

MILTON EDGAR PEREIRA FLORES

**ALOCAÇÃO DE MATÉRIA FRESCA, ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO E  
PROCESSAMENTO MÍNIMO DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2010

MILTON EDGAR PEREIRA FLORES

**ALOCAÇÃO DE MATÉRIA FRESCA, ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO E  
PROCESSAMENTO MÍNIMO DE ALFACE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de abril 2010

---

Prof. Rolf Puschmann  
Co-Orientador

---

Prof. Derly Jose Henriques da Silva  
Co-Orientador

---

Prof. Mario Puiatti

---

Prof. Franciscleudo Bezerra da Costa

---

Prof. Fernando Luiz Finger  
(Orientador)

A mi amada esposa Evelyn y  
a mis queridos hijos Andres y Pablo

DEDICO!

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade em participar do Programa de Pós-Graduação e ao PEC-PG, CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas.

Ao professor Fernando Luiz Finger, pela orientação, cooperação dedicada, construção do conhecimento e amizade.

Aos professores Rolf Puschmann, Derly J. H. da Silva e Mário Puiatti, pelos ensinamentos, cooperação e amizade.

Aos professores Aluizio Borém e Marco Aurélio Pedrón e Silva pelas extraordinárias aulas, os ensinamentos e amizade.

Aos professores Franciscleudo Bezerra e Adriano Simões, pela amizade.

Ao meu grande amigo o Prof. Nelson L.C. de Oliveira e sua família, pelo convívio e amizade ao longo do Mestrado e Doutorado.

Aos amigos e parceiros de pesquisa do programa de Fitotecnia, Fabrício Coelho, Marcelo Cleón e Hilton Galvão, e outros colegas dos Departamentos de Fitotecnia e Fisiologia Vegetal.

Aos colegas do Laboratório de Pós-colheita, particularmente a Daniela e Juliane, e aos funcionários José Geraldo Julio e Sebastião Gomes! Muito obrigado por tudo!

Aos funcionários da “Horta Velha” Wilson, Zé Nilson, Marcos, Zé Maria, Carlos, Toninho, Raimundo, Liacir e outros, pela dedicada cooperação e amizade recebida no desenvolver da pesquisa. !Tudo está ótimo!

Ao Antônio e Gracinha Mendez, donos do “sitio Paraíso” pela cooperação na produção do material de estudo e amizade.

A todas as pessoas que participaram no decorrer desta pesquisa.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen María de Urkupiña, por las bendiciones recibidas.

A Evelyn Rosse Mary, Milton Andres y Pablo Ignacio, por el infatigable apoyo, amor y paciencia estos años lejos de casa y de nuestros seres queridos. Muchas gracias y mil disculpas.

A mis amados padres Walter y Victoria<sup>†</sup>, por la vida, amor, ejemplo, apoyo y valores inculcados que me guían.

A mis amados hermanos Walter, Fernando, Miriam, Roxana, Eliana y mis cuñados Hortencia y Daniel, por el apoyo, amor y respaldo.

A mis queridos sobrinos(as) Patricia, Nadine, Beatriz, Walter, Ximena, Vania, Vladimir, Sergio, Pablo, Alejandro, Carol, Isabella, cuyas existencias me renuevan día a día.

A María Zerdas, mi querida suegra, por la luz que insufla en el seno de mi familia, el amor a mis hijos y apoyo permanente.

A mi familia de corazón Felix<sup>†</sup>, Jorge Zerdas, José Morgana, Nelson, Patricia, Ruth, Valentina, Paola y Carla, por el aliento y cariño.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. CAPÍTULO 1 .....	5
DESCARTE FOLIAR E DISTRIBUIÇÃO DE MATÉRIA FRESCA EM CABEÇAS DE ALFACE ( <i>Lactuca sativa</i> L.), VISANDO O PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FOLHAS INTEIRAS, FATIAS E CORAÇÕES .....	5
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
Material biológico e condições de cultivo .....	8
Número de folhas por cabeça. F.....	11
Matéria fresca processável e alocação .....	11
Alocação da matéria fresca foliar entre posições da cabeça .....	11
Número de folhas e área foliar específica de corações .....	12
Alocação relativa da matéria fresca de corações.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
Número total de folhas.....	12
Descarte foliar.....	12
Matéria fresca processável.....	15
Distribuição de matéria fresca foliar na cabeça .....	17
Número de folhas e área foliar específica de corações .....	19
Alocação relativa da matéria fresca de corações.....	19

CONCLUSÕES.....	22
3. CAPÍTULO 2 .....	24
ESCURECIMENTO, PADRÃO DE ISOENZIMAS E ATIVIDADE DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM NERVURAS DE ALFACE ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	24
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Material vegetal e condições de crescimento.....	27
Tratamentos .....	27
Extração das enzimas e eletroforese .....	28
Reação enzimática no gel.....	28
Análise de zimogramas .....	29
Extração e ensaio enzimático da POD e PPO .....	29
Escurecimento de nervuras .....	30
Análise estatística.....	30
RESULTADOS E DISCUSÃO.....	30
Padrão de isoenzimas.....	30
Atividade específica de enzimas .....	37
Escurecimento de nervuras .....	39
CONCLUSÕES.....	40
4. CAPÍTULO 3 .....	42
EFEITO DO ACIDO ASCÓRBICO NO ESCURECIMENTO E QUALIDADE VISUAL DE ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA .....	42
RESUMO .....	42
ABSTRACT .....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Material biológico e regiões foliares avaliadas.....	45
Produtos minimamente processados .....	45
Tratamento com ácido ascórbico .....	45
Embalagem e conservação .....	45
Escurecimento de nervuras .....	45
Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em nervuras.....	46
Qualidade visual de folhas inteiras .....	47
Qualidade visual de corações.....	47
Escurecimento do caule de corações.....	47

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
Escurecimento de nervuras .....	48
Atividade da polifenoloxidase e peroxidase .....	51
Qualidade visual de folhas inteiras .....	53
Qualidade visual dos corações .....	57
Escurecimento da base do caule em corações.....	58
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXOS.....	71

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 .....		05
Figura 1.	Aspecto das cabeças de alface Aurélia, Vitória e Crespa .....	09
Figura 2.	Operações de colheita e manuseio pós-colheita de alface .....	09
Figura 3.	Fluxograma de operações e características avaliadas na colheita, manuseio pós-colheita e preparo da materia prima na indústria .....	10
Figura 4.	Componentes da matéria prima processável da cabeça e corações .....	10
Figura 5.	Número de folhas/cabeça na colheita das cvs. Aurélia, Vitória e Crespa .....	13
Figura 6.	Descarte absoluto e relativo de folhas na colheita, pós-colheita e total .....	13
Figura 7.	Alocação absoluta e relativa da materia fresca nos componentes folhas, caule e coração .....	15
Figura 8.	Matéria fresca de folhas individuais da cabeça de alface por posição e matéria fresca foliar acumulada .....	18
Figura 9.	Aparência de corações desmontados e inteiros de alface cvs. Aurélia, Vitória e Crespa .....	20
Figura 10.	Fluxograma de operações convencional e proposto da colheita, manuseio pós-colheita e destinação da matéria fresca dos componentes folhas, caule e corações de alface .....	23
CAPÍTULO 2 .....		24
Figura 1.	Padrão de isoenzimas da polifenoloxidase e peroxidase em nervuras de alface cv. Grandes Lagos .....	31
Figura 2.	Padrão de isoenzimas da peroxidase de nervuras de folhas de diferentes posições da cabeça de alface cvs. Aurélia, Vitória e Crespa .....	31
Figura 3.	Razão do nível Quântico (QLR) de isoenzimas da peroxidase de três cultivares de alface .....	33
Figura 4.	Padrão de isoenzimas da polifenoloxidase de nervuras de folhas de diferentes posições da cabeça de alface das cvs. Aurélia, Crespa e Vitória.....	34
Figura 5.	Razão do nível Quântico (QLR) de isoenzimas da polifenoloxidase de três cultivares de alface .....	35
Figura 6.	Atividade específica da Peroxidase e polifenoloxidase em nervuras de diferente posição foliar na cabeça das cvs. Vitória, Aurélia e Crespa .....	37
Figura 7.	Aparência de nervuras e escores de escurecimento de nervuras de três posições foliares da cabeça de alface cv. Vitória .....	39
CAPÍTULO 3 .....		42
Figura 1.	Escala para avaliação do escurecimento da superfície abaxial de nervuras e da superfície cortada da base de nervuras da região média e interna.....	48

Figura 2.	Escurecimento de nervuras de alface Vitória das regiões externa, média e interna da cabeça de alface, tratadas com ácido L-ascórbico.....	45
Figura 3.	Atividade da polifenoloxidase e peroxidase de tecido escurecido e não escurecido de nervuras de alface Vitória.....	52
Figura 4.	Qualidade visual (QV) de folhas da região externa, média e interna, tratadas com ácido L-ascórbico e expressas em porcentagem de folhas com boa qualidade por embalagem.....	54
Figura 5.	Aparência visual de folhas minimamente processada com qualidade visual, e defeituosas por descoloramento, necrosamento e apodrecimento.....	55
Figura 6.	Qualidade visual de corações tratados com ácido L-ascórbico.....	57
Figura 7.	Aparência visual do coração inteiro e das folhas do coração tratados com ácido L-ascórbico.....	58
Figura 8.	Valores do Hunter (a) L, a, b, e ângulo Hue (b) da base dos caules dos corações, tratados com ácido L-ascórbico.....	59

**LISTA DE TABELAS**

CAPÍTULO 1 .....	05
Tabela 1. Correlação r de Pearson para número de folhas e descarte foliar na colheita e pós-colheita em alface cvs. Aurélia, Vitória e Crespa.....	14
Tabela 2. Correlação r de Pearson para características relacionadas com a alocação da matéria fresca de cabeças de alface das cvs. Aurélia, Vitória e Crespa.....	16
Tabela 3. Número de folhas, área foliar específica e alocação relativa de matéria fresca de corações de alface cvs. Aurélia, Vitória e Crespa .....	20
CAPÍTULO 3 .....	42
Tabela 1. Escurecimento da superfície abaxial de nervuras de alface Vitória, tratados com ácido L-ascórbico.....	49
Tabela 2. Escurecimento do corte basal de nervuras de alface Vitória, tratados com ácido L-ascórbico.....	49

## RESUMO

PEREIRA FLORES, Milton Edgar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2010.  
**Alocação de matéria fresca, escurecimento enzimático e processamento mínimo de alface.** Orientador: Fernando Luiz Finger. Co-orientadores: Rolf Puschmann; Derly Jose H. da Silva e Paulo Roberto Cecon.

Os objetivos desta pesquisa foram: caracterizar a alocação da matéria fresca da cabeça de alface nos seus componentes, o padrão de isoenzimas e as atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), e o efeito do ácido ascórbico (AA) no escurecimento de alface minimamente processada. As características foram estudadas em folhas e nervuras das posições foliares externa, média e interna da cabeça e em corações de alface das cultivares Aurélia, Vitória e Crespa. Houve diferença significativa entre as posições foliares para as características avaliadas dentro a cultivar e entre cultivares de alface. As cv. Aurélia e Vitória tiveram favorável padrão de distribuição da matéria fresca foliar e número de folhas para a produção de folhas inteiras, folhas fatiadas e corações a partir da mesma cabeça de alface. Os padrões de isoenzimas da PPO e POD de nervuras de folhas revelaram a existência de variabilidade em número e intensidade de bandas entre diferentes posições foliares da cabeça de alface. Foram encontradas uma ou duas isoenzimas da PPO (PPO-1 e PPO2) e duas ou quatro isoenzimas da POD, sendo duas catiônicas (POD-C1 e POD-C2) e duas aniônicas (POD-A1 e POD-A2), dependendo da cultivar. A variabilidade nos padrões isoenzimáticos da PPO e POD entre as posições foliares foi atribuída à ausência ou presença das isoenzimas PPO-1 e POD-A1. Essas isoenzimas não foram presentes nas nervuras de folhas internas e sem em nervuras de folhas intermediárias, embora com menor intensidade que nas nervuras das folhas externas da cabeça de alface. A ausência ou presença das isoenzimas PPO-1 e POD-A1 foram associadas com o menor ou maior escurecimento das nervuras, respectivamente. Nervuras de folhas externas escureceram mais que as intermediárias, e as intermediárias mais que as internas que não apresentam as isoenzimas PPO-1 e POD-A1. Entretanto, a intensidade do escurecimento nas

nervuras pode estar influenciada não apenas pela presença das isoenzimas PPO-1 e POD-A1 quanto pela interação com as outras isoenzimas da PPO e POD. O escurecimento não teve relação com a atividade específica da PPO e POD. As atividades destas enzimas apresentaram diferentes comportamentos em cada cultivar e entre as posições foliares da cabeça de alface. O tratamento por imersão de um minuto em soluções contendo 10 a 30 mM de AA de nervuras dissecadas de folhas e folhas inteiras da região média e interna, e corações minimamente processadas resultou em diferenças significativas influenciadas pela idade do tecido. O tratamento com 20 e 30 mM de AA promoveu maior escurecimento de nervuras das folhas médias e internas, e menor qualidade visual das folhas externas e médias minimamente processadas. Contrariamente, essas concentrações diminuíram o escurecimento da superfície cortada do caule e o número de folhas sem qualidade visual dos corações. Implica-se que o AA favoreceu a atividade da POD em relação à atividade da PPO, por ter inibido em maior grau a PPO, ou, induzido maior deterioração por vias não determinadas por esta pesquisa. A aparência visual de folhas da região interna não foi influenciada significativamente pelo tratamento com AA, evidenciando a influência da idade do tecido na resposta ao ácido. Conclui-se a existência de diferenças físicas, fisiológicas e bioquímicas de folhas de posições diferentes na cabeça de alface com implicações no escurecimento enzimático e a qualidade visual pós-colheita o que sugere a incorporação de mudanças nos protocolos de processamento mínimo para melhor aproveitamento da matéria prima e qualidade pós-colheita da alface minimamente processada.

## ABSTRACT

PEREIRA-FLORES, Milton Edgar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2010.  
**Allocation of fresh matter, enzymatic browning and lettuce minimally processed.**  
Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-advisers: Rolf Puschmann; Derly Jose H. da Silva and Paulo Roberto Cecon.

The objectives of this research were to characterize the allocation of the accumulated fresh mass, the isoenzymes pattern, the activity of the peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO), and the effect of the ascorbic acid (AA) on the lettuce browning of minimally processed lettuce. The characteristics were studied located in leaves and mid-ribs of the outer, middle and inner foliar positions throughout of the head and in lettuce hearts of the Aurélia, Vitória and Crespa cultivars. Regardless the cultivar, there was significant difference among the leaf positions or regions of the rosette for the evaluated characteristics. Among cultivars, Aurélia and Vitória cultivars had number of leaves and pattern of distribution of the leaf fresh mass favorable for the production of whole leaves and hearts minimally processed, simultaneously. The pattern of the PPO and POD isoenzymes from mid-ribs of different leaf positions revealed the variability existence in relation to the number and intensity of bands with the development stage. The isoenzymes pattern can be composed by one or two isoenzymes of PPO (PPO-1, PPO2) and two or four isoenzymes of POD, being two cationic (POD-C1, POD-C2) and two anionic (POD-A1, POD-A2) isoenzymes, depending on the cultivar. The variability of isoenzymes number was attributed to the absence or presence of the PPO-1 and POD-A1 isoenzymes, absent in the internal leaves, and present with larger intensity in external mid-ribs in relationship with the middles leaves. The absence of the PPO-1 and POD-A1 isoenzymes, in the internal leaves mid-ribs were associated to the smallest browning of those mid-ribs in relationship of the external and intermediate leaves mid-rib. The largest browning of the mid-ribs from external and intermediate leaves was associated with the presence of all of the isoenzymes of PPO and POD, independently of the magnitude of the specific activity of those

enzymes, among the leaf positions. The treatment with immersion for one minute in solutions containing 10 to 30 mM of AA of dissected mid-ribs and leaves minimally processed from external, middle and internal region of rosette, and lettuce leaves hearts had different results depending on the leaf tissue age. The treatment with AA was favorable to reduce the degree of the browning of the cut stem surface from lettuce hearts, and it favored the maintenance of the visual quality of the heart leaves. Contrarily, the treatment with AA promoted larger browning of mid-ribs of the medium and internal leaves, and to loss of visual quality of the external and medium leaves, minimally processed. It suggests that AA treatment favored the POD activity in relation to the PPO activity, for having inhibited in a larger degree PPO or induced larger deterioration by ways not determined in this research. The visual quality of leaves of the inner region of the rosette was not influenced significantly by AA treatment, evidencing the influence of the leaf age of the response to the acid. It was verified the existence of significant physiologic differences among the leaves of different regions from lettuce rosette, with implications in the susceptibility to browning and visual quality, which justify the existence of a specific classification to optimize the use of the raw matter in the minimum processing.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça de folha mais produzida e exportada no mundo (USDA/FAS, 2004; Gutiérrez & Bruna, 2008; USDA/ERS, 2008), e provavelmente, devido à diversidade de formatos, tamanhos, cores e texturas da cabeça e folhas, as preferências por determinado grupo de alface são variadas por país ou continente. Similarmente, os grupos de alface têm sido classificados em função das particularidades de cada mercado, não existindo uma classificação unificada para alface.

No Brasil a classificação da alface considera os grupos: a) Lisa, b) Romana, c) Crespa, d) Mimosa e, e) Americana, e os subgrupos Verde e Roxa (<http://www.hortibrasil.org.br>). Já nos EUA, os grupos estão constituídos pelos tipos: a) Crisphead ou Iceberg (*Lactuca sativa* L., var *capitata*); b) butterhead, bib ou Boston (*L. sativa*, var *capitata*); c) Cos ou Romana (*L. sativa*, var *longifolia*) e; d) “Leaf”, de folha crespa (*L. sativa*, var *crispa*) e lisa (Saltveit, 2006).

