

ADRIANO DO NASCIMENTO SIMÕES

**Alterações químicas e atividades de enzimas em folhas de
couve inteiras e minimamente processadas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

ADRIANO DO NASCIMENTO SIMÕES

**Alterações químicas e atividades de enzimas em folhas de
couve inteiras e minimamente processadas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA EM: 16 de fevereiro de 2004.

Prof. Mário Puiatti

Prof. Paulo Roberto Mosquim

Prof. Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Conselheira)

Prof. Luiz Carlos Chamhum Salomão
(Conselheiro)

Prof. Rolf Puschmann
(Orientador)

À Diana, minha esposa, com todo o amor.
Aos meus pais, José Edvaldo e Maria Leuda.
Aos meus irmãos, Adriana e André.

Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade que me foi concedida para a realização do curso de Mestrado.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Ao professor Paulo Roberto Mosquim, pela orientação, pela amizade e pela profunda contribuição ao meu desenvolvimento profissional.

Aos professores Rolf Puschmann, Nilda Soares, Mário Puiatti e Luiz Carlos Chamhum Salomão, pelas valiosas sugestões.

Aos estagiários André, Daniela, Danielle, Flávia, Lívia, Paulo e Rogério que muito ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus amigos conterrâneos do Nordeste e de moradia, em especial a Pahlevi e Franciscleudo, pela amizade ao longo do curso e pelos jogos de futebol ganhos e perdidos.

Aos funcionários do laboratório Maria Mercês, Inês, Geraldo e Carlos Raimundo, pelas sugestões, quando solicitadas.

Aos docentes da Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de turma de pós-graduação, em especial Gilberto e Natália, pelo apoio e amizade.

Meus sinceros agradecimentos também àqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta obra.

BIOGRAFIA

ADRIANO DO NASCIMENTO SIMÕES, filho de José Edvaldo Simões e Maria Leuda do Nascimento Simões, nasceu em 21 de novembro de 1978, em Aracati - CE. cursou o nível fundamental e o 1^o ano do nível médio no Colégio Instituto São José, na mesma cidade, e o 2^o e 3^o ano do nível médio, no Colégio Marista de Aracati – CE, concluindo em 1995. Em março de 1997, ingressou na Escola Superior de Agricultura de Mossoró – RN, onde participou de programas de monitorias, estágios e bolsas de iniciação científica CNPq (bolsa balcão e PIBIC), por um período de três anos e meio. Graduou-se engenheiro-agrônomo em dezembro de 2001. Em março de 2002, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, com ênfase em fisiologia pós-colheita de hortaliças minimamente processadas, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	4
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS EM FOLHAS DE COUVE	
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
4. CONCLUSÕES	10
CAPÍTULO 2	11
AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EMBALAGENS PARA O ARMAZENAMENTO	
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4. CONCLUSÕES	18
CAPÍTULO 3	19
EFEITO DO PROCESSAMENTO MÍNIMO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FOLHAS DE COUVE	
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÕES.....	30
CAPÍTULO 4	31
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSERVAÇÃO DE FOLHAS DE COUVE INTEIRAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS	
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CONCLUSÕES	65
5. CONCLUSÕES GERAIS	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

RESUMO

SIMÕES, Adriano do Nascimento, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Alterações químicas e atividade de enzimas em folhas de couve inteiras e minimamente processadas.** Orientador: Rolf Puschmann. Conselheiros: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Luiz Carlos Chamhum Salomão.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar os efeitos fisiológicos, químicos e bioquímicos em folhas de couve inteiras e minimamente processadas durante o armazenamento refrigerado. Estabeleceram-se também, técnicas mais confiáveis para extração de sólidos solúveis e tipos de embalagens alternativas para folhas de couve. As extrações foram realizadas em três etapas: antes do processamento (discos de folhas inteiras); após o fatiamento (folhas fatiadas com processador industrial para vegetais); e após processamento mínimo (fatiadas, sanitizadas e centrifugadas). As técnicas envolvendo maceração e centrifugação do tecido foram igualmente eficientes na extração dos sólidos solúveis totais em folhas de couve inteiras, fatiadas e minimamente processadas. A perda de água em folhas de couve inteira e minimamente processada foi afetada pelo número de furos e suas localizações nas embalagens. Embalagens com perfurações localizadas em suas extremidades promoveram melhor controle da perda de água em relação às embalagens totalmente perfuradas e com perfurações localizadas no centro. O processamento mínimo promoveu perda significativa de açúcares solúveis totais, de amido e de aminoácidos, mas não alterou significativamente os teores de vitamina C e de proteínas, em comparação com as folhas intactas. O

processamento mínimo e a temperatura de armazenamento de 10 °C aceleraram o acúmulo dos teores de aminoácidos, enquanto no armazenamento a 5 °C, tanto para as folhas inteiras quanto para as minimamente processadas, observou-se diminuição nos teores de proteínas. O armazenamento a 5 e 10 °C promoveu perda de vitamina C, principalmente em folhas minimamente processadas, contribuindo possivelmente para o início do seu escurecimento. A senescência das folhas armazenadas a 5 °C foi retardada, provavelmente, devido à menor taxa de consumo de açúcares solúveis totais e de amido. O amarelecimento foi a principal causa da perda da qualidade visual das folhas inteiras, causado pela perda das clorofilas a, b e total e da turgescência, processo que foi acelerado à temperatura de 10 °C. O escurecimento das folhas minimamente processadas coincidiu com comportamento diferenciado na atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL), Peroxidase (POD) e da Polifenol oxidase (PPO). O aumento na atividade da PAL e POD pode se refletir em perda de qualidade, pela lignificação do tecido. A atividade da PAL para as folhas minimamente processadas armazenadas a 5 °C foi três vezes superior até o segundo dia, em relação às armazenadas a 10°C.

ABSTRACT

SIMÕES, Adriano do Nascimento, M. S., Universidade Federal de Viçosa, february, 2004. **Chemical Alteration and enzyme activities in intact and minimally processed kale leaves.** Adviser: Rolf Puschmann, Committee Members: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Luiz Carlos Chamhum Salomão.

This work aimed to characterize the physiological, chemical and biochemical effects in intact and minimum processing kale leaves during cold storage. Soluble solids extraction and alternatives packing types methods were established for kale leaves. The extractions were realized in three stages: before processing (intact leave discs); after slicing (leaves sliced on industrial processor); and after minimum processing (slice, sanitation and centrifugation). The methods involving on maceration and centrifugation tissue were equally efficient on soluble solids extraction in intact, sliced and minimally processed kale leaves. The water loss in intact and minimally processed kale leaves was affected by number of the packing perforation and it localization. Packing with extremity perforation promoted best water loss control in relation to total perforate and localized centre perforation. It was observed that minimum processing promoted a significant decrease on the total soluble sugars, starch and amino acids and no altered vitamin C and protein in relation to intact leaves. The minimum processing and 10 °C storage temperature caused additional amino acids accumulation, while the 5 °C storage caused protein loss in both intact and minimally leaves. The storage at 5 and 10 °C promoted

vitamin C loss principally in minimally processed leaves, contributing to the browning start. The senescence of the leaves at 5 °C storage was retarded, probably, due less consumption of total soluble solids and starch. The principal reason of the intact leaves visual quality loss were the yellowing, with chlorophylls a, b and total and turgescence loss, accelerated at 10 °C storage. The browning of the minimally processed leaves coincided with the different compartment of the Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Peroxidase (POD) and Polyphenol oxidase (PPO) activities. The increase on PAL and POD activities can reflect the loss quality, by tissue lignifications. The PAL activities in minimally processed leaves at 5 °C storage, was 3-fold large until second day in relation to 10 °C storage.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande interesse na produção de frutas e hortaliças minimamente processadas, pois diminuem o tempo necessário para o preparo, tanto em nível doméstico quanto em restaurantes de comidas rápidas e hotéis (BEAULIEU et al., 1997). Nos países desenvolvidos, cerca de 70% desses produtos são utilizados em cozinhas industriais, restaurantes “fast-food” (WILEY, 1994), por serem mais práticos para manusear e conservar suas qualidades nutricionais e sensoriais.

As embalagens possuem várias funções, entre elas, a de proteger os alimentos contra danos físicos e contaminações externas, reduzir a perda de umidade do produto e melhorar seu aspecto visual. No caso de Produtos Minimamente Processados, têm sido utilizadas embalagens de filmes poliméricos que possuem a propriedade de reduzir a perda de água e gerar a modificação da atmosfera em torno do alimento.

No Brasil, diversos são os produtos, potencialmente utilizáveis como minimamente processados, destacando-se o repolho, a taioba, a serralha e a couve (CARNELOSSI, 2000). Essa última é altamente consumida pela população brasileira, o que viabiliza seu uso como minimamente processada. Em Brasília, por exemplo, a produção de couve minimamente processada ultrapassa 12 toneladas por mês, entretanto sua vida útil não ultrapassa 4 dias (CARNELOSSI, 2000).

A couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) é consumida, predominantemente, fatiada em vários pratos, tais como, caldo verde, couve à

mineira, feijoada e saladas. Entretanto, folhas de couve minimamente processadas possuem alta perecibilidade, apresentando alta atividade respiratória, devido às injúrias mecânicas durante o processamento e aos estresses ocorridos na fase pós-colheita (CARNELOSSI, 2000).

O conhecimento da fisiologia de frutos e de hortaliças pós-processamento mínimo é importante, visto que, o mesmo provoca fermento nos tecidos. Esse tipo de processo envolvendo descasque, corte ou fatiamento, difere do processo tradicional, em que o tecido permanece intacto até próximo do consumo. O comportamento do tecido durante o processamento é, em geral, típico do que é observado em plantas, quando submetidas a condições de estresses (BRECHT, 1995), incluindo o aumento na respiração e a produção de etileno. Outras conseqüências do corte são de natureza química e fisiológica, tais como, o escurecimento oxidativo, a oxidação de lipídeos e o aumento da perda de água (BRECHT, 1995).

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos em couve, inicialmente com folhas intactas, por AMARANTE (1991), que mostrou a influência do estado hídrico da folha no horário de colheita, na sua senescência. Com o avanço do processamento mínimo no Brasil, tornaram-se imprescindíveis estudos de técnicas de processamento de folhas de couve, visto que é uma hortaliça bastante consumida pela população. Assim, CARNELOSSI (2000) desenvolveu técnicas adequadas para o processamento, embalagem e armazenamento, que permitem a obtenção de produto de boa qualidade para a comercialização, o que foi continuado por TELES (2001). No entanto, ainda são necessários estudos para elucidar os principais efeitos fisiológicos, químicos e bioquímicos, que contribuem para a senescência de folhas de couve, durante o armazenamento refrigerado.

O presente trabalho teve como objetivo, desenvolver técnicas mais confiáveis para extração de sólidos solúveis em folhas de couve. Investigaram-se também, embalagens que pudessem manter a qualidade, efeitos do processamento mínimo na composição química das folhas, assim como, os principais fatores fisiológicos, químico e bioquímicos que contribuem para a

redução da qualidade e para a senescência em folhas de couve inteiras e minimamente processadas, durante o armazenamento refrigerado.

CAPÍTULO 1

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS EM FOLHAS DE COUVE

1. INTRODUÇÃO

A couve é uma das hortaliças mais populares no Centro-Sul do Brasil, sendo Minas Gerais, o maior produtor (AMARANTE, 1991). É consumida por todas as camadas sociais da população brasileira. Nos últimos anos, no Brasil, a couve vem sendo altamente consumida, o que viabiliza seu uso como minimamente processada. Em Brasília, por exemplo, a produção de couve minimamente processada ultrapassa 12 toneladas por mês, entretanto sua vida útil não ultrapassa 4 dias (CARNELOSSI, 2000).

A qualidade dessa hortaliça está estritamente relacionada com a presença e com os teores de alguns componentes químicos que lhe conferem sabor e aroma característicos e um alto valor nutritivo. O primeiro atributo é devido, principalmente, aos açúcares e óleos essenciais e o segundo, aos teores de vitamina C, β -caroteno, cálcio e demais vitaminas e minerais (CARVALHO, 1983).

Os teores de sólidos solúveis têm sido utilizados como indicadores de qualidade em algumas hortaliças (LUENGO *et al.*, 2000a). Em folhas de couve, podem servir para indicar boa qualidade da hortaliça minimamente processada. A técnica normalmente utilizada para sua quantificação consiste na extração do suco celular através de compressão mecânica. Acredita-se que, através desse procedimento, podem-se obter resultados subestimados, pois uma parte dos

sólidos solúveis pode ficar adsorvida nas paredes celulares remanescentes. Porém, essa técnica parece depender da força manual do operador (LOPES & SANTOS, 1990).

Técnicas alternativas que demandam menor esforço físico foram testadas por LUENGO et al. (2000a, b), utilizando congelamento/descongelamento e maceração total do tecido, obtendo resultados mais confiáveis em tecidos mais resistentes como cenoura e mandioquinha-salsa. Para folhas de couve, por terem tecidos menos fibrosos, espera-se uma completa extração de sólidos solúveis, utilizando-se de técnicas alternativas.

O objetivo deste ensaio foi avaliar várias técnicas de extração do suco celular para determinação do teor de sólidos solúveis totais em folhas de couve.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), acesso BGH 1578, conhecida comumente como Portuguesa, foram cultivadas na horta experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 20° 45' 14''S de latitude e 42° 52' 53''W de longitude. As folhas foram destacadas das plantas-mãe, quando atingiram cerca de 35 cm de comprimento, e imediatamente levadas ao laboratório. Tiveram seus pecíolos imersos em baldes contendo água de torneira e foram armazenadas em expositor com ventilação forçada de ar, nas condições de 5 ± 1 °C com 90 ± 5 % de UR, por um período de 24 h, para recuperação da turgescência.

2.2 Técnicas de extração

Foram realizadas extrações do suco celular em folhas inteiras (utilizando-se discos); em folhas fatiadas com processador industrial para vegetais (robotcoupe); e folhas minimamente processadas. Esta técnica foi executada de acordo com CARNELOSSI (2000), consistindo de seleção, padronização e lavagem, fatiamento, sanitização, enxágüe e centrifugação. Todas as etapas foram realizadas na Unidade de Processamento de Frutas e Hortaliças da UFV, com temperatura em torno de 18 ± 2 °C.

As técnicas de extração do suco celular, consistiram de: **T1** – compressão mecânica do tecido; **T2** - maceração do tecido em almofariz com areia lavada, seguida de centrifugação, por 15 min, a 2000 g; **T3** - maceração do tecido com

nitrogênio líquido e areia lavada, em almofariz, seguida de centrifugação por 15 min, a 2000 g; **T4** - maceração das folhas (sem a nervura central) em multiprocessador doméstico, seguida de filtração em duas camadas de gaze e centrifugação por 15 min, a 2000 g; **T5** - congelamento do tecido por 24 horas a -18 °C, seguido de maceração em almofariz, com areia lavada e centrifugação por 15 min, a 2000 g; **T6** - congelamento do tecido por 24 horas a -18 °C, seguido de compressão mecânica; **T7** - congelamento do tecido 24 horas a -18 °C, seguido de adição de nitrogênio líquido e compressão mecânica. Os teores de sólidos solúveis foram determinados por refratometria, através do refratômetro de mesa tipo Abbé.

2.3 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com nove repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos a análises de variância com o auxílio do programa de computação SAEG 5, da Central de Processamento de Dados da UFV. Foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, para detecção de diferenças de médias entre tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os menores valores de sólidos solúveis totais foram encontrados nos procedimentos T1 e T6, para as folhas inteiras e T1, T6 e T7, para as folhas fatiadas e minimamente processadas (Tabela 1).

A técnica de congelamento seguida de descongelamento foi eficiente apenas quando se fez maceração do tecido (T5), diferente do encontrado por Luengo *et al.* (2001a; 2001b), em que a compressão mecânica, após o processo de congelamento e descongelamento, foi igualmente eficiente para a trituração. Segundo os mesmo autores, quando o tecido é congelado, ocorre formação de cristais de gelo nas membranas, que são quebrados após o descongelamento, ocorrendo perda na semi-permeabilidade das membranas e mistura dos conteúdos do simplasma e do apoplasma, podendo o suco celular ser extraído com leve compressão. No entanto, para couve, não foi observado esse comportamento.

Os maiores valores médios de sólidos solúveis totais foram obtidos nos tratamentos T2, T3, T4 e T5, visualizados na tabela 1, quando se utilizaram procedimentos envolvendo maceração e centrifugação. Resultado semelhante foi obtido por LUENGO *et al.* (2001a; 2001b) em raízes de cenoura e mandioquinha-salsa. No entanto, para a escolha da melhor técnica, o tempo, a disponibilidade de material, equipamentos e custo devem ser levados em consideração.

Com esses resultados, torna-se imprescindível utilização de técnicas para a extração de sólidos solúveis em folhas de couve, que requeiram maior confiabilidade, menor tempo de execução e custo para extração, visto que, em muitas ocasiões, esta característica define a qualidade final do produto, portanto, seu preço para o mercado consumidor.

