

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 comoceptor 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”.

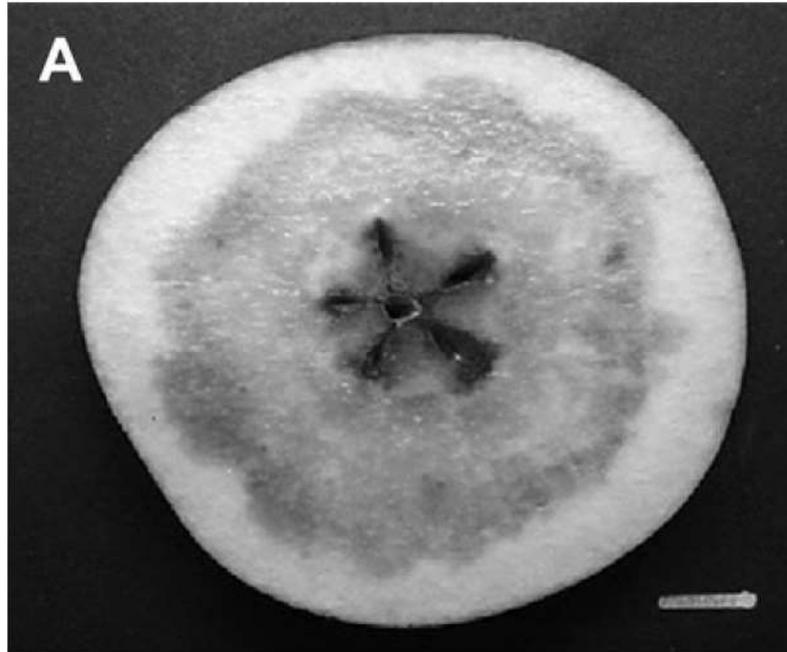


FIGURA 10.1 Escurecimento de peras *Conference* após quatro meses em condições de armazenamento que induziam o escurecimento (sem período de resfriamento, 1% de O₂, 10% de CO₂, - 1 C). Reproduzido de Franck *et al.* (2007). © 2007 com a permissão da Elsevier.

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).

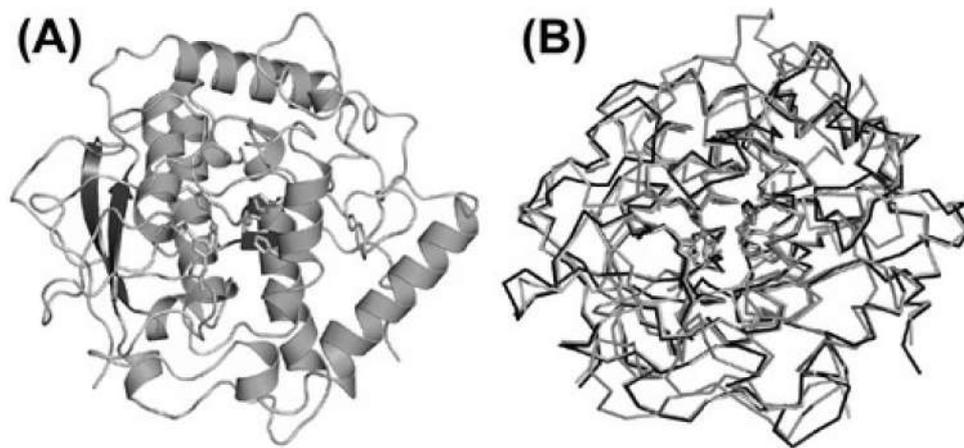


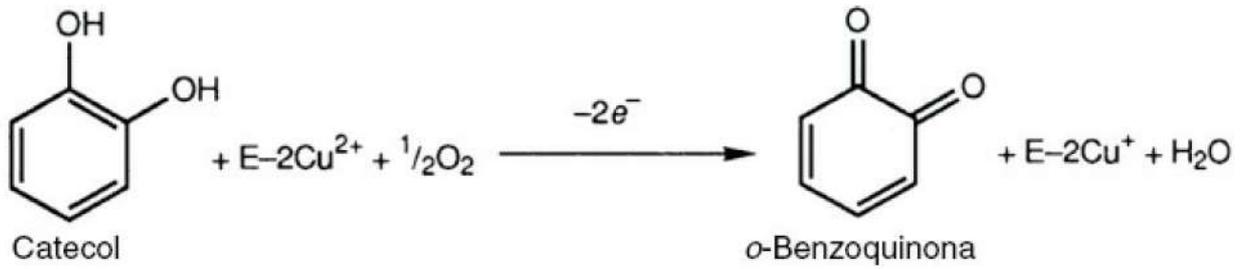
FIGURA 10.2 Estrutura obtida por raios X da polifenoloxidase (PFO) de *Vitis vinifera*. (A) Modelo em fitas que mostra a forma elipsoidal, duas folhas b e o centro com dois átomos de cobre, no interior de um feixe com quatro hélices. (B) Representação dos C_α da PFO de *V. vinifera* (azul) sobreposta 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

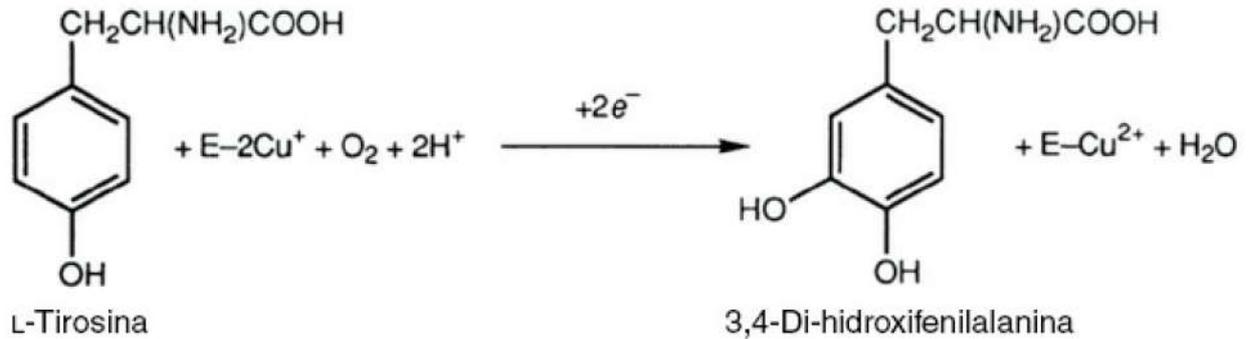
O mecanismo de ação proposto para a PFO baseia-se em sua capacidade de oxidar compostos fenólicos. Quando o tecido vegetal é danificado, a ruptura de plastídios, o compartimento celular no qual a PFO está localizada, permite que essa enzima entre em contato com os compostos fenólicos liberados pela ruptura 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-hidroxifenilalanina, 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.