As classificações têm se baseado nas diferenças de formato e compactação da cabeça, e do formato e cor das folhas. Assim, as denominações Lisa, Crespa, Mimosa e “Leaf” das classificações brasileira e americana correspondem a cultivares que não produzem cabeças compactas e mantêm o formato de roseta até a fase madura. Já as denominações Americana, Crisphead e Iceberg correspondem às alfaces que formam grandes cabeças compactas a partir do enrolamento das folhas médias e internas. Romana e Cos são tipos intermediários às anteriores denominações, e produzem rosetas com folhas fechadas da região interna da cabeça, possibilitando a produção de corações de alface ou “heart lettuce”.

Nos EUA e Espanha ao redor de 80% das vendas de alface são dos tipos Americana e Romana (Cook, 2007; Gutierrez & Bruna, 2008). Contrariamente, no mercado Brasileiro os tipos Crespa e Lisa constituem 90% das vendas de alface “*in natura*”, e o tipo Iceberg somente o 10% (Sala & Costa, 2005). Entretanto, nos EUA essa predominância de cultivares do tipo Iceberg tem estado diminuindo continuamente nas últimas décadas e aumentando o consumo de cultivares do tipo “Leaf” e Romana (USDA/ERS, 2008). Assim, no período 2006 e 2007,

registraram-se quedas de 10,7% nas vendas de alface do tipo Iceberg e aumentos de 13,6% nas vendas de “corações” de Romana (Cook, 2007).

A tecnologia de industrialização da alface “*in natura*” e a pesquisa nesta área têm utilizado tradicionalmente cultivares do tipo Iceberg e menos do tipo “Leaf” provavelmente, entre outras razões, à demanda do consumidor, da comida “fast food” e da indústria por alfaces de cabeça compacta de fácil corte mecânico e manipulação.

Alfaces do tipo “Leaf” são de difícil corte mecânico pela fragilidade e heterogeneidade física das folhas da cabeça. No processamento mínimo desse tipo de alfaces as folhas são fatiadas a mão, com desvantagens no custo/benefício em relação ao corte mecânico de alfaces do tipo Iceberg, ou mantidas inteiras e classificadas por tamanho e cor similares, ao invés de fatiá-las ou rasgá-las. O fatiamento das folhas resulta em um produto de aspecto “homogêneo” devido ao padrão do corte aplicado. Desta maneira a heterogeneidade natural das folhas da cabeça não é relevante e o balanço de massas se baseia simplesmente no peso da matéria fresca antes e depois do processamento. Entretanto, na produção de folhas inteiras minimamente processadas (FIMP) somente o conhecimento do peso da matéria fresca a ser processada é informação insuficiente para determinar as unidades comerciais prováveis de serem produzidas com características físico-fisiológicas similares.

A heterogeneidade foliar na cabeça de cultivares do tipo “Leaf” pode estar afetando a distribuição da matéria fresca no conjunto de folhas e esta característica, entre outras, pode influenciar a conformação de unidades comerciais padronizadas. Todavia, nessa variabilidade foliar terá de ser analisada a relevância de características físico-fisiológicas a serem utilizadas como critérios de seleção de cultivares apropriados para o processamento mínimo.

Por outro lado, o escurecimento enzimático e a conseqüente deterioração da qualidade visual pós-colheita da alface processadas são desafios constantes da indústria. Nesta área existem evidências sobre o envolvimento das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) no escurecimento enzimático pós-corte de alface (Hyodo *et al.*, 1978; Ke and Saltveit, 1989b; Couture *et al.*, 1993). Entretanto, as correlações entre as atividades da PPO e POD, o conteúdo de compostos fenólicos e o escurecimento têm sido discrepantes em alface (Ke e Saltveit, 1989a; Ke e Saltveit, 1989b; Cantos *et al.*, 2001; Hisaminato *et al.*, 2001; Fukumoto *et al.*, 2002; Degl’Innocenti *et al.*, 2007, Castañer *et al.*, 2009). É provável que essa divergência possa ter relação com o fato das pesquisas previas utilizarem cultivares diferentes, camadas foliares específicas da cabeça, mistura de folhas, e mesmo cabeças sem controle da idade, quando compradas em supermercados.

O controle do escurecimento enzimático na alface minimamente processada tem utilizado o choque térmico (Saltveit, 2000; Murata *et al.*, 2004; Martin-Diana *et al.*, 2005), a complexação dos ativadores metálicos das enzimas (Gawlick-Dziki *et al.*, 2008), a redução de *o*-quinonas a difenois (Barry-ryan & O'breirne, 1999), imersões em soluções com pH sub-ótimos aos requeridos para a atividade catalítica das enzimas (Artés & Martínez, 1996; Castañer *et al.*, 1996), e o uso de atmosfera modificada ou controlada (Artés & Martínez, 1996; Mattos *et al.*, 2003), além da utilização de temperaturas entre 1 a 5°C, durante a conservação. Porém, os resultados variaram em função da cultivar, intensidade e qualidade do fatiamento, e a presença de etileno, entre outros fatores (Barry-Ryan & O'Beirne, 1999; Pereyra *et al.*, 2005; Mattos *et al.*, 2007; 2008).

A PPO e a POD são enzimas codificadas por famílias multigênicas, com múltiplas isoformas de variabilidade estádio e tecido-específico, desde a germinação até a senescência (Scandalios, 1974; Amiot *et al.*, 1995; Thyngensen *et al.*, 1995; Thipyapong *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 2002). Essas formas alternativas podem apresentar diferenças nos parâmetros cinéticos e atividade catalítica, influenciado pela especificidade e conteúdo de substratos fenólicos, formas latentes e ativas da enzima e sensibilidade a inibidores (Martinez & Whitaker, 1995; Veitch, 2004; Sinha, 2004); ou, devido à expressão diferencial dos genes em estádios específicos ao longo do desenvolvimento da planta, influenciando na atividade específica da PPO e POD (García & Barrett, 2002).

Fukumoto *et al.*, (2002) têm evidenciado a influência da idade do tecido de alface ao escurecimento enzimático, independente do nível de atividade da PPO e POD encontradas em cada tipo de tecido. Foi também constatada significativa influência da idade foliar nas taxas respiratórias e de fotossíntese (Henriques & Park, 1976), relações hídricas (Agüero *et al.* 2007), hidrofobicidade da superfície foliar (Arnez-Zerdas, 2009) e o crescimento de bactérias patogênicas (Brandl & Amundson, 2008). No entanto sem ter sido, os estudos, focalizados **para** o processamento mínimo de alface.

É provável que a existência de significativa variabilidade fisiológica estádio-específico entre as folhas da cabeça esteja relacionada com a susceptibilidade ao escurecimento e ao deterioro, e que devidamente caracterizada possa orientar no controle do escurecimento e na utilização classificada da matéria prima visando melhorar a qualidade e vida útil da alface minimamente processada.

Maior conhecimento deve ser gerado acerca da influência da idade foliar sobre características físicas e fisiológicas das folhas de alfaces submetidas ao processamento mínimo. No caso das alfaces do tipo "Leaf", esse maior conhecimento pode contribuir a aumentar a

parcela deste tipo de alface entre os minimamente processados em mercados onde existe preferência “*in natura*” por este tipo de alface.

Nesse sentido, o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar as diferenças físicas, fisiológicas e bioquímicas, com base em características como o padrão de distribuição e utilização da matéria fresca foliar, padrão de isoenzimas e atividades da PPO e POD, e o escurecimento enzimático em folhas de três regiões da cabeça de alface, visando o processamento mínimo de alfaces do tipo “Leaf”.

## 2. CAPÍTULO 1

### **DESCARTE FOLIAR E DISTRIBUIÇÃO DE MATÉRIA FRESCA EM CABEÇAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.), VISANDO O PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FOLHAS INTEIRAS, FATIAS E CORAÇÕES**

#### **RESUMO**

Alfaces das cultivares Aurélia, Vitória de Santo Antão e Crespa Cinderela foram caracterizadas com relação à produção e alocação da matéria fresca, visando obter folhas inteiras, fatias e corações minimamente processados (MP), a partir de uma mesma cabeça de alface. Avaliaram-se o descarte foliar na colheita e pós-colheita, a distribuição da matéria fresca da cabeça em folhas, corações e caule, o número de folhas e distribuição da matéria fresca foliar de corações, e a correlação entre as características. O descarte de folhas na colheita foi maior que na pós-colheita, constatando-se a maior influência da cultivar no descarte foliar versus o manuseio. Entretanto, a magnitude do descarte foi atenuada pelo elevado número de folhas da cabeça na colheita. O padrão de distribuição de matéria fresca foliar foi diferente entre as cultivares, sendo esta característica determinante para a seleção de cultivares com possibilidades de produzir folhas inteiras, fatiadas e corações minimamente processados, a partir de uma mesma cabeça de alface. Corações com maior peso e aparência atrativa foram obtidos de cultivares com elevado número de folhas e área foliar específica. O número de folhas teve correlação positiva com matéria fresca total, matéria fresca de folhas e caule, e matéria fresca de corações, e correlacionou negativamente com o índice de alocação de caule e índice de perda foliar, revelando-se junto ao padrão de distribuição da massa fresca foliar, como características de fácil avaliação e utilização para a seleção de cultivares, visando obter vários produtos a partir de uma mesma cabeça. Entre as cultivares avaliadas, Aurélia e Vitória tiveram número de folhas por cabeça e distribuição da matéria fresca foliar que se adaptam para a obtenção de folhas inteiras, fatiadas e corações MP, simultaneamente.

**Palavras-chave.** Alface, alocação de matéria fresca, folhas de alface inteiras e fatiadas, corações de alface, processamento mínimo.

## ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars Aurélia, Vitória de Santo Antão and Crespa Cinderela, were characterized regarding the leaf loss and the pattern of distribution of the processing fresh mass, seeking the production of whole leaves and hearts fresh cut. It was evaluated the leaf loss and leaf loss index at the harvest and postharvest handling, the distribution and fresh mass partition index of the rosette in leaves, hearts and stem, the distribution pattern and accumulation of the fresh leaves mass, the number of leaves and the specific leaf area (SLA) of hearts and the correlation among the characteristics. The results evidenced that the high number of leaves of the rosette lessens the leaf loss index same that the number of lost leaves is significant. The leaf loss at the harvest, inherent to the interaction genotype x environmental, had significantly influences in the leaf loss that the postharvest handling. Among the lettuce cultivars, Aurelia had fresh leaf matter distribution more homogeneous in a larger strip of leaf positions trough the rosette, which can favor the production of whole leaves and hearts fresh cut in relationship of Vitória and Crespa cultivars. Higher number of leaves and SLA also favor the obtaining of more attractive hearts. The number of leaves had positive correlation with fresh mass total, leaf and stem fresh mass, and hearts fresh mass, and negative correlation with stem partition index and leaf loss index. Rosettes of leaf lettuce with larger number of leaves and with homogeneous distribution pattern of leaf fresh mass, in the first half of leaves, of out to inside of the rosette, it'll be ideals for the production of whole leaves and hearts fresh cut.

**key-words.** Lettuce, fresh mass distribution, whole leaves, hearts, fresh cut.

## INTRODUÇÃO

A associação internacional de produtos frescos cortados – IFPA define os produtos minimamente processados como qualquer fruta ou hortaliça que tem sido fisicamente alterada da sua forma original, mas que se mantém no estado fresco até o consumo (IFPA & PMA, 1999). A forma original da alface é a “cabeça” constituída pelo conjunto de folhas aderidas ao caule. Desta forma, folhas inteiras apenas destacadas do caule; folhas fatiadas ou rasgadas em troços, e corações separados da cabeça de alface cumprem a definição da IFPA, e podem ser denominados de minimamente processados.

A alface minimamente processada (AMP) tem sido convencionalmente fatiada ou rasgada em pedaços, a partir de alfices de cabeça compacta dos tipos Iceberg e Romana, apesar da existência de países como Brasil, onde 90% a demanda de alface “in natura” corresponde a cultivares dos grupos Lisa, Crespa e Mimosa e apenas 10% ao grupo Americano (Sala & Costa,

2005), contrariamente à predominância dos tipos Iceberg nos mercados americano e europeu (Cook, 2007; Gutierrez & Bruna, 2008, USDA/ERS, 2008).

Os grupos Lisa, Crespa e Mimosa do sistema brasileiro de classificação de alface são equivalentes à denominação “Leaf” ou “Folha” do sistema de classificação americano. Estas alfaces mantêm o formato de roseta até a fase madura, contrariamente aos do grupo Americano, Iceberg e Crisphead, que produzem cabeças compactas a partir do enrolamento das folhas médias e internas da cabeça. O grupo Romano sé intermediário às anteriores denominações, e produzem cabeças com folhas fechadas da região interna da cabeça, possibilitando a produção de corações de alface ou “heart lettuce”.

A industrialização da alface tem privilegiado cultivares do tipo Iceberg por serem de fácil corte mecânico e manipulação na indústria em relação aos do tipo “Leaf”, entre outras razões. A cabeça aberta do tipo “Leaf” possui folhas frágeis ao corte e, heterogêneos tamanhos e cor entre as camadas de folhas. Convencionalmente, nesse tipo de alface as folhas são cortadas e fatiadas a mão, com desvantagens no custo/benefício em relação ao mecânico. Alternativamente, as cultivares do tipo “Leaf” se adaptam melhor para a produção de folhas inteiras minimamente processadas (FIMP). Nesse processo as folhas da cabeça são separadas do caule por corte, logo sanitizadas, enxaguadas, secadas e embaladas por tamanho e cor similares, ao invés de cortá-las, fatiá-las ou rasgá-las.

No processamento de alface o fatiamento mecânico das folhas resulta em um produto de aspecto “homogêneo” devido ao padrão do corte aplicado. Desta maneira a heterogeneidade natural da cabeça de alface como matéria prima não tem sido relevante, e o balanço de massa foi baseado simplesmente no peso da matéria fresca antes e depois do processamento. Entretanto, na produção de FIMP somente o conhecimento do peso da matéria fresca a ser processada não é suficiente informação para determinar as unidades comerciais prováveis de serem produzidas ou o balanço de massa, pois há uma influência da heterogeneidade foliar. Todavia, em alguns cultivares do tipo “Leaf” é provável a produção de corações de alface, similares aos “cogollos de Tudela” (<http://www.dole.com>), aproveitando as folhas mais internas em torno da porção superior do caule. Isto pode agregar valor a essa matéria fresca marginal, que no processamento de alface fatiada, é usualmente descartada.

Responder às perguntas Qual é o rendimento industrial? Quais características das cultivares permitem à produção simultânea de folhas inteiras, fatiadas e corações? São questionamentos de complexa resposta em relação ao simples conhecimento do peso total da matéria fresca processável, requerido para a produção de alface fatiada MP.

Existem evidências da susceptibilidade ao escurecimento pós-processamento (Fukumoto *et al.*, 2002) e da atividade da PPO e POD (Martin-Diana *et al.*, 2005) com a heterogeneidade estágio-específico das folhas da cabeça de alface. Por outro lado, Mattos *et al.*, (2007; 2008) encontraram melhor qualidade, conservabilidade e menor escurecimento em folhas inteiras MP da cv. Verônica em relação a fatias foliares de 1,5 e 5,0 mm, constatando o favorecimento da vida útil pós-processamento com a menor intensidade de corte sofrido pela folha.

A influência da idade foliar nas propriedades físico-fisiológicas das folhas e na adesão bacteriana foi também constatada em estudos sem ser necessariamente focalizados ao processamento mínimo. Relataram-se, entre folhas de idades ou posições foliares diferentes, variações significativas nas taxas respiratórias e de fotossíntese (Henriques & Park, 1976), na perda de umidade e deterioração (Agouro *et al.* 2007), na hidrofobicidade foliar e adesão bacteriana (Arnez-Zerdas, 2009) e na sobrevivência de bactérias patogênicas (Brandl & Amundson, 2008).

As alterações fisiológicas supracitadas mostram a relevância de considerar a idade foliar no processamento mínimo e a necessidade de compreender melhor essa variabilidade e sua implicância no processamento mínimo. Todavia, essa variabilidade foliar deverá ser caracterizada e traduzida em parâmetros de fácil determinação para sua utilização na seleção de cultivares do tipo “Leaf”, mais apropriados ao processamento mínimo.

Nesse sentido o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar cultivares de alface do tipo “Leaf” com relação ao descarte foliar e a alocação da matéria fresca visando à identificação de características da cabeça que permita orientar sobre a melhor utilização das qualidades físicas e fisiológicas das folhas perante a heterogeneidade foliar da cabeça.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material biológico e condições de cultivo.** Utilizou-se alface das cultivares Aurélia, Vitória de Santo Antão e Crespa Cinderela do tipo “Leaf” (Figura 1). Essas cultivares foram produzidas em sistema protegido do tipo “guarda chuva”, com espaçamento de 0,30 x 0,25 cm entre plantas, em solo franco argilo-arenoso com saturação de bases  $V=74\%$ ,  $pH = 6,5$  (relação solo : água = 1 : 2,5),  $Ca^{2+}/Mg^{2+} = 2 : 1$  e CTC 10,6. A adubação foi aplicada na relação 1 : 2,2 : 2 de N-P-K para produção de  $20 t\cdot ha^{-1}$  e parcelada conforme Fontes (1999), e sem adição de micronutrientes. A irrigação realizada por micro aspersão foi aplicada duas vezes por dia, sob monitoramento com tensiômetros a 15 cm de profundidade do solo.