Tabela 1. Sólidos solúveis totais (%) em folha de couve inteira, fatiada e minimamente processada, obtidos através de diferentes técnicas de extração.

tratamentos	folha inteira	folha fatiada	folha minimamente processada
T1	9,3 ab	4,7 d	4,0 d
T2	10,7 a	8,3 a	8,0 a
T3	10,7 a	8,0 a	8,0 a
T4	10,3 a	7,7 ab	8,0 a
T5	10,0 a	8,0 a	8,0 a
T6	8,0 b	6,0 c	6,7 b
T7	10,3 a	6,7 bc	6,0 c

T1 a T7 representam as técnicas usadas na metodologia, antes do processamento (discos de folhas inteiras); após o corte (folhas fatiadas com processador industrial para vegetais); e após processamento mínimo (fatiadas, sanitizadas e centrifugadas)

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

4. CONCLUSÕES

As técnicas envolvendo maceração e centrifugação foram mais eficientes na extração dos sólidos solúveis totais em folhas de couve inteiras, fatiadas e minimamente processadas, do que aquelas envolvendo compressão.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EMBALAGENS PARA O ARMAZENAMENTO DE FOLHAS DE COUVE

1. INTRODUÇÃO

Testes preliminares feitos por CARNELOSSI (2000) indicaram que, para aumentar a vida de prateleira de folhas de couve minimamente processadas, devem ser utilizadas embalagens bastante permeáveis, como as poliolefinas de multicamadas da Cryovac (PD 900, PD 941, PD 961 e B 900). A PD 941 foi selecionada pelo referido autor, como a melhor embalagem para a couve minimamente processada, quando relacionada com a manutenção das clorofilas, dos carotenóides e da vitamina C. No entanto, as embalagens de poliolefinas multicamadas são de custos relativamente elevados, tornando-as onerosas para os produtos embalados.

Uma alternativa de se utilizarem embalagens mais econômicas, seria a utilização de sacos de polipropileno perfurados, tanto para as folhas inteiras como para as minimamente processadas. Porém, essas embalagens no Brasil têm sido pouco difundidas para produtos minimamente processados, visto que são sujeitos a contaminações, diferentemente da Inglaterra e Irlanda, em que se utilizam filmes microperfurados de polipropileno (VAROQUAUX e MAZOLLIER, 2002). Porém, existem embalagens que podem evitar ou reduzir o efeito de contaminação por apresentarem furos feitos a quente e em forma de cone, em que pressão interna, correspondente à maior área do cone, é maior que a pressão externa, o que acarretaria a saída do vapor de água, dificultando a entrada de microrganismos. Esse tipo de embalagem também pode funcionar como uma alternativa eficiente

em reduzir a condensação interna do vapor de água, o qual contribui para a redução da qualidade do produto do ponto de vista comercial.

O objetivo deste ensaio foi determinar a melhor localização para os furos em embalagens de PP para o armazenamento de folhas de couve inteiras e minimamente processadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a realização desse trabalho, foram colhidas folhas de couve (*Brassica oleracea* cv. acephala), conhecida como Portuguesa, acesso BGH 1578. Parte dessas folhas permaneceu intacta e outra parte foi minimamente processadas (CARNELOSSI, 2000).

2.2 Tipos de embalagens

Para as folhas inteiras, utilizaram-se sacos de PP de 39 cm de comprimento x 26 cm de largura, com as seguintes características: **1-** 4 µm de espessura, perfurados com furos de 810 µm de diâmetro num total de 5.238 furos/embalagem; **2-** 6 µm de espessura, sem furos; **3-** 6 µm de espessura, contendo uma faixa de PP (4 µm) de 5 cm de largura, perfurada com 648 furos (810 µm de diâmetro), localizada em uma das extremidades em que se situava o pecíolo; **4-** 6 µm de espessura, com faixa de PP (4 µm) de 5 cm de largura, perfurada com 648 furos (810 µm de diâmetro), localizada no centro do saco, local em que se situava o limbo foliar. As faixas foram seladas na frente e no verso do saco.

Para as folhas minimamente processadas, utilizaram-se sacos de PP de 22 cm de comprimento x 26 cm de largura, com as seguintes características: **1-** 4 µm de espessura e 2.619 furos; **2-** 6 µm de espessura, sem furos **3-** 6 µm de espessura, contendo uma faixa de PP (4 µm) de 5 cm de largura, perfurada com 648 furos (810 µm de diâmetro), localizada na extremidade.

Os sacos plásticos continham cerca de 200 g de couve correspondendo a 4 folhas inteiras, tendo sido armazenadas a 10 °C por até 12 dias, com o pecíolo

para baixo, coincidindo com as perfurações. As folhas minimamente processadas, em embalagens de 100 g, correspondendo a 4 folhas, foram armazenadas com as perfurações voltadas para cima.

2.3 Avaliações

Foram avaliadas a aparência externa e a perda de massa fresca (%) em intervalos regulares de 3 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sacos de PP totalmente perfurados apresentaram as maiores perdas de massa fresca, tanto para folhas inteiras (Figura 1) como para as minimamente processadas (Figura 2). A partir do 2º dia de armazenamento, as folhas minimamente processadas já apresentavam sinais de ressecamento, com cerca de 15 % de perda de massa fresca (Figura 2), enquanto nas folhas inteiras, esses sinais foram mais aparentes a partir do terceiro dia, com aproximadamente 7 % de perda (Figura 1).

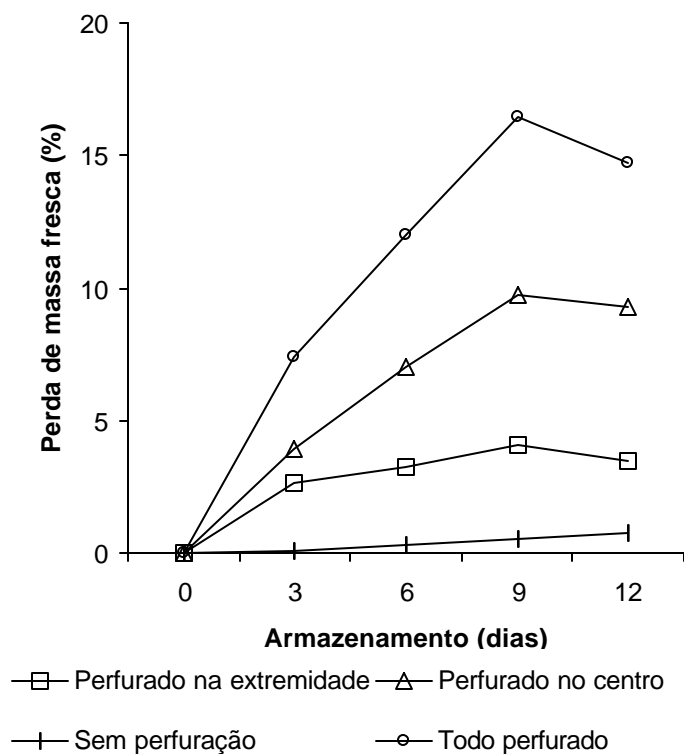


Figura 1- Perda de massa fresca (%) em folhas de couve inteira, embaladas com filmes de polipropileno e armazenadas a 10 °C.

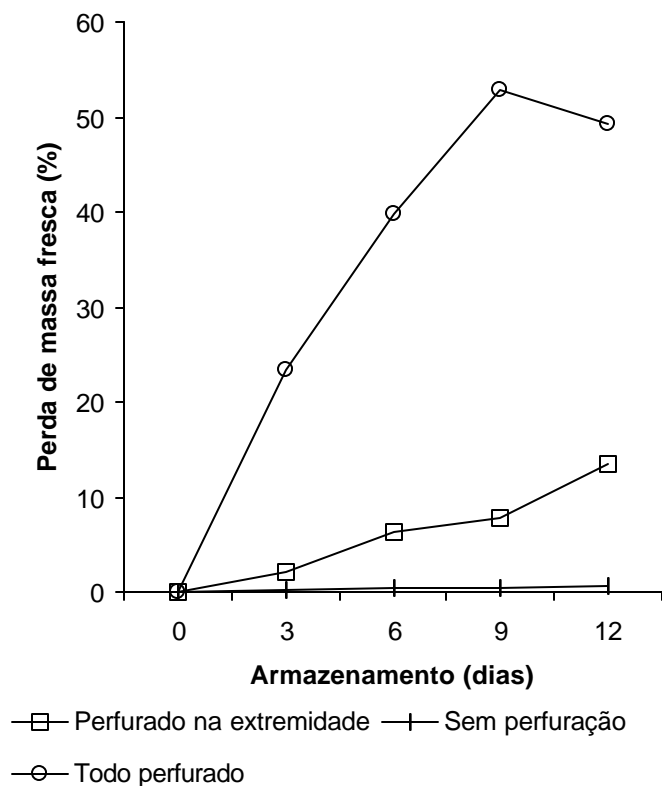


Figura 2- Perda de massa (%) em folhas de couve minimamente processadas, embaladas com filmes de polipropileno e armazenadas a 10 °C.

Observou-se, na embalagem totalmente perfurada, que a perda de massa fresca da folha minimamente processada foi, aproximadamente, três vezes maior do que a perda das folhas inteiras durante o armazenamento, provavelmente devido à liberação da água contida nos espaços intercelulares. BURTON (1982) também relata diferença na taxa de perda de água entre superfícies cortadas e intactas, variando de cinco a dez vezes para órgãos com a mínima suberização na superfície como a cenoura e de dez a cem vezes para órgãos com superfícies cuticularizadas, como frutos da família *Cucurbitaceae*, e de até quinhentas vezes para órgãos poucos suberizados, como os tubérculos de batata.

A embalagem sem furos, embora tenha promovido menor perda de massa fresca para ambos os tipos de folhas (Figuras 1 e 2), não resultou em boa qualidade do produto, por ter promovido odor desagradável, causado

provavelmente por condições de anaerobiose, criadas pela baixa permeabilidade da embalagem.

Para os sacos com a faixa de polipropileno (PP) perfurado, localizado na extremidade, o início do ressecamento foi a partir do 6º dia, com aproximadamente 4 % de perda de massa fresca para as folhas inteiras e 7 % para as minimamente processadas (Figuras 1 e 2). Nos sacos com a faixa de PP localizada no centro, o início da perda de turgescência ocorreu no 4º dia, antecipando-se portanto em dois dias, em relação à anterior, cujos furos se localizavam na extremidade (Figura 1). Nesta embalagem, não foi observada condensação interna de vapor de água, ao contrário da anterior. A maior perda de massa fresca nas embalagens perfuradas no centro pode ser causada pelo fato de os furos estarem localizados mais próximos à região em que há uma maior relação superfície/volume (no limbo), em relação à base do pecíolo.

Com base nos resultados, optou-se por utilizar, nos experimentos seqüenciais, embalagens de PP com as faixas de PP perfuradas, localizadas na extremidade, tanto para folhas inteiras quanto para aquelas minimamente processadas, embora não tenham sido feitas avaliações microbiológicas.

4. CONCLUSÕES

A perda de água em folhas de couve é afetada pelo número e localização dos furos das embalagens, quer sejam em folhas inteiras ou minimamente processadas. As folhas acondicionadas em sacos totalmente perfurados apresentaram maiores perdas de água e ressecamento do tecido.

Embalagens com perfurações localizadas na base promoveram melhor controle quanto à perda de água em relação às demais e, conseqüentemente, retardando o ressecamento.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO PROCESSAMENTO MÍNIMO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FOLHAS DE COUVE

1. INTRODUÇÃO

As frutas e as hortaliças minimamente processadas constituem-se hoje em uma forma de alimento que está se desenvolvendo de forma bastante rápida. A exemplo de alguns países da Europa e também Japão e Estados Unidos, observa-se no Brasil, crescente demanda, tanto institucional como individual por estes produtos (MORETTI, 1999).

Este segmento da indústria alimentícia tem por objetivo proporcionar ao consumidor, um produto prático e conveniente, com características muito semelhantes às do produto intacto, ou seja, frescor, além de manter a qualidade sensorial e garantir a segurança dos mesmos, em relação à saúde pública.

O processamento mínimo de frutas e hortaliças se refere às operações que eliminam as partes não comestíveis, como casca, talos e sementes, tornando esses alimentos prontos para o consumo imediato, sem perderem a condição de produto *in natura* (VITT e KLUGE, 2002).

O consumo de frutos e de hortaliças frescos ou minimamente processados tem aumentado grandemente, devido às mudanças no estilo de vida das pessoas.

O aumento na produção de alimentos minimamente processados segue a tendência crescente da procura pelos consumidores por alimentos saudáveis, frescos e de alta qualidade. No entanto, poucas informações são encontradas na literatura sobre alterações nutricionais associadas ao processamento mínimo (KLEIN, 1987).

Uma consequência do processamento mínimo diz respeito às alterações na composição química de compostos como vitamina C (CARNELOSSI, 2000), açúcares e amido, aminoácidos e proteínas, pois pode levar a perdas de nutrientes, devido ao descasque, corte ou fatiamento (KLEIN, 1987).

VITT e KLUGE (2002) relatam que outras consequências da injúria, são de natureza química e física, como perda de vitaminas, pigmentos e de água. Os carboidratos podem ser também afetados porque há elevação na atividade respiratória (CARNELOSSI, 2000) e decréscimo das reservas energéticas do tecido, visto que são os principais substratos utilizados na respiração, refletindo-se nas características de sabor do produto, além de sua vida de prateleira (YANO, e HAYAMI, 1978a; 1978b).

BRECHT (1995) relata que, apesar de o processamento mínimo resultar em perdas consideráveis de metabólitos, estas podem ser minimizadas durante o armazenamento através de temperaturas e embalagens adequadas, resultando, além de maior vida de prateleira, na manutenção das características nutricionais, da aparência e do *flavor*.

O presente trabalho teve por objetivo determinar o efeito do processamento mínimo sobre a composição química de folhas de couve.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), acesso BGH 1578, conhecida comumente como Portuguesa, foram cultivadas na horta experimental do Departamento de Fitotecnia, localizada a 20° 45' 14''S de latitude e 42° 52' 53''W de longitude. As folhas foram destacadas das plantas-mãe, quando suas lâminas foliares atingiram cerca de 0,35 m de comprimento e imediatamente levadas ao laboratório. As folhas tiveram seus pecíolos imersos em baldes contendo água de torneira e foram armazenadas em expositor com ventilação forçada de ar, nas condições de 5 ± 1 °C com 90 ± 5 % de UR, por um período de 24 h, para recuperação da turgescência. Após, iniciou-se ou não o processamento mínimo.

2.2 Processamento mínimo

Foram executadas as seguintes etapas de processamento de acordo com CARNELOSSI (2000), em um tempo total de aproximadamente 1 hora: seleção, padronização e lavagem, corte (fatiamento), sanitização, enxágüe e centrifugação. Todas as etapas foram realizadas na Unidade de Processamento de Frutos e

Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, com temperatura em torno de 18 ± 2 °C.

2.2.1 Seleção, padronização e lavagem- As folhas de couve foram selecionadas pelo tamanho, aparência visual e integridade. Em seguida, foram lavadas com água corrente e retirada a nervura principal.

2.2.2 Corte (fatiamento)- As folhas foram cortadas com auxílio de um processador industrial para vegetais (Robotcoupe), equipado com lâminas para corte de 1,0 mm, gerando fatias de couve com largura de 1 - 3 mm.

2.2.3 Sanitização- O produto fatiado foi imerso em água resfriada a 5 °C com gelo, contendo 150 ppm de cloro ativo, por 10 min (SIMONS e SANGUANRI, 1997), seguindo-se de um enxágüe em água resfriada a 5 °C, contendo 3 ppm de cloro ativo. O sanitizante utilizado tem como princípio ativo, o dicloro s. triazinatriona sódica dihidratada, produto comercial “Sumaveg”, fabricado pela Gessy Lever.

2.2.4 Centrifugação- A couve minimamente processada foi centrifugada por 10 min, utilizando-se de um centrífuga doméstica (ARNO) de pequeno porte, com velocidade constante equivalente a 800 g.

2.3. Análises químicas

Foram determinados os teores de vitamina C, açúcares solúveis totais, amido, aminoácidos e proteínas solúveis, em folhas de couve inteiras após a recuperação da turgescência e em folhas minimamente processadas, imediatamente após a centrifugação.

As amostras nas folhas inteiras foram retiradas através de discos do limbo foliar e para as minimamente processadas, através de fatias.

2.3.1 Vitamina C

O teor de vitamina C foi determinado de acordo com a metodologia recomendada pela American Official Analysis of Chemistry (AOAC, 39.051), com adaptações.

Amostras de 1 g de massa fresca foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido e areia lavada. Após a maceração, foram adicionados 2 mL da solução de extração (34,09 mg de ácido meta-fosfórico dissolvidos em 40 mL de ácido acético glacial e seu volume completado para 500 mL) e, em seguida, filtrada em gaze e o seu volume completado para 10 mL, em balão volumétrico. A titulação da amostra foi realizada, transferindo-se 4 mL da mesma para erlenmeyer e titulada com 2,6-diclorofenolindofenol (50 mg do reagente foram dissolvidos em 50 mL de água destilada contendo 41 mg de NaHCO₃).

