET10 com baixo teor de H ₂ S/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FDA-GRN 350

Enzima maloláctica/*Oenococcus oeni*

+ Malato permease/*Schizosaccharomyces pombe*

Streptomyces violaceurber Fosfolipase A₂/*Streptomyces violaceurber*

Trichoderma reesei Aspergiloepsina I/*Trichoderma reesei*

Quimosina B/*Bos taurus*

Glicoamilase/*Trichoderma reesei*

Pectina liase/*Aspergillus niger*

Transglicosidase/*Aspergillus niger*

FDA-GRN 120

FDA-GRN 212, PLA2 Nagase

FDA-GRN 333

FDA-GRN 230, Chymostar Supreme

FDA-GRN 372

FDA-GRN 32

FDA-GRN 315

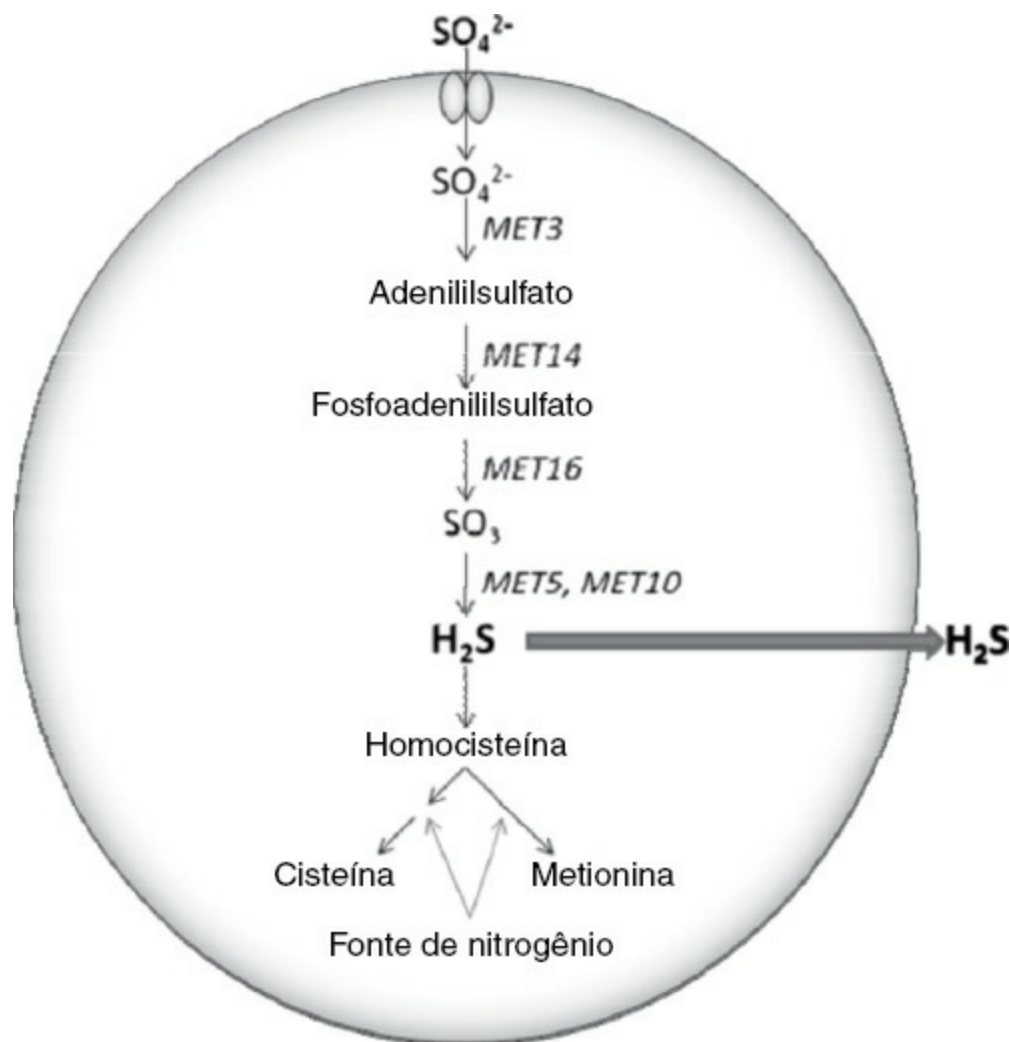


FIGURA 13.9 Via da produção do sulfeto de hidrogênio durante a fermentação. A enzima MET10 catalisa a última etapa da produção do sulfeto de hidrogênio. A substituição da enzima original por uma isoforma com “baixo teor de H_2S ” resulta em baixa produção de sulfeto. Sweigert e Pretorius (2007).

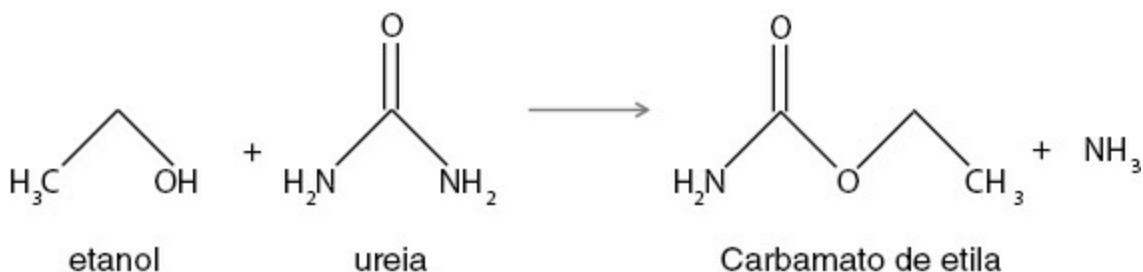
O alelo *MET10* com baixo teor de H_2S difere em três polimorfismos de nucleotídeo-único (C404A, G1278A e C1985A) do alelo selvagem. Os polimorfismos de nucleotídeo-único encontrados nas posições 404 e 1278 são comuns a várias linhagens e aquele encontrado na posição 1985 é específico do gene *MET10*, que codifica a sequência da linhagem UCD932 (e agora do gene *MET10*, que codifica a sequência da linhagem P1Y0). Apenas dois desses polimorfismos levam a alterações de aminoácidos, já que a mudança na posição 1278 é uma mutação silenciosa. As duas cópias do gene *MET10* selvagem foram totalmente removidas do genoma da linhagem comercial final com baixo teor de H_2S , pela inativação (*knocking out*) dos genes com os marcadores *kanMX* e *hphMX*, por meio de recombinação homóloga com sequências flanqueadoras não codificadoras a montante e a jusante do gene *MET10*. Na sequência, os marcadores foram substituídos pelo alelo *MET10* com baixo teor de H_2S da linhagem UCD932. O alelo *MET10* com baixo teor de H_2S está sob o controle de suas sequências flanqueadoras

5' e 3' intrínsecas, conforme visto em seu cassete de expressão (Figura 13.10) (FDA-GRN 350).

A permuta do alelo *MET10* resulta em produção mínima de H₂S da levedura. A levedura desidratada ativa P1Y0 é utilizada como cultura iniciadora na fermentação de bebidas alcoólicas – como a do mosto de uvas, do mosto cervejeiro e do arroz – e empregada no vinho, champanhe, xerez, cerveja, aguardente de frutas, conhaque, uísque e rum.

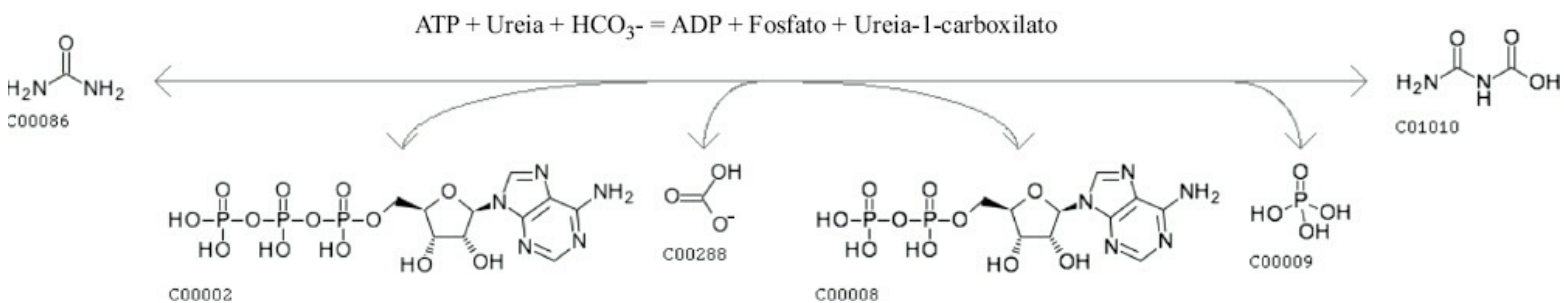
2. Levedura modificada para a redução do carbamato de etila nas bebidas fermentadas

Algumas bebidas alcoólicas e alimentos fermentados contêm carbamato de etila (Uretano, CAS N. 5-179-6) (para mais informações, consulte Zimmerli e Schlatter, 1991), que é um carcinógeno conhecido para animais e um possível carcinógeno para humanos (12º Relatório sobre Carcinógenos, publicado pelo Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos). O carbamato de etila forma-se na reação entre etanol e cianato ou ureia. Em *S. cerevisiae*, a ureia é formada como um produto da degradação de L-arginina, e sabe-se que a reação entre o etanol e a ureia é a principal fonte de carbamato de etila nos produtos fermentados à base de uvas e arroz (FDA-GRN 175):

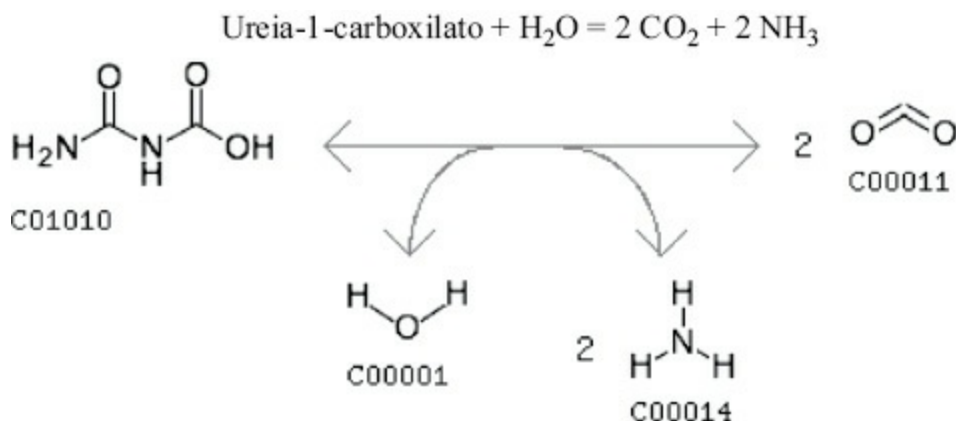


A ureia, normalmente, é metabolizada no *S. cerevisiae* pela enzima ureia amidoliase, que exibe atividade de ureia carboxilase (EC 6,3,4,6) e de alofanato hidrolase (EC 3.5.1.54):

Atividade de ureia carboxilase (EC 6.3.4.6, KEGG R00774):



Atividade de alofanato hidrolase (EC 3.5.1.54, KEGG R00005):



A ureia amidoliase é codificada pelo gene *DUR1,2* de *S. cerevisiae* (nome sistemático YBR208C). Durante a fermentação, e na presença de fontes adequadas de nitrogênio, o gene *DUR1,2* é expresso apenas fracamente e, por isso, a ureia é pouco metabolizada. Como consequência, há um acúmulo de ureia na célula da levedura, que a

libera para o vinho, onde ela reage com o etanol, formando carbamato de etila. O aquecimento e o envelhecimento do vinho aceleram a produção de carbamato de etila e, por essa razão, os níveis são muito mais altos no xerez e no saquê/vinho de arroz (Zimmerli e Schlatter, 1991; FDA-GRN 175).

Para reduzir a formação de carbamato de etila foi desenvolvida a linhagem de *S. cerevisiae* ECMoO1 geneticamente modificada, na qual um cassete de expressão que contém o gene *DUR1,2* foi integrado ao locus *Ura3* por recombinação homóloga das sequências flanqueadoras (flancos *URA3 5'* – *URA3 3'*). A expressão do gene *DUR1,2* é controlada pelas sequências do promotor (*PGK1p*) e do terminador (*PGK1t*) do gene *PGK1*, oriundo de *S. cerevisiae* (FDA-GRN 175):



Como consequência, há um aumento de 17 vezes na expressão do gene *DUR1,2* da linhagem recombinante ECMoO1, o que causa uma degradação mais eficaz da ureia durante a fermentação alcoólica e resulta em uma redução de 89% nos níveis de carbamato de etila (Figura 13.11).

A levedura desidratada ativa ECMoO1 é utilizada como cultura iniciadora na produção de bebidas alcoólicas, como na fermentação do mosto de uvas e do arroz (FDA-GRN 175).

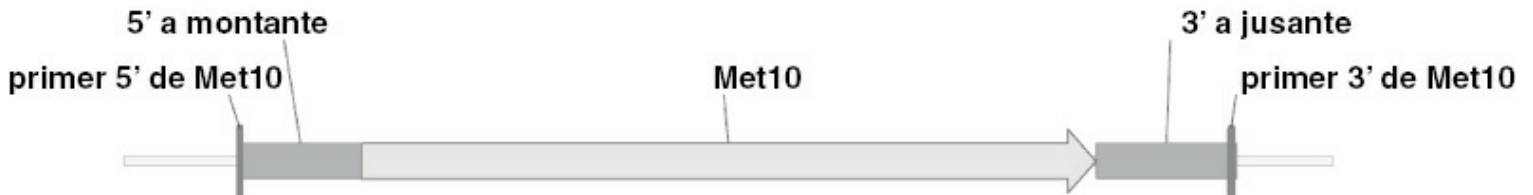


FIGURA 13.10 Cassete de expressão para o alelo *MET10* com “baixo teor de H_2S ”. O gene *MET10* com “baixo teor de H_2S ” obtido de uma linhagem diferente de levedura é flanqueado por sequências intrínsecas – 5' a montante e 3' a jusante –, utilizadas na recombinação homóloga que envolveu o locus do gene *MET10* selvagem de *S. cerevisiae*.

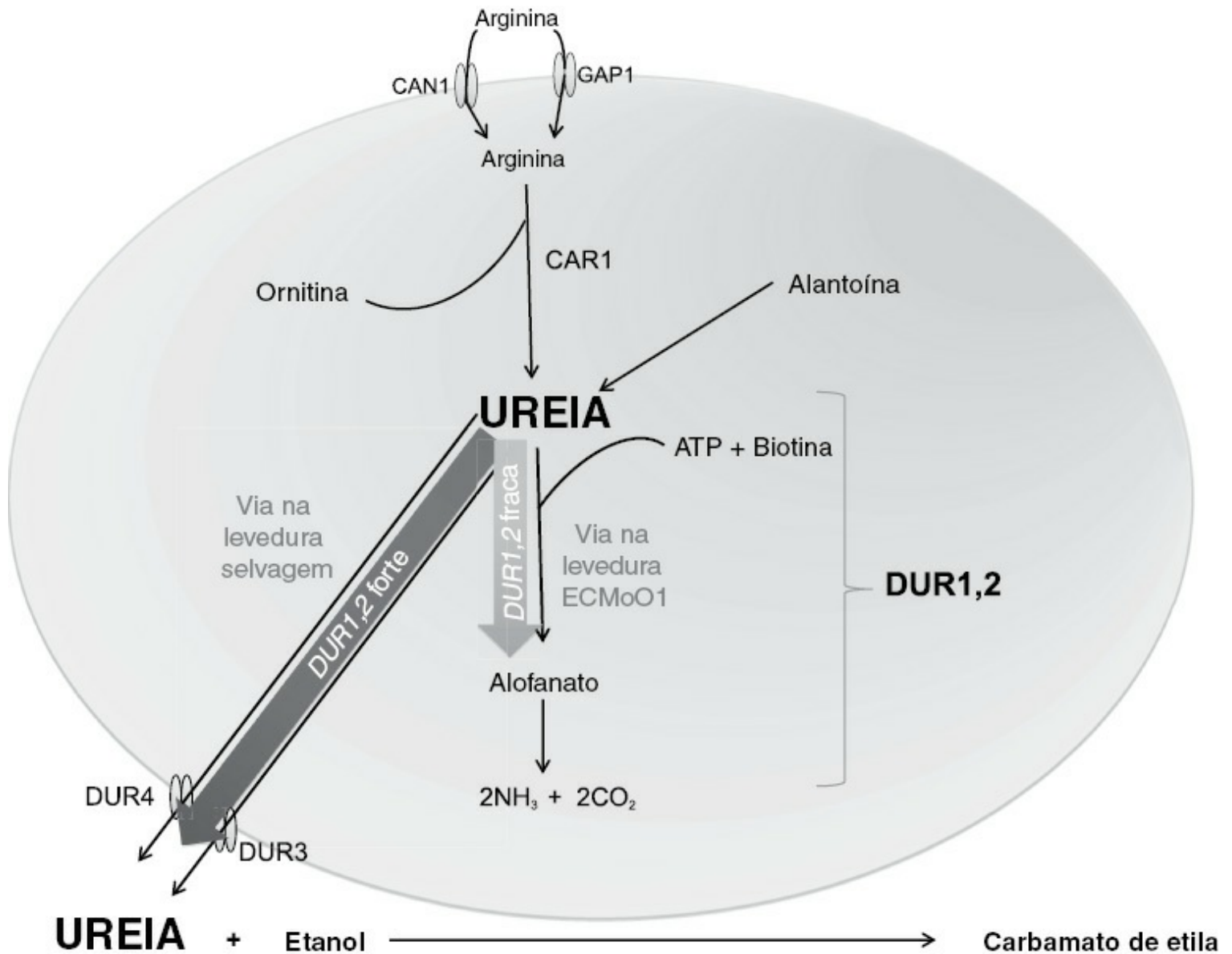
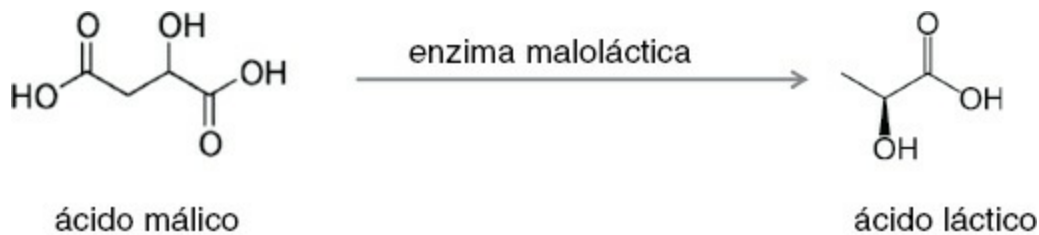


FIGURA 13.11 Degradação da ureia pela ureia amidolase (DUR1,2). A alta atividade da DUR1,2 degrada a ureia de maneira eficaz. No entanto, quando o teor de nitrogênio está elevado, a atividade da enzima diminui, resultando no acúmulo de ureia no vinho e em reações indesejáveis à frente. Desenvolveu-se, então, a levedura recombinante *ECMoO1* com expressão constitutiva alta do gene *DUR1,2* para impedir a excreção da ureia. Coulon *et al.* (2006).

3. Levedura modificada para a fermentação maloláctica

A fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica são os dois principais processos biotecnológicos da fabricação do vinho. Depois da fermentação alcoólica, a maioria dos vinhos tintos, e alguns brancos, são submetidos à fermentação maloláctica. Essa fermentação secundária, em geral realizada pelas bactérias do ácido lático, é importante para a desacidificação, a modificação do sabor e a estabilidade microbiana do vinho. A desacidificação do vinho ocorre por meio da conversão do L-malato (ácido dicarboxílico) em L-lactato (ácido monocarboxílico). A *Oenococcus oeni* é a principal bactéria do ácido lático responsável pela fermentação maloláctica dos vinhos, mas a maioria das bactérias acidoláticas do vinho tem a enzima maloláctica, que catalisa a conversão do L-malato em L-lactato:



Em contraposição aos efeitos desejados da fermentação maloláctica, algumas linhagens de bactérias do ácido láctico também apresentam vias metabólicas específicas que podem levar à formação de compostos indesejáveis. Além disso, por causa da sensibilidade das bactérias do ácido láctico às condições nutricionais, ao pH, à temperatura, ao teor de dióxido de enxofre e à concentração de etanol do vinho, a fermentação maloláctica é, muitas vezes, imprevisível e de difícil obtenção, inclusive com uso de culturas iniciadoras comerciais de bactérias do ácido láctico (FDA-GRN 120).

O *Saccharomyces cerevisiae* não consegue degradar de modo eficiente o L-malato, mas a levedura *Schizosaccharomyces pombe* é capaz de fazê-lo; no entanto, ela não é adequada para a produção de vinhos. Por essa razão, criou-se a linhagem de *S. cerevisiae* ML01 geneticamente modificada para auxiliar na fermentação maloláctica. Pesquisadores transferiram dois genes para a linhagem ML01, com o objetivo de superar a ausência de fermentação maloláctica e de transporte de L-malato para o interior da célula de *S. cerevisiae*: o gene *mleA*, que codifica a enzima maloláctica, de *O. oeni*, e o gene *mae1*, que codifica a malato permease, de *S. pombe* (FDA-GRN 120) (Husnik *et al.*, 2007).

Um cassete de expressão linear que contém os genes em *tandem mae1 e mleA* sob o controle do promotor (*PGK1p*) e do terminador (*PGK1t*) do gene *PGK1*, oriundo de *S. cerevisiae*, foi integrado ao *locus URA3* (recombinação com sequências flanqueadoras *ura3*) da linhagem de *S. cerevisiae* S92 (Husnik *et al.*, 2007) (Figura 13.12).