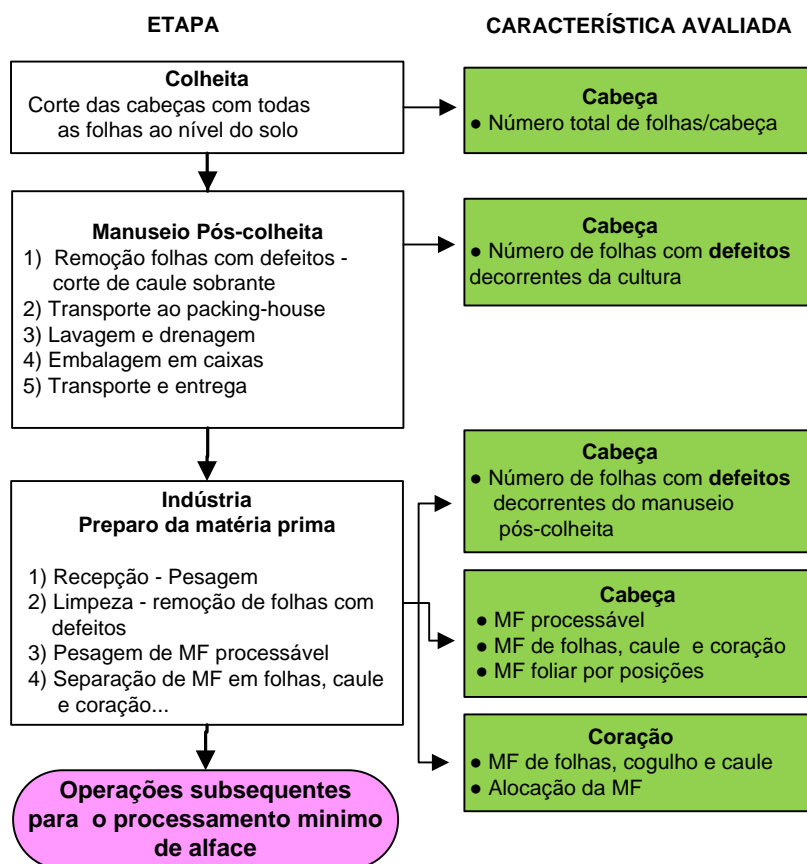
**Figura 1.** Aspecto das cabeças de alface cvs. Aurélia (A), Vitória (B) e Crespa (C).

**Operações entre a colheita e indústria.** A **colheita** das alfaces foi realizada, aos 35 dias após o transplante, por corte das cabeças ao nível do solo com todas as folhas (Figura 2), e na seqüência foram submetidas às operações pós-colheita habitualmente efetuadas pelos produtores de alface da região de Viçosa-MG, para a entrega aos refeitórios e indústria. No caso do presente experimento o transporte foi realizado até a Unidade de Processamento Mínimo do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. No fluxograma da figura 3 se descrevem as operações efetuadas entre a colheita e o preparo da matéria prima, e as características avaliadas.

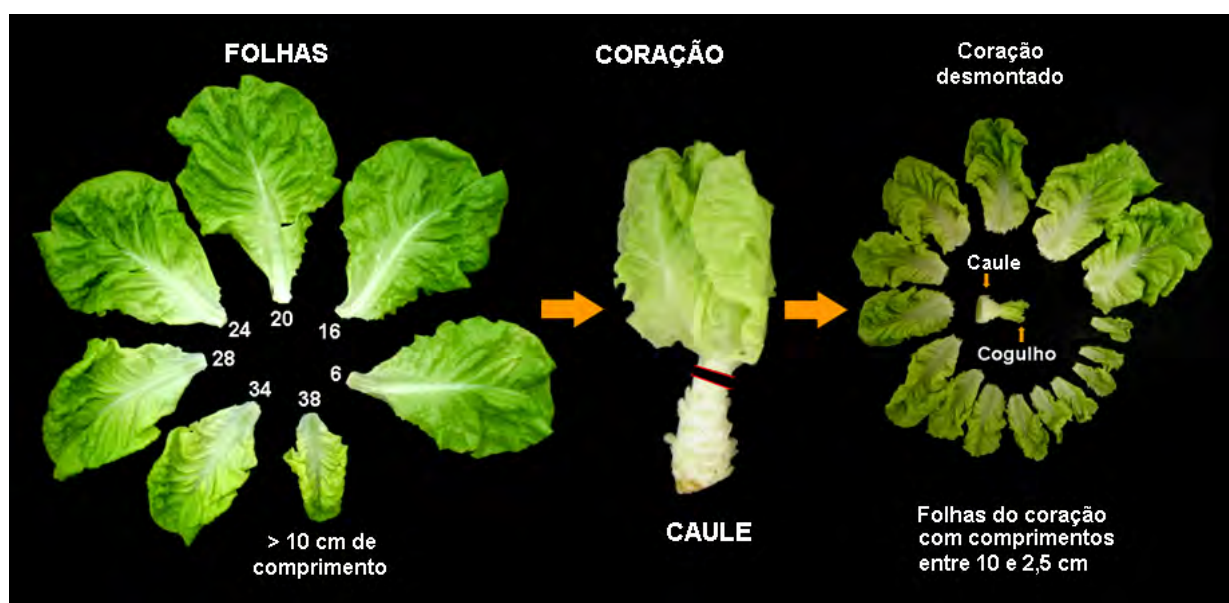


**Figura 2.** Operações de colheita e manuseio pós-colheita de alface. (A) corte da cabeça ao nível do solo na colheita; (B) descarte de folhas com defeitos; (C) cabeças em baldes plásticas para transporte à casa de preparo; (D) cabeças lavadas e embaladas antes do transporte e entrega. As setas indicam restos de terra remanescentes das operações anteriores.

Na **indústria**, as cabeças foram extraídas das caixas e então as folhas com defeitos leves (amassadas e rasgadas), originadas no manuseio pós-colheita, foram removidas na etapa de recepção e limpeza de matéria prima, antes da pesagem da matéria fresca processável. Na seqüência a matéria fresca processável foi separada em folhas da cabeça, caule e coração (Figura 4). As folhas da cabeça constituíram-se de todas as folhas desde a 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> folha externa até a folha com comprimento >10 cm da parte central da cabeça das cultivares Crespa, Vitória e Aurélia, respectivamente. O coração obteve-se por corte do caule a 5-7 mm abaixo da inserção da maior folha do coração, ficando como resíduo o caule. Pela sua vez o coração foi desmontado em folhas, caule e cogulho (Figura 4).



**Figura 3.** Fluxograma de operações e características avaliadas na colheita, manuseio pós-colheita e o preparo da matéria prima na Indústria.



**Figura 4.** Componentes da matéria fresca processável: folhas, caule e coração da cabeça; e folhas, caule e cogulho do coração, após a remoção das folhas com defeitos.

**Número de folhas por cabeça.** Foi determinado na colheita por contabilização de todas as folhas verdadeiras até folhas com comprimento >10 cm da região central da cabeça. Folhas ≤ 10 cm foram deixadas para compor as folhas do coração.

**Descarte foliar.** O descarte foliar por cultivar foi determinado como o somatório de folhas com defeitos descartadas na colheita e pós-colheita, para determinar a influência da cultivar e do manuseio pós-colheita no descarte total de folhas, respectivamente. Os defeitos foram tipificados conforme o Programa Brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros (<http://www.hortibrasil.org.br>), que estabelece como defeito grave a presença de folhas com podridão, senescência ou descoloramento e como defeitos leves o amassamento e rasgamento. Com o número de folhas descartadas e o número total de folhas na colheita foi calculado o descarte relativo em cada etapa (Equação 1), e o descarte foliar relativo por cultivar (Equação 2), expressos em porcentagens (%).

$$DFR_x = (NFD_x / NTF) * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde,  $DFR_x$  é o descarte foliar relativo na etapa  $x$ ;  $NFD_x$  é o número de folhas descartadas na etapa  $x$ , e  $NTF$  é o número total de folhas por cabeça na colheita.

$$DFR_{cv} = [(NFD_c / NTF) * 100] + [(NFD_p / NTF) * 100] \quad (\text{Equação 2})$$

onde,  $DFR_{cv}$  é o descarte foliar relativo da cultivar (cv);  $[(NFD_c / NTF) * 100]$  é o descarte relativo na colheita, e  $[(NFD_p / NTF) * 100]$  é o descarte relativo decorrente do manuseio pós-colheita.

**Matéria fresca processável e alocação.** A matéria fresca processável foi aquela após o descarte das folhas com defeitos (Figura 4). Na seqüência, cada cabeça foi desmontada em folhas, coração e caule residual (Figura 3), e estes componentes foram pesados para a determinação da matéria fresca alocada por componente. A **alocação relativa** foi obtida por divisão da matéria fresca do componente sobre a matéria fresca total processável, e expresso em termos percentuais (%), conforme a Equação 3.

$$AR_x = (MF_x / MFTi) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde,  $MF_x$  é a matéria fresca do componente  $x$  da cabeça: folhas, coração e caule, e  $MFTi$  é a matéria fresca total processável.

**Alocação da matéria fresca foliar entre posições da cabeça.** As folhas foram pesadas a cada duas folhas ao longo das posições foliares da cabeça para a caracterização do padrão de alocação da matéria fresca foliar por cultivar. A pesagem das folhas foi iniciada na 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> folha externa até a folha com comprimento >10 cm da parte central da cabeça das cultivares Crespa, Vitória e Aurélia, respectivamente. A **matéria fresca acumulada** foi elaborada pelo

somatório dos pesos da matéria fresca foliar de todas as posições foliares. Para isso, as massas da matéria fresca das posições não avaliadas foram estimadas pela média aritmética entre as posições avaliadas, reproduzindo-se dessa maneira, aproximadamente, a matéria fresca foliar total de cada cultivar.

**Número de folhas e área foliar específica de corações.** Foram contabilizadas somente as folhas com comprimentos  $\leq 10$  e  $\geq 2,5$  cm (Figura 4) dos corações. Folhas menores em torno do meristema não foram consideradas. A área foliar específica foi determinada conforme (Hunt, 2003) como  $AFE = \text{Area foliar} / \text{Matéria seca da área foliar}$ . Para a determinação da AFE utilizaram-se 21 discos de  $0,7854 \text{ cm}^2$  de área removidos das três folhas maiores dos corações. De cada folha foram removidos 3, 2 e 2 discos das regiões superior, média e inferior, respectivamente. A matéria seca dos discos foi obtida após secagem em estufa a  $65^\circ\text{C}$  até peso constante.

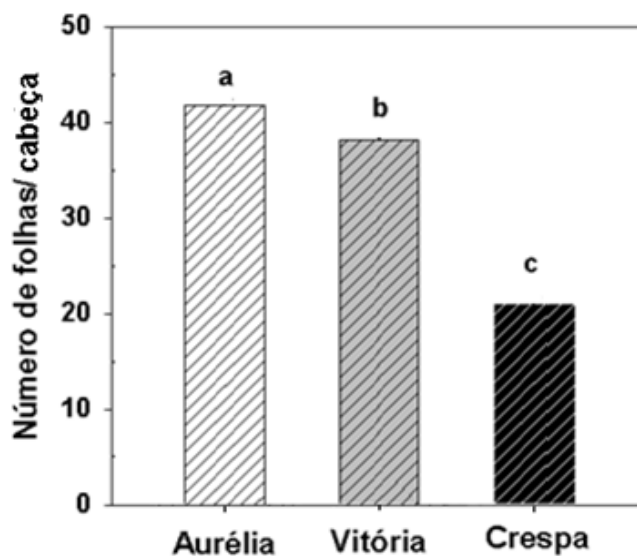
**Alocação relativa da matéria fresca de corações.** Foi calculado seguindo a metodologia empregada para o estudo da alocação da matéria fresca processável. Nos corações os componentes foram folhas, caule e cogulho (folhas menores que 2,5 cm de comprimento em torno do meristema). O caule e cogulho constituíram a matéria fresca residual de corações.

**Análise estatística.** O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com quatro repetições e cinco cabeças por unidade experimental. Os dados foram descritos ou analisados pelos testes de F ( $p \leq 0,05$ ), Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), correlação  $r$  de Pearson ( $p \leq 0,05$ ), e regressão com o auxílio do programa estatístico SAEG V 9.1.

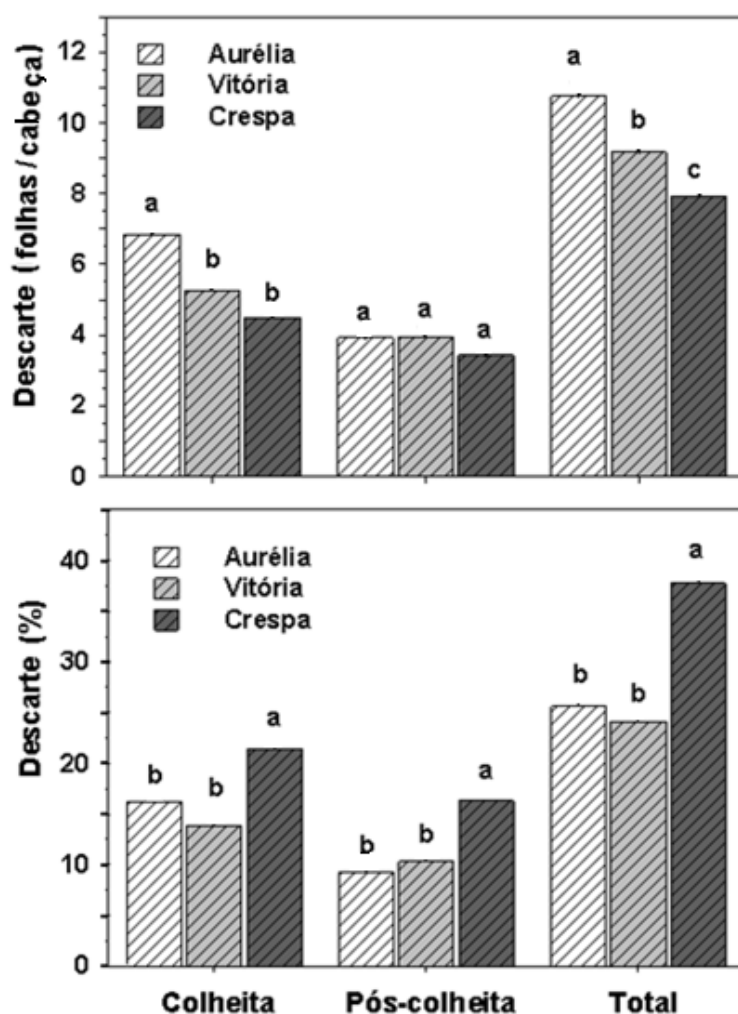
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Número total de folhas.** Houve significativa variação do número total de folhas por cabeça na colheita entre as cultivares (Figura 5). Aurélia com 42 folhas teve quatro folhas mais que Vitória (38 folhas) e 21 folhas mais que Crespa (21 folhas). As diferenças no número de folhas na colheita, entre as cultivares, podem ser atribuídas à expressão genética de cada cultivar através da fisiologia da planta, com implicações nas taxas de aparecimento e crescimento foliar, a taxa assimilatória líquida, e o padrão de alocação de matéria fresca de cada cultivar (Marcelis *et al.*, 1998; Larcher, 2002).

**Descarte foliar.** Na colheita, a 'Aurélia' registrou o maior descarte foliar com  $6,8 \pm 1,1$  folhas por cabeça, seguido das cvs. Vitória e Crespa com descartes de  $5,3 \pm 0,7$  e  $4,5 \pm 1,0$  folhas, respectivamente (Figuras 6). O manuseio pós-colheita originou descartes foliares entre  $3,4 \pm 0,7$  e  $3,9 \pm 1,0$  e sem diferenças estatísticas entre as cultivares ( $p \leq 0,05$ ), constantando-se a maior influência da cultivar em relação ao manuseio pós-colheita.



**Figura 5.** Número de folhas/cabeça na colheita. Letras iguais entre as colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Cada coluna representa a média de 20 cabeças.



**Figura 6.** Descarte absoluto (folhas/cabeça) e Descarte relativo (%), na colheita, manuseio pós-colheita e total. Letras iguais nos grupos de colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Cada coluna representa a média de 20 cabeças.

O maior descarte foliar na colheita pode ser explicado como resultado da interação genótipo x ambiente, atribuindo-se ao auto-sombreamento como o principal modulador do descarte foliar na colheita, visto que Aurélia e Vitória tiveram folhas 2,0 e 1,2 vezes a mais que Crespa (Figura 1), respectivamente, e não houve limitações de nutrientes e água, ou ataque de pragas e doenças. Essa relação positiva, entre o número de folhas na colheita e a magnitude do descarte foliar na colheita, foi também verificada pela correlação positiva entre essas características (Tabela 1) na colheita.