A solução padrão de ácido ascórbico foi preparada utilizando-se 50 mg de ácido ascórbico dissolvidos em 50 mL da solução de extração.

A titulação foi realizada com o DCPIP até que uma cor rosa clara persistisse por tempo igual ou superior a cinco segundos.

2.3.2 Açúcares solúveis totais e amido

Imergiu-se 1 g de massa fresca em 6 mL de etanol 80 %, a aproximadamente 80 °C, seguindo-se trituração em almofariz com areia lavada. O material homogeneizado foi transferido quantitativamente para tubos de centrífugas e centrifugado a 2000 g, por 10 min. O resíduo sofreu três extrações sucessivas com 5 mL de etanol 80 % a 80 °C. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 25 mL em um balão volumétrico, o qual constitui o extrato etanólico I. O extrato etanólico II foi obtido pela remoção dos pigmentos e lipídeos de 10 mL do extrato etanólico I em funil de separação, pela adição de 10 mL de clorofórmio e 10 mL de H₂O. A fase aquosa foi evaporada a 45 °C, em evaporador rotativo a vácuo. O resíduo foi coletado em 2 mL de água destilada, para a determinação dos açúcares solúveis totais e aminoácidos.

No resíduo resultante das centrifugações, após a extração etanólica, foi extraído e determinado o amido, mediante metodologia descrita por McCREADY et al. (1950), adaptada para café, por PATEL (1970).

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais e amido utilizou-se o método de Antrona (DISCHE, 1962). Para o amido, os resultados encontrados foram multiplicados pelo fator 0,9.

2.3.3 Aminoácidos

O teor de aminoácidos foi determinado de acordo com MOORE e STEIN (1948), a partir do extrato etanólico II.

2.3.4 Proteínas

Imergiu-se 1 g de massa fresca em 4 mL de NaOH (0,1 N), seguindo-se de trituração até a obtenção de polpa fina, em almofariz com areia lavada. O material homogeneizado foi transferido quantitativamente para tubos de centrifuga e centrifugado a 2000 g, por 5 min. O resíduo sofreu três extrações sucessivas com 5 mL de NaOH 0,1 N, seguido de ressuspensões. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 25 mL em um balão volumétrico, o qual constituiu o extrato protéico.

O teor de proteínas foi determinado conforme BRADFORD (1976).

2.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos e três repetições em triplicata. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, para detecção de diferenças de médias entre tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computação SAEG 5, da Central de Processamento de Dados da UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Vitamina C

O teor de Vitamina C não diferiu significativamente ($p < 0,5$) entre os tratamentos (Figura 1). No entanto KLEIN (1987) cita que a ruptura celular por machucadura, corte ou trituração, aumenta a atividade de enzimas como a polifenol oxidase, peroxidase, ácido ascórbico oxidase e citocromo oxidase, pelo contato substrato e enzima, resultando em rápida perda de vitamina C, fato que, se ocorreu neste experimento, foi em baixa intensidade.

Os resultados desse experimento indicam que a vitamina C não é perdida imediatamente após o processamento mínimo, embora BEAULIEU et al. (1997) tenham observado queda de 12 % em seu teor, a partir de 3 horas de armazenamento a 20 °C.

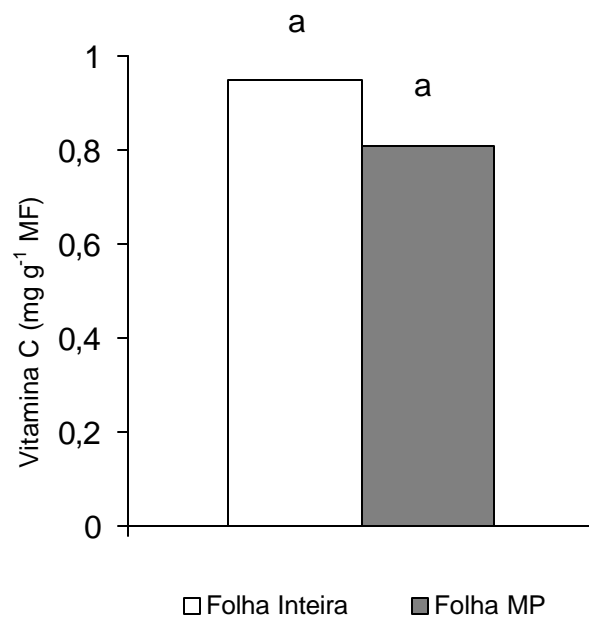


Figura 1- Teor de vitamina C em folhas de couve inteiras e após o processamento mínimo. Letras diferentes sobre as colunas representam diferenças significativas entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade.

3.2 Açúcares solúveis totais, amido e aminoácidos

As folhas de couve, imediatamente após o processamento mínimo, apresentaram menores teores de açúcares solúveis totais, de amido e de aminoácidos, na ordem de 21, 33 e 35 %, respectivamente, em comparação com as folhas inteiras (Figuras 2 A, B e C). Os cortes realizados durante o processamento mínimo podem ter facilitado o extravasamento de suco celular, alterando os teores desses compostos em folhas de couve recém processadas.

Observou-se ainda que os teores de amido e de aminoácidos têm maior representatividade de perdas em relação aos açúcares solúveis totais.

Estudos pós-colheita, realizados com diversas variedades de alface e repolho, mostram relação direta entre o conteúdo de carboidratos no momento da colheita e a longevidade durante o armazenamento, ou seja, as variedades que apresentavam maior conteúdo inicial de carboidratos tinham maior longevidade pós-colheita (YANO e HAYAMI, 1978a; 1978b). Neste experimento, o processamento mínimo reduziu os teores iniciais de açúcares e amido, o que pode contribuir para redução na vida útil pós-colheita.

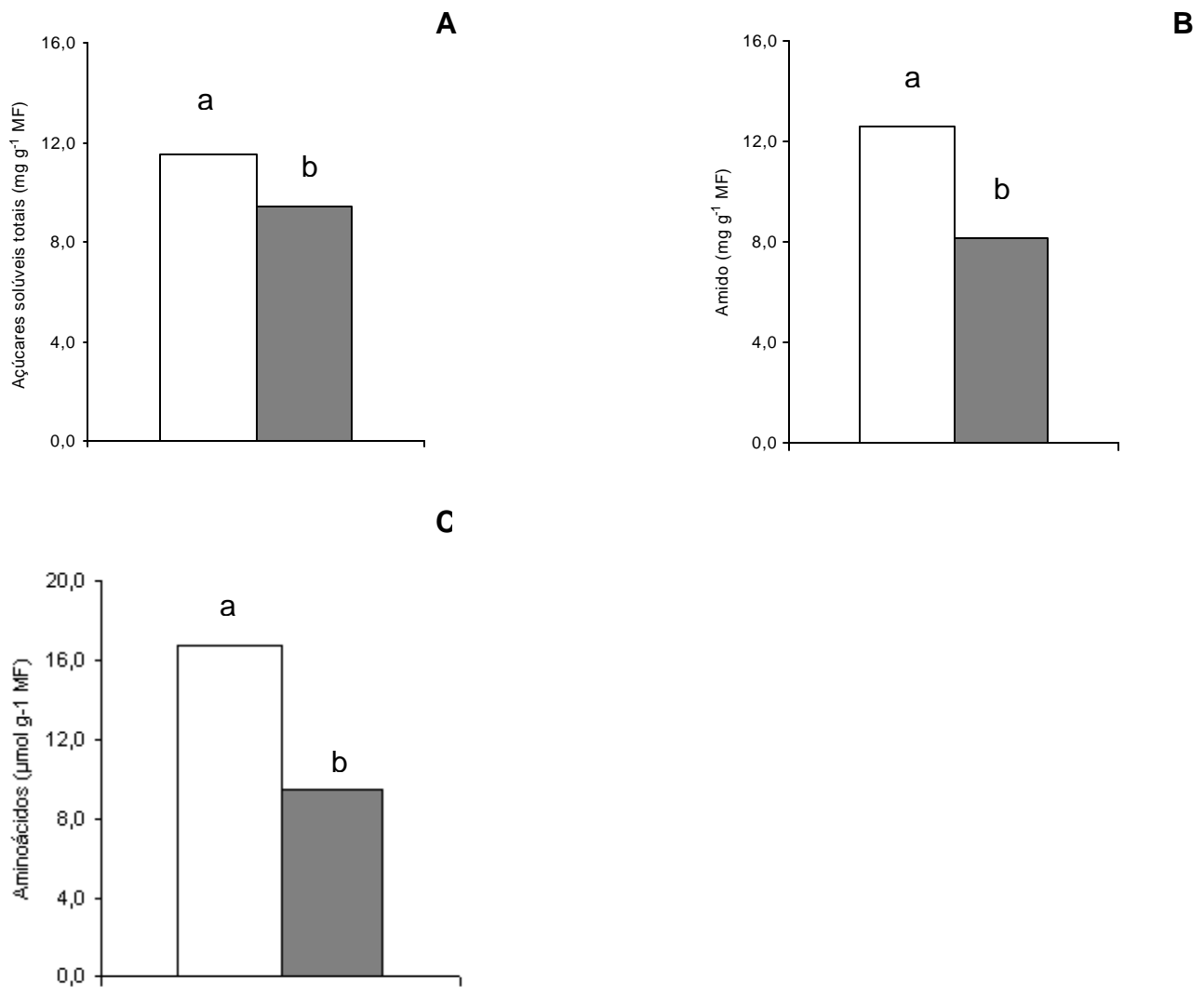


Figura 2- Teores de açúcares solúveis totais (A), amido (B) e aminoácidos (C) em folhas de couve inteiras (□) após processamento mínimo (■). Letras diferentes sobre as colunas representam diferenças significativas entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade.

3.3 Proteínas

O teor de proteínas não foi alterado significativamente ($p < 0,05$) pelo processamento mínimo (Figura 3), apesar de ter tido uma queda ao redor de 16 %. Este comportamento pode ser devido provavelmente à ruptura das paredes celulares.

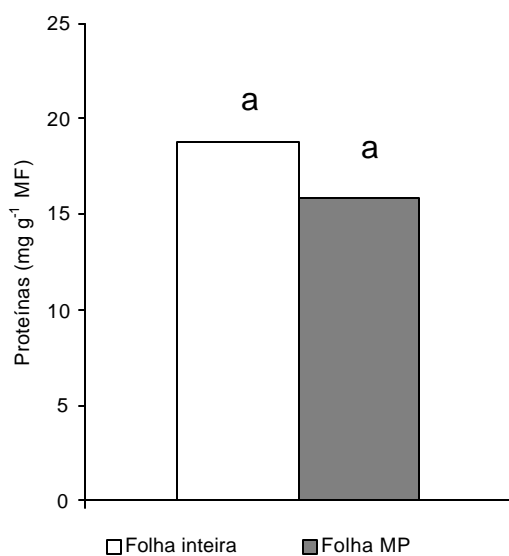


Figura 3- Teor de proteínas em folhas de couve inteiras e após o processamento mínimo (MP). Letras diferentes sobre as colunas representam diferenças significativas entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

O processamento mínimo promoveu perda significativa de açúcares solúveis totais, de amido e de aminoácidos, em comparação com as folhas intactas.

O processamento mínimo não resultou em alterações significativas nos teores de vitamina C e de proteínas.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSERVAÇÃO DE FOLHAS DE COUVE INTEIRAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS

1. INTRODUÇÃO

Na estrutura vegetal intacta, o balanço de energia é mantido pelas trocas metabólicas entre a planta-mãe e o órgão. Uma vez destacado, preconiza-se que o balanço energético seja quebrado e que ocorra aceleração na taxa respiratória, resultando em aumento na produção de etileno e acúmulo de metabólitos secundários. Essas respostas são provocadas e acompanhadas por uma série de eventos complexos, de modo a reparar os danos causados pela colheita e processamento (ROLLE e CHISM, 1987; WATADA et al., 1990).

Após o processamento mínimo, pode ocorrer aumento na atividade de algumas enzimas do metabolismo vegetal, tais como catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL), (ROLE e CHISM, 1987; BOLIN e HXSOLL, 1991; AVENA-BUTILLOS et al., 1993). Essas enzimas causam o aparecimento de odores indesejáveis (“off flavors”), escurecimento e lignificação da parede celular (ROLLE e CHISM, 1987; BRECHT, 1995), piorando, assim, a qualidade do produto.

A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5; PAL) catalisa a transformação da fenilalanina em ácido cinâmico, que pode entrar no metabolismo dos fenil -

propanóides (KE e SALTVEIT, 1989a). Essa enzima pode ter sua atividade aumentada pelo corte do tecido ou pela produção de etileno (ABELES et al., 1992), mas, aparentemente, por mecanismos diferentes. De acordo com HYODO et al. (1978), KE e SALTVEIT (1989a), a PAL é uma enzima induzida pelo corte, que pode então aumentar a concentração de compostos fenólicos como foi observado em alface. O acúmulo de compostos fenólicos pode aumentar a suscetibilidade ao escurecimento por serem substratos naturais de oxidação pelas PPO e POD. Ambas estão presentes em alface (FUJITA et al., 1991; HEIMDAL et al., 1994; GÓMEZ-TENA et. al., 1994). No entanto, para folhas de couve não existe essa informação.

As peroxidases (EC 1.11.1.7; POD) são catalisadores orgânicos, cujo grupo protético é o ferro. Estão largamente distribuídas nas plantas e são vistas como componentes normais da maioria das células vegetais. A maioria das mudanças do *flavor* em frutas e hortaliças cruas e não branqueadas estão relacionadas com a POD (LAMIKANRA, 2002).

Em plantas, as peroxidases participam na biossíntese de lignina, degradação do ácido 3-indol acético ou biossíntese de etileno (ASADA, 1992). Podem contribuir também para o escurecimento enzimático, por apresentar em alta afinidade com substâncias doadoras de hidrogênio, tais como, os polifenóis. Elas também oxidam as catequinas, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (LAMIKANRA, 2002).

A taxa de escurecimento mediada pela POD é limitada pela quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com exceções, por exemplo, do escurecimento em lichia e escurecimento interno de maçã (UNDERHILL e CRITCHLEY, 1995). Hoje, entretanto, há necessidade de melhor entendimento para esclarecer o envolvimento da POD no escurecimento enzimático, visto que existe alta afinidade da PPO pelos seus substratos naturais, assim como, existem baixos níveis de H_2O_2 em frutos e hortaliças intactos.

A polifenoloxidase (EC 1.14.18.1; PPO) é um termo genérico utilizado para designar um grupo de enzimas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, produzindo pigmentos escuros em cortes ou superfícies danificadas de frutas e

hortaliças (LAMIKANRA, 2002). Os compostos fenólicos se localizam predominantemente nos vacúolos das células e essas enzimas são encontradas predominantemente nos tilacóides dos cloroplastos e plastídeos, podendo estar em estado ativo ou latente (MAYER e HAREL, 1979). Para que ocorra o contato entre eles, é necessária a descompartimentalização da célula (LAMIKANRA, 2002). Portanto, as reações de escurecimento enzimático ocorrem no tecido vegetal principalmente quando há ruptura da célula. Na couve minimamente processada, CARNELOSSI (2000) observou que há um aumento no índice de escurecimento (IE) medido colorimetricamente, chegando o autor a inferir que poderia estar diretamente relacionado com a atividade da PPO.

Para couve, os principais problemas que afetam a qualidade durante o armazenamento estão relacionados com a perda de coloração, ressecamento, odor desagradável e um possível escurecimento. No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento das enzimas citadas após o processamento mínimo e/ou durante seu armazenamento a baixas temperaturas. Sabe-se que armazenamento a baixas temperaturas (KIM et al., 1993; HOWARD et al., 1994), o uso de atmosfera modificada (BARTH et al., 1993; NICOLI, et al., 1994) e a utilização de inibidores da síntese de etileno (NICOLI et al., 1994; SAPERS et al., 1994) podem retardar o escurecimento enzimático de produtos minimamente processados.

Um outro problema com produtos minimamente processados é a perda de massa fresca. Em cenoura minimamente processada, a dessecação ou excesso de água nas células superficiais pode causar esbranquiçamento ou vermelhidão, afetando a comercialização. Para evitar esses efeitos visuais indesejáveis, é recomendável recobrir os produtos com filmes poliméricos (BRECHT, 1995). A diferença na taxa de perda de água entre superfícies cortadas e intactas varia de cinco a dez vezes para órgãos com a mínima suberização na superfície, como a cenoura, de dez a cem vezes para órgãos com superfícies cuticularizadas, como frutos da família *Cucurbitáceae*, e de até quinhentas vezes para órgãos poucos suberizados, como os tubérculos de batata (BURTON, 1982). No entanto, para folhas, não existe essa informação.

O processamento mínimo pode acelerar o processo de senescência em frutos e verduras (WILEY, 1994; BRECHT, 1995), causando deterioração e perda da coloração e textura originais (ROLLE e CHISM, 1987). O aumento da atividade de clorofilase, resultando na perda de clorofila, tem sido relatado por alguns autores como uma consequência da síntese e da atividade do etileno (SABATER e RODRIGUEZ, 1978; WATADA et al., 1990; YAMAUCHI e WATADA, 1991).