A linhagem ML01 resultante é capaz de descarboxilar até 9,2 g/l de malato, formando quantidades equimolares de lactato no mosto de uvas *chardonnay*, durante a fermentação alcoólica. A presença do cassete maloláctico no genoma não afeta o crescimento, a produção de etanol, a cinética da fermentação ou o metabolismo da linhagem ML01, que é significativamente equivalente à levedura parental industrial para vinho (Husnik *et al.*, 2007) e, por essa razão, quase sempre considerada segura pela FDA (FDA-GRN 120).

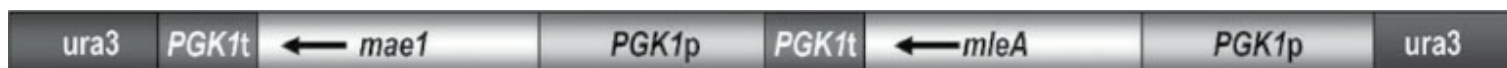


FIGURA 13.12 Cassete de expressão que contém o gene *mae1* de *S. pombe* (que codifica a malato permease) e o gene *mleA*, de *O. oeni* (que codifica a enzima maloláctica). A expressão é controlada pelo promotor (*PGK1p*) e pelo terminador (*PGK1t*) do gene *PGK1*, de *S. cerevisiae*. A sequência flanqueadora *ura3* foi utilizada na recombinação homóloga para criar a linhagem ML01 capaz de realizar a fermentação maloláctica.

A levedura desidratada ativa ML01 para vinho é utilizada como cultura iniciadora na fermentação alcoólica do mosto de uvas. No entanto, ao contrário das linhagens tradicionais da levedura, as fermentações alcoólicas e malolácticas ocorrem simultaneamente e apenas na levedura. O uso da levedura ML01 depende da escolha do fabricante de vinhos e da fermentação maloláctica ser necessária para a desacidificação, modificação do sabor ou estabilidade microbiana, ou para uma combinação dessas características.

Se a desacidificação for o principal resultado que se quer da fermentação maloláctica, o uso da levedura desidratada ativa ML01 para vinho é altamente recomendado. A bioconversão de um ácido dicarboxílico (L-malato) em um ácido monocarboxílico (L-lactato) diminui a acidez total do vinho e suaviza a sensação que a bebida provoca na boca. Em alguns vinhos, como nos tintos com potencial para envelhecer, a fermentação maloláctica por bactérias contribui não apenas para a desacidificação, mas para a modificação do sabor, por meio do metabolismo bacteriano secundário. Nesse caso, muitas vezes, é preferível não utilizar a levedura ML01 e realizar a fermentação maloláctica com as bactérias do ácido láctico. Por outro lado, o uso da levedura ML01 é

apropriado quando a estabilidade microbiana é necessária, porém sem o surgimento de sabores amanteigados (acetoina, diacetila), decorrentes do metabolismo secundário das bactérias do ácido láctico, como ocorre com frequência nos vinhos brancos. A linhagem de levedura ML01 também pode ser usada nos casos em que é necessário estabilizar o vinho o quanto antes, já que a estabilidade microbiana da bebida é intensificada logo que a fermentação maloláctica é completada, por meio da remoção do L-malato. Além disso, quanto antes terminar a fermentação maloláctica, mais cedo o vinho poderá ser sulfitado e engarrafado, com baixo risco de contaminação bacteriana (FDA-GRN 120).

IV. ENZIMAS E PROTEÍNAS COMERCIAIS, ORIUNDAS DE MICRO-ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DESTINADAS À INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Enzimas são muito utilizadas no processamento de alimentos e na produção de ingredientes alimentares. Por tradição, isolam-se enzimas intrínsecas de micro-organismos cultiváveis, plantas e tecidos de mamíferos. Por isso, a produção e o isolamento dessas enzimas podem ser tarefas desafiadoras e as fontes disponíveis, limitadas. Além disso, muitas vezes, as enzimas são obtidas de micro-organismos não facilmente cultiváveis sob as condições industriais, ou que produzem subprodutos tóxicos. Por meio da seleção criteriosa dos micro-organismos hospedeiros, é possível a construção de linhagens recombinantes que possibilitam a produção eficiente de enzimas substancialmente livres de subprodutos ou outros metabólitos microbianos indesejáveis. Um número cada vez maior de enzimas é produzido com o uso de sistemas heterólogos de expressão, nos quais a tecnologia transgênica é empregada para criar transgenes por engenharia genética e introduzi-los em linhagens microbianas hospedeiras, que podem ser geneticamente modificadas para otimizar o processo biotecnológico. Por exemplo, várias linhagens de micro-organismos desenvolvidos recentemente para a produção de enzimas foram modificadas por engenharia genética para aumentar a produtividade de enzimas, por meio da deleção dos genes originais que codificam proteases extracelulares. Além disso, algumas linhagens de fungos foram modificadas para reduzir ou eliminar o potencial natural para a produção de metabólitos secundários tóxicos (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

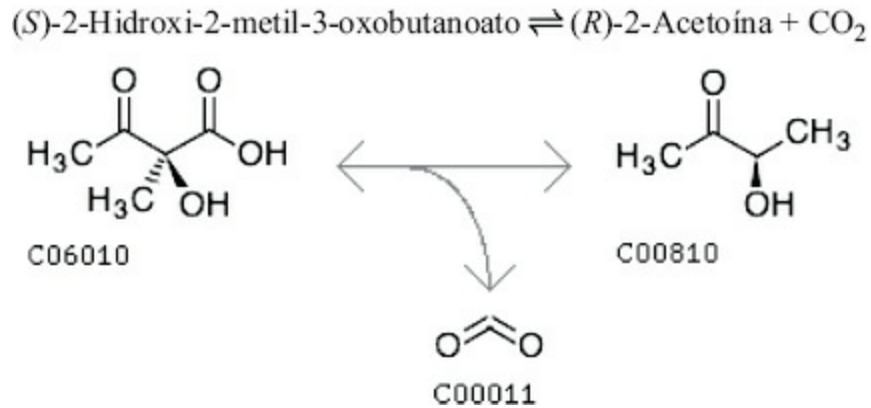
As enzimas originais, muitas vezes, não estão bem adaptadas para as condições encontradas na moderna produção de alimentos. A crescente sofisticação do processamento de alimentos cria uma demanda para uma ampla variedade de enzimas que tenham características compatíveis com as condições atuais. Assim, com o auxílio da engenharia genética, realizam-se mudanças no DNA que alteram as sequências de aminoácidos. Dessa forma, criam-se especificamente enzimas com propriedades melhoradas para uso em processos industriais. Por exemplo, adoçantes utilizados com frequência, como o xarope de glicose ou frutose, em geral são produzidos a partir do amido de milho, com o uso de enzimas hidrolíticas. Na primeira etapa da hidrólise do amido, este é liquefeito com α -amilase por aquecimento a 105°C, durante 2-5 minutos, seguido de aquecimento a 90°C -100°C, por 1-2 horas. Com o uso da engenharia genética, criaram-se α -amilases com maior estabilidade ao calor e maior compatibilidade com os outros parâmetros do processo de liquefação (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

Os parágrafos apresentados a seguir enfocam as propriedades bioquímicas, bem como a origem e as modificações genéticas das enzimas recombinantes produzidas por MGMs, que são utilizados na atual produção de alimentos (Tabela 13.4). Não serão discutidas as características relacionadas com a segurança alimentar. A avaliação da segurança das enzimas para processamento alimentar, oriundas de micro-organismos recombinantes, já foi discutida extensamente na literatura (Jonas *et al.*, 1996; Pariza e Johnson, 2001) e em documentos de orientação emitidos por órgãos reguladores e organizações internacionais; por exemplo, pelo Comitê Científico para Alimentos (SCF, 1992) ou no documento de orientação da EFSA sobre a avaliação dos riscos dos produtos derivados de MGMs (EFSA, 2011). Em princípio, as considerações relativas à segurança são aplicáveis às enzimas provenientes de micro-organismos originais e recombinantes. O componente-chave da avaliação da segurança das enzimas é a análise da segurança da linhagem produtora; em especial, de seu potencial patogênico e toxigênico

(Pariza e Johnson, 2001). Embora não se utilizem intencionalmente micro-organismos patogênicos ou toxigênicos na produção de enzimas para o processamento de alimentos, constatou-se que certos fungos – empregados, por costume, como fontes de enzimas – produzem baixos teores de metabólitos secundários tóxicos, em condições fermentativas propícias para a síntese desses compostos. Alguns desses micro-organismos são utilizados, atualmente, como fonte de enzimas recombinantes (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

A. Acetolactato descarboxilase

A acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) diminui o aroma indesejável de manteiga de diacetila, que ocorre como um subproduto da fabricação da cerveja, pela conversão de diacetila (acetolactato) em acetoína de sabor neutro (KEGG R02948):



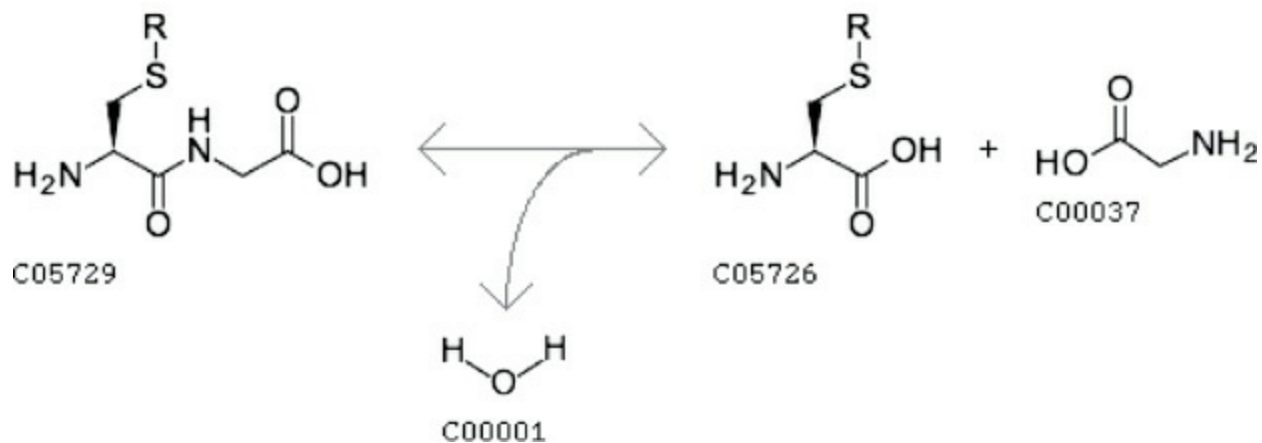
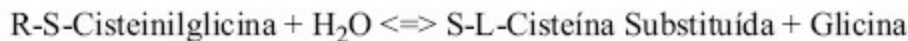
Durante o armazenamento da cerveja, o aroma de diacetila é lentamente convertido em um aroma neutro. A fim de encurtar o tempo de conversão, a diacetila é eliminada, por meio da adição de acetolactato descarboxilase.

Atualmente, a acetolactato descarboxilase transgênica é oriunda de uma linhagem modificada de *Bacillus subtilis* que contém o gene não modificado, que codifica a a-acetolactato descarboxilase do *Bacillus brevis* (21 CFR 173.115).

Até hoje, há dois tipos de acetolactato descarboxilase produzidos com biotecnologia sendo comercializados, na Europa, produzidos com o auxílio da levedura para cerveja *S. cerevisiae* GM. Nos Estados Unidos, é permitido o uso em alimentos para consumo humano de uma preparação enzimática derivada de uma linhagem modificada do *B. subtilis*, a qual contém o gene que codifica a a-acetolactato descarboxilase, oriunda de *B. brevis* (21 CFR 173.115).

B. Aminopeptidase

As aminopeptidases (EC 3.4.11) são enzimas produzidas e secretadas por glândulas do intestino delgado, no qual participam da digestão de proteínas; essas enzimas estão amplamente distribuídas por todo o reino animal e também são encontradas em todos os micro-organismos (banco de dados da KEGG). Uma aminopeptidase cliva um único aminoácido da extremidade N-terminal de uma proteína ou peptídeo. Por exemplo, a aminopeptidase EC 3.4.11.1 consegue mediar a clivagem de uma glicina N-terminal (KEGG R04951):



Essas clivagens alteram os sabores das proteínas de uma matriz alimentar. Por isso, as aminopeptidases são utilizadas na produção de queijos, bebidas, aromatizantes, carnes e produtos à base de leite, com o objetivo de intensificar e otimizar o aroma e o sabor. A adição de aminopeptidases é capaz de acelerar a maturação do queijo. Elas também são utilizadas nas rações, para melhorar o uso das proteínas na alimentação de leitões e aves. A clivagem de uma glicina N-terminal foi descrita na reação anterior, como um exemplo de mecanismo das aminopeptidases.

Diversas aminopeptidases são produzidas por biotecnologia, com o uso de diversas culturas de fungos e bactérias (como *Aspergillus*, *Lactococcus* e *Trichoderma*). Entre as peptidases recombinantes produzidas estão a aminopeptidase (PepN), oriunda das linhagens *Lactobacillus rhamnosus* S93, *Lactococcus lactis* (FDA 21CFR184.1985) e *Aspergillus sojae* (Patente europeia 0967286).

C. Amilases

As amilases são enzimas amilolíticas que hidrolisam amido em açúcares e são encontradas em todo o reino animal, vegetal e em micro-organismos (OrthoDB EC 3.2.1). Existem várias amilases que clivam com muita especificidade as ramificações das moléculas de amido. Dependendo do tipo de amilase, os compostos resultantes podem ser açúcares simples, como a glicose, açúcares compostos, como a maltose, ou formas especiais de amido, como as dextrinas. Todas as amilases são glicosídeo hidrolases que agem sobre as ligações α -(1,4) e/ou α -(1,6) dos polímeros de amido (Goesaert *et al.*, 2009). A Figura 13.13 traz uma visão geral dos modos de ação das enzimas amilolíticas.

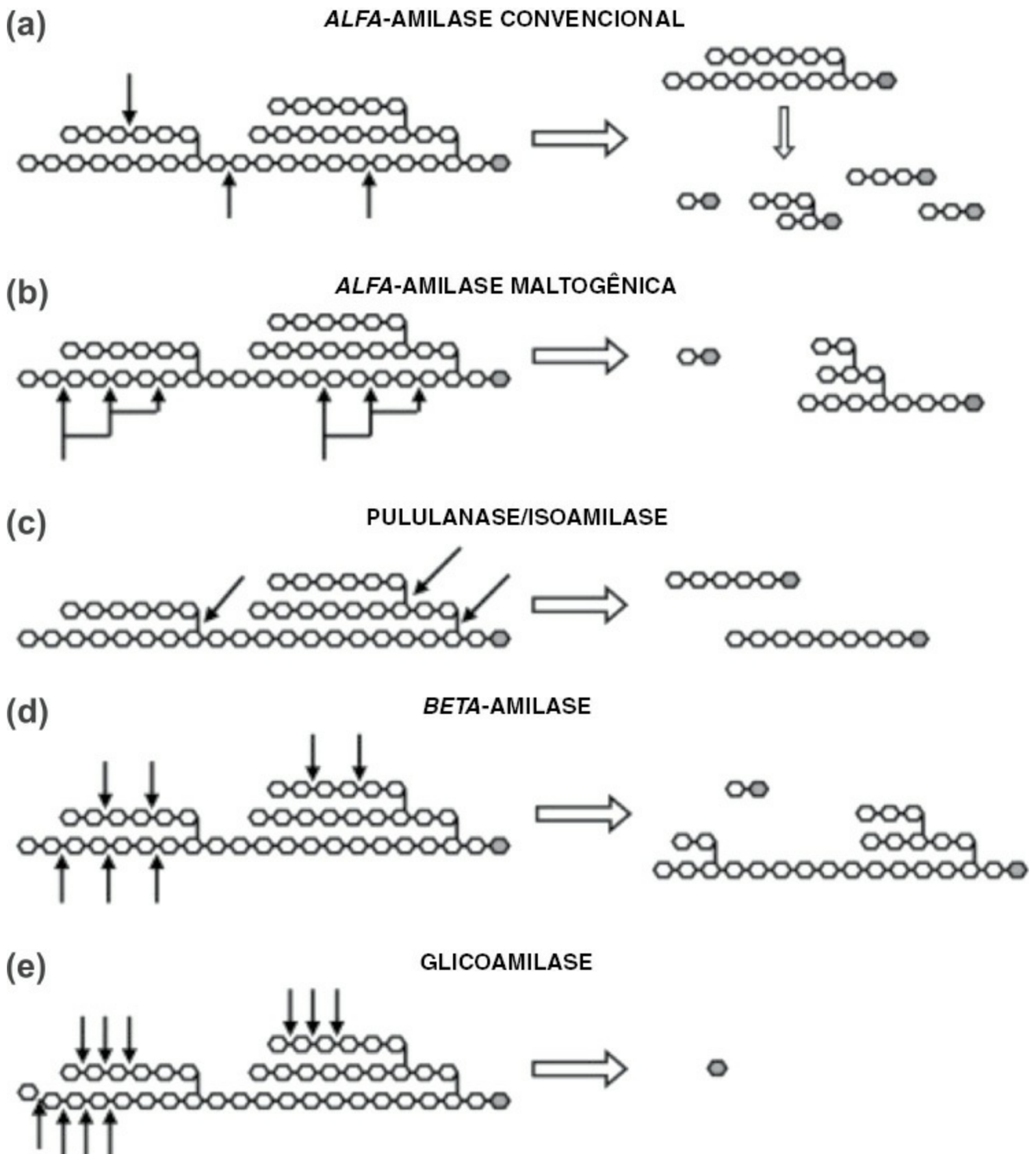


FIGURA 13.13 Representação esquemática da ação de diferentes enzimas amilolíticas sobre amido e derivados. A estrutura em anel de cor cinza representa um resíduo de glicose redutor, sendo: (a) Ação do tipo endo da α -amilase, que produz dextrinas lineares e ramificadas de baixa massa molecular; (b) Ação, sobretudo, do tipo exo da α -amilase maltogênica, que produz principalmente maltose; (c) Ação da enzima desramificante, que produz dextrinas lineares; (d) Ação apenas do tipo exo da β -amilase, que produz maltose e dextrinas β -limite; (e) Ação apenas do tipo exo da glucoamilase, que produz glicose. Extraído de Goesaert *et al.* (2009).

As amilases são utilizadas na indústria do processamento de alimentos, principalmente para modificar as matérias-primas que contêm amido. Sua área de aplicação mais importante é a produção de açúcares, a partir do amido (xarope de glicose, xarope de frutose), que depois se tornam ingredientes de uma ampla variedade de

produtos alimentícios, como doces, produtos de panificação, sorvetes e molhos de tomate ketchup. As amilases estão naturalmente presentes em muitas matérias-primas, como cereais e leveduras. No entanto, essa forma de amilase costuma ser insuficiente ou tem um efeito muito lento. Por isso, é comum a adição de amilases produzidas industrialmente, para conduzir ou acelerar a degradação do amido. Essas preparações contêm uma mistura de vários tipos de amilase (GMO Compass).

As amilases são utilizadas rotineiramente na padronização da farinha empregada na fabricação de bolos e pães, e também como agente antienvelhecimento. Na farinha de trigo intacta, as α -amilases estão praticamente ausentes, enquanto as β -amilases estão presentes em abundância, embora tenham pouca ou nenhuma atividade sobre os grânulos de amido intactos, e não danificados, e sejam inativadas antes da gelatinização do amido. Por essa razão, a atividade das amilases na farinha de trigo é, muitas vezes, otimizada, por meio da adição de α -amilases fúngicas. As amilases adicionadas aumentam o teor de açúcares redutores e fermentáveis na farinha e na massa do pão, estimulando a fermentação pela levedura e a formação de produtos da reação de Maillard; esses produtos, por sua vez, intensificam o sabor e a cor da crosta do pão. No entanto, a funcionalidade da amilase também pode ser relacionada com a redução da viscosidade da massa do pão durante a gelatinização do amido, prolongando o crescimento no forno e resultando em um pão com volume maior. Algumas amilases podem retardar o endurecimento do miolo do pão e, dessa forma, agir como agente antienvelhecimento. Os mecanismos ou modos de ação possíveis, por meio dos quais essas enzimas retardam o processo de endurecimento/envelhecimento, são discutidos mais adiante. Os produtos típicos antienvelhecimento de pães que contêm amilases consistem, em sua maioria, de α -amilases bacterianas ou fúngicas com termoestabilidade intermediária (Goesaert *et al.*, 2009).