**Tabela 1.** Correlação r de Pearson para número de folhas e descarte foliar na colheita e pós-colheita em alface cvs. Aurélia, Vitória e Crespa

	NFDc	NFDp	NFDt	DFRc	DFRp	DFRt
NTF/cabeça	0,5880**	0,1854 <sup>ns</sup>	0,5803**	- 0.6514**	- 0.8009**	- 0,8458**

NFD=número de folhas descartadas; c=colheita; p=pós-colheita; t=total. DFR=Descarte foliar relativo. \*, \*\* significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade

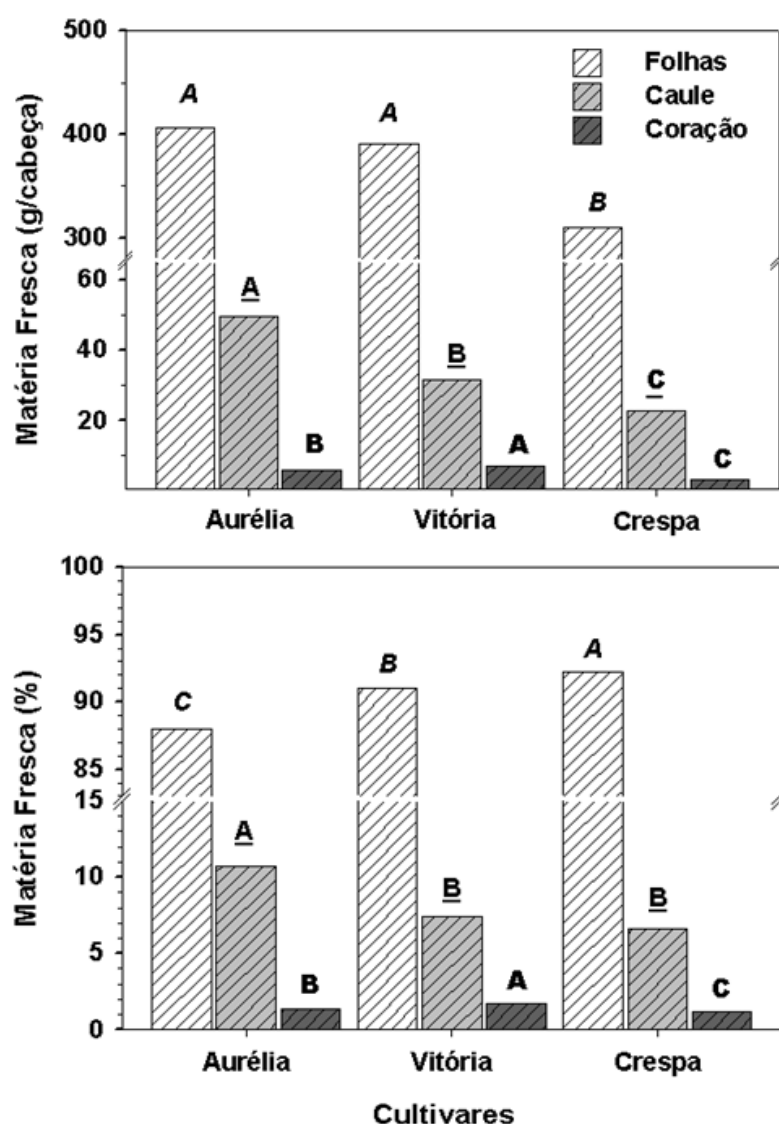
O número de 5 e 7 folhas descartadas na colheita, dependendo da cultivar, permite definir uma “**altura de corte**” da alface como prática segura a ser incorporada nos sistemas de colheita. Como observado, o corte ao nível do solo demanda a remoção manual das folhas apodrecidas e senescentes contendo partículas de solo aderidas à superfície foliar. Todavia, nas folhas mais próximas do solo são frequentemente encontradas caramuxos e lesmas. Na remoção manual das folhas apodrecidas ou com restos de solo aderido (Figura 2b e 2c) outras folhas saudáveis são contaminadas comprometendo-se além a qualidade microbiológica da cabeça, efeito ampliado ao resto da cabeça durante a lavagem devido à água atuar como meio de dispersão microbiológica e de partículas constituintes do solo. Adicionalmente, aplicando o corte de altura elimina-se o requerimento de mão de obra para a remoção das folhas defeituosas.

A altura de corte das cabeças de alface, como boa prática de colheita, pode ser indicada para ser realizada acima da 5ª folha em cultivares com menor número de folhas como no caso da cultivar Crespa, ou acima da 7ª folha em cultivares como nas cultivares Aurélia e Vitória. Isto pode trazer benefícios adicionais na redução do manuseio e na prevenção da contaminação cruzada.

**Descarte foliar relativo.** O Descarte foliar relativo na colheita (DFRc) foi significativamente superior na alface Crespa (21,5%), comparado com o de Aurélia (16,3%) e Vitória (13,8%), e estes últimos cultivares sem diferenças entre si (Figura 3). O DFR na pós-colheita teve a mesma tendência que na colheita registrando-se maiores valores em Crespa (16,3%) em relação com Aurélia (9,3%) e Vitória (10,3%) e essa superioridade da Crespa foi

consequência dos DFR elevados na colheita e na pós-colheita. O maior DFR em Crespa é explicado pelo menor número total de folhas na colheita, sendo o inverso verdadeiro em Aurélia e Crespa, e constatando que descartes foliares elevados podem ser atenuados pelo maior número de folhas/cabeça na colheita. A correlação negativa encontrada entre essas características (Tabela 1) confirma a relação antes indicada.

**Matéria fresca processável.** A matéria fresca processável da cv. Aurélia atingiu  $461,45 \pm 9,2$ , e foi superior ( $p \leq 0,05$ ) ao da 'Vitória' que alcançou a  $429,25 \pm 7,1$  g MF, e que pela sua vez foi significativamente maior aos  $347,36 \pm 13,1$  g atingida por 'Crespa'. A alocação absoluta dessas matérias frescas nos componentes folhas, caule e corações apresentaram também diferenças significativas entre as cultivares (Figura 5).



**Figura 7.** Alocação absoluta da matéria fresca (g/cabeça) e relativa (%) em folhas, caule e coração. Letras iguais nas colunas com a mesma cor e tramado não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). O valor de cada coluna é média de 20 cabeças.

A matéria fresca de folhas (MFF) das cultivares Aurélia e Vitória foram superiores à matéria fresca foliar alcançada por Crespa (Figura 7). Entretanto, na **matéria fresca caulinar** (MFC) observaram-se diferenças significativas entre as cultivares, tendo a cv. Aurélia a maior alocação e Crespa a menor. Na alocação de matéria fresca de corações a cultivar Vitória teve maior matéria fresca em relação às cvs. Aurélia e Crespa (Figura 7), e a matéria fresca de corações correlacionou positivamente com a matéria fresca foliar e caulinar, significando a probabilidade de obter maiores matérias frescas de corações em cabeças de matéria fresca elevada.

Na alocação absoluta de matéria fresca processável revelaram-se associações lineares entre a matéria fresca de folhas, caule e corações (Tabela 2). Todavia houve correlação positiva entre o número de folhas/cabeça na colheita com a matéria fresca de folhas, caule e corações (Tabela 2). Assim, a maior número de folhas haverá maiores valores de matéria fresca de folhas, caule, e corações, o que é desejável para a industrialização. As relações lineares entre o número de folhas, matéria fresca de folhas, caule e corações podem ser explicadas pelo fato destas características definirem o dossel da planta, como confirmado também em tomateiro (Pereira, 2007). Folhas e caule definem a arquitetura do dossel, existindo em consequência, estreita relação entre estes constituintes da alface.

**Tabela 2.** Correlação  $r$  de Pearson para características relacionadas com a alocação da matéria fresca de cabeças de alface das cvs. Aurélia, Vitória e Crespa

	NTF/cabeça	MFfolhas	MFcaule	MFcoração
NTF/cabeça	1	0,7196**	0,6712**	0,6663**
MFfolha	0,7196**	1	0,7118**	0,4628**
MFcaule	0,6712**	0,7118**	1	0,3938**
ARfolha	-0,5678**	-0,4441**	0,9322**	-0,4160**
ARcaule	-0,9915**	-0,4468**	0,9432**	0,2763 <sup>ns</sup>
ARcoração	-0,2375 <sup>ns</sup>	0,0690 <sup>ns</sup>	0,1014 <sup>ns</sup>	0,9086**

NTF=número total de folhas na colheita; MF=Matéria fresca; AR=Alocação relativa.

\*, \*\* significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade

Na **alocação relativa** da matéria fresca foliar a cultivar Crespa teve maior porcentagem que a 'Vitória' e a 'Aurélia', respectivamente. Esta relação contrária observada revela que apesar de uma cultivar possuir maior eficiência para alocar maior matéria fresca às folhas, como no caso da 'Crespa', esta característica somente será importante se a matéria fresca total da cabeça é elevada. Consequentemente, elevadas produções de matéria fresca da cabeça com elevada

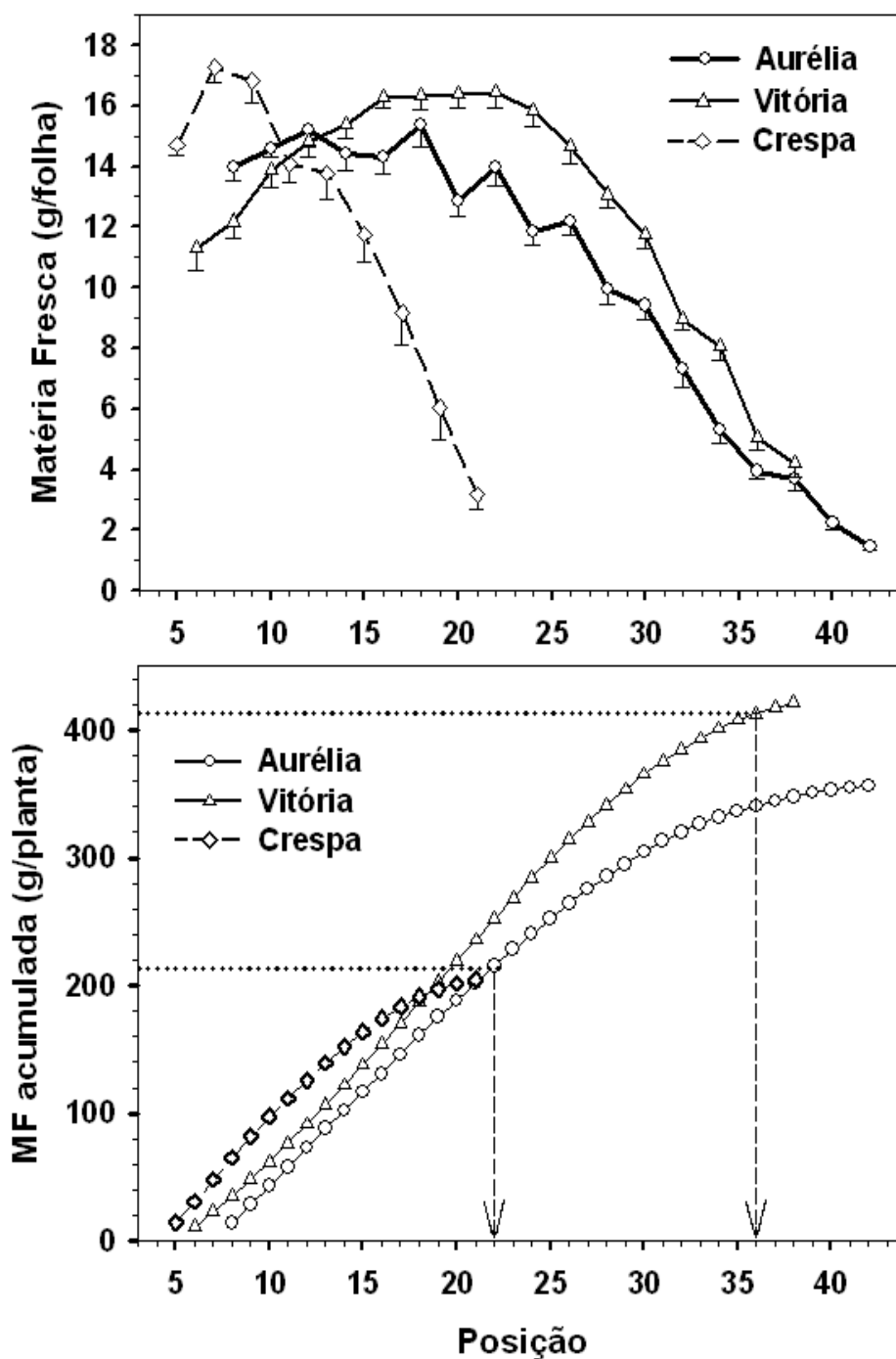
alocação foliar relativa podem ser favorável para a indústria do processamento mínimo, por dispor maior matéria prima processável. A **alocação** relativa da matéria fresca caulinar foi em sentido contrário com a alocação foliar (Figura 4) e essa divergência foi influenciada pela eficiência dos cultivares na alocação de matéria fresca foliar. Nos corações houve maior porcentagem da matéria fresca alocada em Vitória, seguida de Aurélia e Crespa (Figura 4). E essa relação de alocação porcentual da matéria fresca a corações foi similar a alocação absoluta, provavelmente pelas magnitudes menores de matéria fresca em relação aos outros componentes da cabeça. Todavia, a alocação relativa de matéria fresca aos corações não correlacionou com outras características avaliadas, exceto a correlação positiva com a matéria fresca de corações (Tabela 2).

Das correlações encontradas na Tabela 1 e 2 se observa que o número total de folhas na colheita correlacionou positivamente com características de interesse industrial como o descarte foliar, a matéria fresca de folhas, caules e corações. Assim, o número de folhas na colheita se constitui na característica mais simples para selecionar cultivares de alface com orientação para o processamento mínimo. Entretanto, ainda não é possível saber se esta característica é suficientemente informativa para a produção de folhas inteiras, além da produção de corações, sem antes considerar as características a seguir.

**Distribuição de matéria fresca foliar na cabeça.** A distribuição da matéria fresca foliar por posição das cultivares (Figura 5a), ajustou-se ao modelo quadrático e cúbico conforme as equações  $\hat{Y}_{\text{Vitória}} = 4,5514 + 1,2808**X - 0,0346**X^2$ ,  $R^2 = 0,9829$ ;  $\hat{Y}_{\text{Aurélia}} = 6,9546 + 1,2795**X - 0,0580**X^2 + 0,0006X^3$   $R^2 = 0,9805$ ;  $\hat{Y}_{\text{Crespa}} = 6,2275 + 2,8217**X - 0,2239**X^2 + 0,0039 X^3$ ;  $R^2 = 0,9747$ , respectivamente.

A cultivar **Crespa** teve curva com queda acentuada desde a sétima folha da cabeça (primeira após o descarte foliar). Essa distribuição implica elevada variação da matéria fresca entre folhas próximas o que pode dificultar a padronização no processamento de folhas inteiras, sendo provavelmente mais aconselhável para ser cortada. A cultivar **Vitória** proporcionou faixa maior de uniformidade de matéria fresca foliar entre as posições foliares 16 a 22, abrangendo 7 folhas vizinhas. Entretanto nas posições posteriores houve queda acentuada da matéria fresca foliar a partir da posição foliar 22. A distribuição de matéria fresca na cv. **Aurélia** teve maiores matérias frescas foliares entre a 12ª e 18ª folha, mas observou-se menor variação da matéria fresca foliar entre as posições foliares 8 e 22, representando uma faixa maior de folhas próximas em matéria fresca (12 folhas) com relação às outras cultivares. Posterior à posição foliar 23ª se evidencia queda da matéria fresca foliar, embora, menos acentuada que a observada na cv. Vitória.

A acumulação da matéria foliar representada na Figura 8 confirma o fato da cultivares Vitória e Aurélio ser apropriada para a produção simultânea de folhas inteiras e fatiada minimamente processada.



**Figura 8.** A) Matéria fresca de folhas individuais da cabeça de alface (g/folha) por posição. B) Matéria fresca foliar acumulada (g/planta) para folhas da cabeça; valores da matéria fresca foliar entre símbolos foram estimados por interpolação a partir dos dados observados. Cada ponto com símbolo representa a média da matéria fresca foliar de 20 cabeças.

Assumindo-se unidades comerciais de 200 gramas de folhas por embalagem, se observa que na cultivar Aurélia essa massa de matéria fresca é atingida na posição 22<sup>a</sup>, e ainda com folhas que possuem matérias foliares próximas o que permitiria a conformação de uma unidade comercial mais homogênea em termos de matéria fresca/folha. Na cultivar Vitória a acumulação de 200 gr/embalagem foi atingida na posição 20<sup>a</sup>. Já na cultivar Crespa o uso de todas as folhas não foram suficientes para conformar unidades comerciais de 200 gr MF/folha. Assim, a 'Aurélia' apresenta o número de folhas e a distribuição de matéria fresca foliar favoráveis para a produção de folha inteira minimamente processada. As folhas posteriores à posição 22 podem ser destinadas para a produção de outros 200 gramas de alface fatiada, e ainda deixar maior número de folhas para obter um coração de maiores proporções a partir da posição foliar 37. A 'Vitória' possui distribuição intermediária da matéria fresca foliar entre as cvs. Crespa e Aurélia embora mais próxima do padrão de distribuição de Aurélia.

**Número de folhas e área foliar específica de corações.** O número de folhas dos corações foi maior na 'Aurélia', seguido da 'Vitória' e 'Crespa' (Tabela 3). As alfaces Aurélia e Vitória tiveram, em média, sete e cinco folhas a mais que os corações de Crespa, respectivamente. O maior número de folhas pode ser relevante para a obtenção de maior matéria fresca quanto do aspecto geral dos corações por a AFE ser uma propriedade da área foliar. Áreas foliares específicas elevadas como em Vitória indicam folhas finas e maior área foliar das unidades foliares, esperando-se que corações que reúnam essas características possam constituir corações mais atrativos comercialmente. Entre as cultivares houve correlação positiva entre o número de folhas do coração e área foliar específica do coração, confirmando a probabilidade de obter corações atrativos entre os cultivares estudados.

**Alocação relativa da matéria fresca de corações.** Nos corações a cv. Vitória teve a maior porcentagem de matéria fresca de folhas em relação aos cultivares Aurélia e Crespa, estas últimas, sem diferenças entre si (Tabela 3). A alocação relativa de caule das cvs. Aurélia e Crespa foram superiores a Vitória, e não houve diferenças na porcentagem de matéria fresca alocada aos cogulhos, entre as cultivares. A soma das porcentagens de alocação de caule e cogulho de corações corresponderam entre 17 a 20% da matéria total do coração, assim espera-se uma matéria fresca consumível em torno de 80% da matéria fresca total dos corações (Tabela 3).

Entre as cultivares avaliadas, Aurélia e Vitória podem ser consideradas apropriadas para a obtenção de corações, por combinar favoravelmente número de folhas, AFE e matéria fresca total de corações (Figura 3 e Tabela 3). Todavia, o formato compacto do coração de Vitória com folhas enrugadas e nervura central proeminente (Figura 9), é similar com alguns tipos de

corações de alface já comercializados (<http://www.fotosearch.com/photos-images /lettuce-hearts.html>)

**Tabela 3.** Número de folhas, área foliar específica e alocação relativa de matéria fresca de corações de alface cvs. Aurélio, Vitória e Crespa.