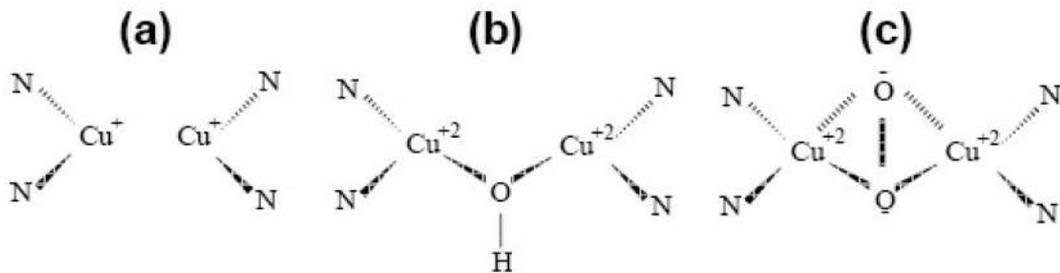
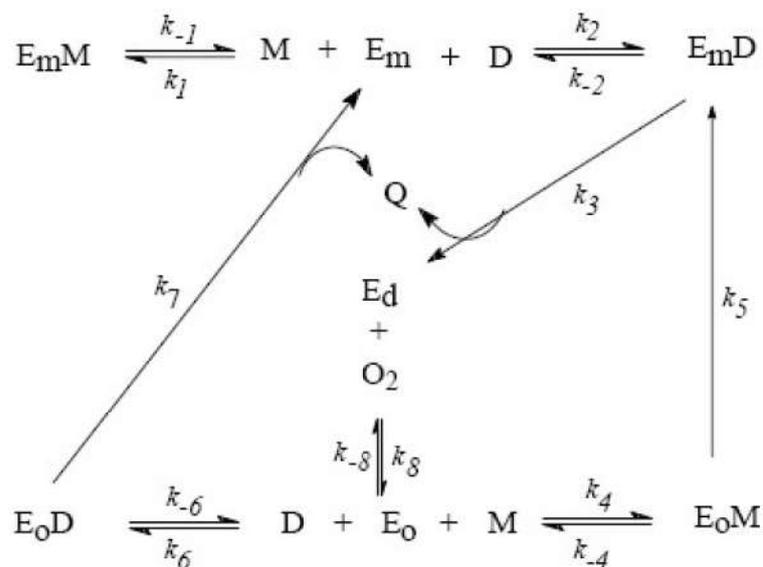


FIGURA 10.3 Estrutura da polifenoloxidase: (a) *desoxi*PFO, (b) *met*PFO e (c) *oxi*PFO. Adaptado com a permissão de Espín *et al.* (1998.) © 2010 The American Chemical Society.



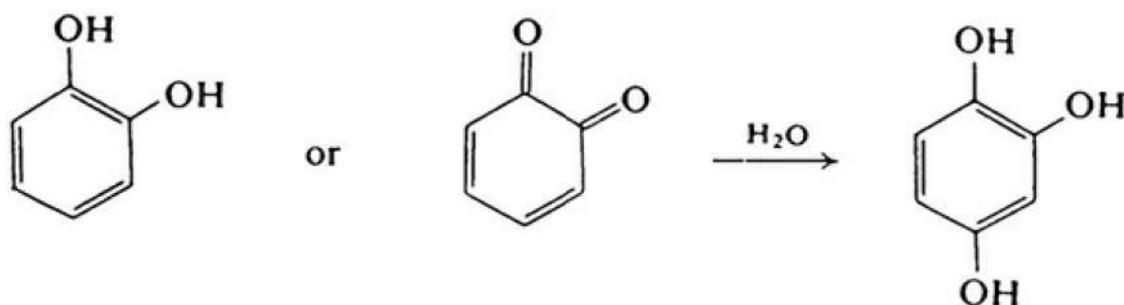
ESQUEMA 10.1 Mecanismo da reação cinética da polifenoloxidase (PFO) sobre monofenóis e *o*-difenóis. Em: *met*PFO; Ed: *desoxi*PFO; Eo: *oxi*PFO; M: monofenol; D: difenol; Q: *o*-quinona. Reproduzido com permissão, Espín *et al.* (1998). © 1998 The American Chemical Society.

Os mecanismos estruturais e cinéticos da hidroxilação dos monofenóis (M) e da oxidação dos *o*-difenóis (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_mD). 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_oD e E_mD , que, por sua vez, dão origem a duas quinonas (Orenes-Piñero *et al.*, 2005) (Esquema 10.1).

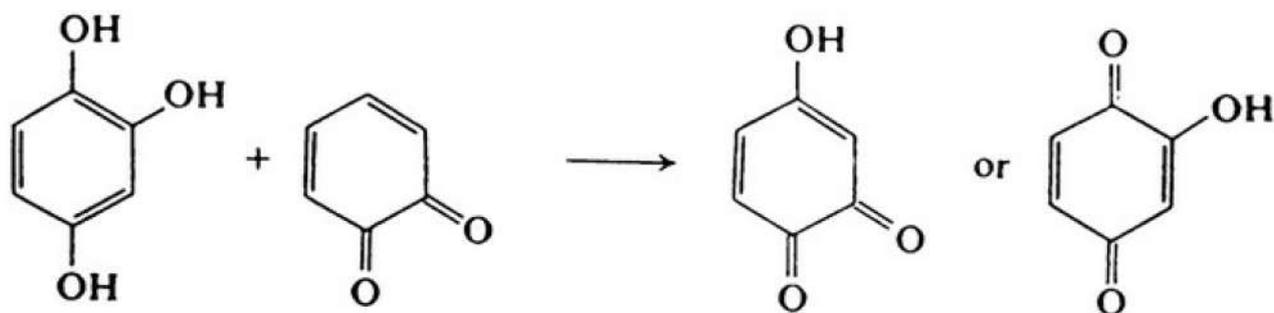
A presença do complexo final E_mM está relacionada com a ocorrência de um período de latência na atividade de monofenolase da PFO (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992), que pode ser eliminada pela adição de pequenas quantidades de agentes redutores ou de *o*-difenóis como cosubstratos.