Alguns autores (ROLLE e CHIM, 1987; AHVENAINEM, 1996) observaram que, durante o armazenamento de alguns produtos minimamente processados, tais como, brócolos, alface e kiwi, os teores de clorofilas diminuíram. No entanto, CARNELOSSI (2000) observou, em couve minimamente processada, que os teores de clorofila total e carotenóides não variaram durante o armazenamento a 5 °C, por um período de sete dias, dependendo das embalagens utilizadas. AMARANTE (1991) observou redução substancial no teor de clorofila total em folhas de couve inteiras, armazenadas em câmaras úmidas escuras (97 ± 2 % UR), com fluxo contínuo de ar úmido de 10 L h^{-1} , por um período de nove dias, a 24 ± 2 °C.

Os teores de vitamina C em folhas de couve minimamente processadas (CARNELOSSI, 2000) e em frutos e hortaliças (KLEIN 1987) podem ser utilizado como um indicador de qualidade. O processamento mínimo pode também causar diminuição na qualidade nutricional, uma vez que afeta a estabilidade de vitaminas e nutrientes do produto (KLEIN, 1987). Mais da metade do ácido ascórbico em alface minimamente processada é perdida após seis dias em condições de refrigeração. Por outro lado, vagem picada, nas mesmas condições de armazenamento, não perde vitamina C (KLEIN, 1987). A vitamina C é vulnerável a oxidações químicas e enzimáticas, sendo altamente solúvel em água, fazendo com que esta se torne um marcador sensível e apropriado para monitorar mudanças na qualidade de produtos minimamente processados (FAVELL, 1998). Apesar disto, imediatamente após o processamento mínimo, os teores de vitamina C não diminuem significativamente (Capítulo 2), sendo importante verificar o comportamento no armazenamento refrigerado.

Não existem informações a respeito dos teores de açúcares solúveis totais, amido e proteínas solúveis, em folhas de couve minimamente processadas, como em folhas de couve intactas. Sabe-se apenas, que ocorrem variações nos teores de açúcares totais e de amido em relação ao horário de colheita, conforme observado por AMARANTE (1991).

Quanto aos aminoácidos, sabe-se que geralmente, pode ocorrer aumento no seu conteúdo durante o armazenamento de produtos vegetais intactos, devido ao processo de proteólise (BACKER, 1987). No entanto, para os produtos minimamente processados, existem poucas informações. CHANCHIN et al. (1999) observaram pequenas mudanças no conteúdo de aminoácidos nos floretes e no talo de brócolos, quando armazenados a 20 °C e submetidos a vários tipos de filmes plásticos. Observaram também que a prolina foi o aminoácido predominante nos floretes como nos talos, com predominância nos floretes. Os autores observaram também acúmulo do aminoácido alanina.

Muitos frutos e hortaliças devem ser armazenados sob refrigeração, quando se deseja prolongar sua vida útil. Para os produtos minimamente processados, esta prática torna-se indispensável. No entanto, alguns vegetais são sensíveis a baixas temperaturas de armazenamento e tornam-se injuriados quando expostos a período prolongado de exposição. Os sintomas de danos pelo frio podem se apresentar sob diferentes formas, tais como, necrose em plântulas (McCOLLOCH, L, 1966), escaldaduras em mamão e citrus (CHEN e PAULL, 1986) e grandes áreas escurecidas em pimenta e abóbora (WANG e KRAMER, 1990).

Muitas enzimas estão envolvidas nas alterações do metabolismo interno de frutos e hortaliças, quando o tecido é exposto a estresse biótico e abiótico. A POD, PPO e PAL respondem a condições de estresse e estão envolvidas em mecanismos de defesa do vegetal (ROBINSON, 1991b; VAMOS-VIGYAZÓ, 1981). Logo, a utilização de temperaturas adequadas de armazenamento juntamente com a atmosfera modificada em folhas de couve inteiras e minimamente processadas podem influenciar na taxa de perda de metabólitos e água, assim como, na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo fenólico.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do processamento mínimo e de duas temperaturas de armazenamento sobre a qualidade de folhas de couve, avaliando-se características químicas, bioquímicas e fisiológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), acesso BGH 1578, conhecida comumente como Portuguesa, foram cultivadas na horta experimental do Departamento de Fitotecnia, localizada a 20° 45' 14''S de latitude e 42° 52' 53''W de longitude. As folhas foram destacadas das plantas-mãe, quando atingiram cerca de 35 cm de comprimento e imediatamente levadas ao laboratório. Seus pecíolos foram imersos em baldes, contendo água de torneira, por um período de 24 h, para a recuperação da turgescência, e colocadas em câmara fria à temperatura de 5 ± 1 °C (CARNELOSSI 2000). Após esse período, um lote de folhas foi submetido ao processamento mínimo e o outro permaneceu intacto.

2.2 Processamento mínimo

Foram constituídas as seguintes etapas de processamento, de acordo com CARNELOSSI (2000), em um tempo total de aproximadamente de 1 hora: seleção, padronização e lavagem, corte (fatiamento), sanitização, enxágüe e centrifugação, conforme descrito no Capítulo 1. Após o processamento, o produto foi embalado em sacos de PP selecionados no Capítulo 1. Todas as etapas foram realizadas na Unidade de Processamento de Frutos e Hortaliças com temperatura ambiente em torno de 18 ± 2 °C.

2.2.1 Embalagem - Para as folhas inteiras, utilizaram-se sacos de PP de 39 cm de comprimento x 26 cm de largura com a seguinte característica: 6 µm de espessura, contendo uma faixa de PP (4 µm) de 5 cm de largura, perfurada com 648 furos (810 µm de diâmetro), localizada em uma das extremidades em que se situava o pecíolo. Para as folhas minimamente processadas, utilizaram-se sacos de PP, de 22 cm de comprimento x 26 cm de largura e 6 µm de espessura, contendo uma faixa de PP (4 µm) de 5 cm de largura, perfurada com 648 furos (810 µm de diâmetro), localizada na extremidade. As faixas de PP foram seladas na frente e no verso do saco. Em cada embalagem, foram colocados cerca de 200 g de folhas de couve intactas (4 folhas) e cerca de 100 g de folhas minimamente processadas (equivalente a 4 folhas). As embalagens foram seladas com auxílio de uma seladora comercial (SELAMUT, R. BAIÃO). Cada embalagem foi identificada, pesada para a obtenção da massa fresca inicial e submetida aos tratamentos de armazenamento.

2.3. Armazenamento

As folhas embaladas foram armazenadas protegidas da luz, em expositor com ventilação forçada de ar, nas condições de 5 ± 1 °C e de 10 ± 1 °C, ambas com 90 ± 5 % de UR, por um período de até 15 e de 9 dias, respectivamente. As avaliações foram feitas em intervalos de dois dias, até o sexto dia. Subseqüentemente, os intervalos foram de três dias, até o 15º e 9º dia, para as temperaturas de 5 e 10 °C. Nesses intervalos de tempo, foram determinados: início da senescência, a perda de massa fresca, os teores de clorofilas a, b e totais, o teor de vitamina C, os teores de açúcares solúveis totais e de amido, os teores de aminoácidos e de proteínas solúveis e as atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase.

2.4. Início da senescência

Avaliou-se o início da senescência por meio de observações visuais, comparando-se as folhas avaliadas em cada intervalo de tempo com folhas recém-colhidas e recém-processadas. O início da senescência foi caracterizado visualmente com base no amarelecimento, na perda de turgescência e ressecamento, no odor desagradável e no escurecimento.

2.5. Perda de massa fresca

A perda de massa fresca foi determinada pela diferença entre a massa fresca inicial e a obtida em cada intervalo de tempo, para cada embalagem.

2.6. Clorofilas a, b e total

Clorofilas a, b e total foram determinadas pelo método proposto por LICHTHENTHALER (1987).

2.7. Vitamina C, açúcares solúveis totais, amido, aminoácidos e proteínas

As metodologias para a determinação de vitamina C, açúcares solúveis totais, amido, aminoácidos e proteínas solúveis estão descritas no Capítulo 1.

2.8. Extração e ensaio da PAL (EC 4.3.1.5)

A extração e o ensaio para a determinação da atividade da PAL foram feitas de acordo com KE e SALTVEIT (1986), com adaptações. O extrato enzimático foi obtido, homogeneizando-se 3 g do material vegetal em 6 mL de tampão borato de sódio (0,1 M) pH 8,8 contendo -mercaptanol (5 mM), EDTA (2 mM) e polivinil pirrolidona insolúvel (PVPP) 1 % (p/v). O extrato foi centrifugado a 25000 g por 20 min, a 4 °C e dessalinizado em coluna Sephadex G 25.

No ensaio, foram utilizados 2,0 mL de L-fenilalanina (60 mM) em tampão borato (0,1 M) pH 8,8, o qual foi pré-incubado a 40 °C, por 15 min. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático e, após 2 h de incubação a 40 °C, foi feita a leitura de absorvância a 290 nm. Como branco, foi utilizado o tampão borato (0,1 M), ao invés da L-fenilalanina.

A atividade da PAL foi expressa como o aumento da absorvância (absorvância) a 290 nm por hora, por mg de proteína.

2.9 Extração e ensaio da POD (EC 1.11.1.7) e PPO (EC 1.14.18.1)

O extrato enzimático para ambas as enzimas, POD e PPO, foi obtido homogeneizando-se 1 g do material vegetal em 6 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0. A seguir, o material foi centrifugado a 10.000 g por 21 min a 4 °C.

O ensaio da POD seguiu a metodologia de SILVA (1981), com algumas modificações. Foi utilizada uma mistura contendo 1 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 e 10 µL do extrato enzimático, que permaneceu a 25°C até a estabilização da temperatura. A essa mistura, foram adicionados 100 µL de guaiacol (0,5 %) e 100 µL de peróxido de hidrogênio (0,08 %) como substratos, tendo sido as leituras de absorvância a 470 nm realizadas de 30 em 30 s, até 2 minutos.

A PPO foi ensaiada de acordo com modificações do método descrito por COELHO (2001). Para tal utilizou-se uma mistura de 1,3 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 e 1,5 mL de catecol 0,2 M como substrato, que permaneceu a 30 °C até a estabilização da temperatura. A essa mistura foram adicionados 30 µL do extrato enzimático e as leituras de absorvância a 425 nm foram realizadas de 30 em 30 s, até 2 minutos.

Uma unidade enzimática (UE) de POD ou de PPO foi definida como a quantidade de enzima no extrato capaz de aumentar a absorvância em 0,001 unidade por minuto. Como branco, foi utilizado o extrato enzimático fervido por 10 min para a POD e PPO.

2.10 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para cada temperatura de armazenamento foi o inteiramente casualizado, em esquema de parcela subdivididas, tendo nas parcelas, os tipos de folhas (inteiras e minimamente processadas) e nas subparcelas, os períodos de avaliações (0, 2, 4, 6, 9, 12 e 15 dias), com três repetições em triplicata para cada tratamento. Os dados foram submetidos a análises de variância com o auxílio do programa de computação SAEG 5, da Central de Processamento de Dados da UFV. Foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, para detecção de diferenças de médias entre tratamentos. Para as enzimas, fez-se a análise estatística descritiva, sendo os resultados comparados com base nas médias seguidos dos respectivos erros padrões.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Início de senescência

Nas Figuras 1 e 2, estão representados o tempo de armazenamento em dias e o período em que se iniciou a senescência (seta) das folhas inteiras e minimamente processadas, respectivamente. As principais causas que contribuíram para o início da senescência visual das folhas inteiras foram o amarelecimento e perda de turgescência. Em folhas armazenadas a 5 °C, o início da senescência ocorreu aos nove dias e para as armazenadas a 10 °C, foi aos seis (Figuras 1, 3 e 4). Portanto, com a redução da temperatura de armazenamento de 10 para 5 °C, observou-se um ganho de 3 dias para o início da senescência, que pode ser bastante significativo em termos comerciais.

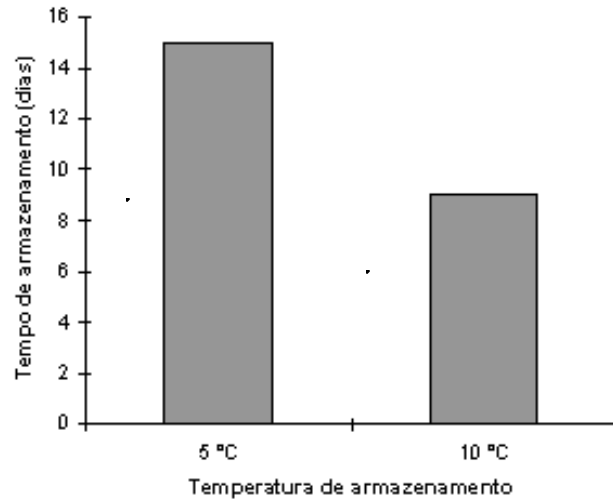


Figura 1- Início de senescência (.) de folhas de couve inteiras, embaladas em sacos de polipropileno com furos e armazenadas a 5 e 10 °C.

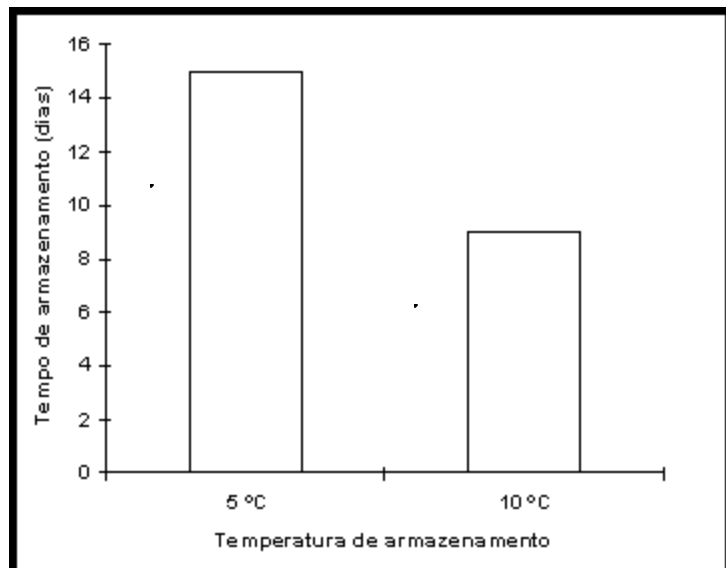


Figura 2- Início de senescência (.) de folhas de couve minimamente processadas, embaladas em sacos de polipropileno com furos e armazenadas a 5 e 10 °C.

Os sintomas de senescência das folhas minimamente processadas foram, principalmente, o amarelecimento, a perda de turgescência provocando ressecamento com maior intensidade na região onde estavam localizados os furos da embalagem, e, ainda, indícios de escurecimento nas bordas dos cortes. O início dos sintomas de senescência das folhas minimamente processadas, quando armazenadas a 10 °C, ocorreu também no sexto dia de armazenamento (Figuras 2, 3 e 4) e quando armazenadas a 5 °C, ocorreu no 11º dia de armazenamento (Figuras 2, 3 e 4). Esse fato evidencia que apesar do dano mecânico das folhas minimamente processadas, a temperatura de 5 °C conseguiu reduzir o metabolismo, pois o início da senescência foi retardada em 5 dias, quando comparado com as folhas minimamente processadas, armazenadas a 10 °C (Figura 2).



Figura 3- Aspecto geral de folhas de couve inteiras (à esquerda) e minimamente processadas (à direita), armazenadas por um período de 6 dias a 10 °C e 5 °C.



Figura 4- Aspecto geral de folhas de couve inteiras (à esquerda) e minimamente processadas (à direita), armazenadas por períodos de 9 e de 11 dias a 10 e 5 °C, respectivamente. O controle representa folhas recém colhidas e processadas.

CARNELOSSI (2000) também verificou aumento no índice de escurecimento em folhas de couve minimamente processadas, armazenadas a 5 °C, sugerindo que esse comportamento possa ser devido ao aumento da atividade da PPO. Este trabalho confirma o que foi sugerido por CARNELOSSI (2000), pois o início do escurecimento verificado visualmente coincidiu com o aumento na atividade da PPO, como será visto mais adiante.

Para a embalagem testada, o processamento mínimo influenciaria o aumento da vida útil pós-colheita, desde que fosse armazenado em temperaturas baixas. Nesse estudo, à temperatura de 5 °C, observou-se aumento em torno de 2 dias para o início da senescência, quando comparado com as folhas intactas à mesma temperatura (Figuras 1 e 2).