Cultivar	Número de folhas	AFE $\text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	Alocação relativa de matéria fresca (%)		
			Folhas	Caule	Cogulho
Aurélio	$14,7 \pm 2,4$ a	$4,1 \pm 0,2$ b	$80,8 \pm 3,1$ b	$16,4 \pm 3,0$ a	$2,8 \pm 0,6$ a
Vitória	$12,6 \pm 1,2$ b	$5,2 \pm 0,2$ a	$82,8 \pm 1,9$ a	$14,2 \pm 2,2$ b	$2,9 \pm 0,5$ a
Crespa	$8,2 \pm 0,6$ c	$3,7 \pm 0,1$ c	$79,6 \pm 2,6$ b	$17,5 \pm 1,6$ a	$2,9 \pm 0,8$ a
CV %	12,9	4,5	13,1	14,7	24,0

AFE = Área foliar específica. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 9.** Aparência dos corações desmontados e inteiros de alface cvs. Aurélio (A), Vitória (B) e Crespa (C).

O número de folhas na colheita, o padrão de distribuição e acumulação da matéria fresca foliar, e as características dos corações observados nas cultivares 'Aurélia' e 'Vitória' favorecem a produção simultânea de: a) folhas inteiras, com aproximadamente 50% das posições foliares externa-média, b) folha fatiada ou rasgada com o 50% das posições foliares média-interna restantes, que naturalmente possuem menor susceptibilidade ao escurecimento como constatado por Fukumoto *et al.* (2002) e, c) corações, com folhas mais internas da cabeça de alface, seguindo o esquema apresentado na Figura 10.

Essa proposta de aproveitamento (Figura 10) tem como base além, a existência de gradiente de perecibilidade natural entre as folhas da cabeça de alface, sendo as folhas da região externas mais perecíveis que as internas. Agüero *et al.*, (2003), após a avaliação das relações hídricas em folhas de diversas posições foliares, têm sugerido a existência de fatores maiores inerentes a natureza foliar comprometendo a qualidade comercial das folhas externas das cabeças de alface.

Fukumoto *et al.*, (2002) também verificaram em alface Iceberg maior susceptibilidade ao escurecimento em folhas das posições externas com relação às internas, independentemente da atividade da PPO e POD. A maior deterioração com a intensidade de fatiamento tem sido relatada por Barry-Ryan & O'Beirne (1999), e maior conservabilidade de folhas inteiras MP versus as fatiadas, tem sido também constatadas por Mattos *et al.*, (2007; 2008).

Cabeças de alface do tipo "Leaf" e Romana possuem três grupos de folhas bem definidas na proporção de 1/3 do total de folhas da cabeça, denominadas de externas, médias e internas, (Siomos *et al.*, 2002). Assim, além do número de folhas por cabeça estar relacionada com a matéria fresca foliar, é provável que a composição numérica de folhas por camada e entre camadas esteja também relacionada com a distribuição da matéria fresca e com a gradiente de susceptibilidade ao escurecimento entre posições foliares.

A informação anterior pode ser relevante no processamento mínimo e na pesquisa nessa área, visto a evidência da significativa variabilidade estádio-específico de características físicas (Arnez-Zerdas, 2009), fisiológicas (Henriques & Park, 1976; Fukumoto *et al.*, 2002; Martin-Diana *et al.*, 2005; Agüero *et al.* 2007) e microbiológicas (Brandl & Amundson, 2008).

Dos resultados obtidos se evidenciam que o elevado número de folhas e distribuição uniforme da matéria fresca em 50% das posições foliares são características a serem procuradas por fitomelhoristas e industriais. Essas características somadas ao descarte foliar, podem contribuir: a) orientar na definição da **altura do corte** das cabeças na colheita, com benefícios na redução de mão de obra e menor contaminação das folhas processáveis e como referencia na negociação das boas praticas de colheita e pós-colheita de alface orientada para a indústria, b) selecionar cultivares de alface do tipo "Leaf" adaptados para a indústria, c) aperfeiçoar a

utilização da matéria prima com o intuito de melhorar a conservação pós-processamento da alface minimamente processada, e c) classificar as folhas perante as posições foliares no processamento mínimo, evitando cortar as folhas mais vulneráveis às alterações fisiológicas e à deterioração.

Entretanto estas hipóteses requerem constatação experimental através da aplicação da tecnologia do processamento mínimo.

## **CONCLUSÕES**

O descarte foliar é influenciado principalmente pelo cultivar e menos pelo manuseio pós-colheita.

O efeito de cultivar se manifesta através do número de folhas com defeitos graves presente na colheita, provavelmente decorrente da senescência foliar promovido pelo auto-sombreamento das folhas baixas ou da taxa média de vida da folha.

O número de folhas descartadas na colheita pode definir a altura de corte de segurança da cabeça de alface, o que pode reduzir o uso de mão de obra na colheita e diminuir o risco de contaminação cruzada.

A magnitude do descarte de folhas na colheita e manuseio pós-colheita é atenuada pelo maior número de folhas produzidas.

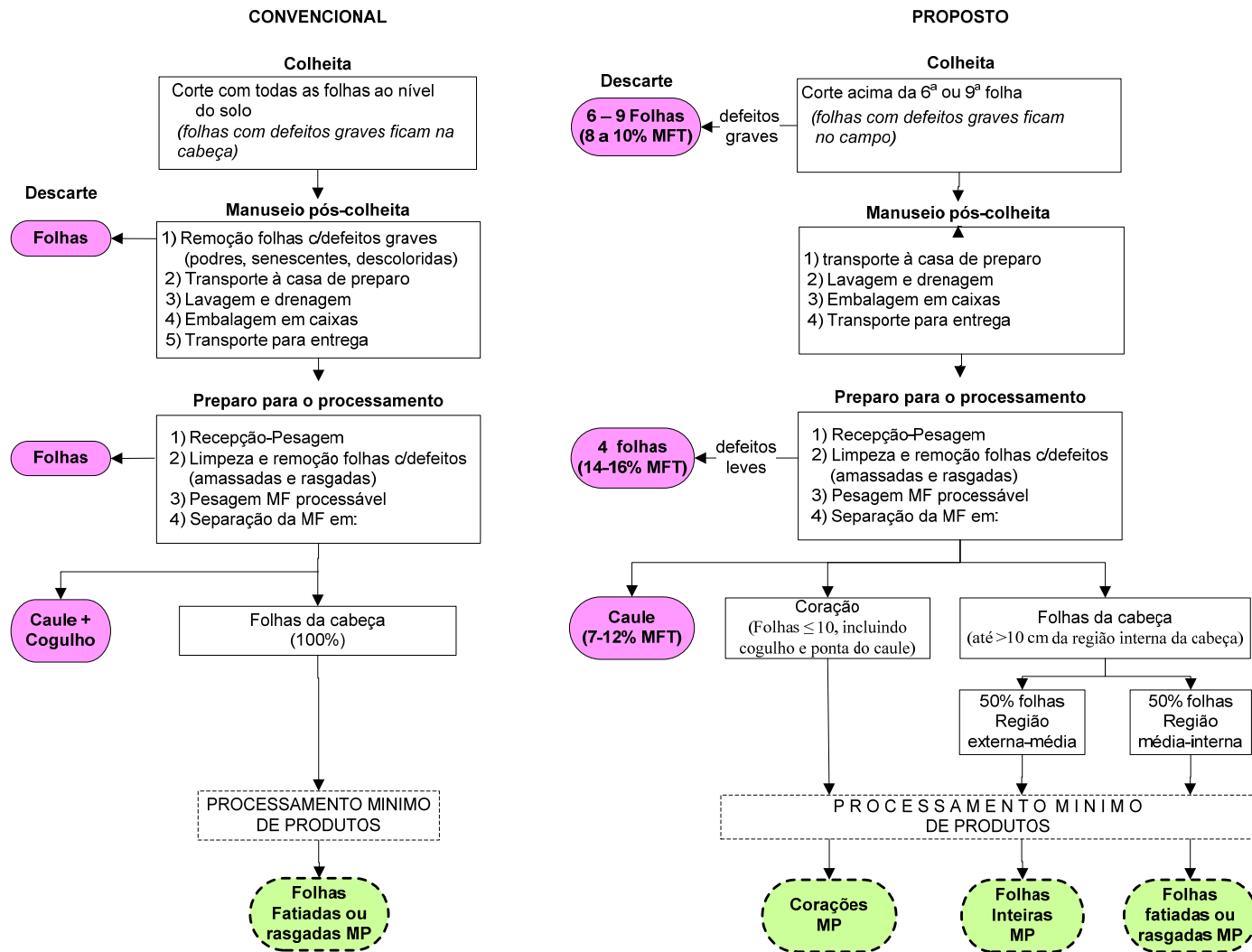
O padrão de distribuição da matéria fresca foliar perante as posições foliares pode influenciar a destinação da matéria prima no processamento mínimo.

Cultivares de alface do tipo “Leaf” que combinem elevado número de folhas e distribuição homogênea da matéria fresca foliar em torno dos 50% das posições foliares podem ser destinados à obtenção simultânea de folhas inteiras, fatiadas e corações no processamento mínimo.

As cultivares Aurélia e Vitória se adaptam à produção simultânea de folhas inteiras, folhas fatiadas e corações minimamente processados.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa PEC-PG CAPES pela bolsa de Doutorado, na pessoa de Milton Edgar Pereira Flores.



**Figura 10.** Fluxograma de operações convencional e proposto da colheita, manuseio pós-colheita e destinação da matéria fresca dos componentes da cabeça de alface do tipo “Leaf”, para a obtenção de produtos MP a partir de uma mesma cabeça. MF = Matéria fresca; MFT = matéria fresca total na colheita; MP = minimamente processado.

### 3. CAPÍTULO 2

#### ESCURECIMENTO, PADRÃO DE ISOENZIMAS E ATIVIDADE DA PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM NERVURAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

##### RESUMO

Foi caracterizado o escurecimento, padrões isoenzimáticos e atividades da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), em nervuras de diferentes posições foliares da cabeça de alface das cvs. Crespa, Vitória, Aurélia e Grandes Lagos. Os padrões isoenzimáticos da PPO e POD tiveram variabilidade estágio-específico em número e expressão. Dependendo da cultivar, foram detectadas uma ou duas isoenzimas da PPO (PPO-1 e PPO-2), e uma ou duas isoperoxidasas aniônicas (POD-A1 e POD-A2) e uma ou duas catiônicas (POD-C1 e POD-C2). As PPO-2, POD-A2 estiveram presentes em todas as posições, com intensidades maiores nas posições mais internas da cabeça. A PPO-1 e POD-A1 se manifestaram somente a partir de posições intermediárias e tiveram intensidades de expressão aumentadas nas folhas externas. A POD-C1 foi encontrada em todas as posições sem diferenças de expressão e a POD-C2 foi expressa em algumas posições da cultivar Crespa. As atividades enzimáticas da PPO e POD tiveram variabilidade significativa entre as posições dependendo da cultivar, e sem padrão comum entre as cultivares. Na cultivar Vitória o escurecimento *in vivo* de nervuras pós-armazenamento refrigerado (5° C) foi significativamente maior em nervuras das posições externa e intermediária versus nervuras das posições internas. A variação em número e intensidade das isoenzimas foi coerente com o maior escurecimento das nervuras de folhas externas e intermediárias versus as internas, implicando o envolvimento da expressão de isoenzimas da PPO e POD na susceptibilidade ao escurecimento ou a maior susceptibilidade ao escurecimento das nervuras externa, em relação às internas independente do nível da atividade da PPO e POD.

**Palavras-chave:** Polifenoloxidase, Peroxidase, isoenzimas, atividade, escurecimento, alface, cultivares.

### ABSTRACT

It was characterized the browning, isoenzymatics pattern and activities of the polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD), in mid-ribs of different leaf positions within rosette of lettuce of the cvs. Vitória, Aurélia, Crespa and Grandes Lagos. The isoenzymatic patterns of PPO and POD showed variability in number and expression stage-specific. Depending of the cultivar, were present, one or two isoenzymes of PPO were detected (PPO-1 and PPO-2), and in the POD one or two anionics (POD-A1and POD-A2) and one or two cationics isoenzymes (POD-C1and POD-C2). PPO-2 and POD-A2 were present in all of the positions, with high intensity of bands in the more outer positions of the rosette. PPO-1 and POD-A1 starting only from positions intermediate and they had expressions increased in the outer leaves. POD-C1 was present in all of the positions without differences of expression and POD-C2 was expressed in some positions of cultivating Crespa. The enzymatic activities of PPO and POD had significant variability among the positions depending on to cultivate, and without common pattern among them cultivate. In the cv. Vitória the browning score of the mid-ribs it was significantly high in mid-ribs of the outer and middle leaf positions versus mid-ribs of the internal positions, after ten days under refrigerate storage to 5 °C and packed bag. The different expression in number and intensity of the isoenzimas was coherent with the largest browning of the mid-ribs of the outer and middle leaves, implicating the involvement of the expression of isoenzimas of PPO and POD, in the susceptibility to the browning, and than the browning in mid-ribs of the outer leaves would be more intensity than internal mid-ribs, independently of the level of the native activity of PPO and POD.

**Key-words:** Polifenoloxidase, Peroxidase, isoenzimas, activity, browning, lettuce, you cultivate.

### INTRODUÇÃO

As enzimas polifenoloxidase (PPO; EC 1.14.1.7) e peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) têm sido estudadas por serem responsáveis do escurecimento enzimático em diversas frutas e hortaliças (Vamos-Vigyazo, 1981; Robinson, 1991; Lamikanra, 2002; Marshall *et al.*, 2002), assim como na deterioração da cor e sabor pós-colheita devido à complexação e degradação de compostos fenólicos (Loaiza-Velarde *et al.*, 1997; Lopez-Galvez *et al.*, 1997, Tomás-Barberán & Espín, 2001).

Na pós-colheita e no processamento mínimo de alface, o escurecimento enzimático é considerado uma alteração fisiológica relevante por diminuir a qualidade sensorial e originar a rejeição do produto pelo consumidor. Esse fato tem estimulado pesquisas diversas em alface, na procura de compreender melhor esse processo e a sua inibição, para prolongar a qualidade pós-colheita, particularmente de alface minimamente processada.

Existem evidências de que o corte estimula uma série de eventos que conduzem ao escurecimento. Em primeira instância e imediatamente posterior ao corte dos tecidos vegetais, as enzimas oxidativas reagem com seus substratos devido à descompartimentalização desses reagentes catalíticos, resultando em escurecimento das regiões cortadas. Em uma segunda etapa, o aumento da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) estimulada pelo corte, ativa a rota dos fenilpropanoides, provocando a síntese de novo e acumulação de substratos fenólicos, que poderão reagir com as enzimas oxidativas quando a integridade das membranas for comprometida e a proximidade desses reagentes acontecer. Em alguns casos observou-se também o aumento transiente do conteúdo e atividade da PPO e POD. No entanto, a relação entre o aumento de compostos fenólicos, enzimas oxidativas e o escurecimento é ainda contraditória em alface (Cantos *et al.*, 2001; Ke & Saltveit, 1989; Fukumoto *et al.*, 2002; Degl'Innocenti *et al.*, 2007), sendo mais provável a associação entre a inibição da PAL e o escurecimento.

É provável que essa divergência na relação entre a alteração do metabolismo fenólico, e o conteúdo e atividade da PPO e POD com o escurecimento possam ter relação com a variabilidade estágio-específico destas enzimas. Todavia, é provável que a heterogênea composição e conteúdo de compostos fenólicos com a idade foliar, relatada por Romani *et al.*, (2002), possam estar influenciando à atividade específica dessas enzimas.

Até agora a maioria das pesquisas nessa área tem trabalhado com camadas foliares específicas da cabeça ou mistura de folhas, apesar da heterogeneidade de desenvolvimento foliar de que se compõe a cabeça de alface. Estudos similares em outras hortaliças e frutas minimamente processadas têm utilizado estágios de maturidade ou desenvolvimento específicos, pois se sabe que a heterogeneidade de estágio compromete a conservabilidade e qualidade sensorial do produto.

A PPO e POD são codificadas por famílias multigênicas e existem múltiplas formas com variabilidade isoenzimática entre espécies e cultivares, idade fisiológica, parte da planta, tipo de tecido e compartimento celular (Scandalios, 1974; Amiot *et al.*, 1995; Marshall, *et al.*, 2002; Shinha, 2004). Todavia, essas formas alternativas podem apresentar diferenças nos parâmetros cinéticos e atividade catalítica, devido à especificidade e conteúdo de substratos fenólicos,

formas latentes e ativas das enzimas, e sensibilidade a inibidores (Martinez & Whitaker, 1995; Veitch, 2004), características que poderiam influenciar a atividade específica da PPO e POD, e conseqüentemente, no escurecimento.

Em alface, as pesquisas para elucidar a associação entre a variabilidade isoenzimática, atividade enzimática e o escurecimento são escassas. Entre elas o estudo de Cantos *et al.*, (2001), constitui a única referência completa disponível. Entretanto, esses autores utilizaram nervuras das posições intermediárias da cabeça de seis cultivares e não conseguiram estabelecer qualquer relação entre o escurecimento e a atividade da PPO e POD. Por outro lado, tem sido descritas por Fukumoto *et al.*, (2002) maior escurecimento em nervuras de folhas externas versus internas sem ter sido observada alteração significativa da atividade da PPO e POD entre esses tipos de tecidos.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar o padrão isoenzimático, as atividades específicas da polifenoloxidase e peroxidase em relação ao escurecimento, em nervuras de folhas de diferente posição na cabeça de alface.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal e condições de crescimento.** Alfaves (*Lactuca sativa*, L.) das cultivares Vitória de Santo Antão, Crespa Cinderela, Aurélia e Grandes Lagos foram cultivadas em casa de vegetação sob condições similares de nutrição, irrigação e práticas culturais como recomendado por Alvarez *et al.*, (1999) e Fontes (1999). Numa primeira época cultivaram-se somente as cultivares Grandes Lagos e Vitória, e posteriormente as cultivares Vitória, Aurélia e Crespa. As cultivares foram escolhidas por serem contrastantes em relação ao tipo de folhas e na característica das suas nervuras, sendo proeminentes e grossas em Crespa e Grandes Lagos, finas e delgadas em Aurélia, e com dimensões intermediárias em Vitória.