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-hidroxibenzeno 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 (*Rhis 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 nêspers 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).

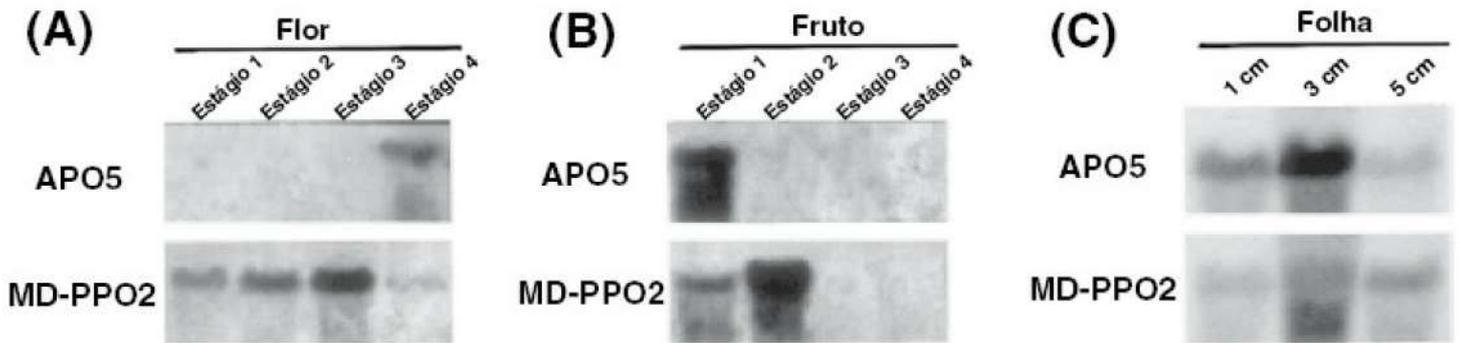


FIGURA 10.4 Expressão tecido-específica de dois mRNAs da polifenoloxidase (PFO) de maçã Fuji. Os RNAs totais foram isolados de (A) flor, (B) fruto e (C) tecidos da folha, em diferentes estágios do desenvolvimento, conforme indicado. Reproduzido de J. Y. Kim *et al.* (2001). © 2001, com a permissão da 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) submetem 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 tomateiros 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.

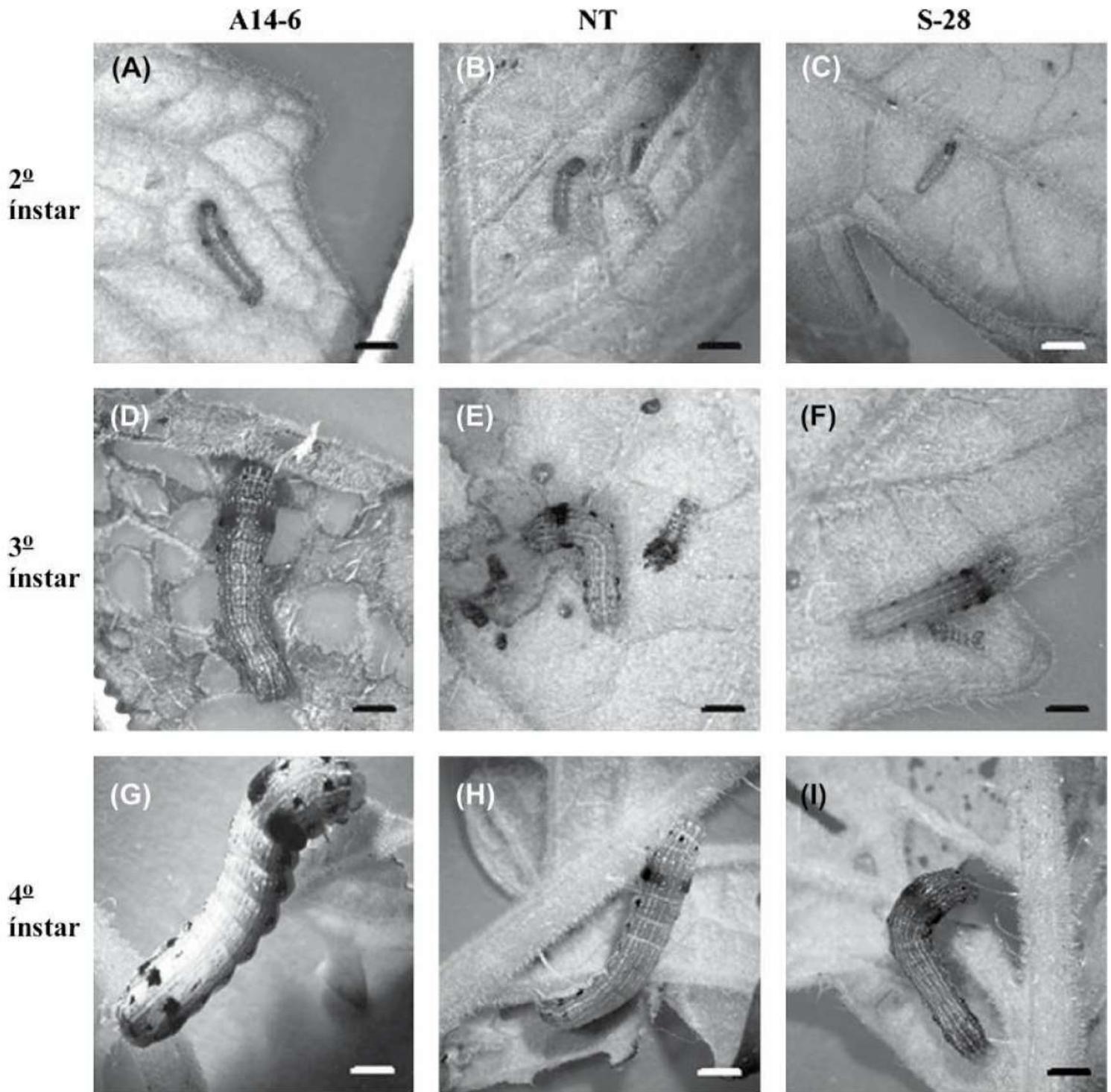
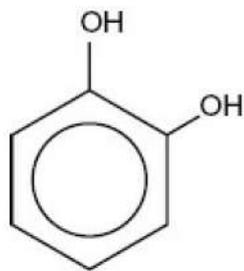