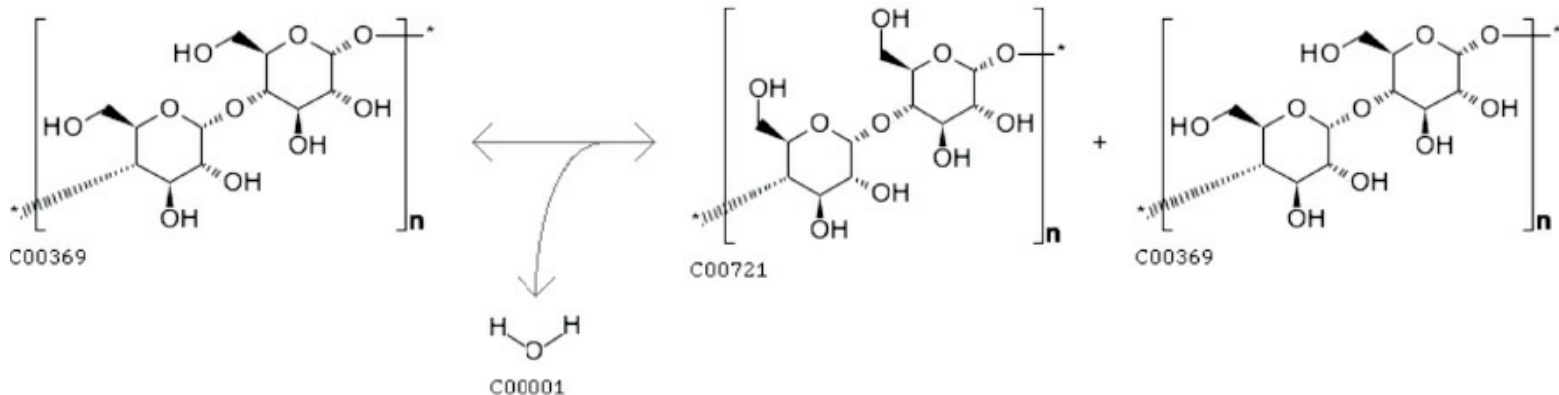
Durante a produção de bebidas alcoólicas fermentadas, o amido das matérias-primas precisa ser hidrolisado em moléculas menores de açúcar, para permitir que a levedura transforme-as em álcool. As enzimas realizam esse processo em duas etapas: liquefação e sacarificação. Por costume, as enzimas são acrescentadas por meio da adição de malte, que está sendo cada vez mais substituído por preparos à base de enzimas, nas operações de destilação. Uma quantidade pequena de enzimas industriais é capaz de substituir quantidades significativas de malte.

Nos sucos de frutas, as amilases eliminam o sedimento que contém amido. Isso é de especial importância quando as frutas são colhidas verdes e armazenadas por períodos relativamente longos, em baixa temperatura. Sob essas condições, a polpa das frutas contém amido em quantidade suficiente para causar turbidez ou gelatinizar, o que dificulta o processamento. A adição de enzimas amilolíticas neutraliza essas reações. Na forma de aditivos para rações, as amilases aumentam a hidrólise do amido e, dessa forma, contribuem para o melhor uso das rações à base de vegetais.

Há algum tempo, é possível produzir-se amilases com uma variedade de culturas de fungos e bactérias sem modificações genéticas. Em geral, as amilases bacterianas são mais estáveis em relação à temperatura que aquelas provenientes de culturas de fungos. Hoje, as amilases bacterianas são, sobretudo, produzidas com MGMs (vários tipos de *Bacillus*). Na produção de amilases com o uso de fungos, é mais frequente a adoção de culturas não consideradas geneticamente modificadas (GMO Compass).

1. α -Amilases

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações internas α -1,4-glicosídicas de polissacarídeos, originando produtos com baixa massa molecular, como a glicose, a maltose e as unidades de maltotriose (de Souza e Magalhães, 2010). As α -amilases atuam de modo aleatório sobre o amido, o glicogênio e polissacarídeos ou oligossacarídeos relacionados; essa ação leva à liberação de grupos redutores com configuração a (KEGG R02108):



A letra “ α ” está relacionada com a configuração anomérica inicial do açúcar liberado, e não com a configuração da ligação hidrolisada. Diversos mutantes recombinantes produtores de α -amilase criados por engenharia genética para aplicações específicas são produzidos atualmente, utilizando-se *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens* (Olempska-Beer *et al.*, 2006). O gene da α -amilase (*amyl*) do *B. licheniformis* normalmente é utilizado como transgene e modelo para modificações (FDA-GRN 79). Além disso, várias α -amilases termoestáveis são isoladas de micro-organismos termofílicos e expressas em linhagens com produção heteróloga. O tratamento do amido com a α -amilase pode ser seguido por um tratamento com outras enzimas adequadas, como a glicoamilase, a pululanase e a glicose isomerase.

O Termamyl SC é uma preparação elaborada com a α -amilase termoestável de *Bacillus stearothermophilus*, produzida por *B. licheniformis* (GRASP 0G0363, FDA-GRN 24). A sequência do gene *amyS* da α -amilase do *B. stearothermophilus* foi modificada para aumentar a estabilidade da enzima em concentrações baixas de cálcio e pH baixo. A enzima modificada apresenta deleção de dois aminoácidos (posições 181 e 182) e uma substituição (posição 193), quando comparada à sequência do gene *amyS* original do *B. stearothermophilus*. O Termamyl SC pode ser utilizado na indústria, para a liquefação contínua do amido em temperaturas de até 105-110°C, na indústria do álcool, para liquefazer o amido dos mostos para destilação, na fabricação da cerveja, para liquefazer o amido adicionado ao mosto e na indústria do açúcar, para hidrolisar o amido do caldo de cana (FDA-GRASP 0G0363, FDA-GRN 24).

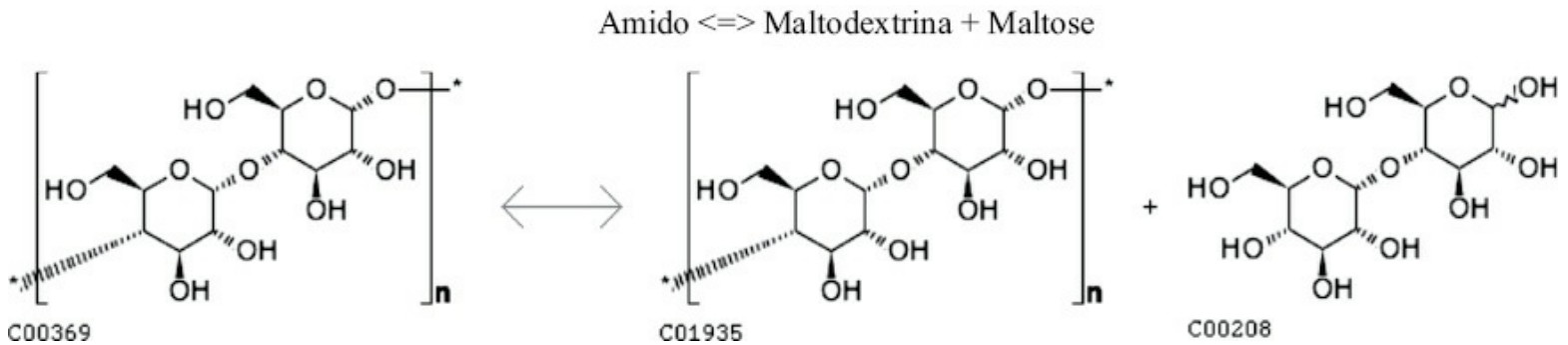
O Termamyl LC é uma preparação elaborada com a α -amilase termoestável de *B. licheniformis*, produzida por *B. licheniformis* geneticamente modificada (FDA-GRN 22). A sequência do gene *amyL* da α -amilase do *B. licheniformis* foi modificada para possibilitar a atuação da enzima em pH mais baixo e em teores de cálcio mais baixos que as α -amilases termoestáveis convencionais. O molde para a enzima do Termamyl LC foi o gene *amyS* da α -amilase de *B. licheniformis*, e esse gene foi utilizado na produção do Termamyl SC (FDA-GRASP 3G002612). A enzima do Termamyl LC foi construída por meio da união, na região N-terminal, da sequência da α -amilase do *B. amyloliquefaciens* e da alteração na sequência do DNA que codifica outros resíduos específicos de aminoácidos; as mudanças visaram o aumento da estabilidade da enzima em pH baixo, concentração baixa de cálcio e temperatura alta (FDA-GRN 22). As enzimas do Termamyl foram desenvolvidas a partir da sequência de nucleotídeos E01158 de um banco de genes, por meio de uma molécula intermediária, denominada M38570. As preparações enzimáticas são utilizadas na indústria alimentícia, como auxiliar na liquefação do amido para a produção de xarope, ou na indústria do álcool, para hidrolisar o amido dos mostos que seguem para a destilação.

Baseando-se na enzima do Termamyl LC, foi desenvolvida outra α -amilase modificada, denominada Novozym 28035. O objetivo foi obter uma enzima com uma estabilidade ainda maior em pH baixo, concentração baixa de cálcio e temperatura elevada. A enzima α -amilase do Novozym 28035 apresenta substituições em mais quatro aminoácidos, quando comparada à precursora, a α -amilase Termamyl LC, e suas aplicações são equivalentes (FDA-GRN 79).

Sequências do gene de linhagens de *Thermococcales archaeobacteria* foram utilizadas para obter a α -amilase BD5088 (FDA-GRN 126), uma enzima híbrida derivada de três α -amilases de linhagens selvagens arquea. A enzima hibridizada foi selecionada para comercialização por causa de sua estabilidade e atividade em pH baixo, temperatura alta e concentração de cálcio baixa. O alinhamento das sequências de aminoácidos das α -amilases termofílicas de linhagens arquea revelou uma homologia de pelo menos 85% com a α -amilase BD5088. A α -amilase BD5088 foi desenvolvida para ser utilizada na hidrólise do amido comestível, para a obtenção de produtos que resultam dessa hidrólise, entre eles xarope de glicose, xarope de milho com alto teor de frutose, glicose cristalina (dextrose) e etanol destilado para uso em alimentos e bebidas (FDA-GRN 126).

2. β -Amilases

As β -amilases (EC 3.2.1.2) ou amilases maltogênicas atuam na extremidade não redutora do amido, glicogênio, e polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, formando β -maltose (duas unidades de glicose) com inversão da configuração. A β -amilase é intrínseca a bactérias e plantas; durante o amadurecimento de uma fruta, a β -amilase quebra o amido em maltose, que deixa um sabor adocicado na fruta madura. A letra “ β ” está relacionada com a configuração anomérica inicial do açúcar livre liberado, e não à configuração da ligação hidrolisada (KEGG R02112):

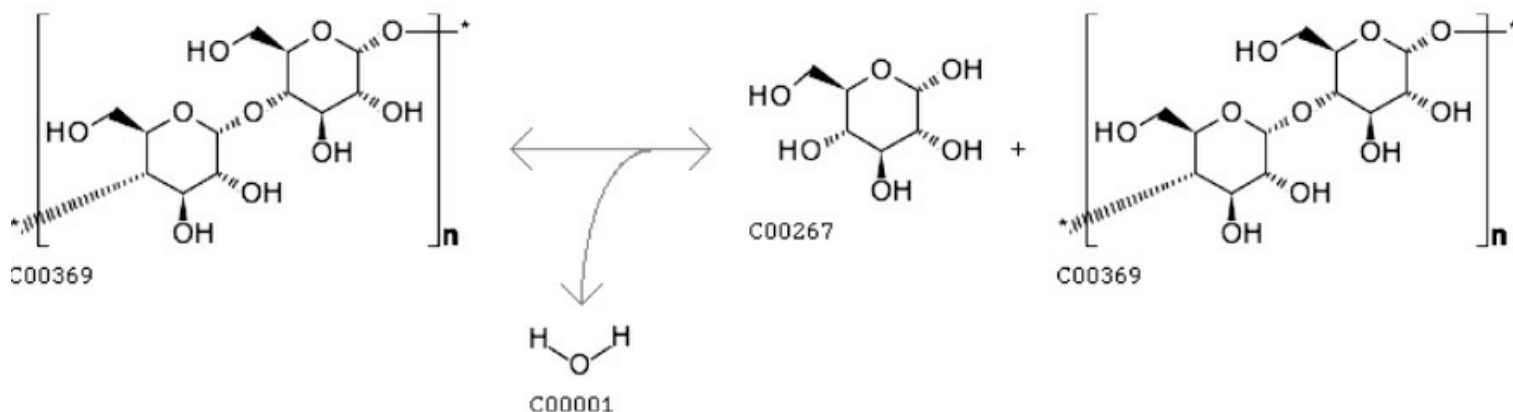


3. Amilase maltogênica

A amilase maltogênica (EC 3.2.1.133) é uma exoenzima que catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas da amilose, da amilopectina e de polímeros de glicose relacionados. Resíduos de α -maltose são removidos sucessivamente, a partir da extremidade não redutora do amido ou de polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, até que a molécula seja degradada ou, no caso da amilopectina, até que seja alcançada uma ramificação (WHO Food Additives Series 40). A amilase maltogênica pode ser produzida pela fermentação submersa de uma linhagem não patogênica e não toxigênica do *Bacillus subtilis*, a qual contém o gene *amyM* do *Bacillus stearothermophilus*, que codifica a amilase maltogênica (WHO Food Additives Series 40; Diderichsen e Christiansen, 1988) (FDA-GRASP 7G0326).

4. γ -Amilases

As γ -amilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as ligações 1,4- α -d-glicosídicas, a partir das extremidades não redutoras das cadeias, de maneira sucessiva, liberando β -d-glicose. A maioria das formas das enzimas consegue hidrolisar rapidamente as ligações 1,6- α -d-glicosídicas, quando a ligação seguinte na sequência é do tipo α -1,4, e algumas preparações dessa enzima hidrolisam ligações α -1,6 e 1,3-d-glicosídicas de outros polissacarídeos (KEGG R01790):



As γ -amilases ou glicoamilases são encontradas apenas em fungos (KEGG, OrthoDB); diferentemente das outras formas de amilase, a γ -amilase é mais eficiente em pH ácido e apresenta atividade ótima em pH 3.

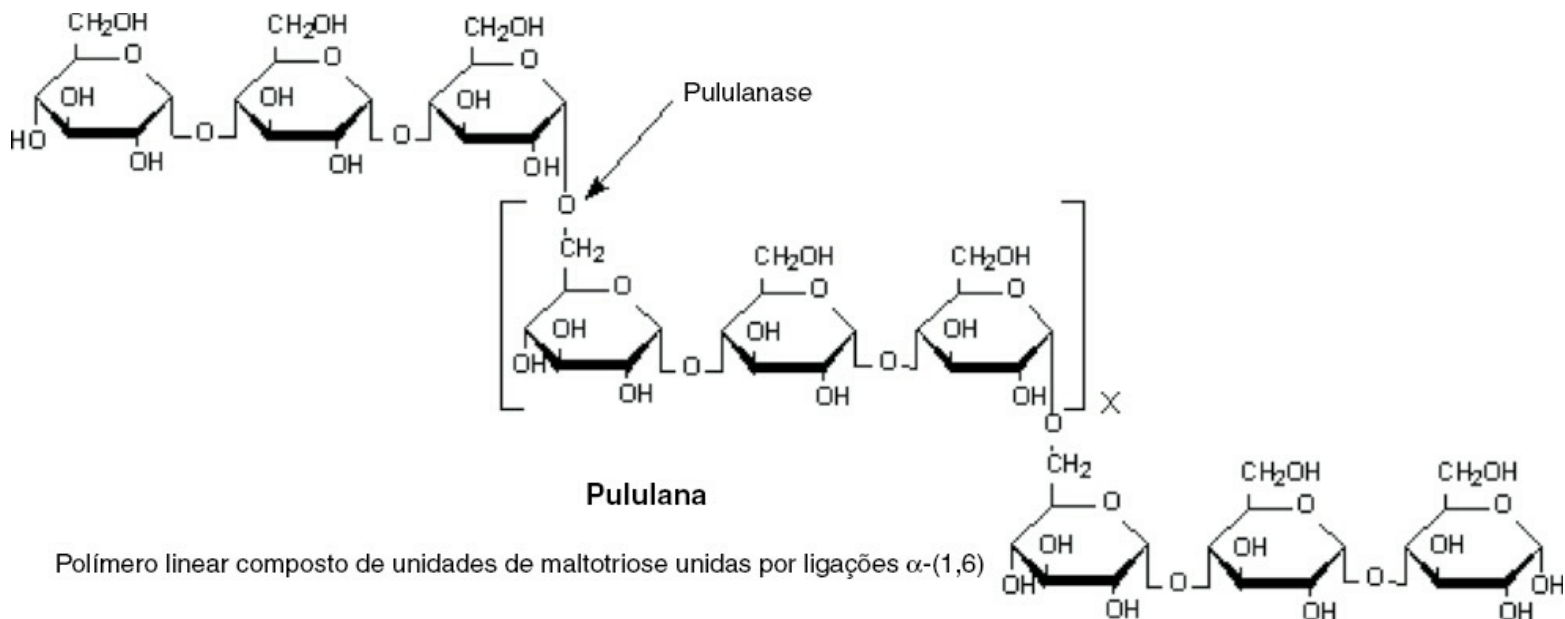
A glicoamilase de *Trichoderma reesei* foi superexpressa no próprio micro-organismo, *T. reesei*. A linhagem produtora foi geneticamente modificada, por meio da inativação de vários genes de celulases, a fim de facilitar a superexpressão do gene original *TrGA* do *T. reesei* para a produção e secreção da enzima glicoamilase recombinante.

Dois cassetes de expressão que contêm o promotor e o terminador do gene *cbh1* do *T. reesei*, flanqueando o gene *glal* que codifica a glicoamilase do *T. reesei*, foram integrados ao genoma da linhagem produtora final, designada 70H2-TrGA #32-9 (FDA-GRN 372).

A glicoamilase derivada é utilizada para sacarificar o amido de milho liquefeito na fabricação de adoçantes à base de amido de milho, como o xarope com alto teor de frutose. Ela maximiza a conversão do substrato amiláceo em carboidratos fermentáveis. Além disso, intensifica a extração e a sacarificação do amido (*mashing*) de cereais maltados, de cereais e de outras fontes vegetais (que incluem cevada, milho, trigo, centeio, sorgo (*milo*), arroz, tapioca e batatas). Os líquidos (mostos) resultantes do processo são fermentados, normalmente por uma levedura, para produzir etanol (e, às vezes, ácidos orgânicos). A glicoamilase do *Trichoderma reesei* também é empregada nos processos de fabricação do ácido láctico, similares àqueles utilizados na fabricação do álcool para bebidas (FDA-GRN 372).

5. Pululanases

As pululanases (EC 3.2.1.41) são tipos específicos de glucanases, exoenzimas amilolíticas, que degradam a pululana, a amilopectina, o glicogênio e α - e β - dextrinas limite da amilopectina e do glicogênio. Elas são produzidas na forma de lipoproteínas extracelulares ancoradas à superfície das células por bactérias Gram-negativas. As pululanases do tipo I atacam as ligações α -1,6, em específico, enquanto as do tipo II também são capazes de hidrolisar as ligações α -1,4. As pululanases clivam as ramificações das moléculas de amilopectina do amido, produzindo cadeias de amilose e, por isso, são denominadas enzimas desramificantes (Lee e Whelan, 1972). A maltose é o menor açúcar que elas conseguem liberar da ligação α -1,6:



Singh et al. (2008)

Elas são utilizadas com outras enzimas, principalmente, para intensificar a sacarificação do amido em glicose e xarope de glicose. Às vezes, são aplicadas como enzimas na preparação de pães, bolos etc. ou na indústria de bebidas alcoólicas, aumentando a quantidade de açúcares fermentáveis disponíveis para conversão em álcool (FDA-GRN 20). As pululanases são produzidas por fermentação, utilizando-se culturas de bactérias (*Bacillus* e *Klebsiella*) ou fungos (*Trichoderma*).

Existe uma pululanase recombinante específica, oriunda do *Bacillus naganoensis*, expressa em *Bacillus subtilis* (FDA FDA-GRN 20). O *Bacillus subtilis* também é utilizado para expressar a pululanase do *Bacillus acidopullulyticus* (FDA FDA-GRN 205). Uma terceira pululanase, oriunda do *Bacillus deramificans*, é expressa no *B. licheniformis* (FDA FDA-GRN 72).

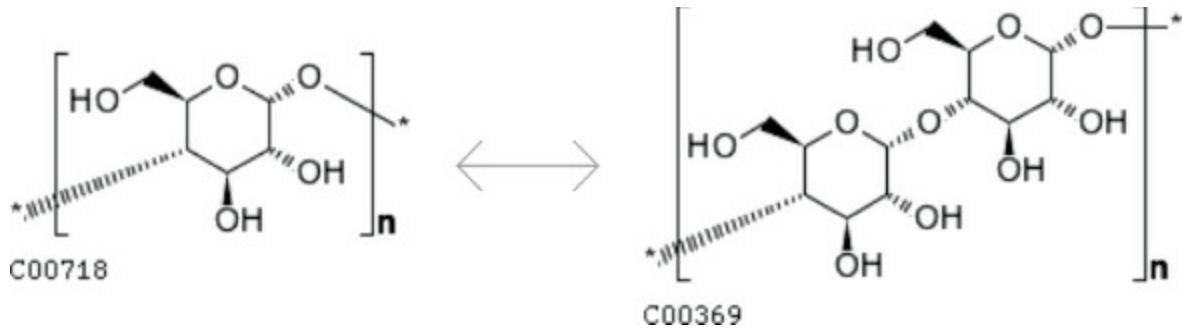
6. Amilases formadoras de maltotetraose

As amilases formadoras de maltotetraose (EC 3.2.1.60) são utilizadas para retardar o processo de envelhecimento de pães, bolos etc. e, desse modo, estender o período durante o qual os produtos apresentam uma qualidade aceitável para o consumo. Uma amilase formadora de maltotetraose, a amilase G4, é utilizada como auxiliar de processamento na indústria do amido. A amilase G4 heteróloga é produzida na linhagem de *B. licheniformis* GICC03279, a qual expressa o gene *mta* de *Pseudomonas saccharophila* (FDA-GRN 277). A fim de melhorar a termoestabilidade da enzima durante a preparação de pães, bolos etc., a sequência de DNA do gene da linhagem selvagem de *P. saccharophila* PS4 foi alterada, por meio da remoção do domínio C-terminal de ligação ao amido e da mudança de 16 dos 429 aminoácidos restantes do núcleo catalítico (FDA-GRN 277). A introdução dessas mutações aumentou a termoestabilidade e o desempenho da enzima durante o cozimento, o que tornou a amilase G4 muito mais adequada como agente antienvelhecimento do pão que a enzima maltotetraose-hidrolase do tipo selvagem, oriunda de *P. saccharophila*.