**Tratamentos.** Os tratamentos corresponderam às posições das folhas no momento da colheita. Na primeira etapa, considerada exploratória, utilizaram-se nervuras das posições foliares, de fora para dentro da cabeça, nos números 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 na cv. Grandes Lagos, e 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 32 na cv. Vitória. Essas posições equidistantes abrangeram desde a segunda folha verdadeira (folha senescente) até as folhas mais internas ou imaturas com tamanho aproximado de dez centímetros. As nervuras das posições indicadas foram dissecadas com bisturi, identificadas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo utilizadas para cada parcela amostras compostas de três nervuras provenientes de três cabeças por cultivar e sem repetições no gel.

Em uma segunda etapa e com base nos resultados da etapa exploratória, foram avaliadas as posições foliares 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30 nas cultivares Vitória e Aurélia e as posições 6, 10, 15, 20 e 24 em Crespa, sendo a primeira folha da serie a sexta folha verdadeira. Foram extraídas as nervuras como na etapa exploratória, seguido do congelamento em nitrogênio líquido e liofilização do material. O experimento foi conduzido em DIC com três repetições, sendo constituída cada parcela por uma amostra composta com nervuras provenientes de três cabeças por repetição, sendo avaliadas nove cabeças para cada cultivar.

**Extração das enzimas e eletroforese.** A extração das enzimas para a eletroforese da etapa exploratória foi realizada com  $0,5 \pm 0,1$  g de amostras congeladas de matéria fresca e macerados em almofariz resfriado com 1,0 mL da solução extratora nº 1 descrita por Alfenas (2006). Na segunda etapa foram utilizados  $0,12 \pm 0,02$  g de nervuras liofilizadas e 0,6 mL da solução extratora nº 1. Os macerados foram posteriormente centrifugados a 4 °C a 17.000 g por 30 minutos em eppendorf de 2 mL. No sobrenadante contendo as enzimas, três tiras de papel cromatográfico Whatman 3M (1,4 x 0,3 cm) foram embebidas por tratamento e repetição, logo embrulhadas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C em tubos eppendorf, até a realização da eletroforese em sistema horizontal de gel de amido a 12% (Alfenas, 2006).

A solução-tampão do gel e do eletrodo foram as descritas por Soltis *et al.*, (1983), tendo a do gel: Tris ( $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ ) 1,84 g; ácido cítrico ( $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ ) 0,69 g; água destilada 1000 mL e pH 7,8; e a do eletrodo: ácido bórico ( $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ ) 18,55 g; NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) 4,00 g; água destilada 1.000 mL e pH 8,6.

Para a eletroforese, as tiras de papel contendo as enzimas, foram colocadas nos géis e então se procedeu à eletroforese a 4°C. A corrida inicial foi realizada por 30 minutos a 150 V, logo as tiras de papel foram retiradas, e imediatamente continuou-se a corrida eletroforética por mais 5 horas a 300 V, até que o marcador azul de bromofenol atingisse 9 cm de corrida. Dos géis contendo as enzimas foram obtidas fatias intermediárias com espessura de 2 mm e logo distendidas em bandejas de vidro tipo pirex e imersas na solução corante específica de cada enzima.

**Reação enzimática no gel.** A coloração das bandas nos géis foi por reação enzimática sendo utilizada para peroxidase a solução descrita por Oliveira & Casali (1999) e na polifenoloxidase a sugerida por Soltis *et al.*, (1983). Para a revelação dos sistemas, as bandejas com os géis foram mantidos em estufa a 37 °C, no escuro, exceto o sistema POD que foi mantido a 4 °C, até a revelação das bandas (cerca de uma hora). Após a revelação, os géis foram lavados em água corrente e em seguida, fixou-os em solução de glicerina 10% (12 horas a 4

°C). Após adquirirem consistência, os géis foram secos pelo método do bastidor em placas de vidro descrito em Alfenas (2006).

**Análise de zimogramas.** Na análise dos zimogramas foram consideradas a mobilidade relativa (Mr) das bandas e o Quantum Level Ratio (razão do nível quântico). A Mr foi determinada através da razão  $D_i/D_m$ , em que  $D_i$  é a distância percorrida pela isoenzima específica, e  $D_m$ , a percorrida pelo marcador (azul de bromofenol). Considera-se  $Mr=0$  o ponto de saída, e  $Mr=1$  a distância total percorrida pelo marcador. O conjunto de bandas correspondentes às isoenzimas, nas suas posições específicas, foi denominado de padrão. Para a análise quantitativa foram obtidas as QLR (Quantum Level Ratio) de cada banda com o software MultiGauge V3.0 (FujiFilm) de imagens digitalizadas de cada padrão isoenzimático. O QLR é a expressão percentual da relação entre a intensidade-área da banda (isoenzima) de um tratamento (posição) com a intensidade-área das bandas de todos os tratamentos em uma mesma repetição. Os QLR assim obtidos foram analisados estatisticamente.

**Extração e ensaio enzimático da POD e PPO.** O experimento foi conduzido em DIC com quatro repetições, sendo constituída cada parcela por uma amostra composta com nervuras provenientes de três cabeças por repetição, sendo avaliadas 12 cabeças para cada cultivar. A solução extratora para a POD foi tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 6,5 contendo bissulfito de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15M, e para a PPO tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 1% polivinilpirrolidona PVP-40T e 10 mM de ácido ascórbico. A extração das enzimas foi realizada por maceração das amostras com a solução extratora na relação 1:1,6, em almofariz cerâmico resfriado. Os homogenatos foram centrifugados a 17.000 g durante 30 minutos a 4°C, sendo os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático e para a quantificação da proteína total pelo método de Bradford (1976). O ensaio enzimático para ambas as enzimas foi realizado a 25 °C. O meio de reação para a POD foi composta por 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5), 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 0,5 mL de  $H_2O_2$  (1,8%) e uma alíquota de extrato enzimático até 0,5 mL. O meio de reação para PPO foi 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0), 0,5 mL de catecol 60 mM e uma alíquota de extrato enzimático até 1,0 mL. A atividade da PPO, POD e proteínas solúveis totais foram medidas em espectrofotômetro a 420, 470 e 595 nm, respectivamente. As atividades foram registradas ao longo de dois minutos com leituras da absorbância a cada 15 segundos. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em unidades de absorbância por minuto / miligramas de proteína (UA min/mg proteína) (Neves, 2003). As características foram avaliadas em DIC com quatro repetições. Todas as medições foram feitas em duplicatas.

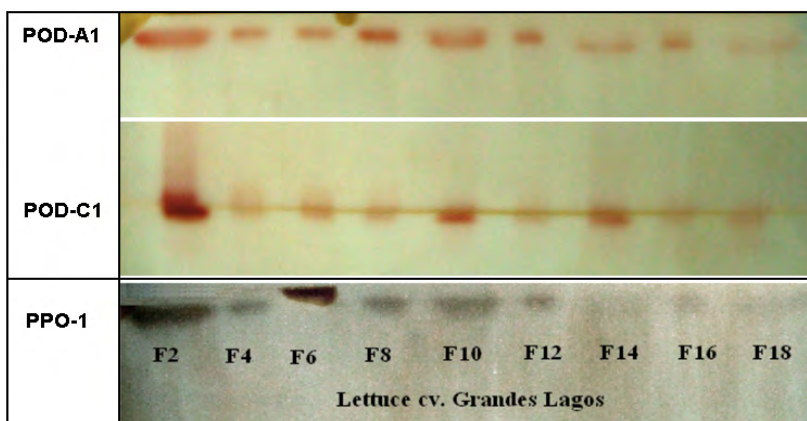
**Escurecimento de nervuras.** O escurecimento foi estudado em nervuras das posições foliares 6, 18 e 30 de 12 cabeças colhidas aleatoriamente. As nervuras dissecadas foram cortadas em segmentos de 4 cm aproximadamente, sendo obtidos dois segmentos por nervura. Os segmentos depois de sanitizadas em água resfriada a 4°C e enxaguadas em água potável, foram secadas com papel toalha e então seis segmentos tomados aleatoriamente de cada posição foram embaladas em potes de PEBD (8 x10 cm) e logo conservados a 5°C por seis dias. No final do período de conservação o escurecimento foi avaliado mediante notas com sete graus de classificação, sendo: 1- sem escurecimento (similar a corte fresco), 3-leve, 5- média, 7- forte escurecimento (pintas e manchas avermelhadas coalescentes na superfície nerval e escurecimento severo nas superfícies cortadas). As notas pares 2, 4 e 6, corresponderam a características intermediárias entre as notas ímpares. As notas foram analisadas em DIC, com quatro repetições e quatro unidades experimentais por tratamento e seis segmentos avaliados por unidade experimental.

**Análise estatística.** Todos os dados foram analisados por F ( $p \leq 0,05$ ) para análise de variância e por Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) para discriminação de médias, com o software estatístico SAEG V 9.1.

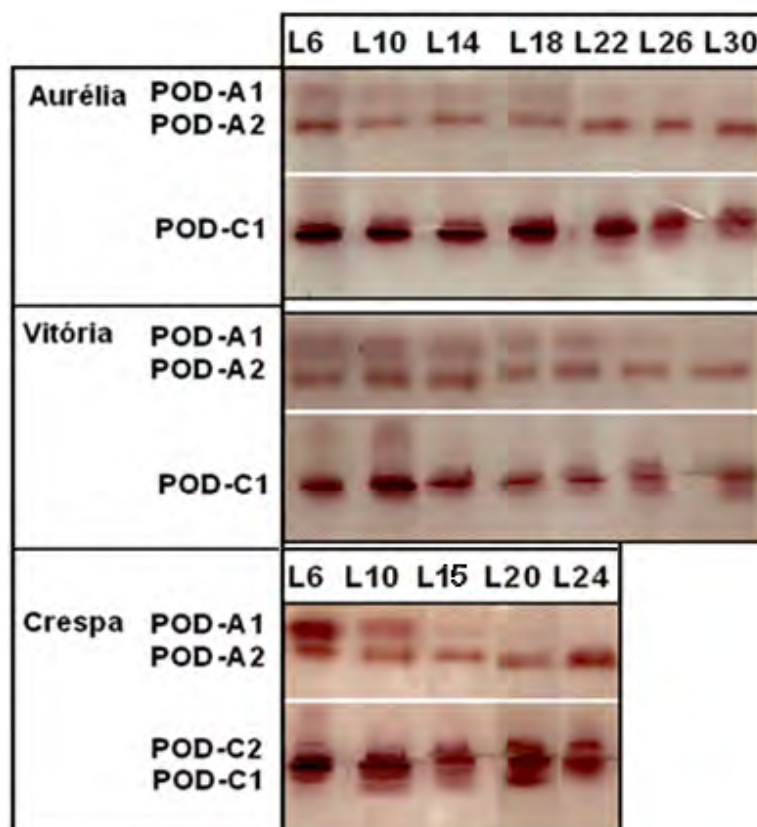
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Padrão de isoenzimas.** Os padrões isoenzimáticos da POD e PPO da etapa exploratória com as cultivares Grandes Lagos e Vitória e, da segunda etapa com as cultivares Vitória, Aurélia e Crespa mostraram diferenças na resolução das bandas. Entre estas etapas, foi observada menor resolução das bandas quando se utilizou material fresco congelado na etapa exploratória, e maior resolução quando utilizado material liofilizado na segunda etapa de la pesquisa, indicando a necessidade de concentrar as enzimas em estudos isoenzimáticos em alface.

Os padrões isoenzimáticos estágio-específico em número e expressão da POD nas diferentes cultivares apresentaram variabilidade entre as posições foliares avaliadas (Figura 1 e 2). O padrão isoenzimático da POD na cultivar Grandes Lagos foi composto por uma isoenzima catiônica e outra aniônica (Figura 1), e duas isoenzimas aniônicas (POD-A1 e POD-A2) e uma catiônica (POD-C1) nas cultivares Aurélia, Vitória e Crespa (Figura 2), sendo que a POD-A1 esteve presente entre as posições intermediárias e externa, e a POD-A2 em todas as posições foliares avaliadas.



**Figura 1.** Padrão de isoenzimas da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em nervuras de alface cv. Grandes Lagos. Cada coluna corresponde a uma posição foliar (F) de fora para dentro da cabeça. Teor de proteína do extrato enzimático  $5,56 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ , para ambas as enzimas.



**Figura 2:** Padrão de isoenzimas da peroxidase de nervuras de folhas de diferentes posições da cabeça de alface (L6 a L30) das cvs. Aurélia, Vitória e Crespa. Cada coluna no gel representa uma repetição de três, por posição foliar e cultivar. Teor de proteína dos extratos enzimáticos utilizados:  $2,39 \pm 0,21$ ;  $1,49 \pm 0,25$  e  $1,26 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$  para Aurélia, Vitória e Crespa, respectivamente.

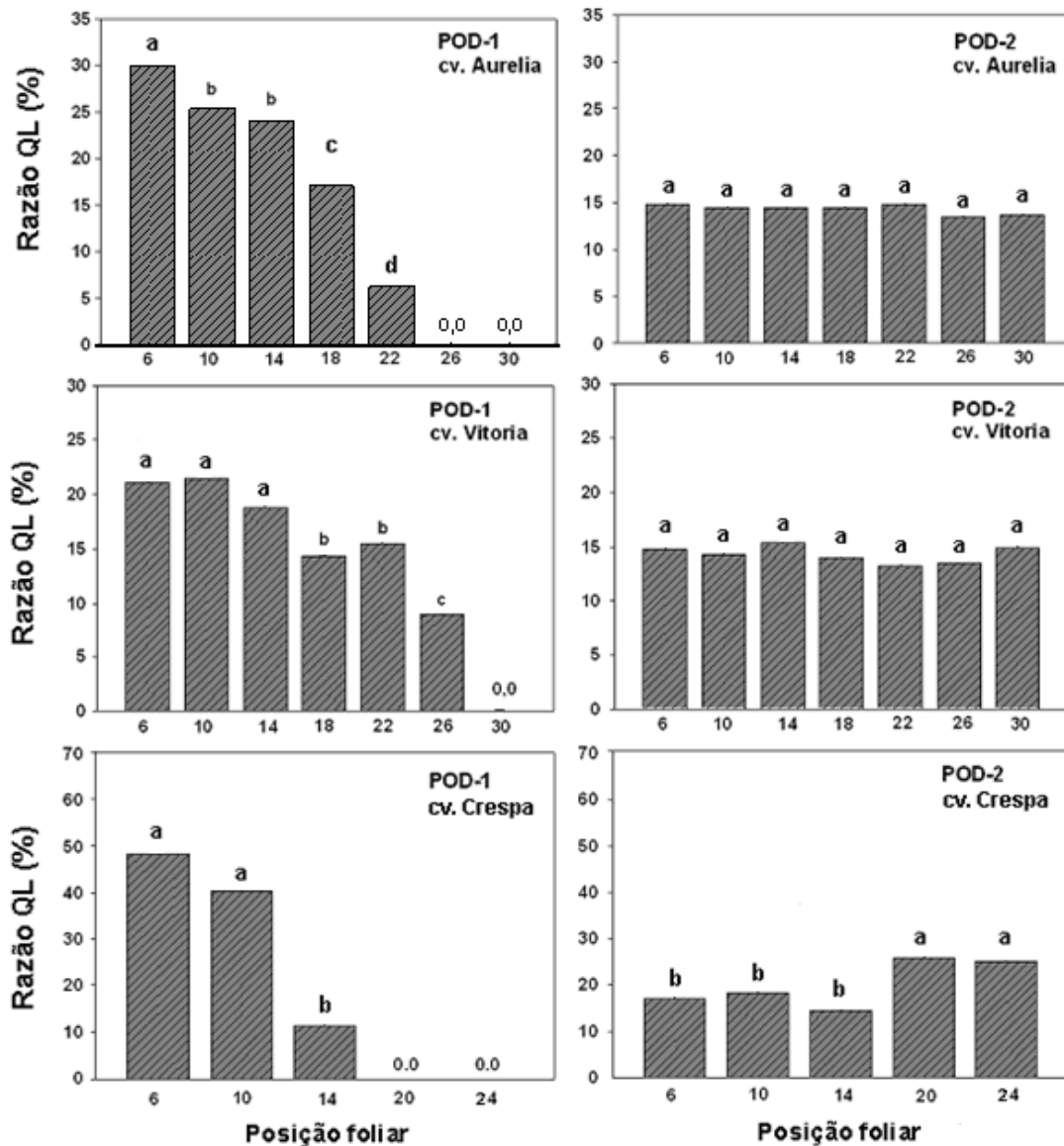
Os movimentos relativos (Mr) das isoperoxidasas catódicas foi entre 0,9 e 0,91 para POD-A1 e entre 0,80 e 0,82 para POD-2, indicando a similaridade das isoenzimas entre as cultivares, e a proximidade dos pesos moleculares entre a POD-1 e POD-2.

A variação no número e intensidade das isoperoxidasas nas três cultivares indica a expressão diferencial de genes que codificam essas enzimas em fases fisiológicas específicas (Alfenas, 2006). Os estudos genéticos confirmam que o polimorfismo isoenzimático corresponde à variação alélica de locis genéticos das formas aniônicas e catiônicas no caso da POD e latente ou ativas no caso da PPO. Além disso, o controle da expressão isoenzimática pode ser regulado ao nível de transcrição, ativação da enzima ou precursor prévio (Scandalios, 1974; Passardi *et al.*, 2005).