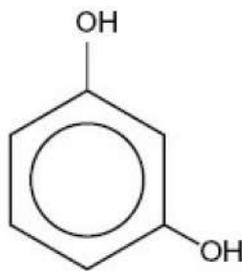
FIGURA 10.5 (A-C) Segundo ínstar, (D-F) terceiro ínstar e (G-I) quarto ínstar larval de *Spodoptera litura* (F) alimentando-se de folhas de tomateiros (nódulo 8) com graus variados de atividade da polifenoloxidase (PFO). A14-6: linhagem transgênica com atividade de PFO suprimida; NT: controle não transformado; 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

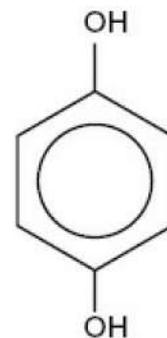
Os fenóis simples incluem monofenóis, como a L-tirosina, e *o*-difenois, como o catecol, o resorcinol e a hidroquinona. No entanto, desses compostos, apenas o catecol pode ser oxidado pela PFO, porque sua hidroxila está na posição *orto*. O catecol foi identificado nas raízes de *Diospyro kaki* por Jeong *et al.* (2009), e a PFO exibiu alta afinidade por esse composto fenólico (Özen *et al.*, 2004).



catecol



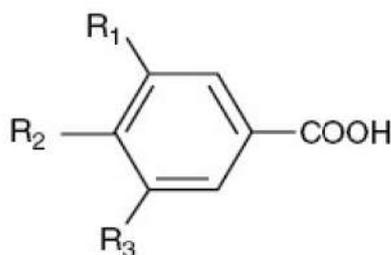
resorcinol



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 nêsperas europeias (Gruz *et al.*, 2011).



Ácidos benzoicos

Ácido gálico $R_1=R_2=R_3=OH$

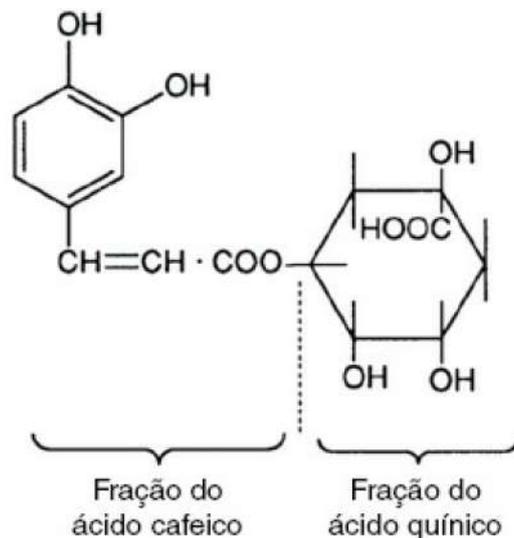
Ácido protocatecuico $R_1=H, R_2=R_3=OH$

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.

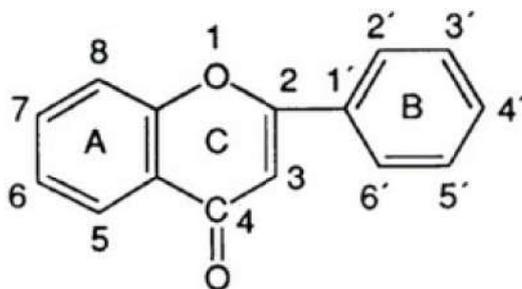


Outros membros desse grupo de compostos incluem os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. A distribuição universal e a alta concentração dos ácidos cinâmicos nas frutas podem resultar de sua função como precursores na via da biossíntese de polifenóis mais complexos.

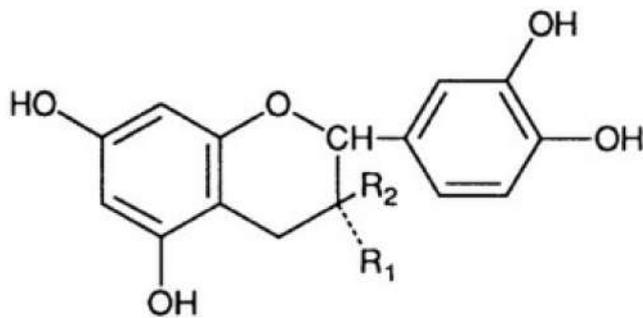


4. Flavonoides

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:

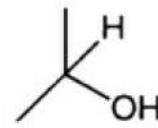


Na matéria-prima alimentar, os flavonoides importantes são as catequinas, as antocianinas e os flavonóis. A estrutura da catequina é apresentada a seguir:

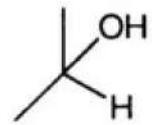


(+) – Catequina ($R_1 = H$; $R_2 = OH$)