CARNELOSSI (2000) reportou que para folhas de couve minimamente processadas da mesma variedade, a qualidade foi mantida por um período de até 10 dias a 10 °C e de 15 dias a 5 e 1 °C, todas em embalagens PD 961, PD 941 e caixas plásticas. Portanto, as condições deste experimento não proporcionaram aumento na vida útil, em relação aos resultados obtidos pelo autor acima citado. No entanto, considera-se um período de armazenamento de até 11 dias a 5 °C, comercialmente viável. Estudos mais detalhados são necessários, incluindo avaliações sensoriais, visto que as enzimas que participam na perda de *flavor*

como a PAL e POD (serão vistas posteriormente), apresentaram respostas diferenciadas para as folhas minimamente processadas em relação às intactas, além de estudos microbiológicos para melhor definição da vida útil do produto.

3.2 Perda de massa fresca

Houve efeito significativo da interação tipos de folhas x tempo de armazenamento, nas duas temperaturas de armazenamento estudadas.

A perda de massa fresca aumentou no decorrer do armazenamento nas duas temperaturas utilizadas (Figuras 5A e 5B). Esse fato pode ser devido à perda de água, visto que, nas folhas minimamente processadas, o corte aumenta a superfície de evaporação da água entre a folha e o ar, como observado por BURTON (1982), para os produtos cortados.

A temperatura de armazenamento de 5 °C retardou a perda de água somente até o quarto dia, para ambos os tipos de folhas (Figura 5A), diferentemente do encontrado por TULLIO (2002) em folhas de juta, cuja redução na temperatura de armazenamento significou redução também na perda de massa fresca em todo o período de armazenamento.

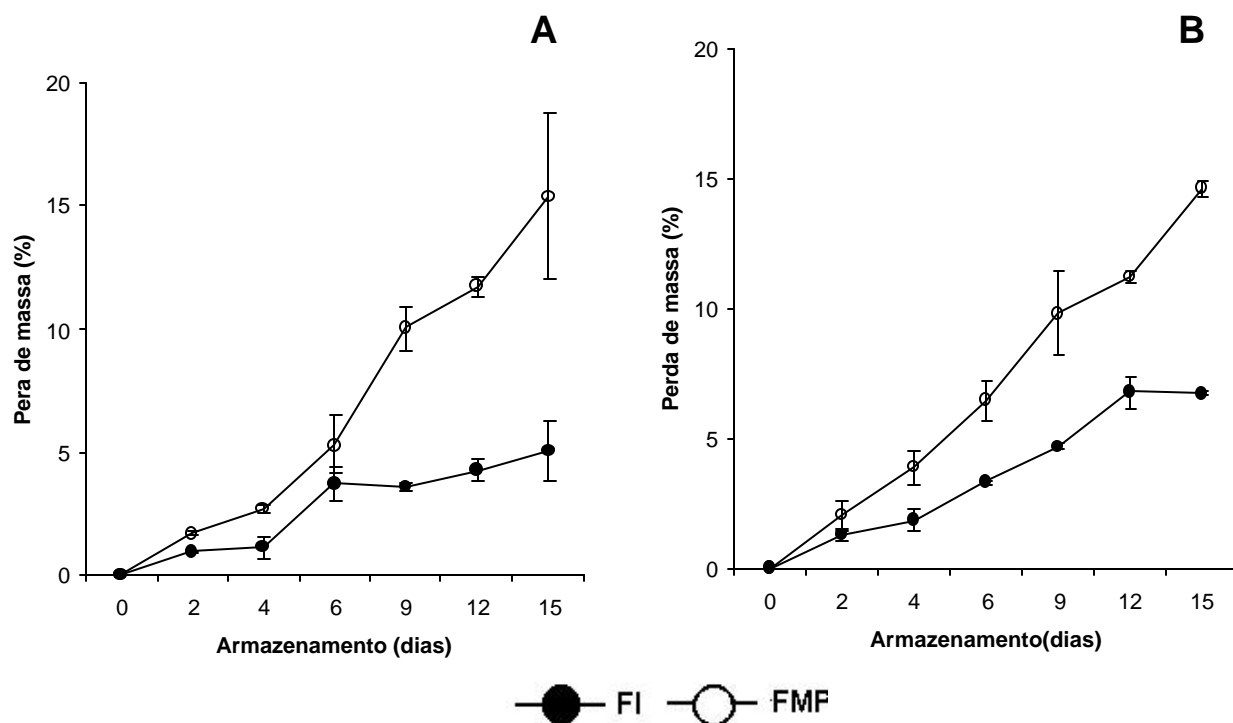


Figura 5- Perda de massa em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP) e armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da

Embora as folhas tenham apresentado perda de massa fresca a partir do primeiro dia de armazenamento, o período em que as folhas minimamente processadas apresentaram início de perda visível de turgescência, ocorreu aos 11 dias, quando a 5 °C e aos 6 dias, quando armazenadas a 10 °C. Para as folhas inteiras, o início da perda visual de turgescência se deu aos 9 dias a 5 °C e aos 6 dias a 10 °C (Figuras 5A e 5B). Nesses períodos, as folhas inteiras apresentaram valores de perda de massa fresca próximos a 3,6 % e entre 6,5 e 10 %, para as minimamente processadas. Portanto, parece que a partir desses valores de perda de massa fresca, a aparência visual das folhas é comprometida.

3.3 Clorofilas Totais

Houve efeito significativo da interação tempo de armazenamento X tipo de folha, apenas para a temperatura de 10 °C.

Observou-se queda significativa no teor de clorofilas totais imediatamente após o processamento mínimo (dia zero), assim como, durante o armazenamento para as duas temperaturas estudadas, nos dois tipos de folhas (Figuras 6A e 6B). As perdas no teor de clorofilas totais foram praticamente semelhantes para ambos os tipos de folhas, apresentando perdas de clorofilas no início da senescência (seis dias) de 39 % e 37 % para folhas inteiras e minimamente processadas, respectivamente, armazenadas a 10 °C; no armazenamento a 5 °C, essa foram de 30,0 % aos 9 dias para as folhas inteiras e de 28 % aos 11 dias para as minimamente processadas (Figuras 6A e 6B).

A temperatura de 5 °C reduziu a taxa de perda de clorofilas, adiando o início da senescência em relação a 10 °C (Figuras 6A e 6B), fato também observado por TÚLIO et al. (2002).

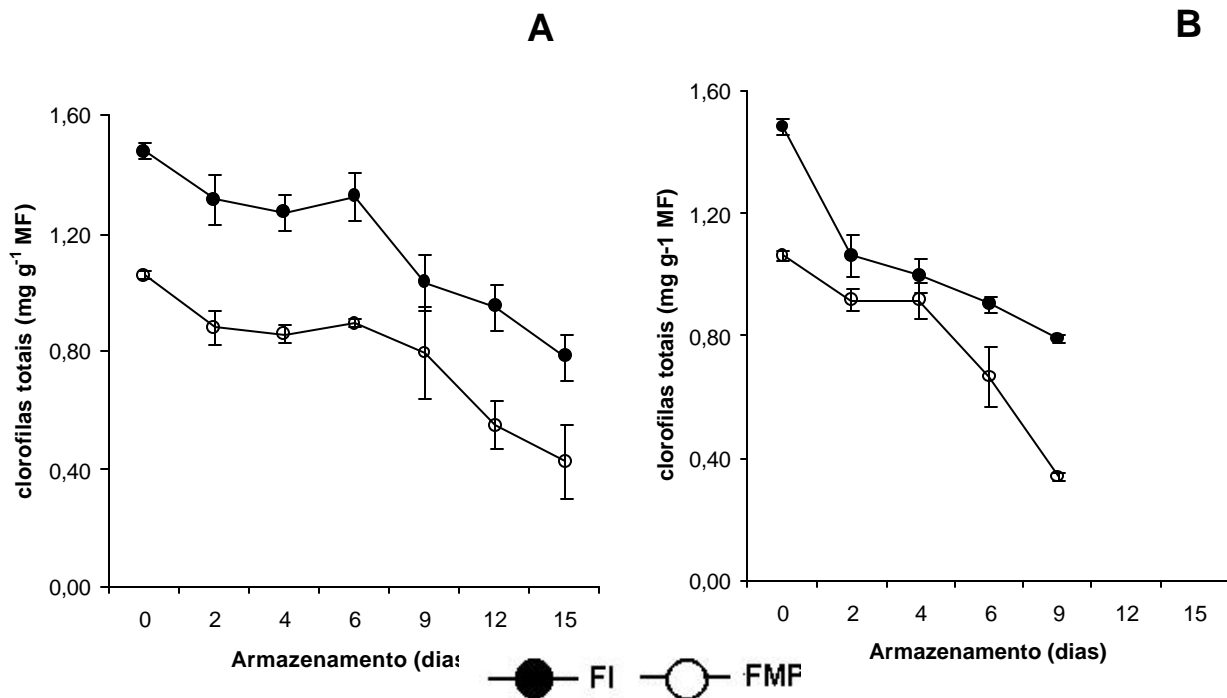


Figura 6- Teor de clorofilas em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

A degradação da clorofila depende de vários fatores, tais como, temperatura, pH, oxigênio e etileno (WATADA et al., 1990; HEATON e MARAGONI, 1996; MATILE et al., 1996). A temperatura, porém, afeta essa degradação, por interferir diretamente nos processos metabólicos, principalmente na ativação de enzimas degradativas (HEATON e MARAGONI, 1996), enquanto o etileno está diretamente envolvido no processo de senescência, estando seu papel na degradação de clorofilas associado ao aumento da atividade de clorofilases (SABATER e RODRIGUEZ, 1978; YAMAUCHI e WATADA, 1991). De acordo com CARNELOSSI (2000), o processamento mínimo em couve induz síntese de etileno, explicando os resultados encontrados.

CARNELOSSI (2000) não observou variação nos teores de clorofilas totais em folhas de couve minimamente processadas, armazenadas por sete dias, a 5 °C

e embaladas em filmes PD 941, PD 900, B 900 e PP, diferentemente dos resultados encontrados neste experimento. Este fato ocorreu provavelmente devido ao tipo de embalagem, pois foi utilizada embalagem perfurada, que talvez tenha aumentado a permeabilidade ao oxigênio, acelerando, portanto, a perda de clorofilas. ROLLE e CHISM (1987), AHVENAINEN (1996) e AGAR et al. (1999) observaram em brócolos, alface e kiwi minimamente processados, perdas de clorofilas em consequência do processo de senescência do produto. AMARANTE (1991) também observou redução substancial no teor de clorofila total em folhas de couve inteiras, armazenadas em câmara úmida escura (97 ± 2 % UR), com fluxo contínuo de ar úmido de 10 L h^{-1} , por um período de nove dias, a 24 ± 2 °C.

3.4 Clorofilas a e b

Houve efeito significativo da interação tempo de armazenamento x tipo de folha, apenas para as folhas armazenadas a 10 °C.

Observou-se comportamento semelhante ao das clorofilas totais, para clorofilas a e b (Figuras 7 e 8). WATADA et al. (1990) também verificaram redução nos teores de clorofilas a e b em folhas de espinafre armazenadas a 25 °C.

Não se observou, porém, um tipo de clorofila que caracterizasse mais a senescência, visto que ambas tiveram quedas proporcionais.

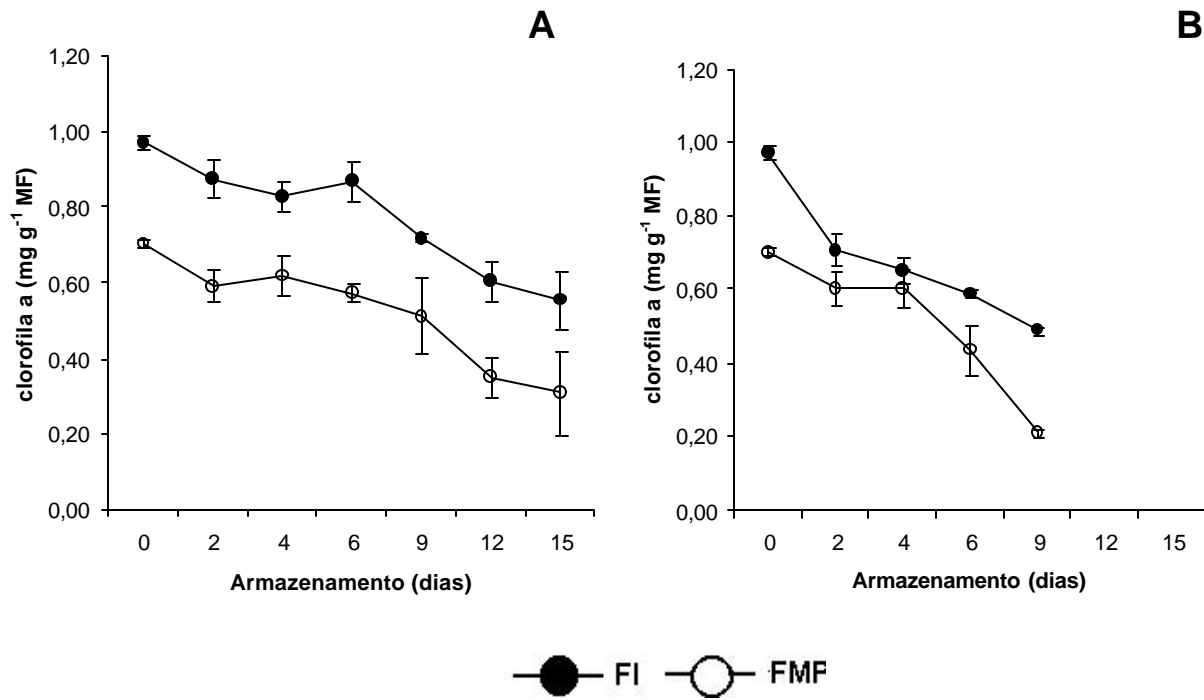


Figura 7- Teor de clorofilas a em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

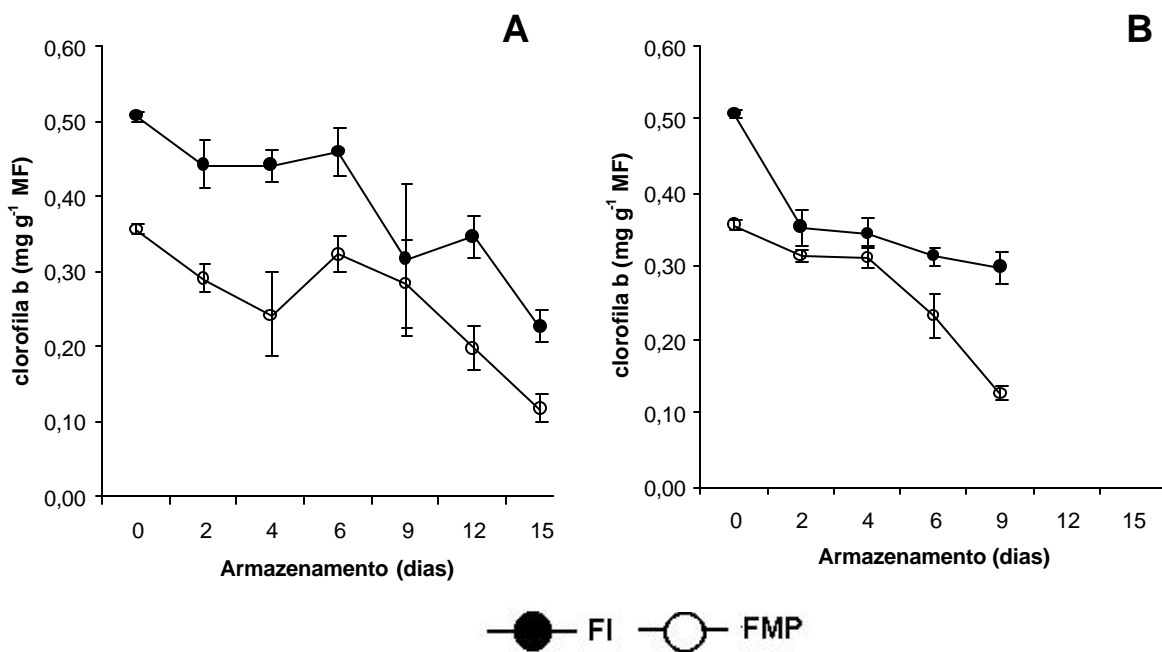


Figura 8- Teor de clorofilas b em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

3.5 Vitamina C

Não foi observado efeito significativo ($p < 0,05$) da interação tipos de folhas x tempo de armazenamento para teor de vitamina C, e sim entre os fatores isolados.

O teor de vitamina C caiu a partir do segundo dia de armazenamento a 10 °C para os dois tipos de folhas, permanecendo o mesmo até o final do armazenamento (Figura 9B) Quando armazenadas a 5 °C, a queda dessa vitamina se iniciou realmente no sexto dia para as folhas inteiras e no quarto dia, para as minimamente processadas (Figuras 9A e 9B), acelerando em dois dias, o início da queda de vitamina C em relação às folhas inteiras, apesar de suas taxas de perdas terem sido aparentemente semelhantes no decorrer do armazenamento (Figuras 9A e 9B).

Nota-se que a temperatura de 10 °C acelerou a perda de vitamina C, o que também foi verificado por MOZAFAR, (1994) em repolho, alface e cenoura cortados ou fatiados.