7. Glicosiltransferase ramificante

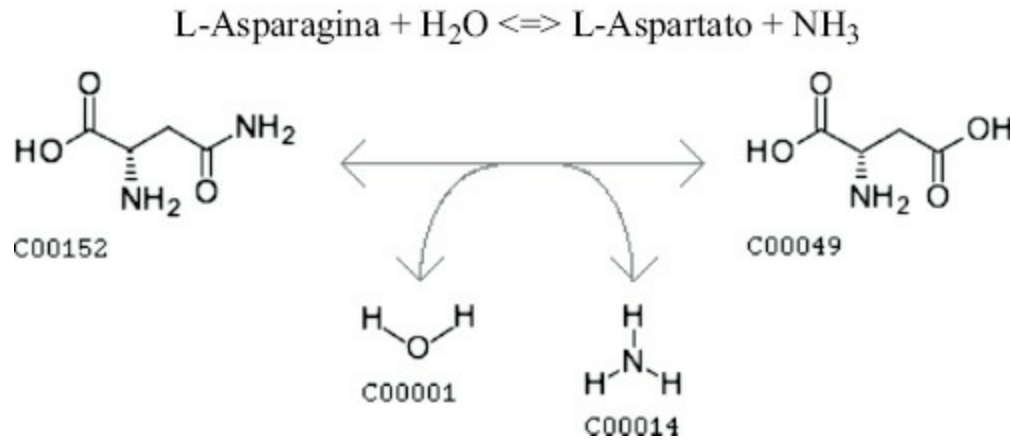
A glicosiltransferase ramificante (EC 2.4.1.18) de *Rhodothermus obamensis* produzida pelo *B. subtilis* é utilizada como enzima na indústria do amido para obter dextrinas com propriedades físicas melhoradas, como solubilidade mais alta, viscosidade mais baixa e retrogradação reduzida (FDA-GRN 274). Uma preparação melhorada de dextrinas pode ser utilizada em sopas, molhos, alimentos desidratados instantâneos, produtos com baixo teor de

gordura e refrigerantes. A glicosiltransferase ramificante catalisa a transferência de um segmento de uma cadeia α -1,4-d-glucana para um grupo hidroxila primário em uma cadeia glucana similar, criando ligações α -1,6 e aumentando o número de pontos de ramificação. Ela converte a amilose em amilopectina (KEGG R02110):



D. Asparaginase

A asparaginase (EC 3.5.1.1) converte o aminoácido asparagina em ácido aspártico (KEGG R00485):



A asparagina é um precursor da acrilamida, que é um possível carcinógeno. Quando alimentos ricos em açúcares redutores e asparagina são assados, fritos e grelhados em temperaturas superiores a 100°C ocorre escurecimento e a formação de acrilamidas, por meio da reação de Maillard. Quando se adiciona asparaginase, a asparagina torna-se indisponível e o teor de acrilamida no alimento processado pode ser reduzido em até 90%. O valor nutricional, o sabor e o escurecimento do produto permanecem inalterados (Pruser e Flynn, 2011).

As preparações à base de asparaginase são utilizadas em alimentos que contêm carboidratos e asparagina e que são aquecidos acima de 120°C , como os pães (por exemplo, pão de forma, pão francês, pães para cachorro-quente e hambúrguer, bisnagas, baguetes, pães com passas, pães com tipos diferentes de grãos e outras variedades de pães, além de biscoitos e bolachas do tipo *cracker*), outros produtos à base de cereais (por exemplo, bolos, rocamboles, bolos de mel holandês e cereais matinais), produtos à base de batatas (por exemplo, batatas fritas e batatas *chips*) e em reações nas quais ocorre formação de compostos de sabor (FDA-GRN 214).

As preparações à base de asparaginase são comercializadas com os nomes Acrylaway e PreventASe. Essa última é fabricada com o auxílio do fungo geneticamente modificado *Aspergillus niger*, transgênico para o próprio gene *aspA* da asparaginase, que está sob o controle do promotor do gene *glaA* para exibir uma expressão maior da enzima de 378 aminoácidos. Na linhagem de *A. niger* GAM-53 receptora, sete *loci* do gene da glicoamilase foram removidos e substituídos por sítios para integração direcionada, denominados *plug sites*. O gene *pepA* da principal protease, bem como os genes *amyA* e *amyB* das principais amilases, foram suprimidos, intensificando a capacidade da linhagem de secretar proteínas (FDA-GRN 214).

A preparação Acrylaway é produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* com o próprio gene da asparaginase, que

foi modificado e está sob o controle do promotor do gene *Pna2/tpi* para aumentar a expressão da enzima (FDA-GRN 201). A linhagem de *A. oryzae* BECh2 hospedeira foi modificada para eliminar a secreção de TAKA-amilase e de metaloproteinase neutra I, por meio de deleção genética. Além disso, a síntese dos ácidos ciclopiazônico e kójico foi eliminada, mediante irradiação gama e ultravioleta (FDA-GRN 201).

E. Proteinase aspártica

A proteinase aspártica, ou mucorpepsina (EC 3.4.23.23), hidrolisa proteínas, atuando preferencialmente nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos localizados em P1 e P1'. Ela coagula o leite, mas não aceita lisina em P1 e, por essa razão, não ativa o tripsinogênio.

A proteinase aspártica clonada, oriunda de *Rhizomucor miehei* e produzida por *A. oryzae*, é utilizada como enzima para coagulação do leite e aprovada para uso na produção de queijos (21CFR 173.150). Uma proteinase aspártica subclonada, oriunda de *R. miehei* e produzida pela linhagem de *A. oryzae* IFO 4177, é utilizada como agente amaciante sob a marca registrada NovoCarne. A linhagem receptora *A. oryzae* IFO 4177 é uma linhagem industrial geneticamente modificada, bastante conhecida do Instituto para Fermentação de Osaka, Japão. Nesse plasmídeo de expressão, a proteinase aspártica está sob o controle do promotor do gene da TAKA-amilase de *A. oryzae* (FDA-GRN 34). Utilizada na forma líquida, a enzima é injetada na carne que, em seguida, passa por um processo mecânico (*tumbling*) que aumenta a distribuição. Ela também pode ser misturada aos ingredientes da marinação e, posteriormente, passar pelo processo mecânico. O preparado NovoCarne Tender tem uma especificidade limitada, agindo apenas sobre as proteínas miofibrilares, e não sobre as proteínas do tecido conjuntivo. Exibe também uma hidrólise autolimitada da miosina. Esses fatores impedem que ele amacie excessivamente a carne (FDA-GRN 34).

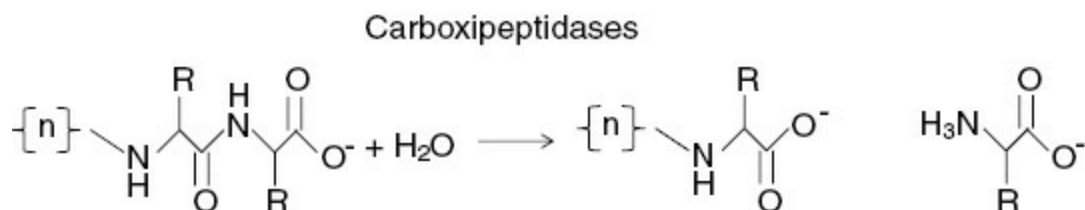
F. Aspergilopepsina I/Protease ácida fúngica

A protease ácida fúngica, ou aspergilopepsina I (EC 3.4.23.18), é uma protease que hidrolisa proteínas e apresenta uma especificidade ampla.

O gene da protease ácida fúngica do *Trichoderma reesei* é superexpresso nesse micro-organismo. O DNA que codifica a protease ácida fúngica secretada madura do *T. reesei* foi fundido no DNA que codifica o peptídeo-sinal da celobio-hidrolase I (CBHI) do *T. reesei*, intensificando a produção e a secreção. Esse quadro de leitura aberto é flanqueado pelas sequências do promotor e do terminador do gene da CBHI, oriundo do *T. reesei*, para otimizar a superexpressão. A protease ácida fúngica isolada é utilizada na maceração do milho, na fabricação de bebidas alcoólicas para aumentar o nitrogênio amino livre ou reduzir a espuma, na clarificação do suco de maçã e na degomagem das membranas durante a fabricação do suco de laranja (FDA-GRN 333).

G. Carboxipeptidases

As carboxipeptidases pertencem à subclasse das peptidases que hidrolisam as extremidades C-terminal de cadeias polipeptídicas. Também são chamadas de exopeptidases (EC 3.4.11.x-3.4.19.x):



A função tecnológica da carboxipeptidase é liberar aminoácidos da extremidade C-terminal de proteínas e peptídeos, presentes em vários alimentos, como o leite (caseína, soro do leite) e a carne, a fim de facilitar e/ou acelerar o surgimento de sabores durante a fase de maturação.

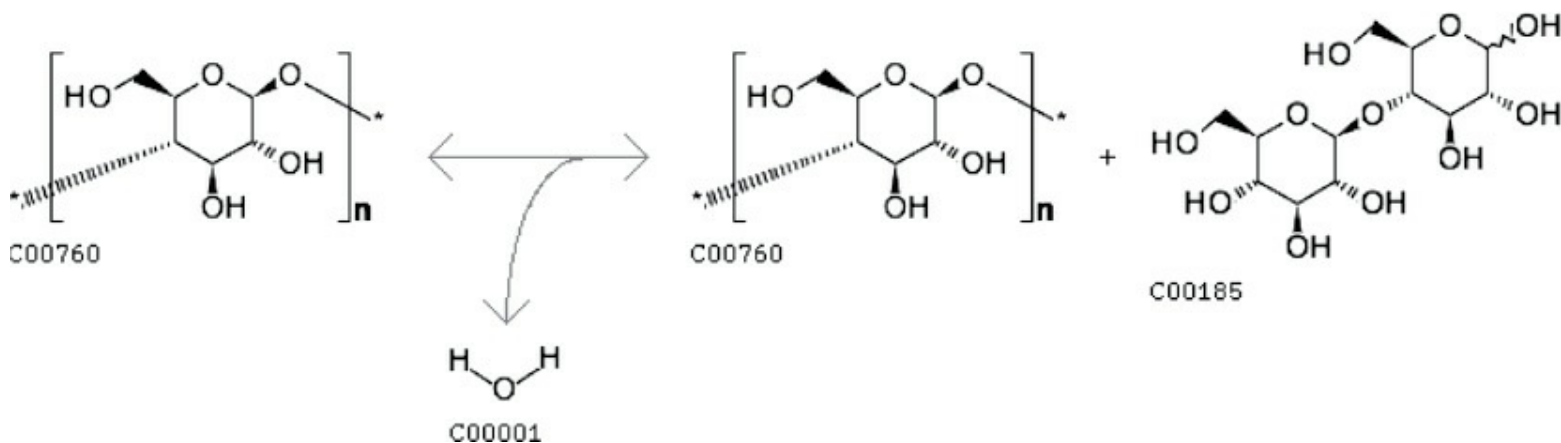
A preparação enzimática à base de carboxipeptidase do tipo serina, comercializada com o nome Accelerzyme CPG, deriva de culturas geneticamente modificadas de *Aspergillus niger*. A linhagem hospedeira *A. niger* ISO-528 deriva da linhagem GAM-53 pela deleção dos sete *loci* do gene *glaA* da glicoamilase, os quais foram substituídos pelos chamados *plug sites* ou sítios para integração direcionada. Esses sítios do gene Δ *glaA* permitem a inserção (guiada pelos sítios) dos cassetes de expressão. Além disso, o gene *pepA*, que codifica a principal protease foi inativado e os genes *amyA* e *amyB*, que codificam as principais amilases, foram suprimidos. A linhagem também tem a capacidade melhorada de secretar proteínas, a qual foi selecionada mediante geração por mutação clássica (FDA-GRN 345).

O cassete de expressão da carboxipeptidase contém DNA do *A. niger*, que começa com o promotor do gene *glaA*, acompanhado da sequência inteira do gene *pepG*, a qual codifica a proteína carboxipeptidase, e flanqueado em 3' pela sequência do terminador do gene *gluA*. Essa sequência garante a terminação eficiente da transcrição do gene *pepG* e o direcionamento da unidade de expressão para os *loci* Δ *glaA* (FDA-GRN 345).

A preparação *Accelerzyme CPG*, à base de carboxipeptidase, pode ser utilizada em queijo, queijo modificado por enzimas e carne fermentada. Na produção de queijos, a enzima é adicionada ao leite, junto com as bactérias do ácido láctico, que possibilitam à enzima agir sobre as proteínas presentes no queijo e liberar os aminoácidos como precursores dos compostos responsáveis pelo sabor. Dessa forma, desenvolvem-se os mesmos tipos de compostos responsáveis pelo sabor encontrados na maturação regular, porém a velocidade do desenvolvimento do sabor é acelerada, resultando em um período mais curto de maturação do queijo, bem como na redução do sabor amargo durante o processo. Na carne fermentada, a carboxipeptidase também pode ser utilizada para acelerar o desenvolvimento do sabor durante a maturação. A carne seca fermentada é produzida por meio do corte e mistura de pedaços frescos de carne e toucinho defumado, junto com bactérias do ácido láctico. A mistura é embutida em intestino de porco ou material sintético e deixada para secar e fermentar em uma câmara de maturação com temperatura e umidade controladas. Durante o período de maturação de três semanas, a umidade se reduz por evaporação, o pH diminui como resultado da formação de ácido láctico pelas bactérias do ácido láctico, as quais também formam os componentes responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. A adição da carboxipeptidase às bactérias do ácido láctico durante o corte e a mistura da carne e do toucinho defumado leva à liberação de aminoácidos, que estimulam as bactérias do ácido láctico a formar os componentes responsáveis pelo sabor. Como consequência, a carne alcança o sabor desejado depois de 22 dias, e não 28 (FDA-GRN 345).

H. Celulase

A celulase (EC 3.2.1.4) é a enzima responsável pela endo-hidrólise das ligações β -1,4-d-glicosídicas da celulose, da liquenina e das β -d-glucanas dos cereais. Além disso, as celulases hidrolisam as ligações β -1,4- em β -d-glucanas, que também contêm ligações β -1,3 (KEGG R02886):



As preparações à base de celulase podem ser utilizadas para: hidrólise de celulose de uma ampla variedade de alimentos que contêm celulose, tais como produtos cítricos ou outras frutas utilizadas na produção de sucos e vinhos; remoção de fibras das tortas de prensagem na produção de óleos comestíveis; aumento da recuperação de amido de batatas e de outras fontes de amido; extração de proteínas de folhas e gramíneas; amaciamento de frutas e verduras antes do cozimento; extração de óleos essenciais e compostos de aroma de vegetais; tratamento do mosto para destilação; extração de componentes do chá-verde; e outros usos (FDA-GRN 292).

Há uma preparação à base de celulase que deriva de um fungo geneticamente modificado, o *Myceliophthora thermophila*. Cópias extras do gene *eg5* da celulase do *M. thermophila* foram incorporadas ao cromossomo do *M. thermophila* receptor. Essas cópias adicionais estão sob o controle do promotor do gene *cbh1*, resultando em uma linhagem hiperprodutora de celulase (FDA-GRN 292).

I. Ciclodextrina glucanotransferase

A ciclodextrina glucanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima singular capaz de converter amido ou derivados do amido em ciclodextrinas, por meio de uma reação de ciclização. Essa enzima provoca a ciclização de parte de uma cadeia de α -1,4-d-glucana, pela formação de uma ligação α -1,4-d-glicosídica (KEGG EC 2.4.1.19).

Inicialmente, a enzima cliva a ligação α -1,4-glicosídica entre os resíduos ligados nos subsítios +1 e -1, levando à formação de um intermediário covalente. Em seguida, a cadeia linear do intermediário adquire uma conformação cíclica, que é a etapa de circularização. Depois, forma-se uma nova ligação α -1,4-glicosídica com o grupo terminal 4-hidroxila do intermediário. Os resíduos catalíticos envolvidos na clivagem da ligação são Asp²²⁹ e Glu²⁵⁷ (numeração da ciclodextrina glucanotransferase do *B. circulans*) (Figura 13.14) (Li *et al.*, 2007).

Como resultado, formam-se de modo reversível ciclodextrinas (dextrinas de Schardinger) de vários tamanhos a partir do amido e de substratos similares. As maltodextrinas lineares também podem ser desproporcionadas sem ciclização. As ciclodextrinas são α -1,4-glucanas cíclicas, compostas de 6 a mais de 100 unidades de glicose, e as formas mais comuns são a α , a β e a γ -ciclodextrinas. A produção de ciclodextrinas a partir do amido, mediada pela ciclodextrina glicosiltransferase, resulta em uma mistura de ciclodextrinas α , β e γ , que consistem em seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (Figura 13.15) (Li *et al.*, 2007).

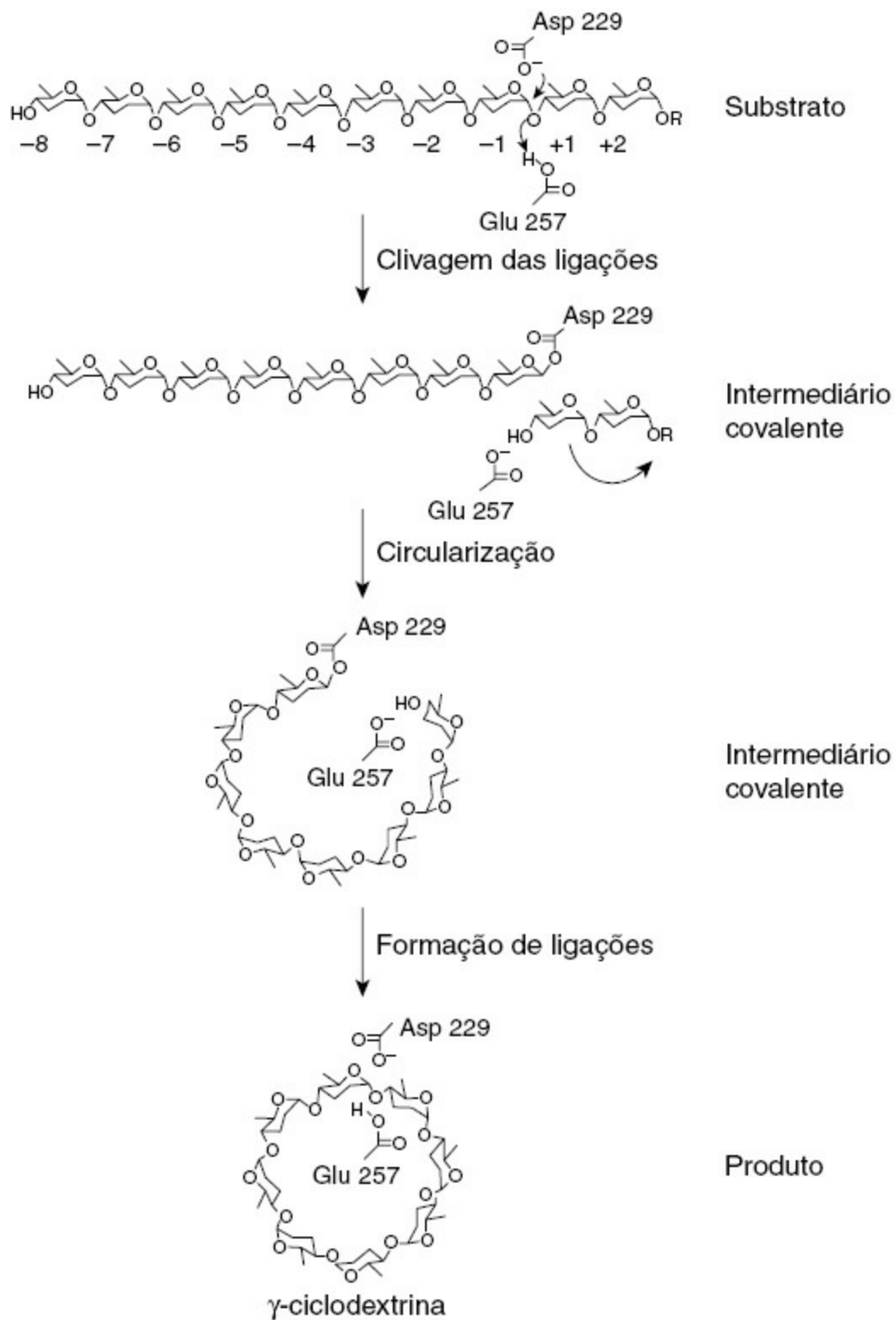


FIGURA 13.14 Circularização de derivados do amido em ciclodextrinas, catalisada pela ciclodextrina glicanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19). Extraído de Li *et al.* (2007).