(-) – Epicatequina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

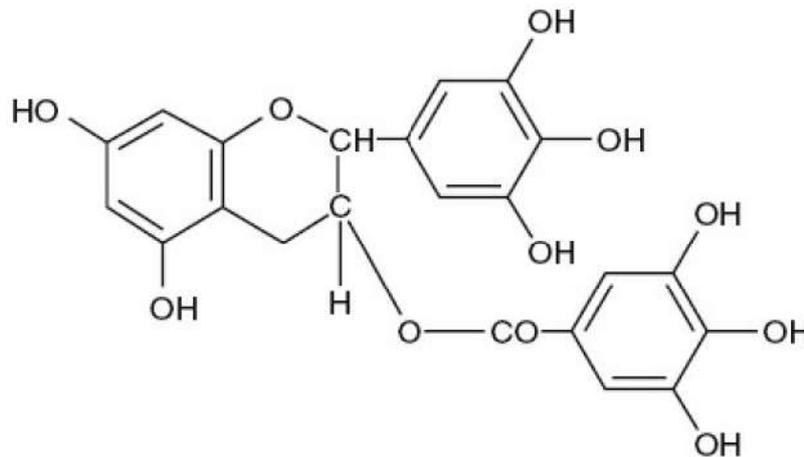


Catequina

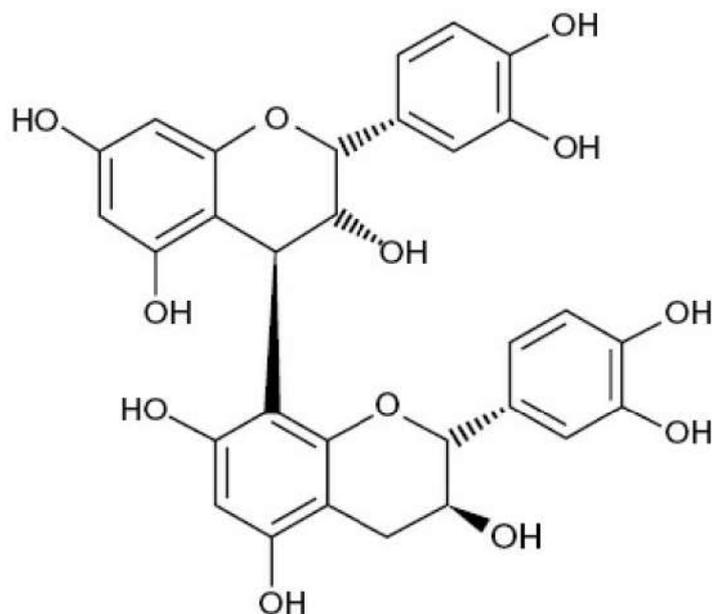


Epicatequina

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.

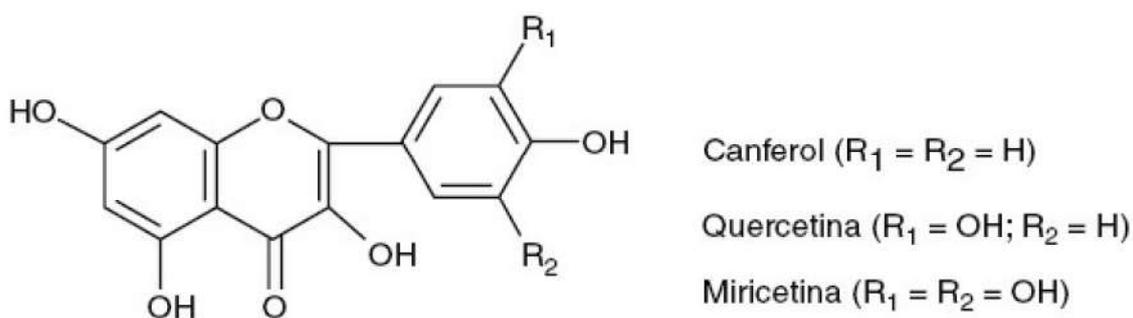


Esses compostos não são os principais fenóis das frutas, mas são constituintes importantes presentes nas formas oligomérica ou polimérica, como as proantocianidinas (ou taninos condensados). A procianidina é um dímero e está presente na maçã, na uva e na cereja (Robards *et al.*, 1999).



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:



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.