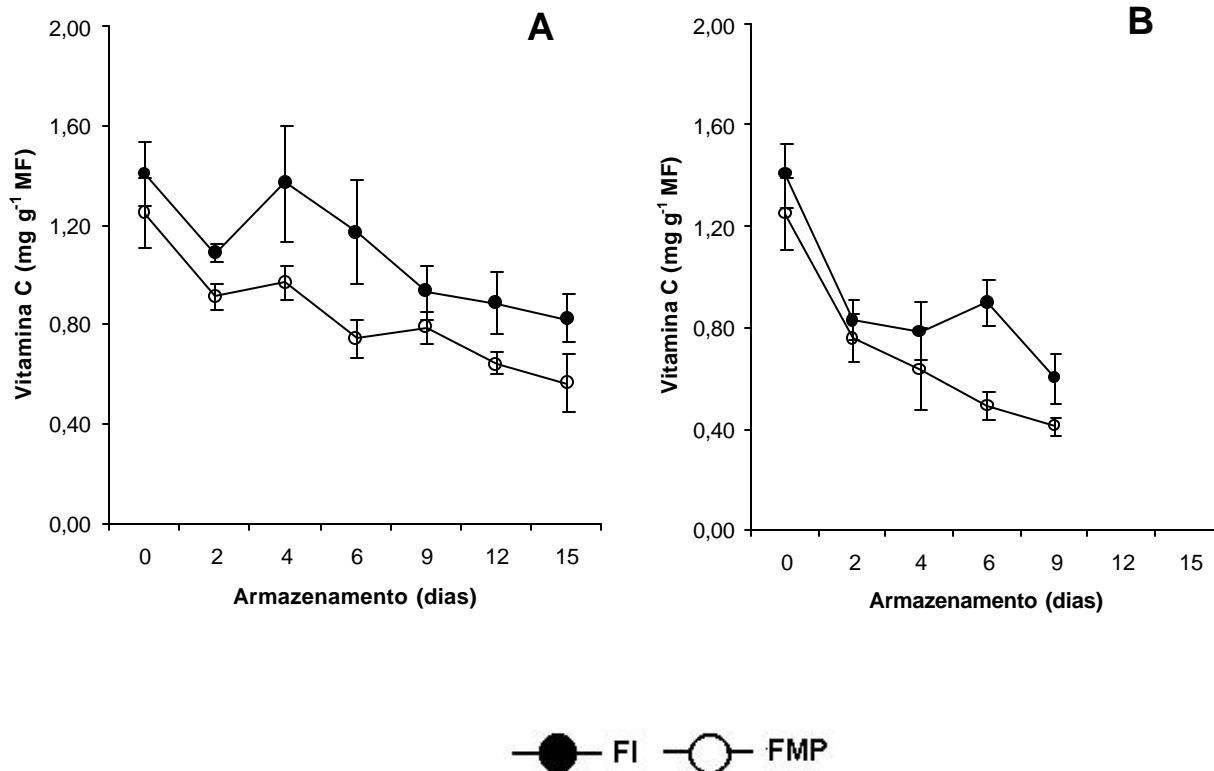


Figura 9- Teor de vitamina C em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

KLEIN (1987) relata que a vitamina C é bastante afetada pela temperatura, oxigênio, luz e pH, sendo desta maneira vulnerável a oxidações químicas e enzimáticas. Nos resultados encontrados, a temperatura de armazenamento e o processamento mínimo afetaram o teor de vitamina C. À temperatura, provavelmente, deve-se a ativação de enzimas como ascorbato oxidase, peroxidase e polifenol oxidase que contribuem para perda desta vitamina. O processamento mínimo favorece a degradação da vitamina C, pelo aumento da concentração interna de oxigênio nos tecidos (KLEIN, 1987; LEE e KADER, 2000).

Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por CARNELOSSI (2000) e KLEIN (1987), cujos trabalhos mostram que o processamento mínimo e a temperatura de armazenamento resultam em maior suscetibilidade à perda de vitamina C.

CARNELOSSI (2000) verificou que o teor de vitamina C de folhas de couve minimamente processadas permaneceu constante até o sétimo dia de armazenamento a 5 °C, quando embaladas em filmes do tipo PD 941. Quando em embalagens PD 900 e PP, o teor caiu a partir do quinto dia, nas mesmas condições.

ZEPPLIN e ELVEHJEIN (1994) verificaram que folhas de hortaliças armazenadas a 6 °C perderam 10 % de seu conteúdo de ácido ascórbico em 6 dias e quando armazenadas em temperatura ambiente, perderam 20 % em 2 dias, resultados semelhantes aos obtidos neste experimento.

3.6 Açúcares solúveis totais e amido

Houve efeito significativo da interação tipos de folhas e tempo de armazenamento somente para a característica açúcares solúveis totais, quando as folhas foram armazenadas a 5 °C. Para o amido, observou-se efeito significativo apenas para os fatores, isoladamente, nas duas temperaturas.

O teor de açúcares solúveis totais diminuiu imediatamente após o processamento mínimo, assim como, durante o armazenamento (Figuras 10A e 10B).

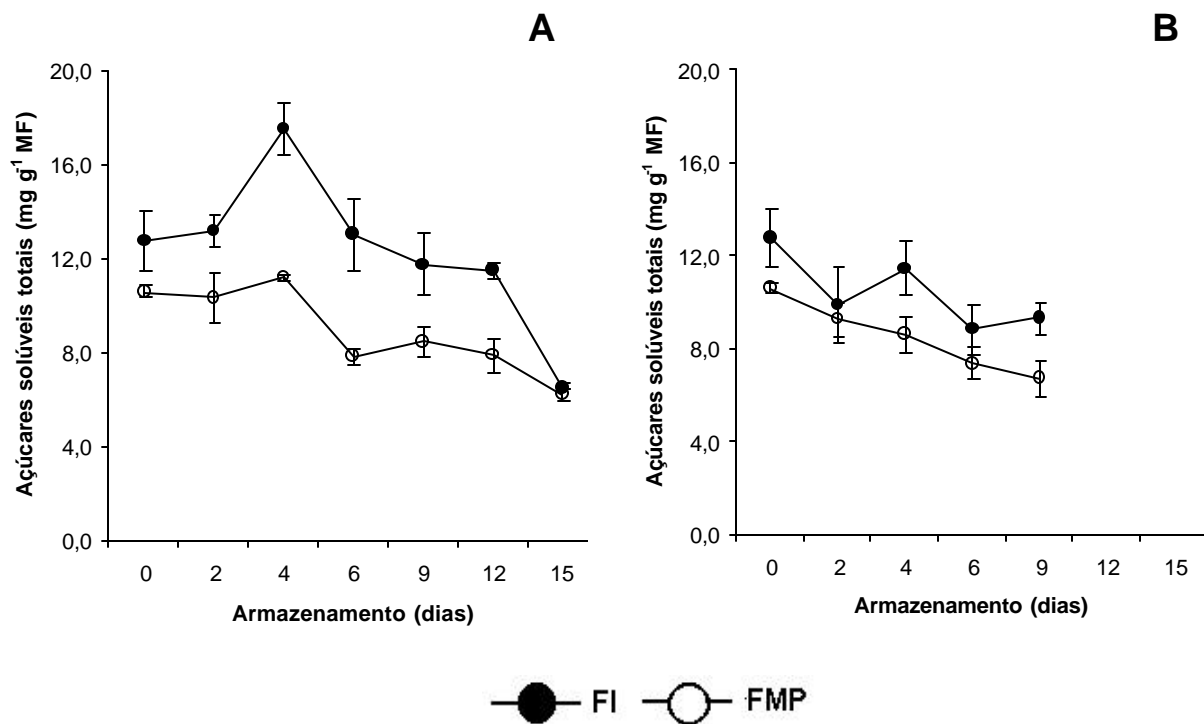


Figura 10- Teor de açúcares solúveis totais em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

O teor de açúcares, nas folhas inteiras foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que nas folhas minimamente processadas até o 12^o dia de armazenamento a 5 °C. Quando armazenadas a 10 °C, os valores médios foram muito próximos (Figuras 10A e 10B). Isso sugere que a temperatura de armazenamento de 5 °C reduziu o metabolismo para as folhas inteiras e, conseqüentemente, o consumo de açúcares em relação à temperatura de 10 °C.

O início da queda no teor dos açúcares solúveis totais na temperatura de 5 °C ocorreu a partir de seis dias para as folhas inteiras e de quatro dias para as minimamente processadas. A 10 °C, o início da queda do teor de açúcares solúveis

ocorreu a partir do segundo dia, para os dois tipos de folhas (Figuras 10A e 10B). A queda no teor de açúcares pode refletir menor vida útil, como observado também por YANO e HAYAMI (1978A; 1978b), diferentemente do encontrado nesse experimento.

A temperatura de armazenamento foi o principal fator para o controle da senescência das folhas, embora o processamento mínimo tenha contribuído para a redução inicial dos teores de açúcares. Logo, a temperatura de 5 °C promoveu redução no decréscimo no teor de açúcares solúveis totais, provavelmente por reduzir o metabolismo, como verificado por CARNELOSSI (2000), em folhas inteiras de couve.

O teor de amido das folhas também caiu durante o armazenamento (Figuras 11A e 11B). Essa redução foi observada a 5 °C, somente a partir de 9 dias (Figura 11 A), enquanto a 10 °C, ocorreu a partir de 4 dias (Figura 11 B) para os dois tipos de folhas, antecipando assim a queda em cinco dias em relação a 5 °C.

A utilização do amido no processo respiratório das folhas de couve coincide com o início da senescência, podendo ser utilizado como um bom parâmetro de qualidade e vida útil do produto.

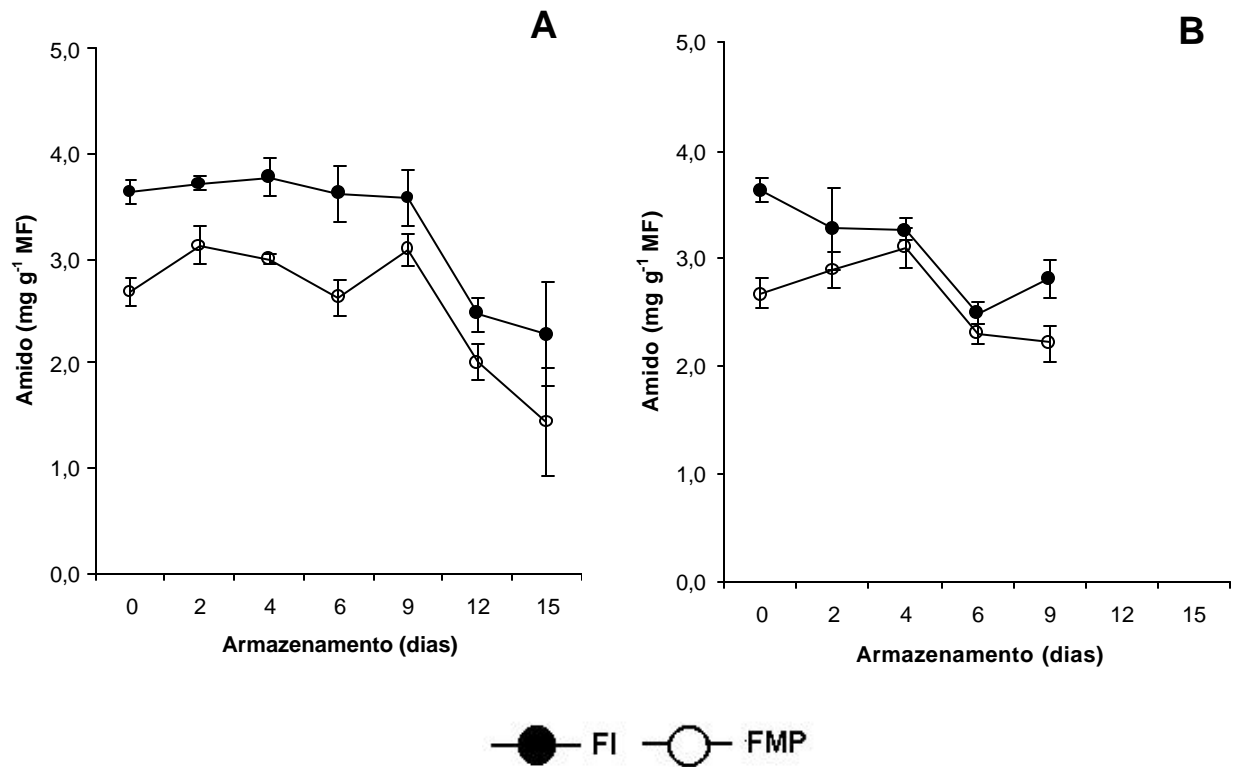


Figura 11- Teor de amido em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

3.7 Aminoácidos e Proteínas

Houve efeito significativo da interação tipos de folhas x tempo de armazenamento, nas duas temperaturas de armazenamento para aminoácidos, não tendo havido interação para a variável proteína.

Observou-se aumento no teor de aminoácidos durante o período de armazenamento, nas duas temperaturas estudadas, tanto para folhas inteiras como minimamente processadas (Figuras 12A e 12B).

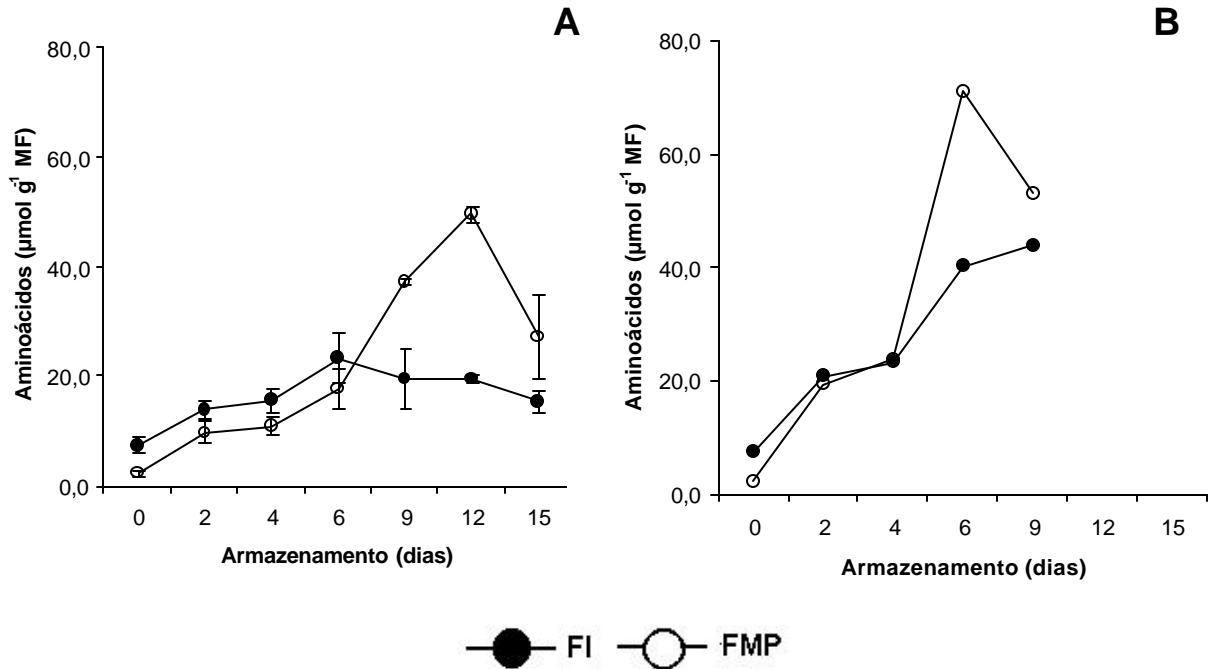


Figura 12- Teor de aminoácidos em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

Quando as folhas minimamente processadas foram armazenadas à temperatura de 5 °C, a partir do sexto dia, houve maior acúmulo de aminoácidos, alcançando valores 2,5 vezes maiores em relação às folhas inteiras a os 12 dias de armazenamento (Figura 12A). A 10 °C, o acúmulo foi a partir de 4 dias, atingindo um máximo aos 6 dias, principalmente nas folhas minimamente processadas (Figura 12 B).

Observou-se que a maior temperatura de armazenamento induziu maior acúmulo de aminoácidos durante o armazenamento e a senescência, fato também verificado por TULLIO et al. (2002) em folhas de juta e em repolho, por HITARA et al. (1987a, b).

TULLIO et al. (2002) sugeriram que o maior acúmulo de aminoácidos livres em folhas maduras e jovens de juta, sob altas temperaturas de armazenamento, é provavelmente atribuído à degradação de proteínas associada ao início da senescência, também verificado por BACKER (1987). Nesse experimento, esse

também pode ter sido o principal fator de degradação como se observa nas folhas minimamente processadas, armazenadas principalmente a 5 °C (Figuras 13A e 13B). Esse aumento nos teores de aminoácidos livres pode ser devido ao aumento na atividade de proteases, como proposto por KAYS (1991b) e MARTIN (1972a e b), os quais relatam a ação de enzimas proteolíticas na redução dos teores de proteínas pós-colheita.