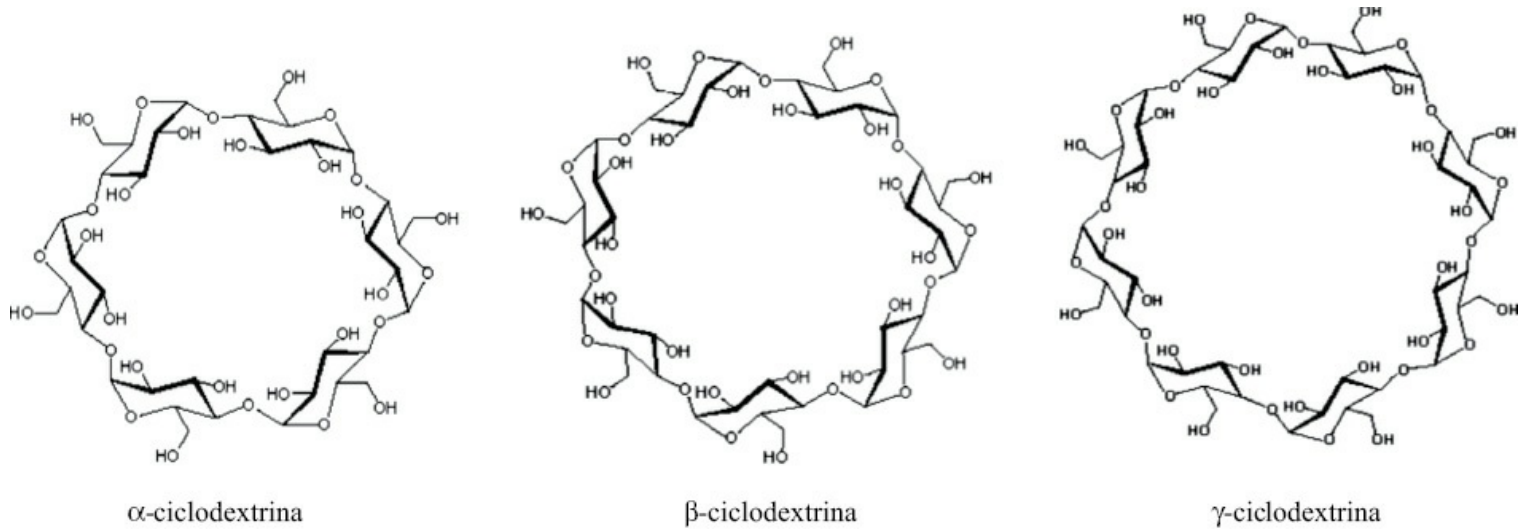


FIGURA 13.15 Formas mais comuns de ciclodextrinas circulares. Extraído de Li *et al.* (2007).

As moléculas circulares de α , β e γ -ciclodextrina têm a forma de um cone truncado e oco ou de um anel. Os átomos de hidrogênio e oxigênio das ligações glicosídicas estão voltados para o lado interno do anel, enquanto os grupos hidroxila estão localizados do lado externo; como consequência disso, as ciclodextrinas têm uma cavidade hidrofóbica e, ao mesmo tempo, uma superfície externa hidrofílica, que as torna solúveis em água. A cavidade hidrofóbica permite que as ciclodextrinas formem complexos de inclusão com vários compostos orgânicos. O diâmetro da cavidade cria certa seletividade para os complexos que podem ser formados pelas moléculas “hóspedes”, isto é, o anel maior da γ -ciclodextrina de oito unidades consegue acomodar uma variedade maior de moléculas hóspedes que os anéis menores das α e β -ciclodextrinas. Moléculas maiores podem formar complexos com mais de uma molécula de ciclodextrina (Tsoucaris *et al.*, 1987). A formação de um complexo de inclusão com uma molécula hóspede é a base para a utilização das ciclodextrinas em alimentos, cosméticos e preparações farmacêuticas (Li *et al.*, 2007).

As ciclodextrinas podem ser utilizadas para aumentar o teor de fibras dos alimentos sólidos, semilíquidos e líquidos. Por causa de sua capacidade de formar complexos com certas moléculas orgânicas, as ciclodextrinas podem executar certas funções tecnológicas, como adjuvante de sabor; adjuvante de coloração; ou agente transportador, estabilizante ou solubilizante de certas vitaminas (por exemplo, acetato de retinol, vitaminas K₁ e C, riboflavina e b-caroteno) e ácidos graxos (FDA-GRN 155). Em geral, são consideradas agentes estabilizadores, emulsificantes, transportadores e auxiliares da formulação de alimentos (FDA-GRN 64).

As ciclodextrinas são produzidas com o uso de preparações de ciclodextrina glucanotransferase. Nos Estados Unidos, essas preparações são elaboradas por linhagem *E. coli* K12 recombinante, a qual expressa o gene que codifica a α -CGTase da *Klebsiella oxytoca* (FDA-GRN 155). A enzima é totalmente removida da ciclodextrina final (FDA-GRN 155, FDA-GRN 64).

J. Quimosina

A quimosina (EC 3.4.23.4) é uma peptidase com ampla especificidade pelo substrato. Ela é mais conhecida por sua capacidade de coagular o leite, ao clivar a ligação Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ da κ -caseína (Gilliland *et al.*, 1991) e, por essa razão, ser essencial na produção de queijos firmes. A quimosina produzida de maneira heteróloga substitui as preparações tradicionais obtidas do estômago de bezerras.

A quimosina B bovina (*Bos taurus*) é produzida por fermentação submersa de *Trichoderma reesei*. O DNA que codifica a porção proquimosina da proteína quimosina foi sintetizado utilizando-se os códons do *T. reesei*, sem alteração da sequência de aminoácidos codificada. O gene sintético da quimosina B está sob o controle do

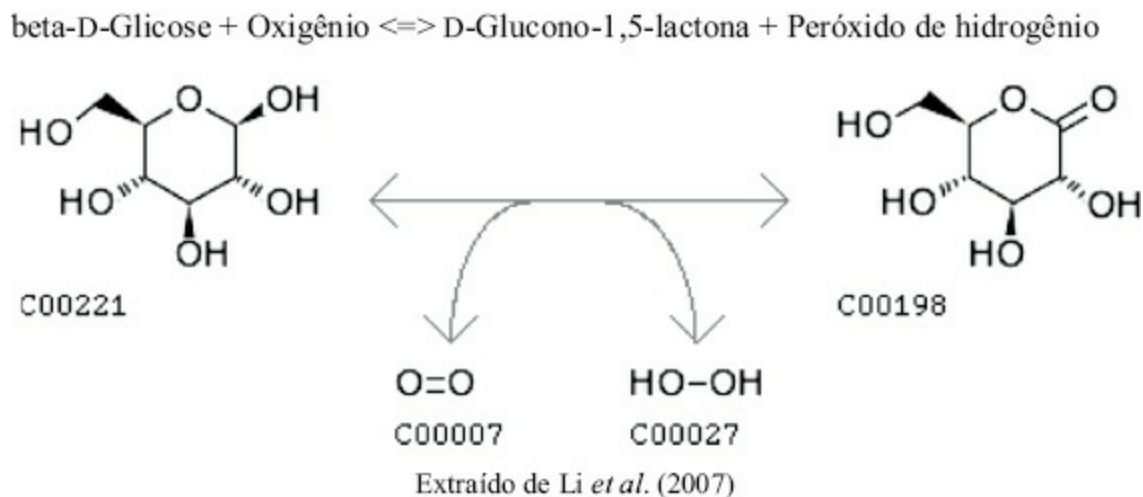
promotor e do terminador originais de *T. reesei*. Um segundo cassete de expressão do DNA transformante codifica uma chaperonina do *T. reesei* que é encontrada no retículo endoplasmático e está envolvida no enovelamento de proteínas nascentes secretadas. Essa sequência codificadora está fundida em um promotor e em um terminador diferentes, oriundos do *T. reesei*, para o controle da expressão (FDA-GRN 230). A linhagem de *Trichoderma reesei* GICC03278 hospeda a sequência construída para a expressão, e a preparação enzimática resultante é conhecida pelo nome comercial Chymostar Supreme. A linhagem *T. reesei* GICC03278 foi otimizada quanto à produção da enzima, por meio da supressão de vários genes.

A quimosina bovina é produzida na forma de proteína de fusão utilizando-se o gene da glicamilase de *A. niger* como molécula transportadora. Para tal, introduziu-se no *A. niger* var. *awamori* uma cópia sintética da quimosina bovina que apresenta os códons de uso otimizado e uma alteração de serina-351 para treonina. A quimosina é liberada da proteína de fusão glicamilase-proquimosina pela clivagem autocatalítica do propeptídeo (Kappeler *et al.*, 2006).

A quimosina recombinante bovina transcrita a partir do gene sintético da proquimosina bovina também é produzida em *E. coli*, em *A. niger* var. *awamori* (Chy-Max) e na levedura *Kluyveromyces lactis* (Maxiren) (FDA 21 CFR 184.1685).

K. Glicose oxidase

A glicose oxidase (EC 1.1.3.4) é uma oxidoredutase que catalisa a oxidação da glicose em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e D-glucono-1,5-lactona, agindo sobre os grupos CH-OH, com o oxigênio como acceptor (KEGG R01522):



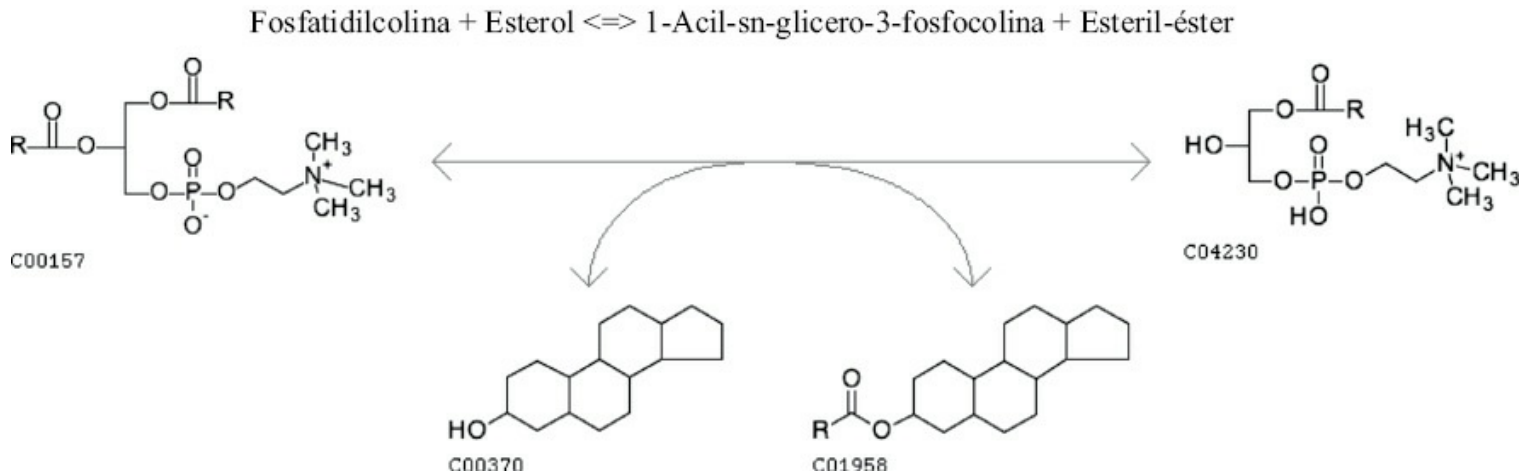
A glicose oxidase é utilizada na indústria da panificação como auxiliar de processamento para reforçar o glúten em massas. A enzima contribui para a oxidação dos grupos sulfidrilas livres do glúten, que participam da formação de ligações de dissulfeto. Como resultado, a massa torna-se mais forte, mais elástica, com maior resistência ao choque mecânico, assim como melhor desenvolvimento no forno e o pão com volume maior (FDA-GRN 106). A glicose oxidase também é utilizada na remoção da d-glicose da clara do ovo, a fim de evitar o escurecimento. Ela é empregada para eliminar o oxigênio das embalagens de alimentos – como o oxigênio presente no espaço livre acima das bebidas engarrafadas ou enlatadas – e também para reduzir o escurecimento não enzimático dos vinhos e maioneses.

A glicose oxidase recombinante é produzida pela linhagem *Aspergillus oryzae* BECh2 geneticamente modificada, que não produz amilase, protease alcalina (*alp*) e metaloprotease I neutra (*Npl*) e exibe deficiência de ácidos ciclopiazônico e kójico. Esse micro-organismo transporta o gene codificador da glicose oxidase de *A. niger* sob o controle do promotor do gene *Pna2ltpI* da amilase neutra I. Além disso, a parte não traduzida 5' desse

promotor foi substituída pela parte não traduzida 5' do promotor (*TPI*) do gene da fosfato isomerase de *Aspergillus nidulas* (FDA-GRN 106). A preparação enzimática resultante está registrada sob o nome comercial Gluzyme.

L. Glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase

As glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferases (EC 2.3.1.43) catalisam a transferência de resíduos acila, como os resíduos palmitoíla, oleoíla e linoleoíla, para vários esteróis (KEGG R02114):



Uma glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase de *Aeromonas salmonicida* é expressa de maneira heteróloga em *Bacillus licheniformis*. O organismo hospedeiro é a linhagem de *B. licheniformis* Bra7, modificada mediante deleção de várias enzimas (proteases, amilase), um gene para esporulação e genes originais para a resistência ao cloranfenicol para se tornar adequada à expressão de proteínas heterólogas. O gene que codifica a glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase da *A. salmonicida* foi sintetizado e o códon, otimizado. Um aminoácido foi trocado, e o gene sintético está sob o controle do promotor e do terminador originais do *B. licheniformis*. A integração no gene (*catH*) da resistência ao cloranfenicol do *B. licheniformis* foi obtida por meio de recombinação homóloga; esse gene atua na seleção, integração cromossômica e amplificação do cassete. As sequências do gene *catH* flanqueiam o cassete de expressão com as sequências montante e jusante. Parte da sequência do gene *catH*, situada a montante (denominada repetição 5'), está presente duas vezes no plasmídeo para permitir a amplificação do cassete de expressão no cromossomo (FDA-GRN 265).

A eficácia da glicerofosfolípídeo colesterol aciltransferase do *B. licheniformis* baseia-se em seus efeitos sobre a membrana celular ao transferir grupos acila dos fosfolípídeos e glicolípídeos para aceptores como os esteróis, os alcoóis graxos e outros alcoóis primários menores. Os grupos acila transferidos são, principalmente, ácidos graxos com 14C a 18C: os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. O colesterol e outros esteróis aceitam os grupos acila transferidos para se transformarem em ésteres do colesterol e ésteres de esteróis. Os alcoóis graxos (definidos como alcoóis com 12C ou maiores) também podem ser esterificados. Os produtos da reação formados dependem do(s) substrato(s), consistindo, em geral, em lisofosfolípídeos, ésteres do colesterol com ácidos graxos de 14C a 20C e ésteres de esteróis com ácidos graxos de 14C a 20C (campesterol, estigmasterol, betasitosterol, 5-avenasterol e 7-estigmasterol).

A preparação enzimática é utilizada em gemas do ovo e em ovos inteiros, em carnes processadas, na degomagem de óleos vegetais, em produtos lácteos como o queijo e em produtos de panificação que contenham ovos, como os bolos. Seu nome comercial é FoodPro™ LysoMaxa Oil (FDA-GRN 265).

A gema do ovo é bastante utilizada na indústria de alimentos, por causa de suas propriedades emulsificantes. Cerca de 30% dos lipídeos da gema do ovo são fosfolípídeos, que contribuem para as propriedades emulsificantes

da gema. Essas propriedades são exploradas em muitos alimentos, como a maionese, os molhos para salada e outro molhos e os bolos. No entanto, em alguns casos, as propriedades emulsificantes da gema não são suficientes para a obtenção de um produto homogêneo, sem separação. Por exemplo, a pasteurização da maionese em temperaturas altas provoca uma separação no produto. A preparação enzimática é utilizada para transformar os fosfolipídeos da gema do ovo em lisofosfolipídeos e ésteres do colesterol. Pode-se evitar a separação do produto na pasteurização em alta temperatura utilizando-se, no caso da maionese, gema de ovo modificada por enzimas. A gema de ovo assim modificada deixa o miolo dos bolos mais fofo e macio.

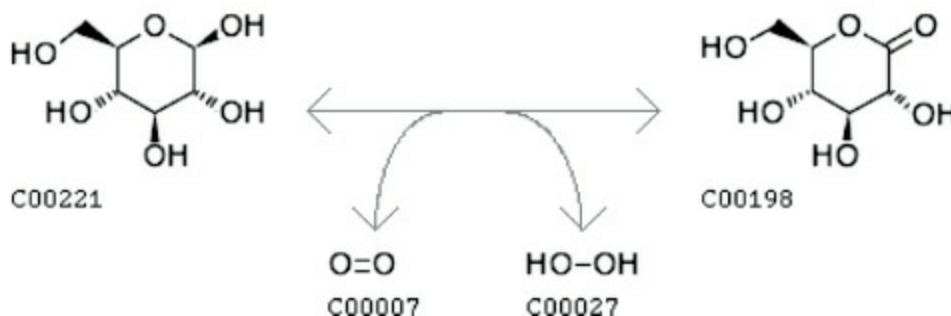
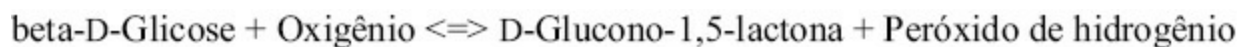
A preparação enzimática também é adotada em produtos cárneos processados. Ela melhora a emulsificação dos produtos cárneos processados e contribui para melhorar a consistência e reduzir a perda de peso por cozimento. Se adicionada à carne processada, converte os fosfolipídeos presentes em lisofosfolipídeos.

Os óleos vegetais brutos, como os de soja, contêm cerca de 12% de fosfolipídeos, que são removidos durante o processo de refinamento para melhorar sua qualidade e evitar a sedimentação. A remoção dos fosfolipídeos é realizada na etapa de degomagem do processo de refino do óleo, que pode ser realizada por meios químicos ou enzimáticos. Na degomagem, a enzima converte os fosfolipídeos em lisofosfolipídeos, que são mais solúveis em água e podem ser removidos do óleo por lavagem com água. A hidrólise enzimática dos fosfolipídeos é um processo mais suave que a degomagem química, que necessita de mais ácidos e álcalis. Além disso, a degomagem com a enzima produz menos efluentes. No processo de degomagem, a enzima catalisa a transferência de ácidos graxos dos fosfolipídeos para os fitosteróis do óleo durante a formação dos ésteres de fitosteróis. Os fitosteróis normalmente são removidos na etapa de desodorização do refino do óleo, mas, quando a preparação enzimática é utilizada, eles são convertidos em ésteres de fitosteróis; esses ésteres não são removidos durante o processo de refino, por causa da volatilidade mais baixa dos ésteres de esteróis. Os ésteres de fitosteróis não são elementos estranhos no óleo vegetal, porque uma parte menor dos fitosteróis já existe de forma natural na forma de ésteres.

O uso da preparação enzimática em produtos lácteos contribui para aumentar o rendimento durante a produção do queijo. A enzima adicionada ao leite converte seus fosfolipídeos em lisofosfolipídeos, intensificando as propriedades emulsificantes e aumentando o rendimento do queijo ao aprisionar mais lipídeos no queijo de coalho (FDA-GRN 265).

M. Hexose oxidase

A hexose oxidase (EC 1.1.3.5) catalisa a oxidação de vários monossacarídeos e oligossacarídeos (em especial, a glicose; mas, também, a maltose, a lactose, a d-galactose, a d-manose e a celobiose) com o oxigênio para produzir lactonas e peróxido de hidrogênio (KEGG R01522):



A principal aplicação da hexose oxidase está na fabricação de pães, aumentando a força da massa e o volume do pão. Para esse fim, a enzima age de modo similar à glicose oxidase, ou seja, o peróxido de hidrogênio produzido atua como oxidante de outros componentes do alimento. No entanto, essa enzima traz vantagens adicionais, uma

vez que age sobre uma variedade maior de substratos. Na indústria de alimentos, a hexose oxidase é utilizada na fabricação de queijos e tofu – auxiliando na formação do coalho –, na limitação do escurecimento indesejável – ao reduzir as reações de Maillard nos alimentos – e removendo o oxigênio durante a produção de molhos para saladas e outros molhos. Essa enzima também é adotada pelas indústrias que fabricam massas e macarrões; nesse caso, ela reforça a estrutura da massa, o que diminui a perda de amido e proteínas durante o cozimento e confere uma consistência mais firme à mordida e uma textura melhor (FSANZ A475).

Há algum tempo, é sabido que a hexose oxidase pode ser extraída de várias algas vermelhas. Porém, por causa da dificuldade para recuperar as pequenas quantidades da enzima dessas algas, suas propriedades foram pouco aproveitadas. Nos últimos anos, esse obstáculo foi superado com o uso das tecnologias do DNA recombinante, possibilitando a produção de quantidades maiores da enzima e, dessa forma, permitindo uma caracterização mais completa. As técnicas permitiram que processos industriais fossem empregados na produção de preparações enzimáticas comercialmente viáveis.

O gene que codifica a hexose oxidase foi isolado da alga *Chondrus crispus* e inserido na levedura hospedeira *Hansenula polymorpha*. O plasmídeo utilizado nessa construção foi criado a partir do plasmídeo pBR322 de *E. coli*, por meio da inserção do gene *URA3* (que codifica a oritidina-5'-fosfato descarboxilase) do *S. cerevisiae*, um promotor e um terminador original da *H. polymorpha* e o gene que codifica a hexose oxidase de *C. crispus*. Além disso, os genes que codificam a resistência à ampicilina (*Apr*) e à tetraciclina (*TCr*) na linhagem pBR322 original foram removidos. O organismo resultante produz a enzima em quantidades comerciais durante o processo de fermentação submersa (FSANZ A475, FDA-GRN 238).

N. Proteína estruturadora de gelo

As proteínas estruturadoras de gelo estão amplamente distribuídas na natureza, como em peixes de água fria, vegetais, grãos, líquens e bactérias. Elas ligam-se ao gelo, ajudando alguns organismos a sobreviver em ambientes muito frios, seja reduzindo a temperatura na qual os cristais de gelo se formam, seja modificando o tamanho e a forma dos cristais de gelo, de modo que o gelo seja menos nocivo aos tecidos (Hall-Manning *et al.*, 2004; EFSA 768, 2008).