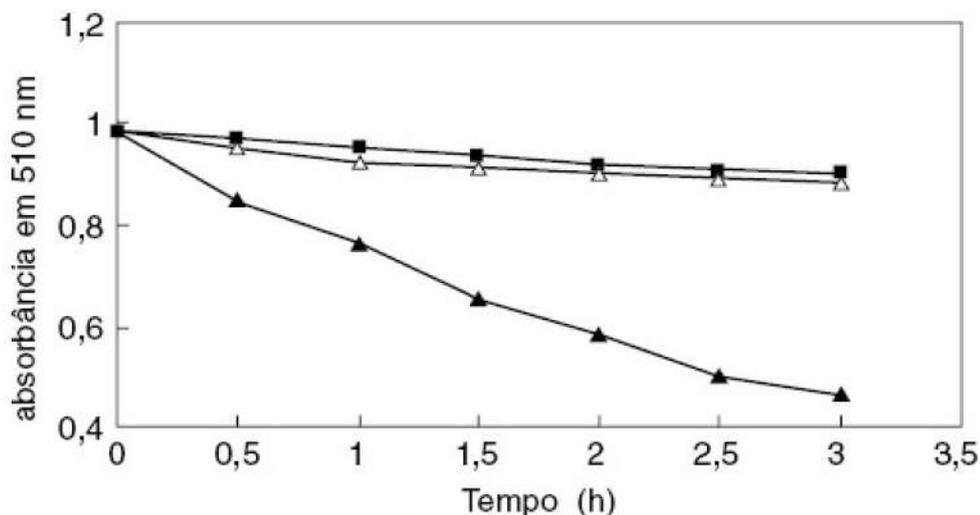


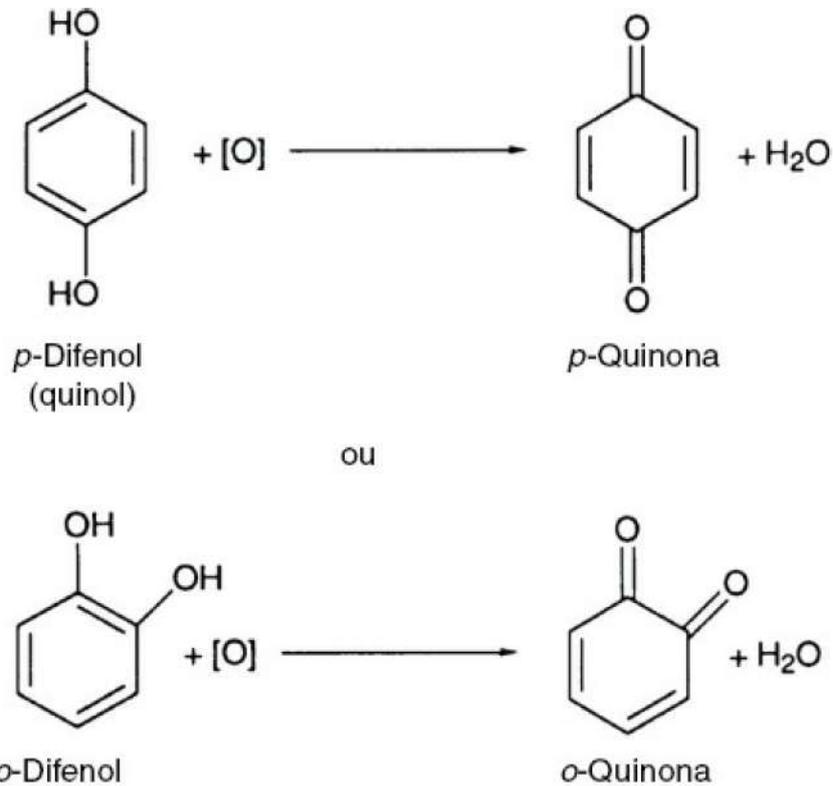
FIGURA 10.6 Alterações na absorbância da antocianina de morango chinês (bayberry) a 510 nm durante sua degradação pela polifenoloxidase (PFO) de morango chinês, na presença (●) e na ausência (Δ) de ácido gálico, e após desnaturação térmica da PFO, na presença de ácido gálico (■). Reproduzido de Fang *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.

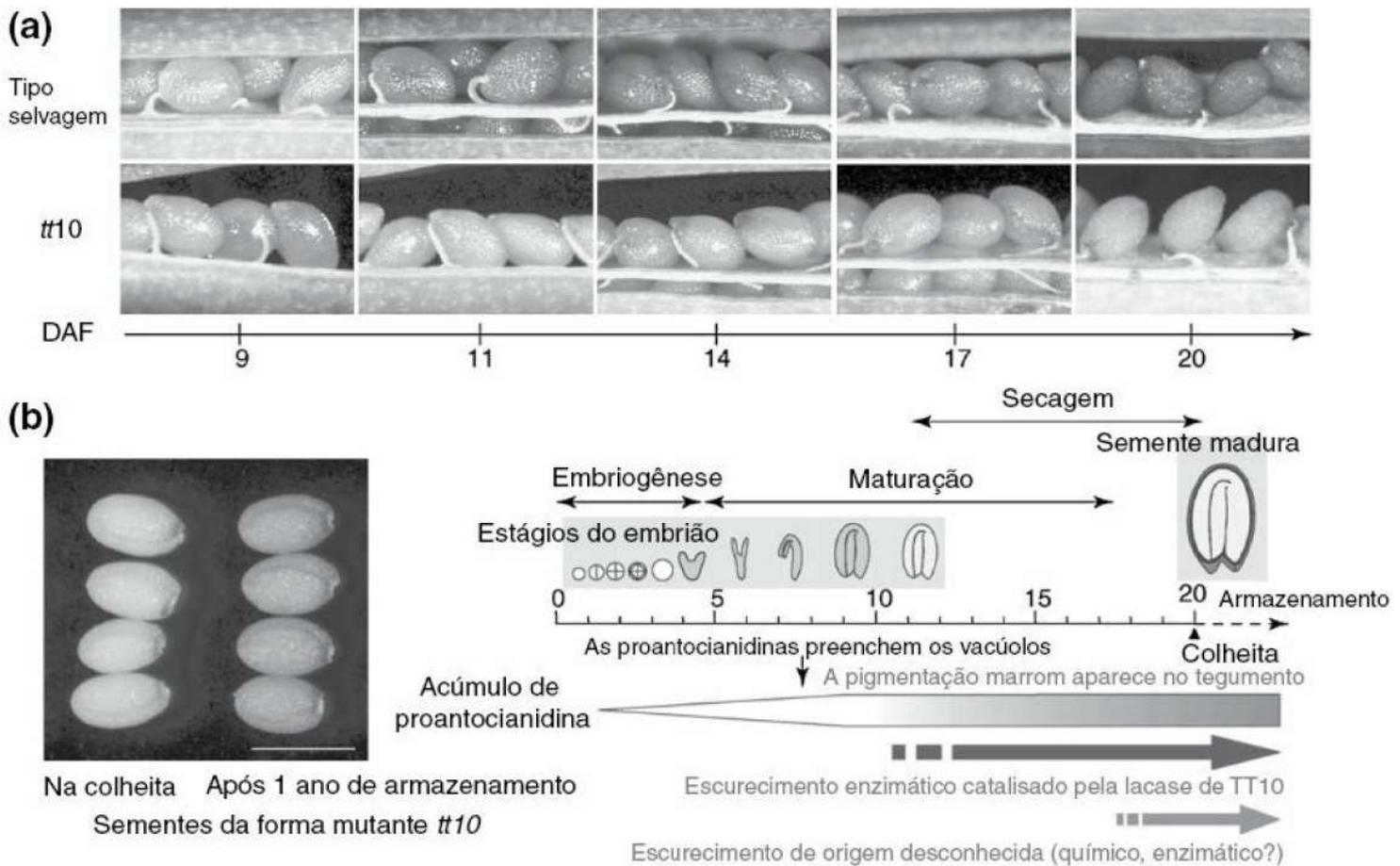
Vários estudos foram realizados para identificar outros substratos endógenos da PFO em frutas. A epicatequina é o substrato endógeno da PFO da lichia e da longana (Sun *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). Outros flavonoides, como o eriodictiol, a miricetina e a fisetina, também podem ser oxidados pela PFO (Jiménez *et al.*, 1998; Jiménez e García-Carmona, 1999; Jiménez-Atiéndez *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*-difenol: oxigênio oxidoreductase (EC 1.10.3.1) e *p*-difenol: oxigênio oxidoreductase (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*-difenol é:



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-hidroxifenóis e a oxidação dos *o*-di-hidroxifenóis 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 pirogallol. 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 polifenoloxidases 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 ^a	Catecol	6,3	30	7,0
Melão ^h	DOPAC ^d	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. 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 ($\Delta DO/min/mg$ 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.