Não foi observada queda significativa nos valores de proteína nos dois tipos de folhas armazenadas a 10 °C, porém, uma mínima queda no teor de proteína pode representar um alto acúmulo de aminoácidos, além de as unidades dos valores de proteínas e aminoácidos estarem em base diferentes.

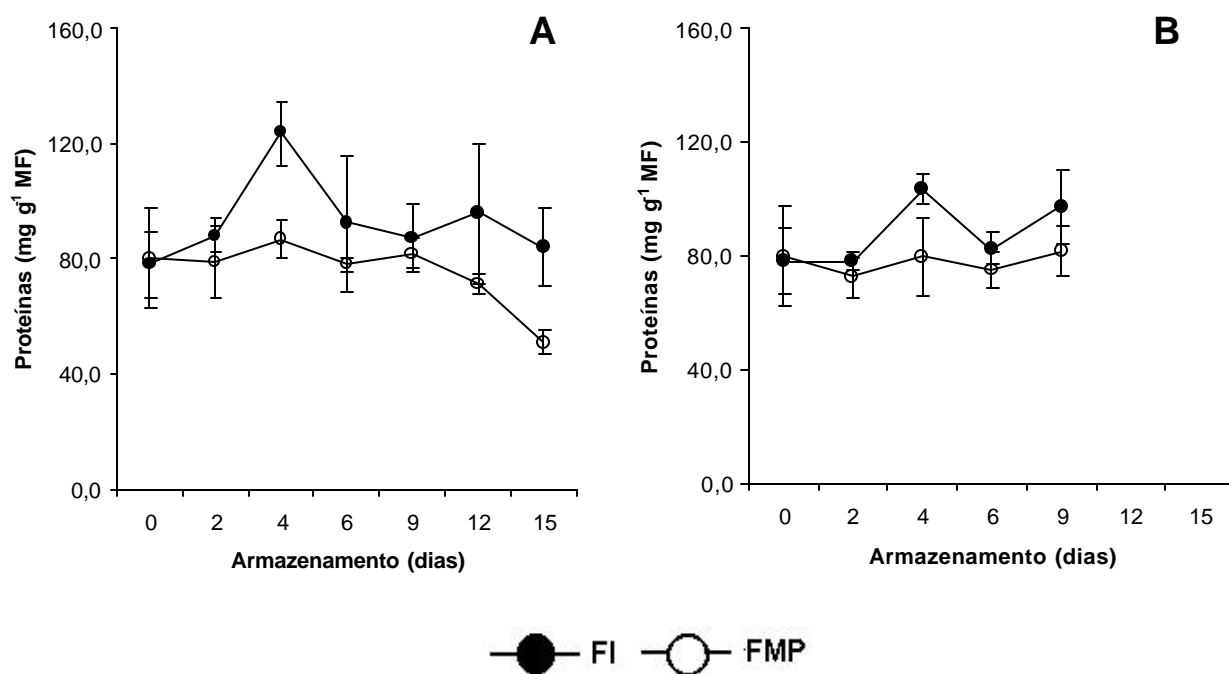


Figura 13- Teor de proteínas em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

3.9 FENILALANINA AMÔNIALIASE [EC 4.3.1.5 (PAL)]

A atividade da PAL foi influenciada tanto pelo processamento mínimo como pela temperatura de armazenamento (Figuras 14A e 14B). Observa-se que a atividade da PAL aumentou cerca de 4 vezes imediatamente após o processamento mínimo. Esse fato pode ser devido ao efeito do corte e do etileno, conforme ABELES et al. (1992), LOPEZ-GALVEZ et. al. (1996), HYODO e FUJINAMI (1989) e KE e SALTVEIT (1989b), os quais encontraram aumento na produção de etileno simultaneamente ao aumento da atividade da PAL, tendo sido proporcionalmente distintos, os mecanismos envolvidos.

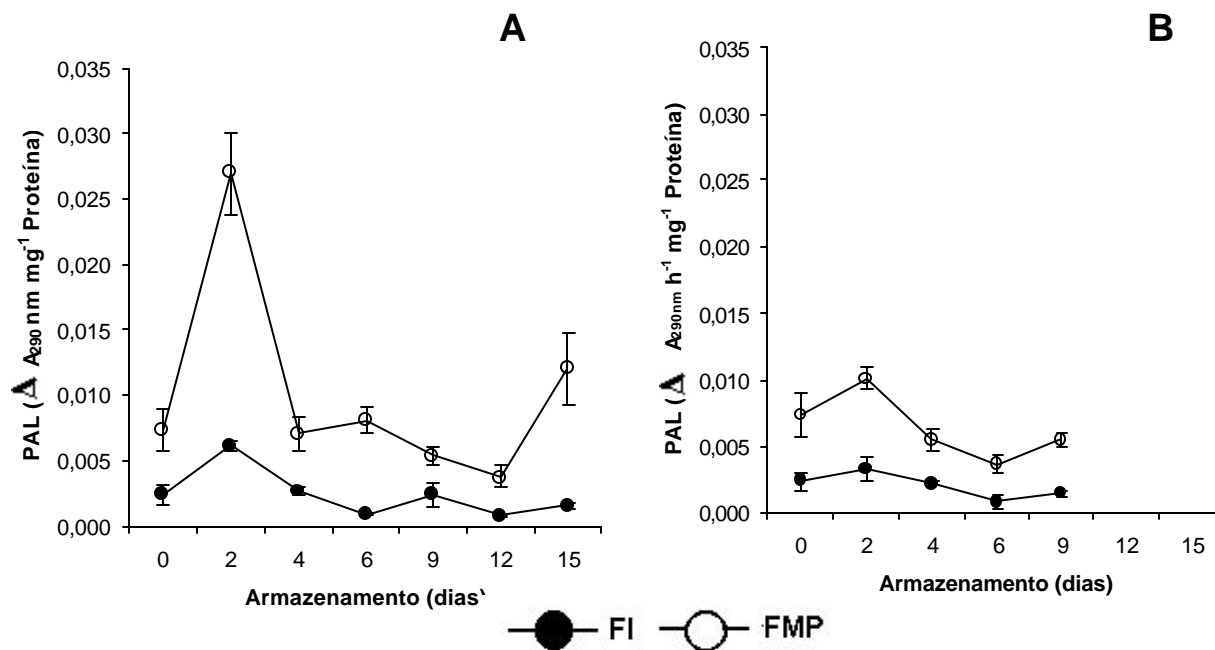


Figura 14- Atividade da PAL em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

Quando as folhas foram armazenadas a 5 °C, no segundo dia de armazenamento, a atividade da PAL, para as folhas minimamente processadas, estava aproximadamente 6 vezes superior em relação às folhas inteiras, enquanto na temperatura de 10 °C, esse valor foi apenas duas vezes maior (Figuras 14A e 14B). Esse resultado sugere que a atividade da PAL seja estimulada no início do armazenamento, principalmente em temperaturas mais baixas, voltando ao estado inicial posteriormente, como também verificado por CANTOS et al. (2001) e BERNARDS e ELLIS (1994). Isso deve ocorrer devido à inibição da PAL pelo acúmulo do seu produto, provavelmente o ácido clorogênico (SARMA et al.,1997), ou pela síntese de um fator chamado Fator de Inativação da PAL (PAL- IF), que ocorre de maneira lenta, aproximadamente 12 h após a indução da PAL, suficiente para permitir sua ativação e acúmulo de compostos fenólicos, causando escurecimento (RITENIOUR e SALTVEIT 1996).

De acordo com KE e SALTVEIT (1989a), o corte induz um sinal para a síntese “de novo” da PAL. Observaram ainda que o pico de sua atividade ocorre após 24 horas de armazenamento a 5 °C em alface minimamente processada, induzindo o escurecimento enzimático, fato também observado por KE e SALTVEIT (1989b) e COUTURE et al., (1993). Além disso, o aumento em sua atividade pode contribuir com a síntese de compostos precursores de lignina em alface e cenoura cortadas (KE e SALTVEIT, 1989a; HOWARD e GRINFFIN,1993).

MOLISCH (1896), PENTZER e HEINZE (1954) e SALTVEIT (2000) relatam que a injúria pelo frio pode alterar o metabolismo dos fenilpropanóides e portanto a atividade da PAL, gerando acúmulo de compostos fitotóxicos. Neste experimento, apesar de não terem sido observados sintomas de danos por frio, as folhas armazenadas a 5 °C tiveram sua atividade bastante estimadas em relação àquelas armazenadas a 10 °C.

3.10 Peroxidase (EC 1.11.1.7; POD)

Folhas minimamente processadas apresentaram atividade da POD cerca de duas vezes maior que as folhas inteiras, diferença esta que se manteve mais ou

menos constante durante todo o armazenamento (Figuras 15A e 15B). Comportamento semelhante também foi encontrado por KE e SALTVEIT (1989a) em alface cortada e armazenada a 5 °C.

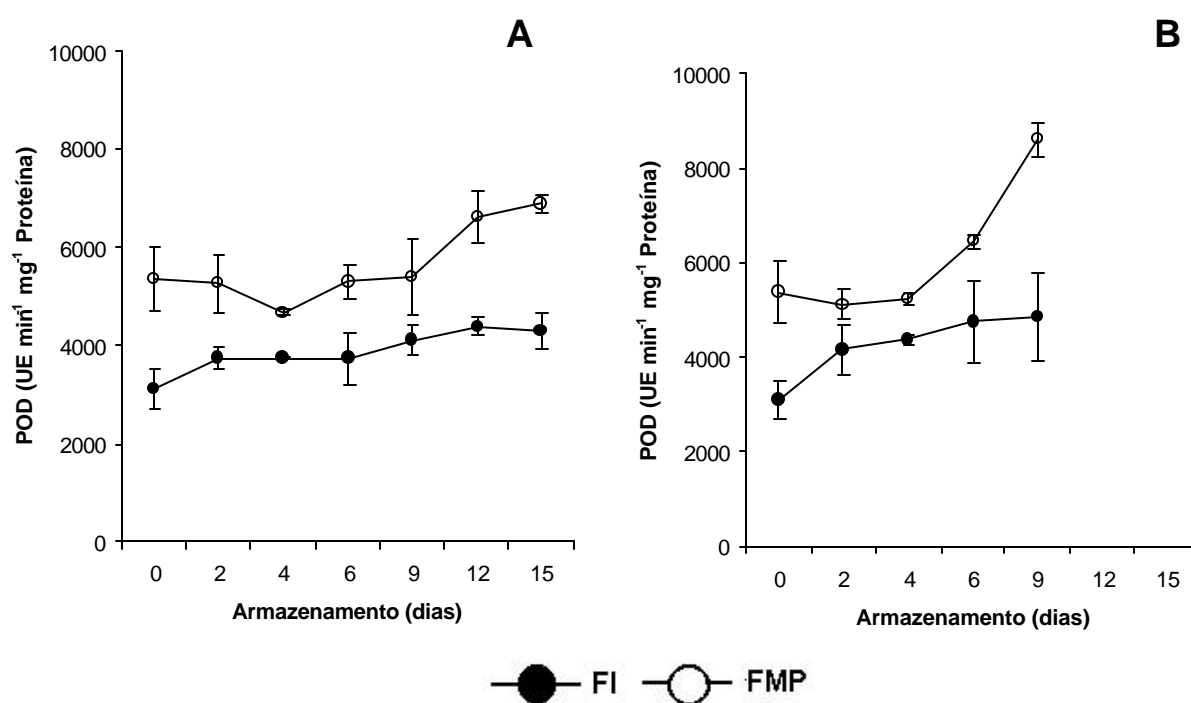


Figura 15- Atividade da POD em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

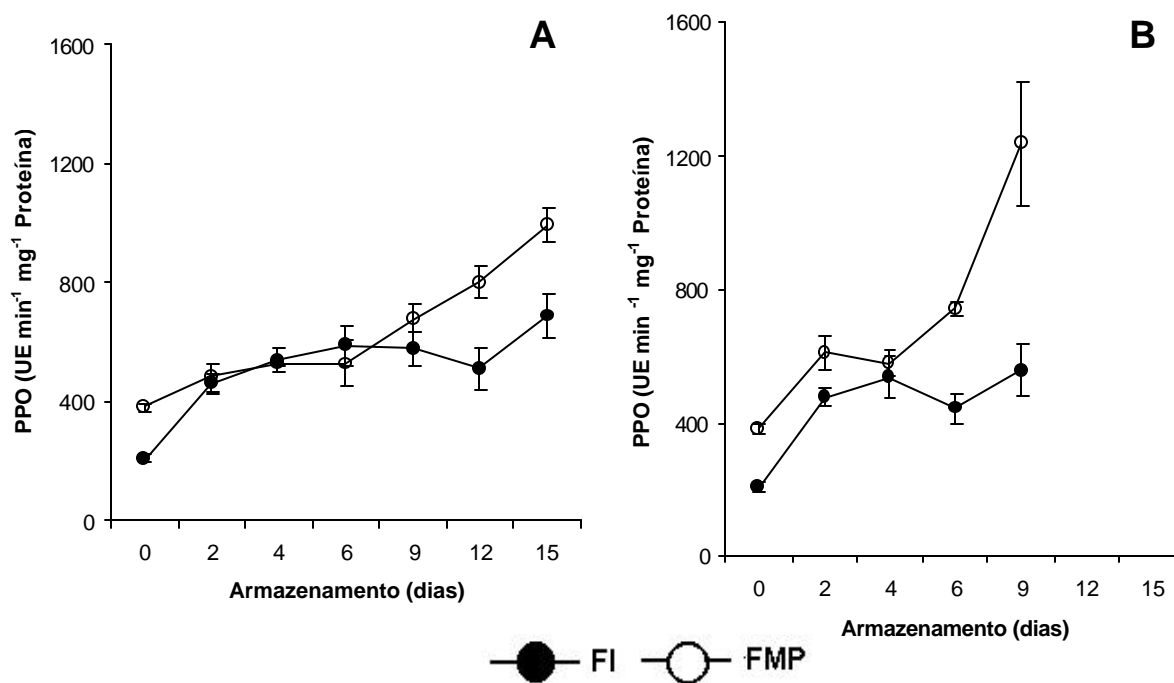
A partir de 4 e 9 dias de armazenamento nas temperaturas de 10 e 5 °C, respectivamente, observou-se aumento na atividade da POD para folhas minimamente processadas (Figuras 15A e 15B), o que pode estar relacionado com a senescência (HAARD, 1973; VAMOS-VIGYAZO et al., 1981).

O aumento da atividade da POD após o processamento mínimo pode ser devido a algum sinal químico que induza a sua síntese 'de novo', conforme observado por KE e SALTVEIT (1989), CANTOS et al. (2001) e SALTVEIT (2000).

Esse aumento na atividade da POD pode se refletir em maior biossíntese de lignina e maior taxa de cicatrização, como também é sugerido por KE e SALTVEIT (1989) e HOWARD e GRINFFIN (1993), a fim de recuperar o dano sofrido após o corte, protegendo o tecido contra ataque de patógenos (BURNETTE, 1977).

3.11 Polifenoloxidase (EC 1.14.18.1; PPO)

A atividade da polifenol oxidase pode ser visualizada nas figuras 16A e 16B. O processamento mínimo induziu aumento na atividade dessa enzima, pois sua atividade foi duplicada, quando comparada ao controle no dia zero (Figuras 16A e 16B).



Figuras 16- Atividade da PPO em folhas de couve inteiras (FI) e minimamente processadas (FMP), armazenadas a 5 °C (A) e 10 °C (B). As barras representam o erro padrão da média.

As folhas minimamente processadas apresentaram atividades da PPO significativamente maiores em relação às folhas inteiras no período em que se iniciou o escurecimento visual nas duas temperaturas de armazenamento. COUTURE et al. (1993), HEIMDAL et al. (1995) e CASTANER et al. (1999) também relatam o envolvimento da PPO no escurecimento de alface minimamente processada.

CARNELOSSI (2000) também verificou pequeno aumento no índice de escurecimento a partir do terceiro dia de armazenamento em couve minimamente processada, armazenada a 5 °C, em todas as embalagens testadas, atribuindo esse comportamento a um possível envolvimento da PPO. Esse fato pode ser devido ao aumento da atividade da PPO, oxidando compostos fenólicos, os quais produzem compostos de coloração marrom, escurecendo os tecidos minimamente processados (COUTURE et al., 1993; HOWARD et al., 1994).

TUDELA et al. (2002) relatam que quanto maior o teor de vitamina C em batatas minimamente processadas, menor é sua suscetibilidade ao escurecimento através da PPO. Os altos teores de vitamina C observados em folhas de couve podem ser o principal fator para essas folhas não apresentarem esses sintomas no início do armazenamento e sim, após os teores de vitamina C caírem quase pela metade aos 6 dias, quando armazenados a 10 °C e aos 9 dias, a 5 °C (Figuras 9A e 9B).

Verifica-se que a temperatura de armazenamento de 5 °C retardou o aumento na atividade da PPO e, conseqüentemente, o início de escurecimento. O processamento mínimo deve ter causado ativação da PPO latente através de proteases, como verificado por ESPÍN et al. (1999) e CANTOS et al. (2001), ou também, pode estar envolvendo síntese 'de novo' da PPO, de acordo com THIPYAPONG et al. (1995).