A proteína estruturadora de gelo de tipo III foi isolada pela primeira vez do sangue do *Macrozoarces americanus*, um peixe encontrado na costa nordeste da América do Norte, e consiste em 12 isoformas que podem ser separadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A isoforma HPLC-12 produz o pico maior e é a enzima funcionalmente mais ativa nos estudos *in vitro* sobre a estruturação do gelo (EFSA 768, 2008). Essa proteína é identificada pelo código de acesso P19614, do banco de dados Swiss Prot. Tem massa molecular de 7,027 kDa, não é glicosilada, é termoestável, estável no intervalo de pH 2-12 e consiste nos 66 aminoácidos apresentados a seguir:

NQASVVANQL IPINTALTLV MMRSEVVTPV GIPAEDIPRL VSMQVNRAVP LGTTLMPDMV KGYPPA

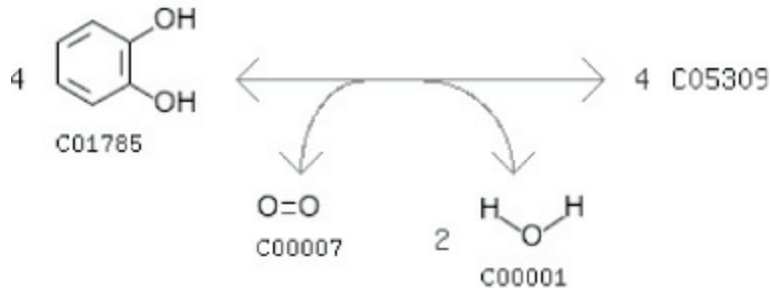
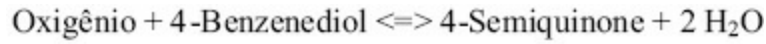
Essa isoforma da proteína estruturadora de gelo do *M. americanus* é preparada mediante fermentação de uma linhagem geneticamente modificada da levedura de panificação *S. cerevisiae*, em cujo genoma foi inserido um gene sintético para a proteína estruturadora de gelo. A proteína expressa pela levedura tem a mesma sequência de aminoácidos da proteína do peixe norte-americano, mas a sequência dos nucleotídeos foi construída de modo que favorecesse o uso dos códons da levedura, com o objetivo de maximizar a expressão. Ela é expressa e secretada no meio de cultura (EFSA 768, 2008, FDA-GRN 117). A proteína estruturadora de gelo produzida na linhagem de levedura recombinante é uma mistura de 60% de proteína não glicosilada com 40% de proteína glicosilada. Apenas a proteína não glicosilada é capaz de se ligar a cristais de gelo e alterar a estrutura do gelo.

É utilizada na fabricação de produtos gelados comestíveis, como sorvetes à base de creme, sorvetes à base de

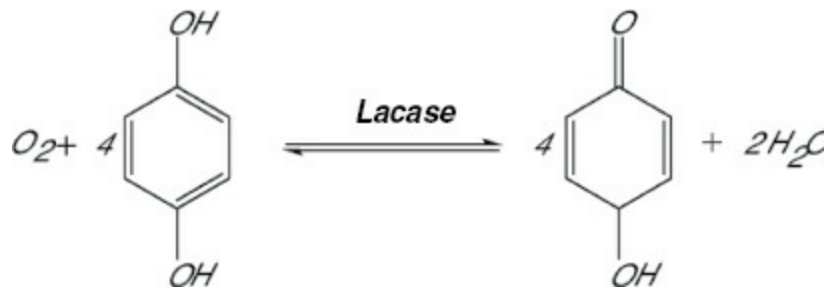
leite, sorvetes à base de água, sorvetes à base de frutas e outros tipos de sorvetes, sobremesas geladas e quaisquer produtos similares. Ela possibilita a elaboração de produtos com baixo teor de gordura, açúcar e calorias. De 2003 a 2007, mais de 470 milhões de produtos gelados comestíveis contendo a proteína estruturadora de gelo foram vendidos nos Estados Unidos, e 47 mil litros de sorvete à base de creme contendo a proteína estruturadora de gelo foram vendidos na Austrália e na Nova Zelândia (EFSA 768, 2008).

O. Lacase

As lacases (EC 1.10.3.2) são um grupo de oxidorreductases que contêm vários íons de cobre e agem sobre *o*-quinóis e *p*-quinóis e, muitas vezes, também sobre os aminofenóis e a fenilenodiamina (KEGG R00083):

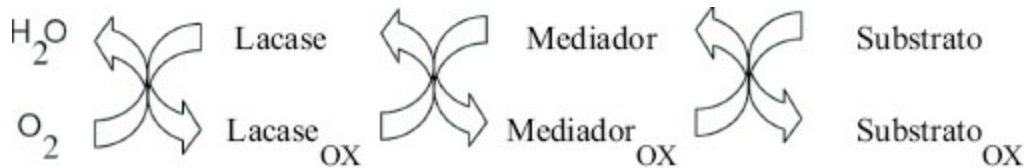


Ou:



A semiquinona pode reagir de modo enzimático ou não. As lacases catalisam a oxidação de uma ampla variedade de fenóis e outros substratos com a redução concomitante do oxigênio em água. Reações entre lacases e fenóis são comuns na natureza. Um exemplo que se destaca é a oxidação de fenóis de frutas e verduras por lacases com a formação de polímeros marrons, conhecido como escurecimento enzimático.

Nos produtos utilizados para refrescar o hálito, como as balas de hortelã, as gomas de mascar, as pastas dentais e os enxaguatórios bucais, a lacase reage com compostos polifenólicos de ocorrência natural em alimentos. As semiquinonas resultantes reagem com os compostos sulfurados voláteis causadores de odor presentes na cavidade oral, desodorizando-os e removendo o mau hálito (FDA-GRN 122):



Kunamneni *et al.* (2008)

Visto que as lacases têm a capacidade de catalisar a oxidação e a polimerização de fenóis e outras substâncias, elas são utilizadas em várias aplicações, como a clarificação de vinhos, a melhora do armazenamento da cerveja, a estabilização de sucos de frutas, a melhora das massas para a fabricação de pães e a produção de etanol. As lacases fúngicas são utilizadas para acelerar a polimerização de polifenóis na produção de bebidas como a cerveja, o vinho

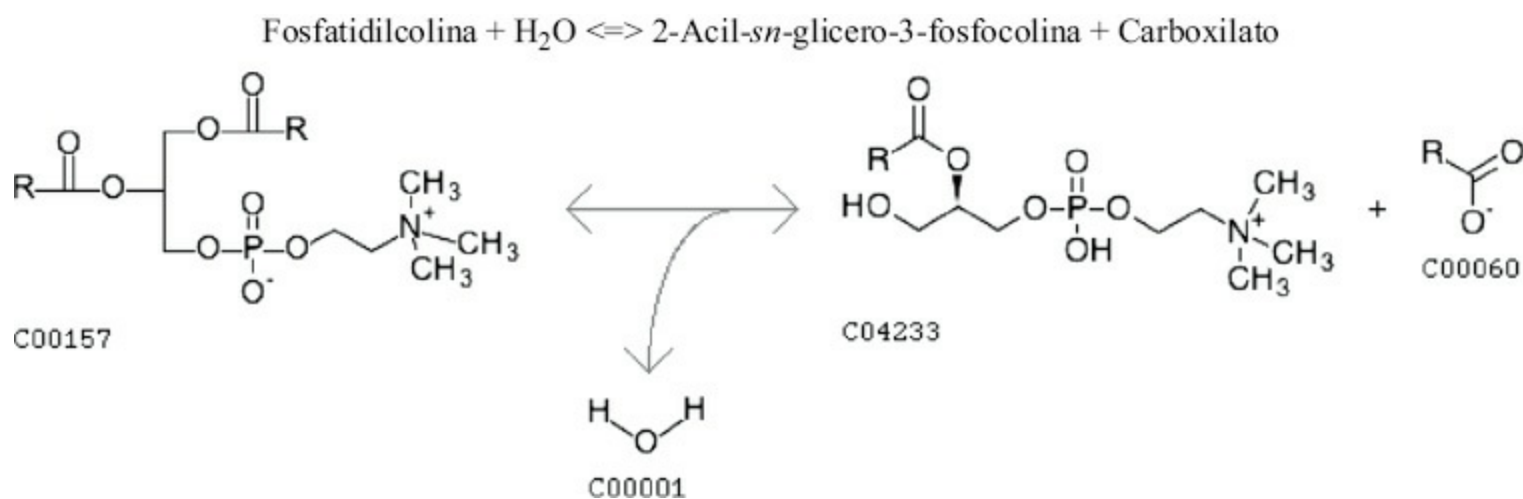
e o suco de maçã. Na clarificação dos vinhos, a lacase é utilizada para remover os fenóis do mosto de uvas brancas. A enzima também pode ser utilizada na remoção do oxigênio durante o processamento de alimentos, impedindo a oxidação de substâncias sensíveis e, ao mesmo tempo, preservando os compostos aromáticos ou evitando a formação de sabores indesejados (FDA-GRN 122).

Uma lacase transgênica foi produzida por fermentação submersa da linhagem *Aspergillus oryzae* How B711. Os três genes da TAKA-amilase dessa linhagem foram removidos, por meio do processo de interrupção do gene sítio dirigida, e fez-se a inserção do plasmídeo de expressão que codifica uma lacase de *Myceliophthora thermophila*. Com isso, o gene da lacase ficou sob o controle transcricional do promotor da TAKA-amilase de *A. oryzae* e do terminador da glicoamilase de *A. niger*.

P. Lipases

1. Fosfolipase A1

A fosfolipase A₁ (EC 3.1.1.32) hidrolisa a ligação *sn*-éster dos diacilfosfolipídeos, formando 2-acil-lisofosfolipídeo e ácido graxo livre (KEGG R01314):



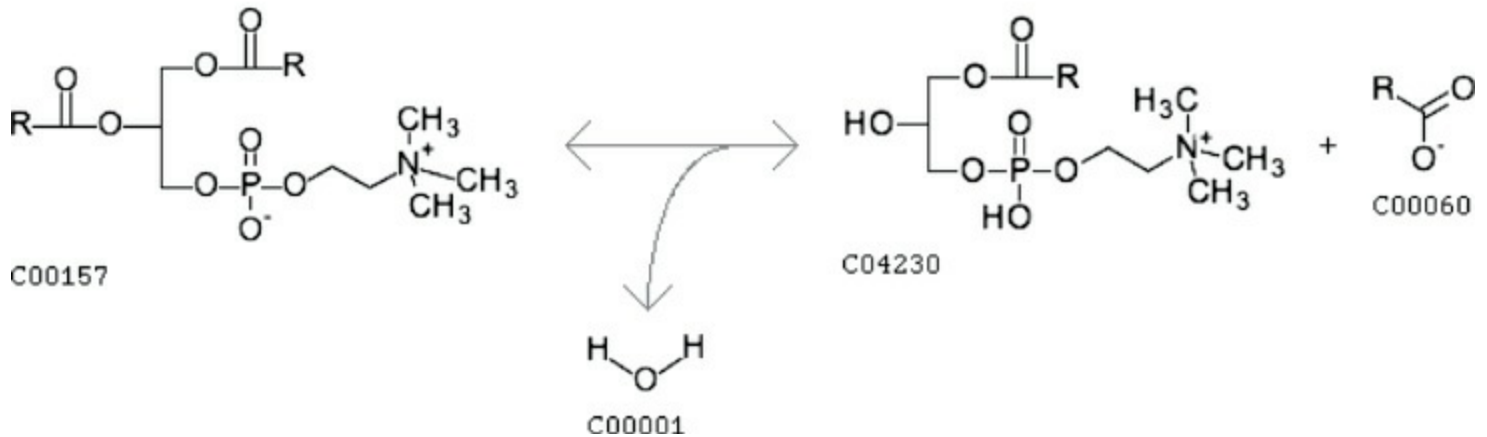
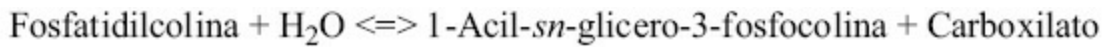
A fosfatidilcolina, muitas vezes chamada de lecitina, é composta de um esqueleto de glicerol esterificado a uma fosfocolina e a dois ácidos graxos, sendo um dos principais componentes da porção fosfolipídica da membrana celular.

O gene *FvPLA1*, oriundo do fungo *Fusarium venenatum*, foi utilizado na produção heteróloga da fosfolipase A₁ na linhagem de *A. oryzae* BECh2. O cassete de expressão contém um elemento promotor duplo, construído a partir do promotor *Pna2* [menos TATA] da amilase neutra II de *A. niger*, fundido na unidade *Pna2/TPI*, que corresponde ao promotor da amilase neutra II de *A. niger* no qual a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase (TPI) de *A. nidulans*. O gene *FvPLA1* da fosfolipase de *F. venenatum* é flanqueado em 3' pelo terminador da aliloglicosidase de *A. niger* (FDA-GRN 142).

A preparação enzimática tem o nome comercial Novozyme 46016 e age, em específico, sobre o ácido graxo da posição 1 dos fosfolipídeos. É utilizada na indústria de laticínios como auxiliar de processamento durante a produção de queijos, sendo adicionada ao leite. Os fosfolipídeos modificados do leite destinado à fabricação de queijos têm propriedades emulsificantes melhoradas e, dessa forma, tornam a produção mais eficiente ao reter mais componentes originais do leite no queijo e reduzir a perda de gordura e de outros sólidos que acompanham o soro do leite (FDA-GRN 142).

2. Fosfolipase A₂

A fosfolipase A₂ (EC 3.1.1.4) catalisa a hidrólise dos 3-*sn*-fosfolipídeos na posição 2, dando origem a 1-*sn*-lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (KEGG R01313):



Embora a fosfolipase A₂ seja capaz de hidrolisar esses fosfolipídeos quando eles estão na forma monomérica, ela é muito mais ativa quando esses substratos estão organizados na forma de micelas ou em membranas lipídicas. A presença de íons cálcio é essencial para a atividade enzimática da fosfolipase A₂.

A linhagem de *A. niger* ISO-502 geneticamente modificada não produtora de protease e glicoamilase foi utilizada como linhagem hospedeira para expressar a fosfolipase A₂ suína. A sequência codificadora da fosfolipase A₂ suína deriva de uma biblioteca de cDNA do tecido pancreático e foi integrada a uma proteína de fusão. As sequências codificadoras dos 498 aminoácidos N-terminais do gene (*glaA*) da glicoamilase do *A. niger* estão ligadas ao gene da fosfolipase A₂ suína, por meio do sítio proteolítico sintético KEX2. A expressão dessa construção é regulada pelo promotor do gene *glaA* e a terminação eficaz do RNA é garantida pelo terminador do gene *glaA* que flanqueia 3', ambos derivados da linhagem parental de *A. niger*. A linhagem produtora, designada PLA-54, possui várias cópias do cassete de expressão e, como resultado disso, os níveis de expressão da enzima fosfolipase A₂ são comercialmente atrativos (FDA-GRN 183).

A unidade de expressão é traduzida em uma proteína de fusão glicoamilase-profosfolipase A₂. Durante a secreção dessa proteína pela célula microbiana, a protease endógena kexina separa a profosfolipase A₂ da glicoamilase no sítio proteolítico KEX2. Além disso, a parte “pro” da profosfolipase A₂ também é separada, resultando em uma enzima madura, ativa. A glicoamilase truncada secretada ainda tem atividade enzimática normal (FDA-GRN 183).

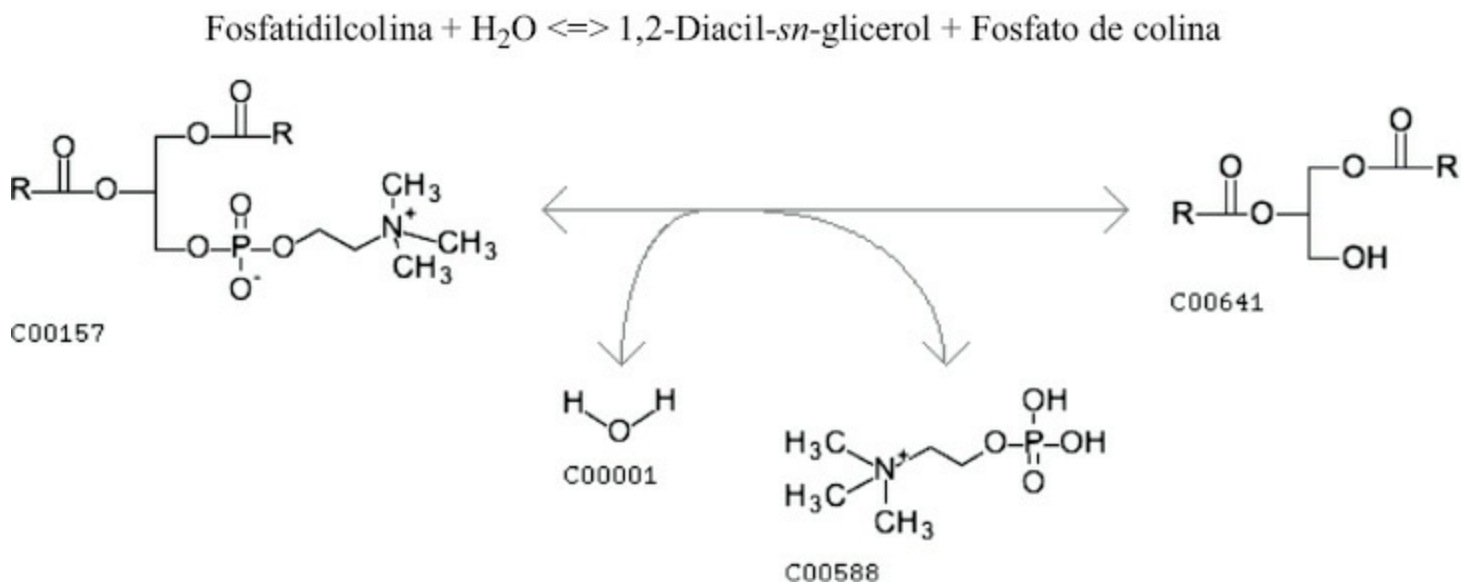
A fosfolipase A₂ suína heteróloga hidrolisa os fosfolipídeos naturais presentes nos alimentos, levando à formação de lisofosfolipídeos, agentes ativos de superfície com propriedades emulsificantes que imitam os efeitos dos emulsificantes químicos nos alimentos. Durante a mistura e a subsequente fermentação da massa do pão, a fosfolipase A₂ hidrolisa os fosfolipídeos presentes na farinha de trigo. Os lisofosfolipídeos resultantes reforçam a massa, melhorando a tolerância à mistura e ao processo mecânico do equipamento e a retenção de gás na massa. Como consequência, há um aumento no volume do pão, a crosta torna-se mais crocante e melhoram a textura e a maciez do miolo. Nos produtos finos de panificação feitos à base de gemas de ovos, a fosfolipase A₂ hidrolisa os fosfolipídeos presentes nos ovos que fazem parte da receita da massa batida e aerada. Essa ação contribui para a estrutura dos produtos derivados dessa massa, como pão de ló e *pound cakes*, por meio da incorporação e retenção eficientes de ar. A adição de fosfolipase A₂ aos molhos feitos à base de gema de ovo aumenta consideravelmente as propriedades emulsificantes, a estabilidade ao calor e a viscosidade (FDA-GRN 183). Os nomes comerciais dos

produtos em pó são Bakezyme e Cakezyme (dependendo da aplicação) e o produto líquido é vendido com o nome Maxapal A₂.

Outra fosfolipase A₂ heteróloga é produzida pela linhagem *Streptomyces violaceruber* AS-IO. Essa linhagem transporta um cassete de expressão que contém o gene codificador da enzima fosfolipase A₂ de *S. violaceruber*, regulado pelo promotor e pelo terminador da fosfolipase D de *Streptomyces cinnamoneum*. A preparação enzimática, denominada PLA2 Nagase, é utilizada como auxiliar de processamento no tratamento das gemas de ovos ou na hidrólise da lecitina. A gema de ovo tratada e a lecitina hidrolisada melhoram as propriedades emulsificantes e, por consequência, produzem um sabor melhor quando adicionadas a alimentos – como a maionese – e/ou aumentam a vida de prateleira do produto (FDA-GRN 212).

3. Fosfolipase C

As fosfolipases C (EC 3.1.4.3) catalisam a hidrólise de um fosfolipídeo, originando um diglicerídeo e fosfato de colina (KEGG R01312):

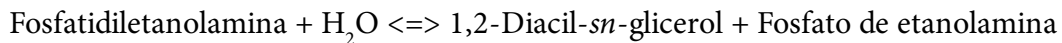


As fosfolipases C bacterianas também agem sobre a esfingomielina e o fosfatidilinositol; a enzima oriunda do plasma seminal não age sobre o fosfatidilinositol.

Um fragmento genético que codifica as fosfolipases C, designado gene PLC BD1649, foi isolado de uma biblioteca de DNA do solo e transferido para *Pichia pastoris*, para criar a linhagem DVSA-PLC-004. As sequências específicas de DNA utilizadas na construção da linhagem incluem o gene codificador das fosfolipases C – proveniente de uma biblioteca ambiental – ligado à sequência do sinal de secreção do fator a de *S. cerevisiae*; um fragmento do gene da álcool oxidase de *P. pastoris* (3' *P.p.* AOXI); um gene marcador de seleção de *Pichia pastoris*, o gene *HIS4* (histidinol desidrogenase); e as sequências reguladoras não codificadoras e bem caracterizadas de *P. pastoris*, que englobam o promotor da álcool oxidase (AOXI) e o terminador transcricional de *AUXI* (FDA-GRN 204).