A mudança no número de isoperoxidasas com o desenvolvimento foliar foi coincidente com relatos de Ferrer *et al.* (1996) em alface cultivar Iceberg. Esses autores encontraram maior variabilidade em idades intermediárias, e ainda, a expressão de duas novas isoperoxidasas foi associada com a maior atividade da POD solúvel. Por outro lado Cantos *et al.* (2001) observaram a presença de uma única isoenzima em gel de ponto isoelétrico de 4,68 em nervuras de folhas intactas de três cultivares do tipo Iceberg e duas do tipo Romana. Esses autores detectaram mudanças no padrão de isoperoxidasas nas nervuras depois do corte e armazenamento refrigerado por sete dias, e atribuíram a expressão das novas isoperoxidasas a processo de lignificação para reparação das paredes celulares pós-corte. As PODs têm sido reconhecidas pela sua participação no catabolismo do ácido indol-3-acético, a expansão da parede celular e biogênese da lignina (Buchanan *et al.*, 2002).

A variabilidade isoenzimática tem sido associada ao tipo de tecido e idade de desenvolvimento, relatando-se mudanças no número ou nível de expressão, dependendo da espécie e o cultivar (Scandalios, 1974; Carpin *et al.*, 1999; Lepedus *et al.*, 2005; Rudrapa *et al.*, 2005; Hilaire *et al.* 2008). Porém, a presença ou ausência temporal e espacial das isoenzimas tem sido explicada pela regulação heterogênea ao nível de transcrição e ativação da enzima ou do precursor (Scandalios, 1974; Passardi *et al.*, 2005). Essa expressão tem sido encontrada em funções celulares da POD como a biosíntese de lignina durante a formação da parede celular, o catabolismo do AIA, e a extinção de espécies reativas de oxigênio, derivadas de estresses diversos.

Valores da QLR da POD-A1 entre as posições foliares mostraram a formação de três grupos significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) em Vitória e Aurélia, e dois em Crespa (Figura 3), implicando a expressão diferencial de genes que codificam a POD-A1 em 85% das posições foliares da cabeça nas cultivares Vitória e Aurélia, e em 57% das posições foliares em Crespa.

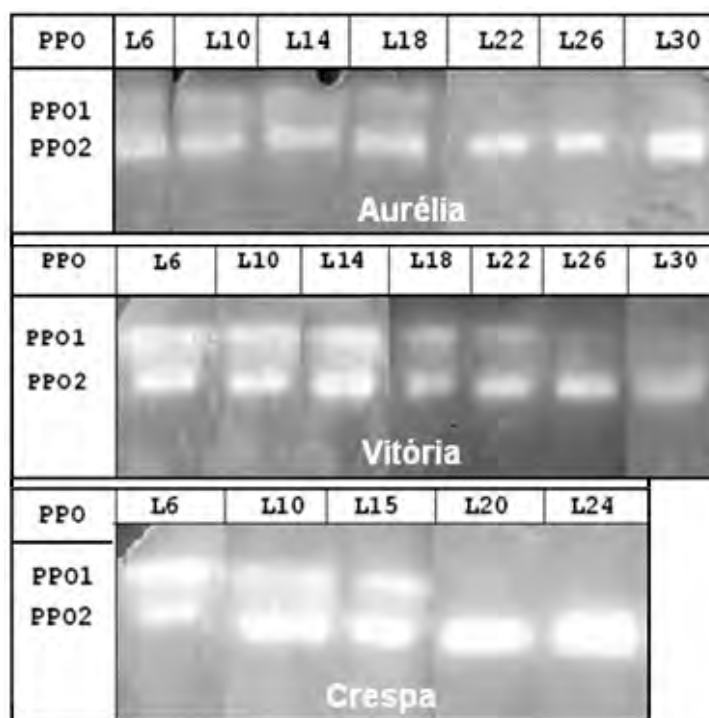


**Figura 3.** Razão do nível Quântico (QLR) de isoenzimas da peroxidase (POD) de três cultivares de alface. Letras iguais nas barras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Os maiores valores de QLR da POD-A1 abrangeram as posições 6, 10 e 14 em Crespa, Aurélia e Vitória, respectivamente (Figura 3). Nessas posições, a intensidade das isoenzimas foi maior que no resto das posições. Por outro lado, a QLR da POD-A2 foi similar ( $p \leq 0,05$ ) em todas as posições foliares das cultivares Vitória e Aurélia, porém em Crespa foi significativamente maior nas posições 20 e 24 correspondente às folhas mais internas. A POD-C1 não variou significativamente entre as posições nas cultivares (Figura 2). No entanto, nas cultivares Crespa e Vitória uma segunda banda catódica bem intensa (POD-C2) foi presente em algumas réplicas entre as posições intermediárias e as mais internas da cabeça. Entretanto, a POD-C2 não esteve presente em todas as repetições. Isto significa que pode ser necessária a

utilização de géis de agarose e poliacrilamida que permitam separar melhor as bandas, para confirmar a presença da POD-C2.

O padrão isoenzimático da PPO foi composto por uma isoenzima (PPO-1) na cultivar Grandes Lagos (Figura 1), e duas isoenzimas (PPO-1 e PPO-2) nas cultivares Aurélia, Vitória e Crespa (Figura 4), com Mr entre 0,8 e 0,81 para PPO-1 e entre 0,70 e 0,72 para PPO-2, e diferenças na intensidade das bandas em função das posições ou estágios de desenvolvimento foliar. O número de isoenzimas da PPO encontrado na alface Grandes Lagos foi coerente com resultados de Flurkey *et al.* (1986), que encontraram uma isoenzima da PPO na cultivar Salad Bowl e Butter, respectivamente. Heimdal *et al.* (1994) encontraram duas isoformas nativas em tecido vascular como as encontradas em Vitória, Aurélia e Crespa. Cantos *et al.* (2001) relataram seis isoenzimas da PPO, sendo duas isoenzimas de marcada intensidade e outras quatro de intensidade reduzida. Consequentemente, os números de isoformas nativas da PPO encontradas no presente experimento estão entre as prováveis PPOs detectadas na espécie.

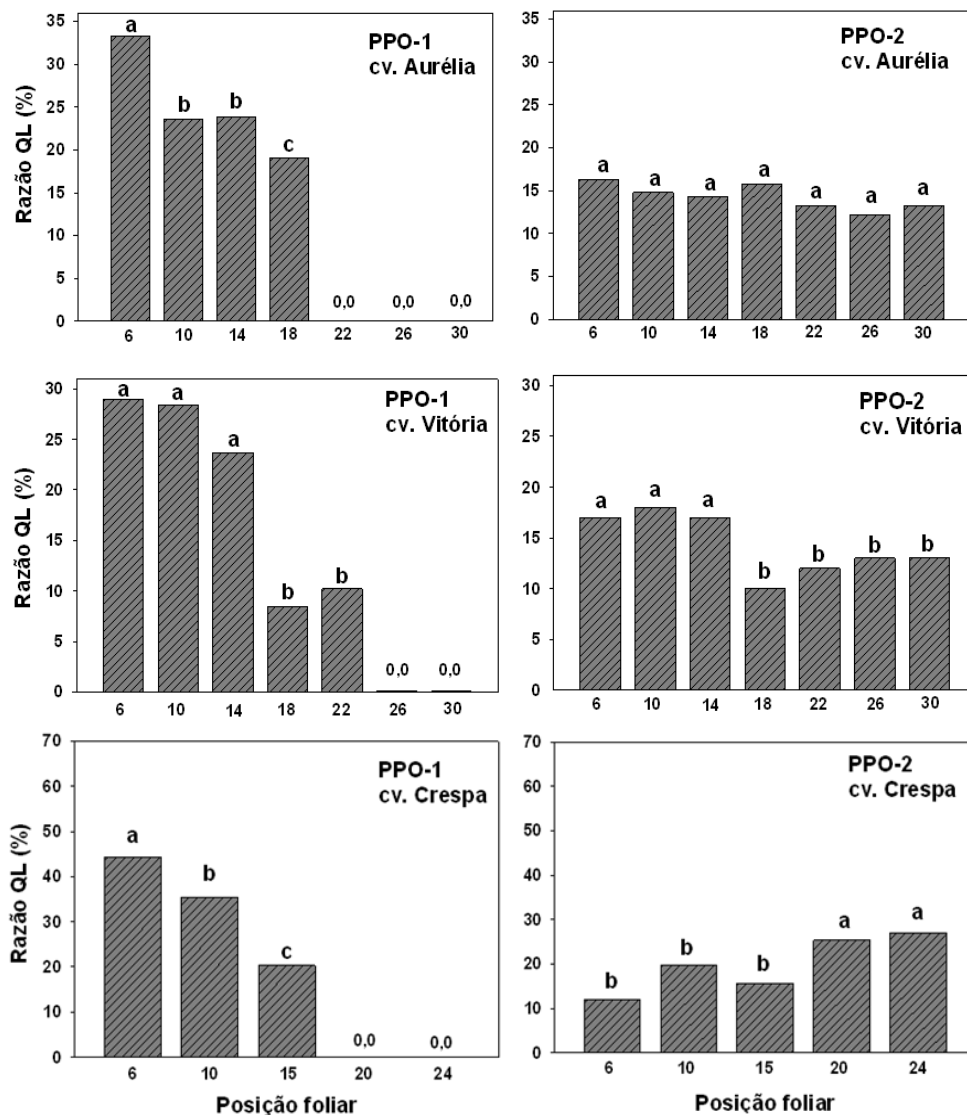


**Figura 4.** Padrão de isoenzimas da polifenoloxidase (PPO) de nervuras de folhas de diferentes posições da cabeça de alface das cvs. Aurélia, Crespa e Vitória. Cada coluna no gel representa uma repetição de três por posição e cultivar. Teor de proteína dos extratos enzimáticos utilizados:  $2,39 \pm 0,21$ ;  $1,49 \pm 0,25$  e  $1,26 \pm 0,05$   $\mu\text{g/mL}$  para Aurélia, Vitória e Crespa, respectivamente.

As isoenzimas PPO-1 foram detectadas a partir das posições 22; 18 e 15 em Vitória, Aurélia e Crespa, respectivamente (Figura 4). Considerando que as séries de posições avaliadas

abrangem a totalidade de folhas comerciais, pode se indicar que entre 57 e 70% das folhas comerciais de fora para dentro da cabeça possuem as isoenzimas PPO-1, indicando que esta isoenzima é expressa a partir de estádios intermediários do desenvolvimento foliar.

A discriminação de médias das QLRs das PPO-1 mostrou a formação de três grupos significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) em Aurélia e Crespa e dois em Vitória (Figura 5), confirmando a expressão diferencial da PPO-1. Os valores das QLRs das PPO-2 nas posições foram similares ( $p \leq 0,05$ ) na cultivar Aurélia, e nas cultivares Vitória e Crespa formaram-se dois grupos diferentes. Porém, na ‘Crespa’ as QLRs das PPO-2 foram significativamente maiores nas posições 20 e 24 (folhas internas), e para a ‘Vitória’ nas posições mais externas.



**Figura 5:** Razão do nível Quântico (QLR) de isoenzimas da polifenoloxidase (PPO) de três cultivares de alface. Letras iguais nas barras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

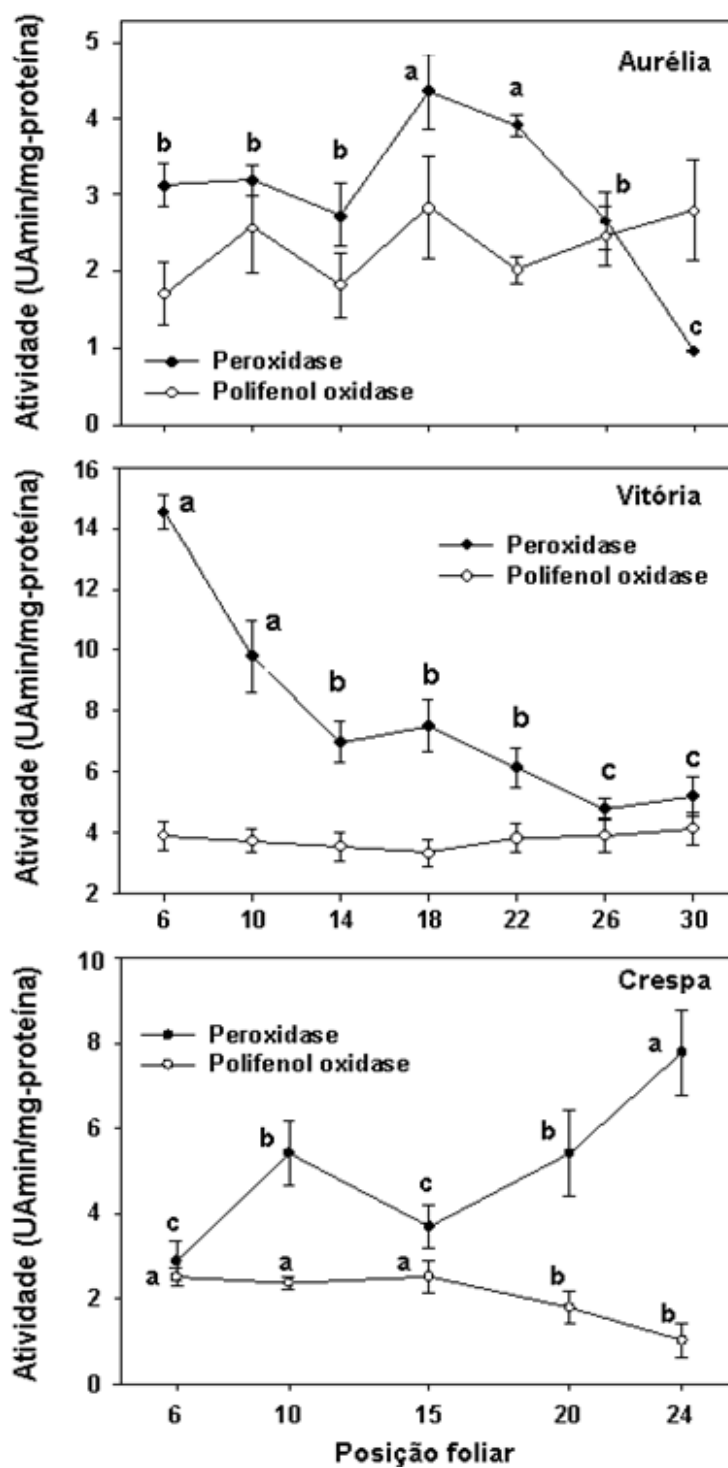
Entre as cultivares, Vitória teve presença das duas isoenzimas da PPO em 70% das posições foliares da cabeça de fora para dentro (Figura 5), enquanto que a ‘Crespa’ e ‘Aurélia’ tiveram ao redor de 60%. Na ‘Crespa’, a maior intensidade-área das isoenzimas foram em direções contrárias em relação as posições foliares. Assim, em quanto a PPO-1 diminuiu até a posição 15<sup>a</sup>, a PPO-2 aumento até a posição 24<sup>a</sup>. Todavia a PPO-1 não esteve presente a partir da posição 20<sup>a</sup>.

A variabilidade dos padrões isoenzimáticos intra-específica pode ser atribuída à existência de diversas isoformas nas formas solúveis, ligadas às membranas, ativas ou latentes, as que diferem nas propriedades químicas, físicas e cinéticas (Ho *et al.* 1999). Acredita-se que essas diferenças somadas à afinidade diferente das enzimas pelos respectivos substratos, mono e difenólicos, sejam responsáveis pela variabilidade no espectro isoenzimático e da atividade dessas enzimas para cada espécie e cultivar. De fato, há evidências de mudanças no conteúdo e composição dos compostos fenólicos totais em função da idade foliar e o sistema de cultivo (Romani *et al.*, 2002).

A variação em número e expressão estágio-específico das isoenzimas nativas da POD e PPO, como demonstrado na presente pesquisa, não foram relatados em estudos prévios da atividade da POD e PPO, e do escurecimento, pois não se consideraram o estágio foliar e a expressão isoenzimática como fatores que possam estar envolvidos nessa relação. É provável que a consideração dessa variabilidade, possa em parte ajudar a explicar a discrepância sobre a associação da atividade da POD e PPO com o escurecimento, estabelecida entre os resultados de pesquisas anteriores (Ke e Salveit, 1989a; Ke e Saltveit, 1989b; Cantos *et al.*, 2001; Degl’Innocenti *et al.*, 2007).

As variabilidades entre as cultivares com relação à posição e expressão das isoenzimas implicam diferenças genéticas com relação aos locos envolvidos, quanto à concentração de enzimas ou substratos nas nervuras. Menores intensidades das bandas isoenzimáticas da PPO e POD foram detectadas na cultivar Aurélia que possui nervuras finas e estreitas em relação às nervuras proeminentes e grossas da Crespa, que apresentou bandas mais intensas. Já a cv. Vitória com nervuras intermediária entre Aurélia e Crespa, teve também intensidades intermediárias nas bandas. Cabe lembrar que as amostras foram liofilizadas e na eletroforese as amostras das cultivares tiveram similar teor de proteína. Conseqüentemente maior fração da proteína total solúvel pode ter estado constituída pelas enzimas nas cultivares com maior atividade enzimática nos géis.

**Atividade específica de enzimas.** A atividade da POD e PPO nas diferentes posições foliares não apresentou padrão similar entre as cultivares. Mas, a atividade da peroxidase foi maior que a atividade da PPO em todas as cultivares (Figura 6).



**Figura 6:** Atividade específica da Peroxidase e polifenoloxidase em nervuras de diferentes posições foliares na cabeça das cvs. Vitória, Aurélia e Crespa. Curvas com letras iguais ou sem letras nas posições não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As barras em cada ponto correspondem ao desvio padrão.