					Dias			
					0	1	4	7
(A)								
(B)								
(C)								
(D)								
(E)								
(F)								
(G)								
(H)								
(I)								

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* (Talbert 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-hidroxiifenilalanina.

^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.

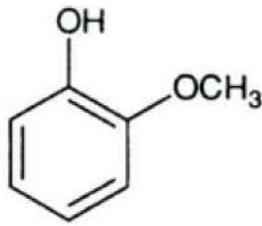
Limbo e Piergiovanni (2006) estudaram os efeitos de pressões parciais elevadas de oxigênio, combinadas com os ácidos ascórbico e cítrico, sobre o desenvolvimento do escurecimento enzimático em batatas (da variedade “Primura”) descascadas e cortadas, acondicionadas em embalagens flexíveis e armazenadas 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 amostras 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

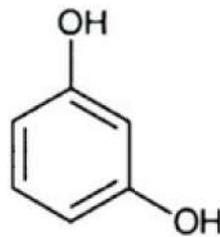
Diferentes compostos são capazes de controlar o escurecimento enzimático e, com base no mecanismo da inibição, esses compostos são classificados em agentes redutores, agentes quelantes, acidulantes, inibidores enzimáticos, tratamentos enzimáticos e agentes formadores de complexos (Özoğlu e Bayındırılı, 2002).

Vários compostos têm uma estrutura química intimamente relacionada com os *o*-difenois, 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*-difenois, 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

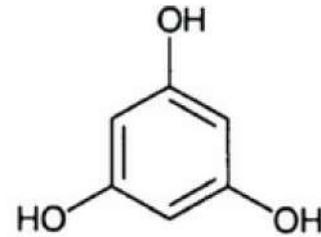
do substrato.



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.

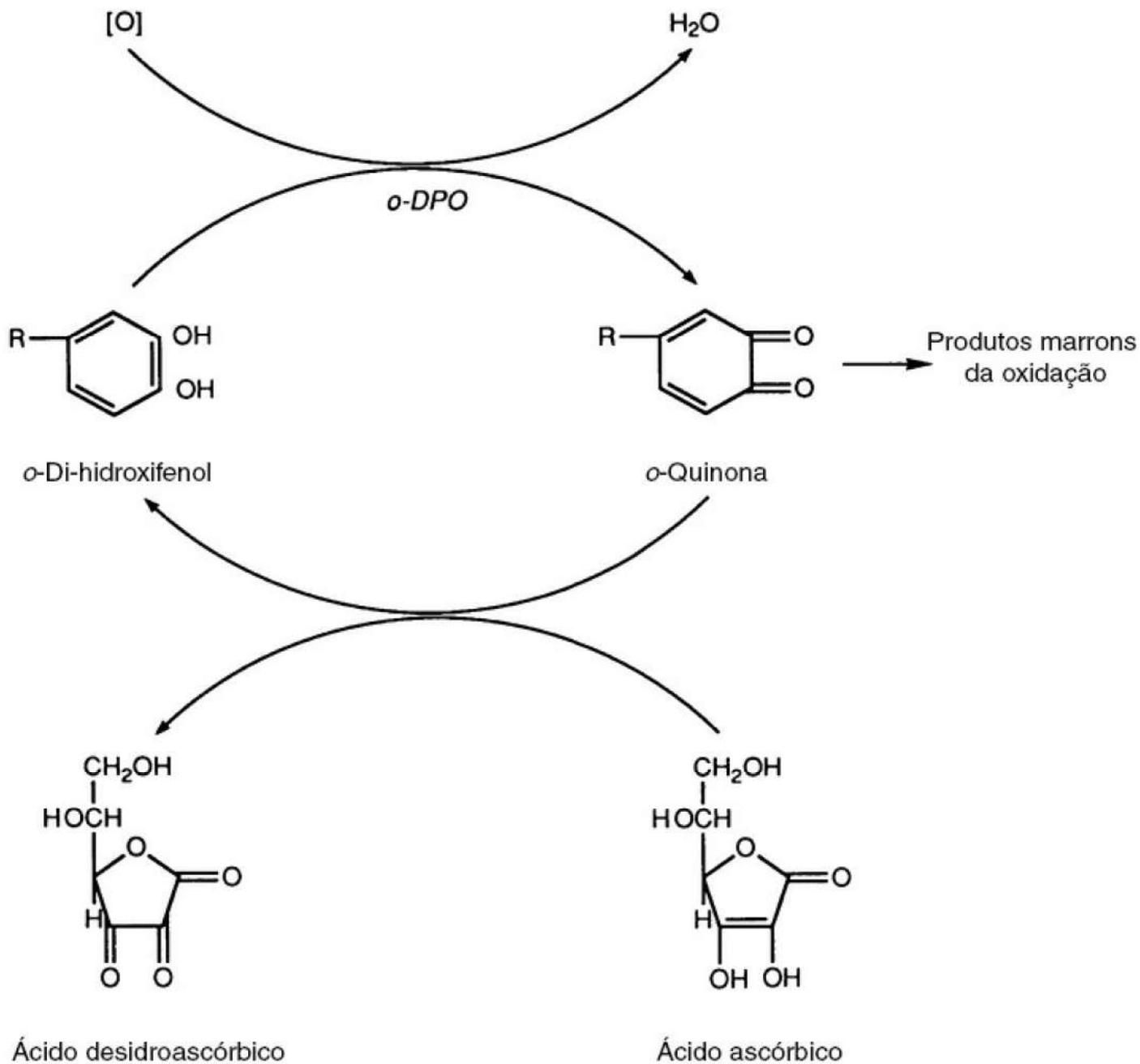
Os sulfitos são inibidores fortes e foram utilizados, durante muito tempo, na indústria alimentícia. No entanto, o uso excessivo de formulações à base de sulfito pode causar reações adversas, principalmente nos indivíduos asmáticos. Desde que foi divulgado, no 51º encontro do Joint Expert Committee on 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 homogeneizados 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 glicidipeptídeos 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 difenolase. 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).