A preparação enzimática é utilizada na degomagem de óleos, a primeira etapa do processo de refino projetada para remover os fosfolipídeos ou fosfatídeos contaminantes que poderiam interferir no processamento dos óleos com alto teor de fósforo, como os óleos de soja, canola, milho e girassol. A fosfolipase C BD 16449 catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster que une o glicerol às porções fosfato na posição *sn*-3 dos glicerofosfolipídeos, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina e o ácido fosfatídico; por exemplo:





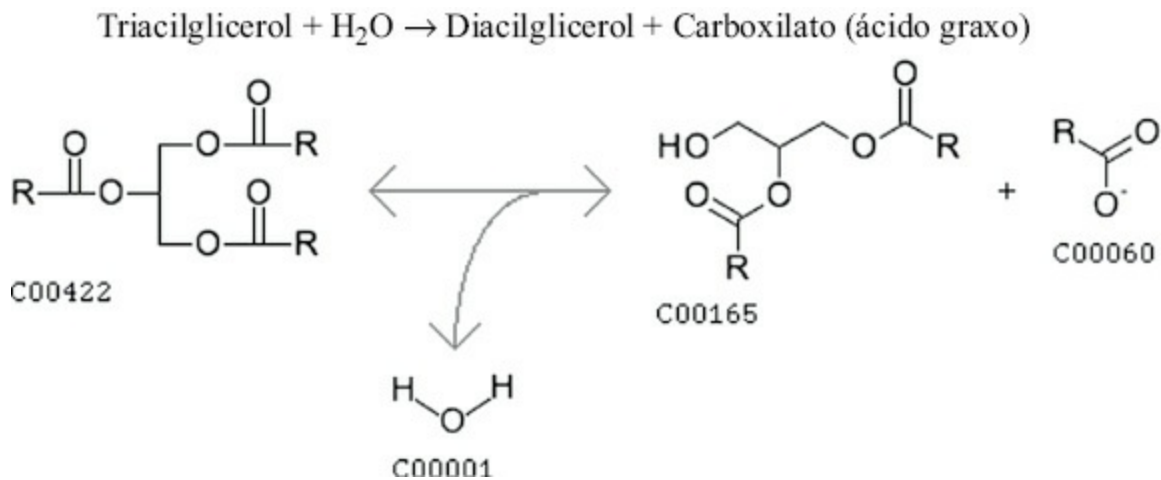
Os produtos da hidrólise são o diacilglicerol e os ésteres de fosfato solúveis em água, o que resulta nos seguintes benefícios:

- Redução da quantidade de fosfolipídeos da goma e da massa total da goma.
- Redução do fósforo total contido no óleo.
- Redução da massa total de óleo neutro arrastado na goma de fosfolipídeos.
- Aumento da quantidade de diacilglicerol contido no óleo.

Em consequência, a produção de óleo é maior e a necessidade de branqueamento é menor, o que leva à redução do uso de água, de terra de branqueamento e de recursos ambientais.

4. Triacilglicerol lipases

As triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triglicerídeos, bem como de fosfolipídeos e galactolipídeos, agindo sobre as ligações éster (KEGG R01369):



As triglicerídeo lipases hidrolisam ésteres em solução aquosa; no entanto, também são conhecidas por catalisar a esterificação de ácidos graxos com alcoóis ou rearranjar os ácidos graxos de glicerídeos em certas condições, nas quais o teor de água é baixo (FDA-GRN 43). Portanto, a especificidade de uma lipase não é determinada apenas pela espécie química, mas também depende dos reagentes e das condições da reação. Por exemplo, em algumas reações, determinada lipase mostra especificidade posicional 1,3, enquanto em outras reações atua como lipase não específica.

O rearranjo dos ácidos graxos de glicerídeos pode melhorar as características físicas e nutricionais dos produtos à base de glicerídeos. As lipases são utilizadas na indústria de sucos de frutas, nos produtos de panificação, na fermentação de vegetais e em laticínios. Tradicionalmente, as lipases são adotadas na indústria de óleos e gorduras, onde são empregadas principalmente na catálise da clivagem dos ácidos graxos de triglicerídeos. Elas são usadas na degomagem de óleos comestíveis para remover os fosfolipídeos. Também podem ser utilizadas para melhorar as propriedades emulsificantes de ingredientes (como a lecitina e a gema do ovo) durante o processamento de alimentos. Na fabricação de pães, as enzimas melhoram a estabilidade e as propriedades de manuseio da massa e, com isso, o volume do pão e a homogeneidade de seu miolo (FSANZ A569). Atualmente, existem várias triacilglicerol lipases produzidas de maneira heteróloga na cadeia alimentar e as mais importantes serão discutidas na seção a seguir.

Uma preparação enzimática à base de triacilglicerol lipase recombinante é produzida por meio de fermentação submersa, utilizando-se uma linhagem selecionada da levedura *Hansenula polymorpha*; essa linhagem transporta o

gene que codifica uma triacilglicerol lipase do fungo *Fusarium heterosporum*. O gene original é resintetizado com otimização do uso do códon, para ser expresso na levedura. No cassete de expressão, o gene sintético codifica a mesma sequência de aminoácidos do gene original de *F. heterosporum* e está sob o controle de um promotor e um terminador originais de *H. polymorpha* (FDA-GRN 238, FSANZ A569). Essa preparação enzimática específica tem o nome comercial GRINDAMYLÔ POWERBake.

Comercializadas com o nome Panamore™, as triacilglicerol lipases transgênicas produzidas por *Aspergillus niger* são utilizadas por causa de sua capacidade de melhorar as propriedades dos produtos para panificação. Nesse caso, o hospedeiro *A. niger* transporta um gene que codifica uma pré-prolipase (o gene *lfs*) e foi construído sinteticamente, com base nas sequências de várias espécies de *Fusarium*. Sua expressão é controlada pelo promotor *glaA* da glicoamilase e pela sequência do terminador *glaA* que flanqueia 3', ambos oriundos da linhagem parental de *A. niger* (FDA-GRN 296).

Uma lipase derivada de *Candida antarctica* é produzida pela linhagem *A. niger* MBin18; que foi otimizada para expressar proteínas heterólogas, por meio da supressão do gene *pyrG* e da interrupção dos genes da glicoamilase, da amilase estável em meio ácido, do regulador de protease, da amilase neutra II e da amilase neutra I. A lipase de *C. antarctica* está sob o controle do promotor *Pna2/tpi* da amilase neutra II de *A. niger*; nesse promotor, a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans*. O terminador da amiloglicosidase de *A. niger* completa esse cassete de expressão. A preparação enzimática é comercializada com o nome Lipozyme e é indicada para a indústria de óleos e gorduras, com a função de melhorar as propriedades físicas e/ou nutricionais dos produtos à base de triglicerídeos (FDA-GRN 158).

Culturas de *Aspergillus oryzae* são utilizadas para produzir várias triacilglicerol lipases transgênicas, oriundas dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* (antigamente conhecido como *Humicola lanuginosa*) (FSANZ A569, FDA-GRN 43, FSANZ A402).

Culturas da linhagem geneticamente modificada de *A. oryzae* H-1-52/c (sinônimo de AI-11) podem expressar o gene da triacilglicerol lipase de *T. lanuginosus*, sob o controle do promotor de TAKA-amilase de *A. oryzae* e a sequência do terminador da glicoamilase de *A. niger*. Há duas preparações enzimáticas derivadas dessas culturas comercializadas: a Lipozyme TL IM, para a interesterificação de gorduras puras ou produção de gorduras para fritura, gorduras e componentes da margarina; e a Novozym 677 BG, para aumentar a estabilidade da massa e o volume dos produtos de panificação, melhorar a maciez e a estrutura do miolo e tornar mais branco o miolo dos pães (FDA-GRN 43).

Uma triacilglicerol lipase de *F. oxysporum* é expressa de maneira heteróloga na linhagem de *A. oryzae* MStr115, que foi geneticamente modificada para não produzir amilase, protease alcalina e metaloprotease neutra I. Esse cassete de expressão está sob o controle do promotor do gene da amilase neutra II de *A. niger*, que está ligado à sequência-líder não traduzida da extremidade 5' do gene da triose fosfato isomerase de *A. nidulans*. A terminação da transcrição é garantida pelo terminador do gene da amiloglicosidase do *A. niger*. As preparações enzimáticas resultantes são comercializadas com os nomes Lipopan F, utilizada em panificação, e Lecitase Novo, empregada na indústria de gorduras e óleos para a degomagem do óleo vegetal, na hidrólise da lecitina para alterar as propriedades emulsificantes e na modificação da gema do ovo (FDA-GRN 75).

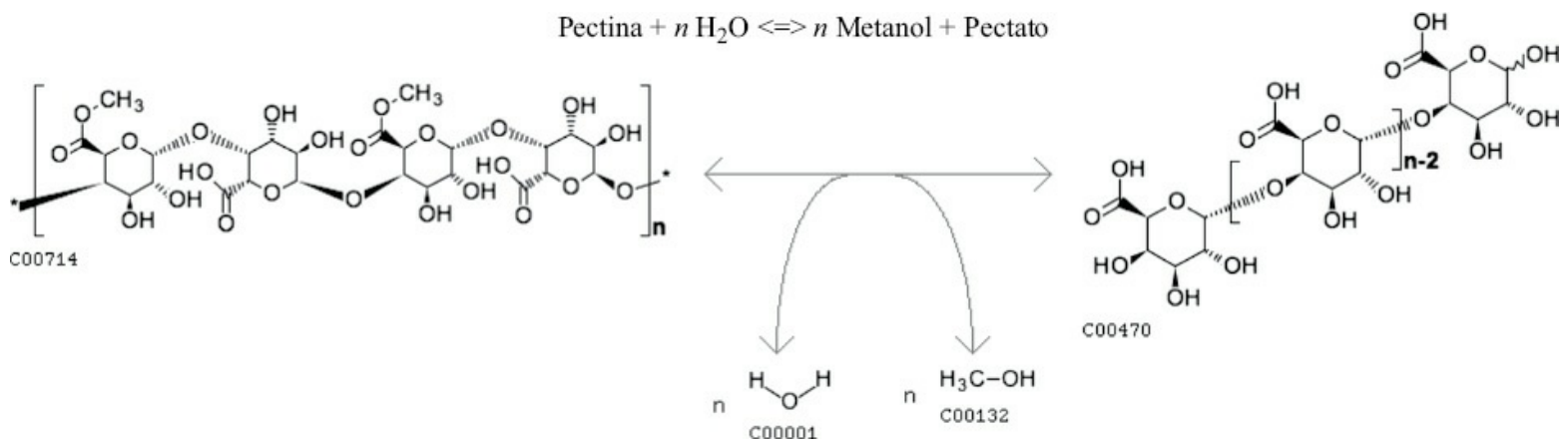
A triacilglicerol lipase de *R. miehei* expressa no *A. niger* é comercializada com o nome Palatase, mas, infelizmente, parece não haver informações disponíveis nos registros públicos sobre a natureza das construções genéticas (FSANZ A402).

Uma construção genética híbrida foi obtida dos fungos *T. lanuginosus* e *F. oxysporum* para a produção de uma triacilglicerol lipase que age, especificamente sobre o ácido graxo da posição 1, tanto de triglicerídeos quanto de fosfolipídeos (FDA-GRN 103). A proteína híbrida é constituída de 284 aminoácidos N-terminais, oriundos do

gene *Tli* da lipase de *T. lanuginosus*; esses aminoácidos estão ligados a 54 aminoácidos C-terminais, oriundos do gene *FoL* da lipase de *F. oxysporum*. Além disso, a sequência da lipase de *T. lanuginosus* foi modificada em três resíduos aminoacídicos específicos: glicina¹¹³ → alanina, ácido aspártico¹¹⁸ → triptofano e ácido glutâmico¹²¹ → lisina. Lipopan H e Lecitase Ultra são os nomes comerciais das preparações utilizadas, respectivamente, na panificação e na indústria de gorduras e óleos. Na panificação, adota-se a atividade direcionada aos triglicerídeos e fosfolipídeos, enquanto nos óleos e gorduras, a atividade direcionada aos fosfolipídeos (fosfatídeos, lecitinas) predominará, como resultado das condições específicas do processamento. A especificidade da lipase direcionada aos ácidos graxos de cadeia longa da posição 1 é empregada na indústria da panificação; a tendência menor para liberar ácidos graxos de cadeia curta das ligações éster primárias de triglicerídeos e fosfolipídeos diminui o risco de geração de sabores indesejados nas fórmulas que contêm gordura de leite. Quando utilizada com óleos e gorduras, essa enzima apresenta maior atividade em relação aos fosfolipídeos, e alta eficácia, se aplicada na modificação da gema do ovo ou do ovo inteiro, na hidrólise da lecitina para alterar as propriedades emulsificantes e na degomagem de óleos vegetais (FDA-GRN 103).

Q. Pectinesterase

As pectinesterases (EC 3.1.1.11) catalisam a desesterificação da pectina em pectato e metanol. Elas hidrolisam a ligação éster entre o metanol e o ácido galacturônico da pectina esterificada (KEGG R02362):



A pectina é um dos principais componentes da parede da célula vegetal. Nas plantas, as pectinesterases desempenham papéis importantes no metabolismo da parede celular durante o amadurecimento das frutas. A desesterificação enzimática das pectinas produz uma pectina baixamente metoxilada que, na presença de íons cálcio, forma um gel forte. A conversão enzimática da pectina altamente metoxilada em pectina de baixo teor de metoxilação possibilita a formação do gel e pode tornar desnecessária a adição de mais agentes espessantes em produtos como geleias e molhos de tomate ketchup. A pectina esterase também dá firmeza a frutas e legumes, depois que se difunde pelo tecido vegetal (FDA-GRN 8).

Uma pectina esterase heteróloga é produzida pela linhagem de *Aspergillus oryzae* IFO 4177; que transporta o gene que codifica a pectina esterase de *Aspergillus aculeatus*. O cassete de expressão consiste no promotor do gene da TAKA-amilase de *A. oryzae*, acompanhado pelo gene da pectina esterase de *A. aculeatus* e pela sequência do terminador do gene da glicoamilase de *A. niger*. A preparação enzimática resultante é comercializada com o nome Rheozyme™ e utilizada na gelificação de materiais vegetais, no espessamento de preparações vegetais, no aumento da firmeza de frutas e legumes e na desmetilação controlada das pectinas altamente metoxiladas. Ela pode ser encontrada em preparações à base de frutas, compotas, sidra, geleias e tomates (FDA-GRN 8).

R. Pectina liase

A pectina é um heteropolissacarídeo encontrado em frutas; seus principais componentes são o ácido galacturônico e o metanol, havendo também alguns açúcares neutros, como a d-galactose, a l-arabinose e a d-xilose. As moléculas de pectina são formadas por ligações α -1,4-glicosídicas entre os anéis de piranose das unidades de ácido d-galacturônico. Essas cadeias de galacturonanas são interrompidas periodicamente pela inserção de resíduos α -l-ramnopiranosil com ligação do tipo 1,2. Os grupos carboxila da pectina estão parcialmente esterificados com metanol, enquanto os grupos hidroxila, às vezes, estão parcialmente acetilados.

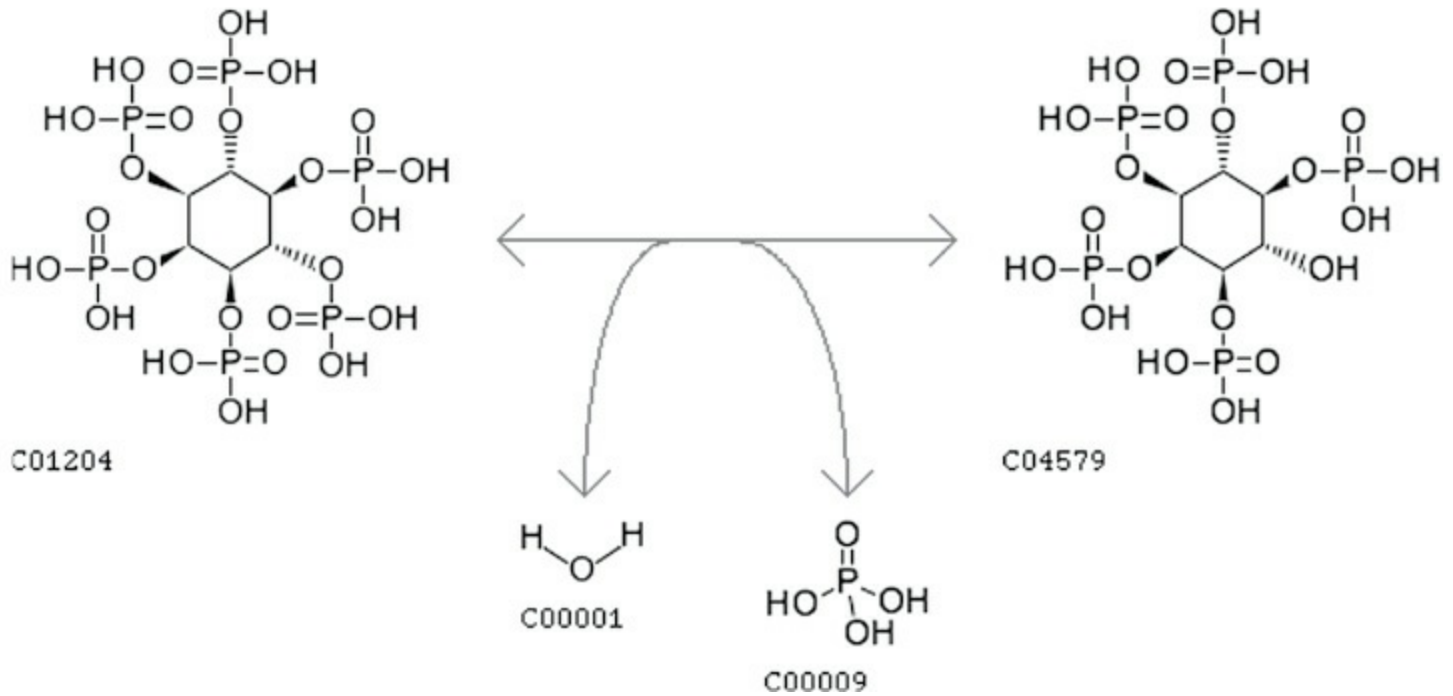
A pectina liase (EC 4.2.2.10) cliva o éster metílico da α -1,4-d-galacturonana em oligossacarídeos com grupos 4-desoxi-6-O-metil- α -d-galacto-4-enuronosil em suas extremidades não redutoras. Portanto, a enzima cliva o esqueleto do ácido poligalacturônico metilado da pectina esterificada, por meio de uma reação de transeliminação, e os oligômeros clivados contêm o grupo ácido 4,5-desidrogalacturônico em sua extremidade não redutora.

Uma pectina liase de *Trichoderma reesei* é produzida por *Aspergillus niger*. O gene (*pe/D*) da pectina liase do *T. reesei* na linhagem recombinante de *T. reesei* está sob o controle do promotor *cbhl*. Essa pectina liase é uma endoenzima de forte especificidade, com capacidade de clivar o ácido poligalacturônico altamente esterificado. No entanto, apenas as ligações glicosídicas adjacentes a um grupo éster metílico são rompidas. Por isso, a pectina liase mostra uma intensa atividade, direcionada apenas para as pectinas com elevado grau de esterificação. No caso da pectina solúvel em água esse grau é de 65-98%. A clivagem de somente um pequeno número de ligações glicosídicas provoca uma diminuição acentuada da viscosidade. Tal redução tem influência favorável tanto sobre a velocidade de filtração quanto sobre o coeficiente de transmissão de calor durante a fabricação do concentrado. Essa preparação enzimática específica à base de pectina liase heteróloga é utilizada no processamento de frutas e verduras em que há a necessidade de uma redução rápida da viscosidade. No processamento de sucos, há um aumento de seu rendimento e de compostos coloridos (FDA-GRN 32).

S. Fitases

Uma fitase (*mio*-inositol hexaquisfosfato fosfo-hidrolase) é qualquer tipo de fosfatase que catalisa a hidrólise do ácido fítico (hexaquisfosfato de *mio*-inositol), uma forma orgânica não digerível de fósforo encontrada em grãos e sementes oleaginosas, que libera uma forma aproveitável de fósforo inorgânico (Mullaney *et al.*, 2000a, b). A 4-fitase, também chamada de 6-fitase (EC 3.1.3.26), catalisa a seguinte reação (KEGG R03372):

Hexaquisfosfato de mio-inositol + H₂O \rightleftharpoons 1,2,3,5,6-pentaquisfosfato de inositol + Ortofosfato



Uma 6-fitase heteróloga de *Peniophora lycii* é produzida de maneira heteróloga na linhagem de *Aspergillus oryzae* Pz-3 (FSANZ A371) (EFSA, 2004). A expressão está sob o controle do promotor Pna2/TPI, construído com o promotor da amilase neutra II de *A. niger*, no qual a parte 5' não traduzida foi substituída pela parte 5' não traduzida do promotor da triose fosfato isomerase (TPI) de *Aspergillus nidulans*. Na Austrália e na Nova Zelândia, essa preparação enzimática é utilizada como auxiliar de processamento na indústria do amido (FSANZ A371). Ela também é conhecida como aditivo de rações para a engorda do gado monogástrico, melhorando a utilização do fósforo nos animais alimentados com dietas à base de cereais (nome comercial Bio-Feed).

T. Transglicosidase

As transglicosidases (EC 2.4.1.24) transferem um resíduo α -D-glicosil de uma α -1,4-D-glucana para o grupo hidroxil primário da glicose, livre ou combinada a uma α -1,4-D-glucana (KEGG).