4. CONCLUSÕES

As principais causas para a perda da qualidade visual das folhas inteiras foram o amarelecimento e a perda da turgescência. Para as folhas minimamente processadas, ocorreu ainda escurecimento.

O processamento mínimo duplicou a perda de massa fresca no armazenamento em relação às folhas inteiras e reduziu significativamente os teores de clorofilas a, b e totais, desde o dia zero até o final do armazenamento.

O teor de vitamina C variou com a temperatura de armazenamento e com o processamento mínimo, ou seja, sua velocidade de perda foi maior nas folhas minimamente processadas e na temperatura de 10 °C em relação a 5 °C.

A temperatura de 5 °C promoveu menor taxa de consumo de açúcares solúveis totais e de amido em relação à de 10 °C.

O processamento mínimo e a temperatura de armazenamento de 10 °C aceleraram o acúmulo de aminoácidos, enquanto a 5 °C, observou-se uma queda maior no teor de proteína.

A atividade da PAL foi estimulada nos primeiros e nos últimos dias de armazenamento, principalmente para as folhas minimamente processadas, armazenadas a 5 °C.

O processamento mínimo também estimulou a atividade da PPO e POD, nas duas temperaturas de armazenamento, principalmente no seu final.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas envolvendo maceração e centrifugação foram mais eficientes na extração dos sólidos solúveis totais em folhas de couve inteiras, fatiadas e minimamente processadas, do que aquelas técnicas envolvendo compressão mecânica.

A perda de água em folhas de couve é afetada pelo número e localizações dos furos nas embalagens, quer seja em folhas inteiras ou minimamente processadas. Embalagens totalmente perfuradas apresentaram maior perda de água e, conseqüentemente, um ressecamento mais rápido do tecido, enquanto a não perfurada promoveu uma rápida condição de odor desagradável.

A embalagem com perfurações localizadas na base promoveu melhor controle quanto à perda de água.

O processamento mínimo promoveu perda significativa de açúcares solúveis totais, de amido e de aminoácidos, em comparação com as folhas intactas, não tendo todavia alterado de forma significativa, os teores de vitamina C e de proteínas.

O processamento mínimo e a temperatura de armazenamento de 10 °C promoveram uma aceleração no acúmulo de aminoácidos, enquanto a 5 °C, observou-se uma queda maior no teor de proteína.

As principais causas para a perda de qualidade visual das folhas inteiras foram o amarelecimento observado pela perda de clorofilas e a perda de turgescência, aceleradas na temperatura de 10 °C.

Nas folhas minimamente processadas, o amarelecimento, o ressecamento, a perda de vitamina C, queda nos teores de açúcares solúveis totais e o de amido e escurecimento, acelerados na temperatura de 10 °C, contribuíram para o início de sua senescência.

O processamento mínimo e as temperaturas de armazenamento contribuíram para um comportamento diferenciado na atividade da PAL, POD e PPO.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W. and SALTVEIT, M. E. **Ethylene in Plant Biology**. 2 ed. Academic Press: San Diego, 414 p., 1992.
- AGAR, I. T., MASSANTINI, R., HESS-PIERCE, B., KADER, A. A. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality maintenance of fresh-cut Kiwifruit slice. **J. Food Sci.**, v. 64, n. 3, p.433-40, 1999.
- AHVENAINEM, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit vegetables. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 7, p. 179-87, 1996.
- AMARANTE, C. V. T. **Relação entre horário de colheita e senescência em folhas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)**. 1991. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFV, Viçosa.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.** v.85, p. 235-241, 1992.
- AVENA-BUTYILLOS, R. J., CISNEROS-ZAVALLOS, L. A., KROCHTA, J. M., SALVEIT, M. E. Optimization of edible coatings on minimally processed carrots using response surface methodology. **Trans. ASAE.**, v. 36, n.3, p. 801-5, 1993.
- BACKER, A. V. Amino acids and nitrogenous compounds. In: Weichmann, J. (Ed), **Postharvest Physiology of Vegetables**. Marcel Dekker, Dublin, pp. 475-480, 1987.
- BARTH, M. M., KERBEL, S. L.; BROUSSARD, S. and SCHIMIDT, S. J. Modified atmosphere packing protects market quality in broccoli spears under ambient temperature storage. **J. Food Sci.**, v. 58, n. 5, p. 1070-1072, 1993.

- BERNARDS, M. A.; ELLIS, B. E. Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. **Plant Physiol.** v. 97, p.1494-1500, 1991.
- BEAULIEU, J. C., OLIVEIRA, F. A. R., FERNANDES, T. D. FONSECA, S. C. BRECHT, J. K. Fresh-cut kale: quality assessment of portuguese storage supplied product for development of a MAP system. **CA´97 Proceedings**, v.5, p 145-51, 1997.
- BOLIN, H., HUXSOLL, C. C. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 2, p. 416-8, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analysis in Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.
- BRECHT, J. K., Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortSci.**, v. 30, n. 1, p. 18-22, 1995.
- BURNETTE, F. S. "Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review". **J. Food Sci.** v. 42, p.1-6, 1977.
- BURTON, W. G. **Post-harvest physiology of food crops**. Longman. London. 1982.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. **J. Agric. Chem.** v. 49, p. 322-330, 2001.
- CARNELOSSI, M. A. G. **Fisiologia pós-colheita de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) minimamente processada**. 2000. 81 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – UFV, Viçosa.
- CARVALHO, V. D. de. **Propriedade Químicas das Brássicas**. Informe Agropecuário, 9: 54-56, 1983.
- CASTANER, M.; GIL, M. I.; RUIZ, M. V.; ARTÉS, F. Browning suscetibility of minimally processed Baby and Romaine lettuces. **Eur. Food Res. Technol.** v. 209, p. 52-56, 1999.

- CHANCHIN, K.; IMAHORI, Y.; UEDA, Y. Factors affecting the postharvest quality of MA packaged broccoli. **Acta Hort.** v. 483, p. 255-264, 1999.
- CHEN, N. M. and PAULL, R. D. Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 639-643, 1986.
- COELHO, A. F. S. **Qualidade de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada.** 2001. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.
- COUTURE, R.; CANTWELL. M. I.; KE, D.; SALTVEIT. M. E. Physiological attributes related to quality attributes and storage life of minimally processed lettuce. **Hortscience** v. 28, p. 723-725, 1993.
- DISCHIE, Z. Color reation of carboidrates. In WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. **Methodos in carbohydrates chemistry.** New York; Academic Prees, v. 1, p. 477-512. 1962
- ESPÍN, J. C., VAN LEEUWEN, J. ; WICHERS, H. J. Kinetic Study of the activation Process of a latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase by Serine Proteases. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, 3509-3517, 1999.
- FAVELL, D. J. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. **Food Chem.**, v. 62, n. 1, p. 59-64, 1998.
- FUJITA, S.; TONO, T.; KAWAHARA. H. Puriication and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). **J. Sci. Food Agric.** v. 55, p. 643-651, 1991.
- GÓMEZ-TENA, M.; PEDREÑO, M. A.; ROS-BARCELÓ, A.; FERRER, M. A. Subcellular localization of a basic peroxidase isoenzyme in crisphead lettuce. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, v.119, p.1276-1278, 1994.
- HAARD, N. F. Upsurge of particulate peroxidase in ripening banana fruit. **Phytochemistry**, v. 12, p. 555-560, 1973.
- HEATON, J. W., MARAGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissue. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 7, p. 8-15, 1996.
- HEIMDAL, H.; LARSEN, L. M.; POLL. L. Characterization of polyfenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues. **J. Agric. Food Chem.** v. 42, p. 1428-1433, 1994.

HITARA, K., CHACHIN, K., IWATA T. Changes in K⁺ leakage, free amino acid contents and phenylpropanoid metabolism in water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) with reference to the occurrence of chilling injury. **J. Jpn. Soc. Hort. Sci.** v. 55, p. 516-523, 1987a. in Japanese with English summary.

HITARA, K., CHACHIN, K., IWATA T. The quality changes of some vegetables used in the tropical and subtropical areas during storage at various temperatures. **Nippon Shokuhim kogyo gakkaiishi** v. 34, p. 566-573, 1987b.

HOWARD, L. R. and GRIFFIN, L. E. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks. **J. Food Sci.** v. 58, n. 5, p. 1065-1068, 1993.

HOWARD, L. R., GRINFFIN, L. E., LEE, Y. Steam treatment of minimally processed carrots sticks to control surface discoloration. **J. Food Science.**, v. 59, n. 2, p. 356-8, 1994.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiol.** v. 62, p. 31-35, 1978.

HYODO, H. and FUJINAMI, H. The effects of 2,5-norbornadiene on the induction of activity of phenylalanine ammonia-lyase in wound mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. **Plant Cell Physiol.** v. 30, p. 857-860, 1989.

KAYS, J. S. **Postharvest Physiology of Perishable Plant Products.** AVI Book, Van Nostrald, New York, p. 335-408, 1991b.

KE, D. and SALTVEIT, M. E. Jr. Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenilalanina ammonia lyase activity in iceberg lettuce. **HortSci.** v. 21 (5): p 1169-1171, 1986.

KE, D. and SALTVEIT, M. E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. **Physiol. Plant,** v. 76, p. 412-418, 1989 a.

KE, D. and SALTVEIT, M. E. developmental control of russet spotting, phenolic enzymes, and IAA oxidasein cultivars of iceberg lettuce. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** v. 114, p. 472-477, 1989 b.

KIM, D. M., SMITH, N. L., LEEY, C. Quality of minimally processed apple slices from selected cultivares. **J. Food Sci.**, v. 58, n. 5, p. 1115-7, 1993.

- KLEIN, B. P. Nutritional consequences of minimal processing of fruits and vegetables. **J. Food Qual.**, v. 10, p. 179-93, 1987.
- LAMIKANRA, O. **Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market**. CRC Press LLC New York Washington, D. C. 2002.
- LEE, S. K. and KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biol. Thechnol**, v. 20, p. 207-220, 2000
- LICHTHENTHALER H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L., DOUCE, R. (Eds.) **Meth. Enzimol.** v. 148, p. 350-382, 1987.
- LOPEZ-GALVEZ, G.; SALTVEIT, M. and CANTWELL, M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase: Factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. **Postharvest Biol. Thechnol.** v. 9, p. 223-233, 1996.
- LOPES, J.F. & SANTOS, R.F.A. Correlação de brix coletado em três pontos distintos em frutos de abóboras (*Cucurbita moschata*). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.8, n.1, p.49,1990. Resumo 106.
- LUENGO, R.F.A.; MAROUELLI, W.A.; FERREIRA, V.R. Avaliação de métodos para extração de sólidos solúveis totais em raízes de cenoura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, suplemento CD-ROM, julho 2001 a.
- LUENGO, R. F. A.; MAROUELLI, W. A.; FERREIRA, V. R. Avaliação de métodos para extração de sólidos solúveis totais em raízes de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento CD-ROM, julho 2001 b.
- MATILE, P. HORTENSTEINER, S., THOMAS, H., KRAUTLER, B. Chlorophyll breakown in senescent leaves. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 1043-9, 1996.
- MAYER, A. M. and HAREL, E. Polyphenol oxidases in palnts. **Phytochemistry**, 18; 193-215. 1979.
- MARTIN, C., and K. V. THIMAN. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formationof proteases. **Plant Physiol.** V. 49, p. 64-71, 1972.

- MARTIN, C., and K. V. THIMAN. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. II. The influence of amino acids on senescence. **Plant Physiol.** V. 50, p. 432-437, 1973.
- MARTINEZ, M. V. and WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Sci. Technol.** v. 6, p. 195-200, 1995.
- McCOLLOCH, L. P. Chilling injury of eggplants fruits. U. S. **Department of Agriculture Marketing Reseach.** Report No. 5, p. 749, 1966.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; QWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables. **Anal. Chem.** v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- MOLISCH, H. Das Erfriern von Pflnzen bei temperaturen uber dem Eispunkt. Sitzungsber. D. Kaiserlichen **Akademie der Wissenschaften zu Wien.** Bd. 105, Abth. I. 1896.
- MOORE S.; STEIN W. H. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, n. 176, p. 367-388, 1948.
- MORETTI, C. L. Processamento mínimo de hortaliças: alternative viável para a redução de perdas pós-colhaeita e agregação de valor ao agronegócio brasileiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v. 17, n. 2, contracapa, 1999.
- MOZAFAR, A., Plant Vitamins: Agronomic, physiological and nutritional aspects. **CRC Press**, Boca Raton, FL. 1994.
- NICOLI, M. C., ANESE, M., SEVERINI, C. Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. **J. Food Qual.**, v. 17, p. 221-9, 1994.
- PATEL, R. Z. A note on the seasonal variations in starch content of different parts of Arabica coffee trees. **East. Afr. Agric. Eor. J.** v. 36, p. 1-4, 1970.
- PENTZER, W. T.; HEINZE, P. H. Postharvest physiology of fruits and vegetables. **Annu. Rev. Plant Physiol.** v. 5, p. 205-224, 1954.
- RITENIOUR, M. A.; SALTVEIT, M. E. Identification of a phenylalanine ammonia-lyase inactivating factor in harvested iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Physiol. Plant.** v. 97, p. 327-331, 1996.

ROBINSON, D. S. Peroxidase and their significance fruit and vegetables. **In Food Enzymology** (Fox P. F. Ed.). v. 1, pp. 399-426, Elsevier Science, London, UK, 1991b.

ROLLE, R., CHISM, G. W. Physiology consequences of minimally processed fruits and vegetables. **J. Food Qual.**, v. 10, p. 157-65, 1987.

SABATER, B. RODRIGUEZ, M. T. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase leaves. **Physiol. Plant.**, v. 43, p. 274-76, 1978.

SALTVEIT, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biol. Technol.** v. 21, p. 61-69, 2000.

SAPERS, G. M., MILLER, R. L., MILLER, F. C., COOKE, P. H., CHOI, S. Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. **J. Food Sci.**, v. 59, p. 1042-47. 1994.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**. v. 49, p. 2233-2243, 1997.

SILVA, E. **Estudos da atividade enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças “in natura” e processadas.** 1981. 108 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SIMONS, L. K., SANGUANSRI, P. Advances in the washing of minimally processed vegetables. **Food Aust.** v. 49, n. 2, p. 75-80, 1997.

TELES, C. S. **Avaliação física química e sensorial de couve (*Brassica oleraceae*, *L. var. acephala*) minimamente processada, armazenada sob atmosfera modificada.** 2001. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**. v. 40, p. 673-676, 1995.

- TULIO, A. Z. Jr., OSE, K., CHACHIN, K., UEDA, Y. Effects of temperatures on Postharvest quality of jute leaves (*Corchorus olitorius* L.). **Postharvest Biology and Technology** v. 26 p. 329-338, 2002.
- TUDELA, J. A., ESPÍN, J. C., GIL, M. I. Vitamin C in fresh-cut potatoes. **Postharvest Biology and Technology** v. 26, p. 75-84, 2002.
- UNDERHILL, S. J. R. & CRITCHLEY, C. Cellular localization of polyphenol oxidase and peroxidase activity in Litchi chinensis Sonn. Pericarp. **Australian Journal of Plant Physiology** v. 22, p. 627-632, 1995.
- YAMAUCHI, N. WATADA, A. E. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 116, n. 1, p. 58-62, 1991.
- YANO, M. & HAYAMI, A. Studies on the improvement of storage ability in the head vegetables. I. The relationship between cultivars, maturity rates and fertilizers and storage ability of lettuce and cabbage. **Bul. Veg. Orn. Crops Res. Sta. Yasai Shikenio. Ser. A.** Hokoku. V. 4, p. 77-88, 1978 a.
- YANO, M. & HAYAMI, A. Studies on the improvement of storage ability in the head vegetables. II. The relationship between the Postharvest physiological characteristics and storage ability of lettuce. **Bul. Veg. Orn. Crops Res. Sta. Yasai Shikenio. Ser. A.** Hokoku. V. 4, p. 89-101, 1978 b.
- VAMOS-VIGYAZO, L. "Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables". **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 15, p. 49-127, 1981.
- VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A. Prontos para o consume. **Revista Frutas & Legumes.** p. 22-28, Ago-Set 2002.
- VOROQUAUX P. GOUBLE, B.; DUCAMP, MARIE-NOELLE; SELF, G. Produce to optimize modified atmosphere packaging for fruit. **Fruits.** 57, pp. 313-322, 2002.
- WANG. C. Y. And KRAMER, G. F. Polyamines reduce chilling injury in McIntosh apples and zucchini squash. **HortScience**, p. 1096, 1990.
- WATADA, A. E., ABE, K., YAMUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Tech.** v. 44, p.116-22, 1990.
- WILLEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables.** London: Chapman & Hall, 357 p. 1994.

ZEPLIN, M., ELVEHJEIN, C. A. Effect of refrigeration on retention of ascorbic acid in vegetables. **Food Res.** v. 9 p. 100 – 111, 1994.