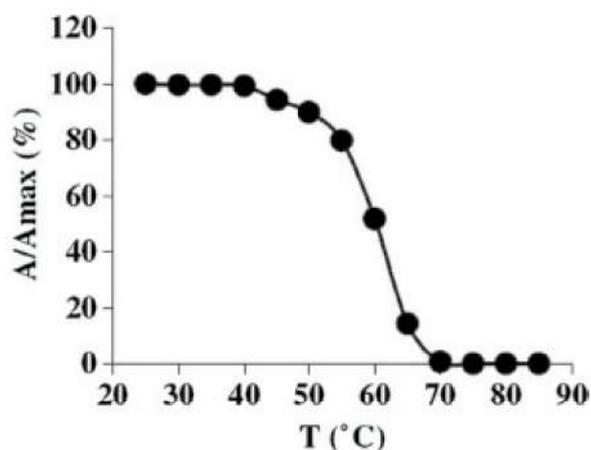


FIGURA 10.9 Estabilidade térmica do extrato de polifenoloxidase da uva Victoria. A atividade residual foi medida após um tratamento de 10 minutos em diferentes temperaturas. Reproduzido de Rapeanu *et al.* (2006). © 2006, com permissão da Elsevier.

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 (Welte-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 pectinametilsterase 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.

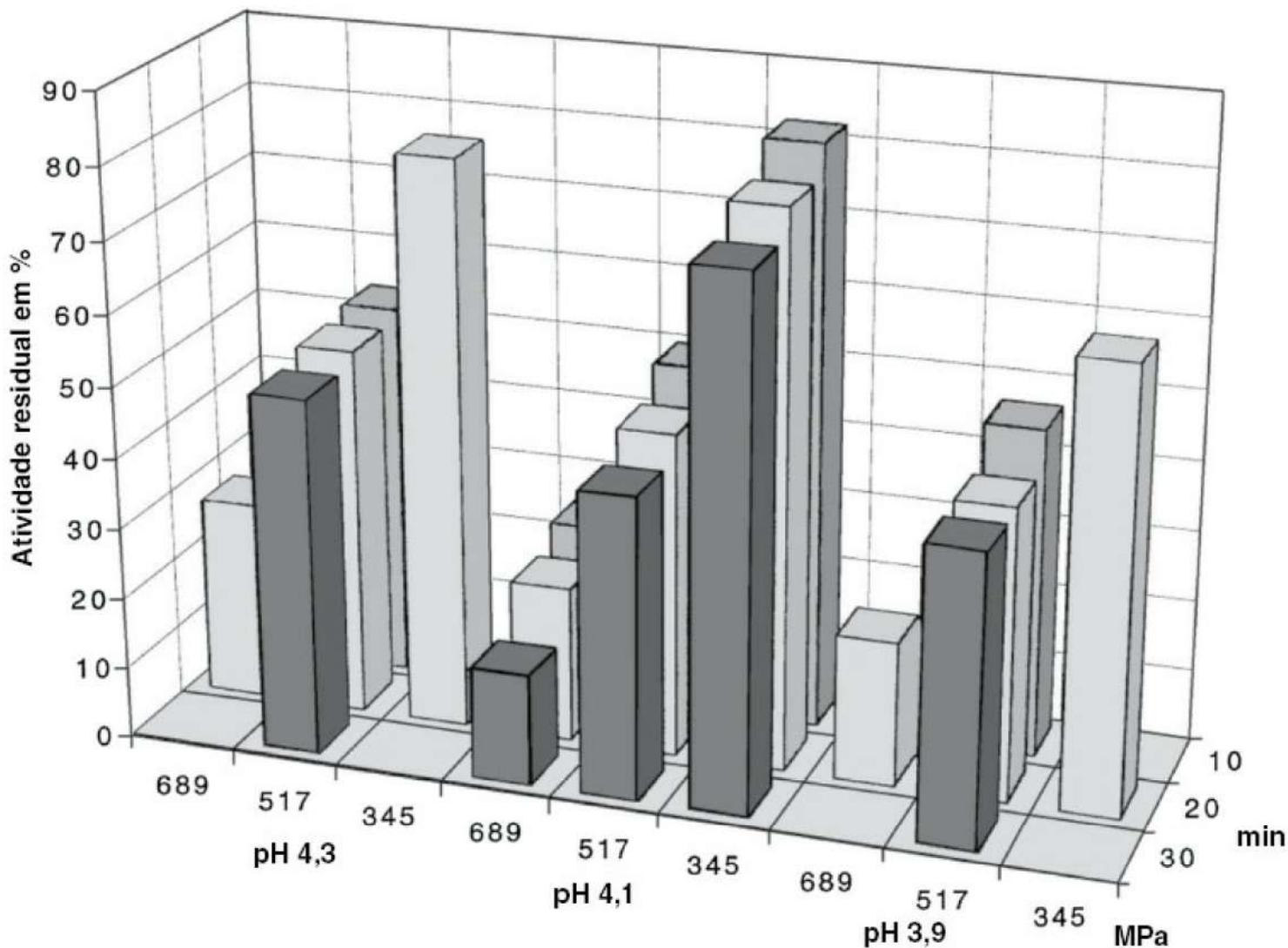


FIGURA 10.10 Efeito dos tratamentos com alta pressão hidrostática, e do pH inicial, sobre a atividade residual da polifenoloxidase do purê de abacate. Reproduzido de Lopez-Malo *et al.* (1998). © 1998, com permissão da Elsevier.

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 pêssigo, 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 ohmicamente 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) submeteram 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., Lerici, 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., Erzençin, 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*