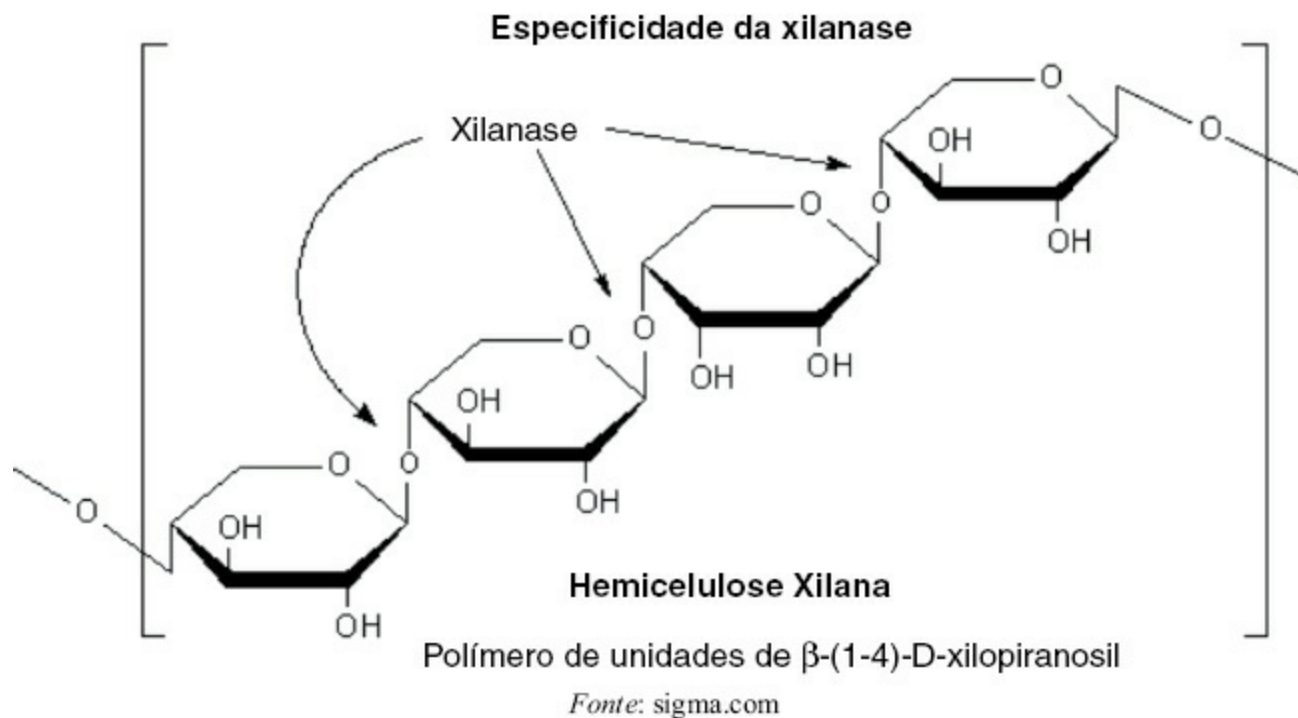
O gene da transglicosidase do *Aspergillus niger* foi expresso de maneira heteróloga na linhagem de *Trichoderma reesei* RL-P37, geneticamente modificada pela deleção de vários genes de celulase. O cassete de expressão contém o DNA que codifica a proteína transglicosidase madura de *A. niger*, proteína que está fundida no peptídeo-sinal CBHI de *T. reesei* para intensificar a secreção. Esse quadro de leitura aberto é flanqueado pelo promotor e pelas sequências do terminador do gene (*cbhl*) da celobio-hidrolase 1 de *T. reesei* (FDA-GRN 315).

A transglicosidase de *A. niger* age apenas sobre oligossacarídeos com grau baixo de polimerização (Goffin *et al.*, 2010). Essa transglicosidase catalisa a hidrólise e também a transferência de α -D-glico-oligossacarídeos, resultando em uma variedade de produtos (Goffin *et al.*, 2010). A transferência ocorre com maior frequência para a HO-6, produzindo isomaltose, a partir de D-glicose, e panose, a partir de maltose. A transglicosidase também pode transferir para a HO-2 ou HO-3 da D-glicose, para formar kojibiose ou nigerose, ou de volta para a HO-4, para formar maltose. A ação sobre a maltose produz uma concentração equimolar de panose e glicose. Como resultado da catálise da transglicosidase, os malto-oligossacarídeos são convertidos em isomalto-oligossacarídeos, que contêm quantidades elevadas de resíduos glicosil unidos por ligações do tipo α -D-1,6, a partir da extremidade não redutora. Portanto, os açúcares não fermentáveis, inclusive a rafinose e a estaquiose, são convertidos em sacarose, galactose, glicose e frutose, que podem, em seguida, ser fermentados em álcool (FDA-GRN 315). Em

consequência, a preparação é utilizada como auxiliar de processamento na produção de xarope de isomalto-oligossacarídeos, a partir do amido, e de álcool para bebidas, a partir do melão.

U. Xilanase

As xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações β -1,4-d-xilosídicas do esqueleto da arabinoxilana:



O polissacarídeo linear β -1,4-d-xilana é um componente das hemiceluloses, principais constituintes da parede das células vegetais. As arabinoxilanas são xilanases altamente ramificadas encontradas em vários cereais e existem nas formas solúvel e insolúvel.

O gene da endo- β -1,4-xilanase de *Thermomyces lanuginosus* foi transferido para uma linhagem selecionada de *Fusarium venenatum* (nome comercial NOVOZYM 899) e também de *Aspergillus oryzae* (FDA-GRN 54), com o gene xilanase de *T. lanuginosus* sob o controle do promotor e do terminador do gene da tripsina de *F. oxysporum*. As preparações enzimáticas à base de xilanase heteróloga são utilizadas na indústria alimentícia, mais especificamente como auxiliar de processamento na panificação. A hidrólise das ligações xilosídicas do esqueleto da arabinoxilana resulta na despolimerização da arabinoxilana em oligossacarídeos menores. Como consequência, a elasticidade da malha de glúten aumenta, melhorando o manuseio da massa.

REFERÊNCIAS

- Agriculture and Agri-food Canada (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency), 1995. Monsanto Canada Inc.'s Glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max* L.) Line GTS 40-3-2. DD95-05. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>.)
- Agriculture and Agri-food Canada, Food Production and Inspection Branch (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency), 1996. Monsanto Canada Inc.'s Roundup Herbicide-Tolerant Brassica napus Canola line GT200. DD96-07. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>.)
- Barry, G.F., Kishore G.M., 1997. Glyphosate tolerant plants. U.S. patent no. 5776760.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baulcombe, D.C., 2007. Amplified silencing. *Science* 315, 199-200.
- Benfey, P.N., Chua, N.H., 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244, 174-181.
- Benfey, P.N., Chua, N.H., 1990. The cauliflower mosaic virus-35s promoter – combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, 959-966.
- Birch, R.G., 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48, 297-326.
- Bos, L., 1982. Crop losses caused by viruses. *Crop Protect.* 1, 263-282.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-

- Cannon, R.J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* 71, 561-636.
- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., van der Merwe, G.K., Lonvaud, A., Erasmus, D.J., van Vuuren, H.J.J., 2006. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 113-124.
- Crickmore, N., 2011. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available at http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Croon, K.S., 1996. Petition for Determination of Nonregulated Status: Insect-protected Roundup Ready Corn Line MON 802. USDA Petition No. 96-317-01P.
- Dale, P.J., Irwin, J.A., Scheffler, J.A., 1993. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding* 111, 1-22.
- Davis, M.J., Ying, Z., 2004. Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to Papaya ringspot virus. *Plant Dis.* 88, 352-358.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J.S., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G.M., 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher-plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6873-6877.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.
- de Souza, P.M., Magalhães, P.O., 2010. Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Braz. J. Microbiol.* 41, 850-861.
- Devine, M.D., Shukla, A., 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protect* 19, 881-889.
- Diderichsen, B., Christiansen, L., 1988. Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 53-59.
- Dougherty, W.G., Parks, T.D., 1995. Transgenes and gene suppression – telling us something new. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 399-405.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S., Proebsting, W.M., 1994. RNA-mediated virus-resistance in transgenic plants – exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 544-552.
- Dröge-Laser, W., Siemeling, U., Puhler, A., Boer, I., 1994. Herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) – identification, stability, and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants. *Plant Physiol.* 105, 159-166.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.* 64, 319-325.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 147, 456-468.
- EFSA, 2011. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA J.* 9 (6), 20.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the change of strain of the producing micro-organism of the enzyme preparation Bio-Feed Phytase. *EFSA J.* doi:10.2903/j.efsa.2004.66.
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection: Scientific Committee on Plants, 1998. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding submission for placing on the market of fodder beet tolerant to glyphosate notified by DLF-Trifolium. Monsanto and Danisco Seed (notification C/K/97/01) (Opinion expressed by SCP on 23 June 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out16_en.htm).
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection: Scientific Committee on Plants, 1998. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified cotton tolerant to glyphosate herbicide notified by the Monsanto Company (notification C/ES/97/01) (Opinion expressed by the SCP on 14 July 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out17_en.htm).
- Fuchs, M., Gonsalves, D., 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 173-202.
- Gatehouse, A.M.R., Ferry, N., Edwards, M.G., Bell, H.A., 2011. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 1438-1452.
- Gerlach, W.L., Llewellyn, D., Haseloff, J., 1987. Construction of a plant-disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* 328, 802-805.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 615-636.
- Gilliland, G.L., Oliva, M.T., Dill, J., 1991. Functional implications of the three-dimensional structure of bovine chymosin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 306, 23-37.
- GMO Compass. Available at www.gmo-compass.org/.
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., Delcour, J.A., 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. *J. Cereal Sci.* 50, 345-352.
- Goffin, D., Wathelet, B., Blecker, C., Deroanne, C., Malmendier, Y., Paquot, M., 2010. Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 14 (4), 607-616.
- Golemboski, D.B., Lomonosoff, G.P., Zaitlin, M., 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic-virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6311-6315.
- Gonsalves, D., 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 415-437.
- Gottula, J., Fuchs, M., 2009. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. *Adv. Virus Res.* 75, 161-183.
- Hall-Manning, T., Spurgeon, M., Wolfreys, A.M., Baldrick, A.P., 2004. Safety evaluation of ice-structuring protein (ISP) type IIIHPLC 12 preparation. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 42, 321-333.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679.
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Harrison, B.D., Mayo, M.A., Baulcombe, D.C., 1987. Virus-resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic-virus satellite RNA. *Nature* 328, 799-802.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L., Padgett, S.R., 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126, 728-740.
- Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., Van Der Klis, R.J., Rouan, D., 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41, 134-149.
- Hoerlein, G., 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino-acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138, 73-145.
- Höfte, H., de Greve, H., Seurinck Jansen, J.S., Mahillon, J., Ampe, C., Vanderkerchove, J., Vanderbruggen, H., Montagu, M.V., Zabeau, M., Vaek, M., 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Eur. J. Biochem.* 161, 273-280.
- Hofte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- Holt Editor-in-chief, J.G., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore.
- Hudspeth, R.L., Grula, J.W., 1989. Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C-4 photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 12, 579-589.
- Husnik, J.I., Delaquis, P.J., Cliff, M.A., Van Vuuren, H.J.J., 2007. Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 42-52.
- ISAAA GM Approval Database. Available at <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>.
- James, C., 2009. Executive summary. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

- James, C., 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAAA, Ithaca, NY.
- Johnson, S.R., Strom, S., Grillo, K., 2007. Quantification of the Impacts on US Agriculture and Biotechnology-Derived Crops in 2006. National Center for Food and Agriculture Policy, Washington, DC.
- Jonas, D.A., Antignac, E., Antoine, J.M., Classen, H.G., Huggett, A., Knudsen, I., Mahler, J., Ockhuizen, T., Smith, M., Teuber, M., Walker, R., De Vogel, P., 1996. The safety assessment of novel foods. Guidelines prepared by ILSI Europe Novel Food Task Force. *Food Chem. Toxicol.* 34, 931-940.
- Kaniewski, W.K., Thomas, P.E., 2004. The potato story. *AgBioForum* 7, 41-46.
- Kappeler, S.R., Van Den Brink, H.M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhani, Z., Hansen, E.B., Johansen, E., 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 647-654.
- Kessler, H.A., Pottage, J.C., Bick, J.A., Benson, C.A., 1992. Aids Part II. *Dis. Mon.* 38 691-674.
- Kishore, G.M., Shah, D.M., 1988. Amino-acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 627-663.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C., 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.
- Kollar, A., Dalmay, T., Burgyan, J., 1993. Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tomosvirus in transgenic plants. *Virology* 193, 313-318.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* 7, 32.
- Lee, E.Y.C., Whelan, W.J., 1972. Glycogen and starch debranching enzymes. In: Boyer, P. (Ed.), *The Enzymes*, vol 3. Academic Press, New York, p. 191-234.
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 245-255.
- Likitvivanavong, S., Chen, J.W., Evans, A.M., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S.S., 2011. Multiple receptors as targets of cry toxins in mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2829-2838.
- Lin, S.S., Henriques, R., Wu, H.W., Niu, Q.W., Yeh, S.D., Chua, N.H., 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnol. Rep.* 1, 125-134.
- Lindbo, J.A., Silvarosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G., 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants – implications for regulation of gene-expression and virus-resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759.
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G., Hunt, A.G., 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6110-6114.
- Malysenko, S.I., Kondakova, O.A., Nazarova, J.V., Kaplan, I.B., Taliansky, M.E., Atabekov, J.G., 1993. Reduction of tobacco mosaic-virus accumulation in transgenic plants producing nonfunctional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.* 74, 1149-1156.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M., Maliga, P., 1995. Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio-Technology* 13, 362-365.
- McElroy, D., Rothenberg, M., Wu, R., 1990. Structural characterization of a rice actin gene. *Plant Mol. Biol.* 14, 163-171.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 1996, Current Status of Commercialization of Transgenic Crop Plants in Japan. (Available electronically at <http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/index.htm>).
- Monsanto, 1997. Petition for determination of nonregulated status: Roundup Ready Corn Line GA21 (submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 97-099-01P). (Copies of the documents are available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737.)
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Sethumadhavan, K., Rodriguez, E., Lei, X.G., Ullah, A.H.J., 2000. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 759-763.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Ullah, A.H.J., 2000. Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* 47, 157-199.
- Nelson, R.S., Abel, P.P., Beachy, R.N., 1987. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic-virus. *Virology* 158, 126-132.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Scheid, O.M., Schweiger, H.G., 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.* 75, 30-36.
- Nida, D.L., Kolacz, K.H., Buehler, R.E., Deaton, W.R., Schuler, W.R., Armstrong, T.A., Taylor, M.L., Ebert, C.C., Rogan, G.J., Padgett, S.R., Fuchs, R.L., 1996. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1960-1966.
- Obbard, D.J., Gordon, K.H.J., Buck, A.H., Jiggins, F.M., 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 99-115.
- OECD, 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. OECD, Safety Assessment of Transgenic Organisms, OECD Consensus Documents, vol. 1. OECD Publishing (2006).
- OECD, 2002. ENV/JM/MONO(2002)14. Available at www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf.
- OECD, 2010. Section 2, Molecular characterisation of plants derived from modern biotechnology. OECD, Safety Assessment of Transgenic Organisms, OECD Consensus Documents, vol. 3. OECD Publishing.
- Olempska-Bier, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 45, 144-158.
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 1-12.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavalley, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M., 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35, 1451-1461.
- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M., Fraley, R.T., 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duke, S.O. (Ed.), *Herbicide-resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, and London, England, p. 53-84.
- Pariza, M.W., Johnson, E.A., 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33, 173-186.
- Parrish, S.K., Kaufmann, J.E., Croon, K.A., Ishida, Y., Ohta, K., Itoh, S., 1995. MON 37500: a new selective herbicide to control annual and perennial weeds in wheat. Brighton Crop Protection Conference, Weeds – 1995. Vols. 1-3, 57-63.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753-2766.
- Potrykus, I., 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 205-225.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic-virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M., 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 9, 73-83.
- Pruser, K.N., Flynn, N.E., 2011. Acrylamide in health and disease. *Front. Biosci.* S3, 41-51.
- Register, J.C., Beachy, R.N., 1988. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166, 524-532.

- Sanford, J.C., 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79, 206-209.
- Sanford, J.C., Johnston, S.A., 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theoret. Biol.* 113, 395-405.
- Sauer, H., Wild, A., Ruhle, W., 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. 2. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z. Naturforsch. C.* 42, 270-278.
- Scientific Committee on Food, 1992. Reports of the Scientific Committee on Foods (Twenty-sixth series). Food Science and Techniques. European Commission, Luxembourg.
- Sharma, H.C., Sharma, K.K., Crouch, J.H., 2004. Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 47-72.
- Shea, K., 2009. Determination of Nonregulated Status for Papaya Genetically Engineered for Resistance to the Papaya Ringspot Virus. US Federal Register Volume 74 (168), 45163-45164.
- Singh, R.S., Sini, G.K., Kennedy, J.F., 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polymers.* 73, 515-531.
- Soberon, M., Pardo, L., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Gomez, I., Porta, H., Bravo, A., 2010. Pore formation by cry toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 677, 127-142.
- Stalker, D.M., McBride, K.E., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *J. Bacteriol.* 169, 955-960.
- Stanley, J., Frischmuth, T., Ellwood, S., 1990. Defective viral-DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6291-6295.
- Steinrucken, H.C., Amrhein, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic-acid 3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1207-1212.
- Svab, Z., Maliga, P., 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 913-917.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 954-960.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., Takematsu, T., 1986. Action mechanism of Bialaphos. 1. Inhibition of glutamine-synthetase and quantitative changes of free amino-acids in shoots of Bialaphos-treated Japanese barnyard millet. *J. Pest. Sci.* 11, 27-31.
- Taylor, N., Chavarriaga, P., Raemakers, K., Siritunga, D., Zhang, P., 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Mol. Biol.* 56, 671-688.
- Tepfer, M., 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 467-491.
- Then, C., 2010. Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* – synergism, efficacy, and selectivity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 791-797.
- Tsoucaris, G., Le Bas, G., Rysanek, N., Villain, F., 1987. Conformational and enantiomeric discrimination in cyclodextrin inclusion compounds. *J. Inclusion Phenom.* 5, 77-84.
- USDA, 1994. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 93-258-01p, Monsanto, Soybean, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/19/94. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 1995. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 95-045-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 7/11/95. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 1997. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 96-317-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/27/97. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>).
- USDA, 2011. Adoption of genetically engineered crops in the US. Available at <http://www.ers.usda.gov/Data/BiotechCrops/>.
- US EPA, 1996. Plant pesticide inert ingredient CP4 enolpyruvylshikimate-3-3 and the genetic material necessary for its production in all plants. Federal Register, vol. 61, No. 150, p. 40338-40340. (Available electronically at <http://www.access.gpo.gov>.)
- US EPA, 1997. Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants – exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. Federal Register 70, 17717-17720.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I.H., Ji, T.H., Bulla, L.A., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., Debeuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Vanmontagu, M., Leemans, J., 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kuznetsova, L., Stram, Y., 1993. Plants transformed with a cistron of a potato virus-Y protease (Nia) are resistant to virus-infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7513-7517.
- Voinnet, O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449-459.
- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206-220.
- Voinnet, O., 2008. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 464-470.
- Waterhouse, P.M., Smith, N.A., Wang, M.B., 1999. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* 4, 452-457.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Waterworth, H., Hadidi, A., 1998. Economic losses due to plant viruses. In: Hadidi, A., Khetarpa, R.K., Koganezawa, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, APS Press, p. 13.
- Whalon, M.E., Wingerd, B.A., 2003. Bt: mode of action and use. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54, 200-211.
- WHO Food Additives Series 40, 1998. World Health Organization International Program on Chemical Safety, Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Maltogenic Amylase Report available under <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je06.htm>.
- Wilnink, A., Vandeven, B.C.E., Dons, J.J.M., 1995. Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae. *Plant Mol. Biol.* 28, 949-955.
- Wong, E.Y., Hironaka, C.M., Fischhoff, D.A., 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 20, 81-93.
- Zacommer, B., Cellier, F., Boyer, J.C., Haenni, A.L., Tepfer, M., 1993. Transgenic plants that express genes including the 3' untranslated region of the turnip yellow mosaic-virus (Tymv) genome are partially protected against Tymv infection. *Gene* 136, 87-94.
- Zambryski, P.C., 1992. Chronicles from the agrobacterium-plant cell-DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465-490.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Vanmontagu, M., Schell, J., 1983. Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant-cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- Zhang, B.Y., Chen, M., Zhang, X.F., Luan, H.H., Tian, Y.C., Su, X.H., 2011. Expression of Bt-Cry3A in transgenic *Populus alba* × *P. glandulosa* and its effects on target and non-target pests and the arthropod community. *Transgen. Res.* 20, 523-532.
- Zhang, W., Wu, R., 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.* 76, 835-840.
- Zimmerli, B., Schlatter, J., 1991. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.* 259, 325-350.

Capítulo 1

* *Department of Nutrition and Food Science, Wayne State University, Detroit, Michigan, USA* † *Department of Nutrition and Food Studies, George Mason University, Fairfax, Virginia, USA* ** *Department of Nutrition and Food Science, University of Maryland, College Park, Maryland, USA* ‡ *Department of Human Nutritional Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*

Capítulo 2

† *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*
‡ *Swiss Federal Research Station, Switzerland*

Capítulo 3

‡ *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada*

Capítulo 4

§ *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

Capítulo 5

¶ *Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

Capítulo 6

** *Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*
† *Food Science Department, Cook College, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA*
** *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada*

Capítulo 7

†† GGStewart Associates, 13 Heol Nant Castan, Rhiwbina, Cardiff, UK

Capítulo 8

‡‡ *Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

Capítulo 9

§§ *Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada

Capítulo 10

¶¶ *Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil*

Capítulo 11

*** Department of Food Science, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, EUA, †Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada, **Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

Capítulo 12

††† *Department of Food Science and Technology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, EUA, †CICATA-IPN Unidad Queretaro, Colonia Colinas del Cimataro, Queretaro, Mexico, **Department of Human Nutritional Sciences, Faculty of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*

Capítulo 13

‡‡‡ *Department of Human Nutritional Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Canada*