Na cultivar Vitória, houve diferenças significativas na atividade da POD entre as posições foliares, com a maior atividade registrada nas posições 6 e 10, e a menor nas posições 26 e 30, revelando a diminuição da atividade da POD com a imaturidade foliar. Contrariamente, a atividade da PPO foi similar entre todas as posições. Na cultivar Aurélia, a atividade da POD foi significativamente diferente entre as posições, com a maior atividade enzimática medida nas posições intermediárias 18 e 22; verificando-se que maiores atividades ocorrem durante estágios intermediários do desenvolvimento foliar. Inversamente a atividade da PPO foi similar entre as diferentes posições, constatando-se ainda uma variação no nível da atividade entre posições.

Na cultivar Crespa, houve diferença significativa da atividade da POD e PPO entre as posições. A atividade da POD aumentou conforme a imaturidade foliar, registrando as maiores atividades na posição 24<sup>a</sup>. De forma contrária, a atividade da PPO foi maior nas posições 15, 10, e 6, diminuindo com a imaturidade foliar (Figura 6).

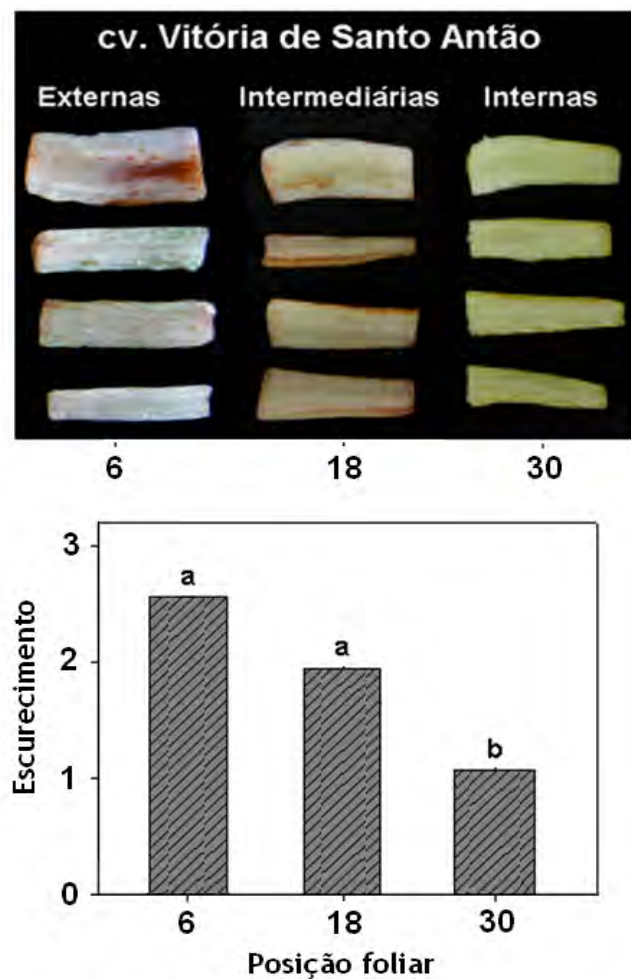
A maior atividade da POD nas folhas externas observada em Vitória e particularmente em Aurélia é coerente com resultados de Ferrer *et al.* (1995), que encontraram na alface Iceber cv. Nordic Grande aumentos de 1,8 vezes na atividade da POD solúvel em folhas totalmente expandidas com 56 dias de idade, versus folhas extremadamente jovens de 21 dias. Esses autores atribuíram mudanças da atividade da POD solúvel à expressão de novas isoperoxidases.

A variação da atividade da PPO como observado em Crespa não está de acordo com o consenso geral da atividade da PPO ser muito mais alta em frutas verdes e folhas jovens, devido à função de proteção da PPO contra infecções e injúrias das plantas em crescimento (Vamos-Vigyazo 1981; Lanker *et al.*, 1987; Felton *et al.*, 1989; Yoruk & Marshall, 2003). Ainda, variações da atividade da PPO no desenvolvimento foliar de espinafre foram associadas com a ativação da PPO latente, com valores elevados de atividade antes, mas não depois do início da senescência (Meyer & Biehl 1980; Lieberei *et al.*, 1981), implicando maiores atividades na maturidade foliar. Por outro lado, a ausência de diferenças na atividade específica da PPO em Vitória e Aurélia em função das posições é coerente com resultados de Fukumoto *et al.* (2002). Esses autores não encontraram qualquer diferença na atividade da PPO e POD entre nervuras de folhas externas e internas, porém, maiores escurecimentos nos tecidos fotossintéticos e nervuras das folhas exteriores e suas similares de posições mais internas na cabeça.

Resultados prévios e os do presente experimento demonstraram que a atividade específica da PPO e POD em nervuras de folhas intactas, podem ou não apresentar variabilidade,

dependendo da cultivar e posição foliar, independentemente do padrão isoenzimático nativo encontrado.

**Escurecimento de nervuras.** A avaliação do escurecimento realizado em nervuras da cv. Vitória constatou diferenças significativas entre três posições foliares estudadas (Figura 7). O escurecimento foi maior nos segmentos de nervuras das posições 6 e 18, versus ao escurecimento das nervuras da posição 30<sup>a</sup>, constatando-se uma gradiente de susceptibilidade ao escurecimento conforme a maturação foliar (Figura 7), fenômeno similar ao relatado previamente por Fukumoto *et al.*, (2002) em alface Iceberg, confirmando-se uma gradiente natural de susceptibilidade ao escurecimento que não pode ser explicado pela atividade das enzimas que participam do escurecimento, devido à variabilidade de respostas encontradas da atividade ao longo das posições da cabeça, ou ao longo do desenvolvimento foliar de alface.



**Figura 7.** Aparência de nervuras e escores de escurecimento de nervuras de três posições foliares da cabeça de alface cv. Vitória, embaladas em PEBD, armazenadas a 5°C por 6 dias. Letras iguais entre as barras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Entre as características previamente avaliadas em Vitória, observa-se relação entre a variação do escurecimento e a variação em número e expressão das enzimas oxidativas com a maturidade foliar. Embora o escurecimento fosse similar estatisticamente entre folhas intermediárias e externas (Figura 7a), as diferenças de escurecimento foram visivelmente evidentes entre as nervuras das três posições foliares avaliadas, constatando-se a existência de uma tendência ao escurecimento com a maturidade foliar.

A variação na atividade específica da PPO e POD encontrada em Vitória, Crespa e Aurélia, mostram a ausência de qualquer padrão comum. Isto implica que as atividades dessas enzimas são altamente influenciadas pelo genótipo, o ambiente e o desenvolvimento foliar, fato que pode explicar, em parte, a controvérsia sobre a associação entre o escurecimento e a atividade da PPO e POD, previamente relatadas (Cantos *et al.*, 2001; Ke & Saltveit, 1989; Fukumoto *et al.*, 2002; Degl'Innocenti *et al.*, 2007).

A variabilidade isoenzimática da POD e PPO em número e expressão estágio-específico como demonstrado no presente experimento, implica a necessidade de considerar esse fator ligado ao cultivar em estudos de escurecimento enzimático e seu controle. A variação isoenzimática da POD-A1 e PPO-1 foram similares entre as cultivares, e essa característica foi coerente com a variação do escurecimento em função da posição foliar na cultivar Vitória. Em consequência, se pode implicar que independentemente do nível da atividade específica da POD e PPO nativa, nervuras das folhas mais externas da cabeça escureceram em maior grau que as de posições mais internas. Nesse sentido a seleção de genótipos com baixo potencial de escurecimento das nervuras das folhas externas, colheitas antecipadas e o aprimoramento de doses e tipos de inibidores específicos para as isoenzimas, podem contribuir para melhorar a qualidade e conservação da alface minimamente processada.

## CONCLUSÕES

Existe variabilidade em número e expressão estágio-específico de isoenzimas da PPO e POD em nervuras de alface, sendo provável encontrar padrões isoenzimáticos com duas (POD-1 e PPO-1) a quatro isoenzimas na POD (POD-A1, POD-A2, POD-C1 e POD-C2), e uma (PPO-1) a duas na PPO (PPO-1 e PPO-2) dependendo da cultivar.

A variabilidade dos padrões isoenzimáticos da PPO e POD são moduladas pelas isoenzimas POD-A1 e PPO-1 variando em número e intensidade entre as posições foliares.

A ausência das isoenzimas POD-A1 e PPO-1 podem estar relacionada com a menor susceptibilidade ao escurecimento das nervuras. As nervuras imaturas não apresentam as bandas das isoenzimas POD-A1 e PPO-1 e não escurecem propriamente. Entretanto, o maior

escurecimento das folhas maduras pode também ser resultado da interação entre o conjunto de isoenzimas e não apenas pela expressão das isoenzimas POD-A1 e PPO-1.

O escurecimento e as isoenzimas POD-A1 e PPO-1 se manifestam a partir de estádios intermediários do desenvolvimento foliar, tendo as maiores intensidades e expressão em folhas maduras ou da região externa da cabeça de alface.

As atividades específicas “*in vitro*” da POD e PPO foram variáveis entre as posições foliares, sem padrão comum entre as cultivares.

Maiores atividades específicas da POD e PPO podem ser encontradas em sentido das posições mais externas, intermediárias ou internas, dependendo da cultivar.

A existência de significativa variabilidade isoenzimática e do escurecimento verificada entre as posições foliares da cabeça de alface constata a heterogeneidade fisiológica e bioquímica entre as camadas foliares. E, essa heterogeneidade não pode ser negligenciada em estudos do escurecimento enzimático em alface do tipo folha solta.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao programa PEC-PG CAPES pela bolsa de Doutorado, na pessoa de Milton Edgar Pereira Flores.

#### 4. CAPÍTULO 3

### EFEITO DO ACIDO ASCÓRBICO NO ESCURECIMENTO E QUALIDADE VISUAL DE ALFACE MINIMAMENTE PROCESSADA

#### RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento de 0, 10, 20 e 30 mM de ácido L-ascórbico (AA) sobre o escurecimento e a qualidade visual de nervuras dissecadas de folhas da posição média e interna das cabeças de alface, folhas inteiras da região externa, média e interna da cabeça, e corações minimamente processados. Os produtos foram embalados em polietileno de alta densidade PEAD e conservados a 5°C até as avaliações. O ácido ascórbico influenciou de maneira distinta o grau de escurecimento das nervuras e na qualidade visual de folhas inteiras. A atividade da polifenoloxidase e peroxidase variou com a aplicação de AA e com a região foliar avaliada. A aplicação de ácido ascórbico teve influência negativa na manutenção da qualidade visual de nervuras e folhas inteiras minimamente processadas, e efeito benéfico somente nos corações. Conclui-se que a ação do AA influencia o escurecimento e a qualidade visual dos produtos em interação com o tipo de tecido e idade do tecido.

**Palavras-chave:** Alface, minimamente processados, ácido ascórbico exógeno, escurecimento, qualidade visual, atividade da polifenoloxidase e peroxidase.

#### ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of the treatment with 0, 10, 20 and 30 mM of L-ascorbic acid on mid-ribs of middle and inner leaf position within lettuce rosette and whole leaves of the outer, middle and inner position, and hearts lettuce minimally processed. Those products were bagged in polyethylene high density bags and storages to 5°C until its evaluation. The ascorbic acid influenced in different way in the browning of mid-ribs, and the visual quality of whole leaves. The activity of PPO and POD varied with the application of AA and with leaf region evaluated The ascorbic acid had negative influence in the visual quality of

mid-ribs and whole leaves minimally processed, and beneficial effect only in hearts. In conclusion, the AA influences the browning and visual quality of the products in interaction with the tissue and stage-specific.

**Key-words:** Lettuce, minimally processed, exogenous ascorbic acid, browning, visual quality, activity of the polyphenoloxidase and peroxidase.

## INTRODUÇÃO

O escurecimento enzimático é uma desordem comum durante a conservação pós-colheita de produtos minimamente processados. Esta alteração fisiológica se manifesta nas folhas de alface como manchas avermelhadas (russet spot), manchas marrons (brown stain), marrom ferrugem (rusty brown), extremos marrons (edge brown) e nervura rosa (pik rib). O escurecimento enzimático é resultado da oxidação de compostos fenólicos mediada pelas enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD). Essas enzimas reagem com fenóis simples e difenois sucessiva ou simultaneamente levando à formação de *o*-quinonas que polimerizam com aminoácidos e formam pigmentos na epiderme dos tecidos (Ilker *et al.*, 1977) de cores marrons, avermelhados ou escuros, dependendo do substrato utilizado no processo oxidativo (Castañer *et al.*, 1999; Degl'Innocenti *et al.*, 2005). Além dos polifenóis, a reação da PPO requer a presença de O<sub>2</sub>, e a POD de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido na respiração ou induzido pelo corte dos tecidos (Saltveit, 2000; Degl'Innocenti *et al.*, 2007). As reações oxidativas podem também formar odores indesejáveis, aumentando a deterioração da qualidade sensorial (Loaiza-Velarde *et al.*, 1997; Garcia & Barret, 2002).

O ácido L-ascórbico tem sido utilizado eficientemente para diminuir ou inibir as atividades da PPO e POD em ensaios de atividade enzimática, a concentrações entre 0,03 a 2 mM de AA em meios de reação com pH ajustado a 6 ou 6,5 (Yang *et al.*, 2001; Nkya *et al.*, 2003; Onsa *et al.*, 2004; Karsten, 2007; Serrano-Martínez, 2008). Já no controle do escurecimento em vegetais minimamente processados, o ácido ascórbico tem sido utilizado em concentrações de 0,3 a 1,5% (Garcia & Barret, 2002; Roura *et al.*, 2003; Grzegorzewska, 2007; Jeong *et al.*, 2008) e em concentrações molares de 1,25 a 2,5 mM (Lamikanra & Watson, 2001; Esparza-Rivera, *et al.*, 2006) sem correções do pH a valores biológicos, e com resultados variáveis em função da espécie, cultivar, concentração de AA e a combinação com outros tipos de inibidores e/ou vácuo. Todavia o efeito do AA pode ser temporário, de penetração insuficiente nos tecidos dos alimentos, e causar alterações na cor e sabor (Garcia & Barret, 2002).

O controle do escurecimento do AA está baseado no seu poder redutor sobre as *o*-quinonas, as que são convertidas em difenois incolores e estáveis, evitando assim a polimerização das *o*-

quinonas (McEvily *et al.*, 1992; Nicolas *et al.* 1994; Ashie *et al.* 1996; Marshall *et al.* 2000). A ação acidulante do AA tem sido também indicada como outro mecanismo de prevenção do escurecimento por diminuir o pH do meio a valores abaixo do ótimo requerido para a atividade catalítica da PPO e POD. Em meio ácido, é provável que ocorra a protonação de grupos catalíticos essenciais, mudanças na conformação do sitio ativo das enzimas, desnaturação irreversível da proteína e a redução da estabilidade das ligações das enzimas com o substrato (Segel 1979; Voet *et al.*, 2002). Adicionalmente, no caso da PPO, a acidez pode diminuir a força das ligações da PPO com o sitio ativo de cobre, e a ação pro-oxidante do AA pode manter íons metálicos de transição Fe(III) e Cu(II) nas suas formas reduzidas e permitindo a esses íons metálicos reagir com o peróxido de hidrogênio para formar radicais altamente reativos (Smirnoff, 1996, Davey *et al.*, 2000).

Ótimos de pH em alface se encontram próximos da neutralidade. Elevadas atividades catalíticas da PPO tem sido relatadas em pH entre 5,0-8,0 com temperaturas de 25 a 35°C (Heindal *et al.*, 1994; Doğan & Salman, 2007; Gawlik-Dziki *et al.*, 2008). Máximos de atividade da POD tem sido encontradas em grande variação de pH entre 3,5 e 8,0, com ótimos em pH de 3,5 e 3,8 em *Vanilla planifolia* (Márquez, *et al.*, 2008) e batata doce (Castillo *et al.*, 2002), respectivamente, e ótimos de pH de 7 em *Olea europea* L. (Saraiva *et al.*, 2007). Essa maior amplitude de atividade catalítica em pH baixos da POD tem sido explicada pela maior variabilidade isoenzimática e pela participação de POD em vários processos desde a germinação até a senescência da planta (Scandalios, 1974).

Por outro lado, além da diversidade de compostos fenólicos presentes em alface (Llorach *et al.*, 2008), há evidências da variação da composição e concentração desses compostos durante o desenvolvimento foliar (Romani *et al.*, 2002). Essas variações de concentração podem influenciar os parâmetros catalíticos da PPO e POD, e/ou mudar o tipo de inibição do AA. Em estudos cinéticos da PPO com substratos fenólicos a inibição da PPO foi do tipo competitivo utilizando catecol como substrato fenólico, e de ação mista (competitivo e não competitivo) quando a PPO reagiu com 4-metilcatecol e pirogallol como substratos fenólicos (Dogam & Salman 2007). Similarmente, tem se encontrado especificidade maior da POD por polifenóis específicos como o ácido clorogênico em cultivares de alface susceptível ao escurecimento, sugerindo-se em consequência do envolvimento da POD e do ácido ascórbico nesse processo (Degl'Innocenti *et al.*, 2005). Entretanto, visto a variabilidade de resultados, anteriormente citados, existe necessidade de ampliar o conhecimento sobre a influência do AA exógeno na qualidade de minimamente processados considerando o estágio e o tipo de tecido. Assim, a pesquisa teve como objetivo estudar o efeito do tratamento com ácido ascórbico sobre o

escurecimento e a qualidade visual de nervuras, folhas e corações minimamente processados.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material biológico e regiões foliares avaliadas.** Cabeças de alface da cv. Vitória de Santo Antão, cultivadas em campo e adubadas conforme Fontes (1999) foram colhidas com 38 dias após o transplante (DAT). Dessas cabeças, seis folhas sucessivas foram separadas da região externa, média e interna entre a primeira folha madura externa, e a folha com > 10 cm da região interna da cabeça. As folhas com tamanho  $\leq 10$  cm aderidas à porção superior do caule constituíram os corações, obtidos por corte do caule a 5 mm abaixo da última folha.

**Produtos minimamente processados.** Foram processadas as nervuras centrais inteiras de folhas da região externa, média e interna; folhas inteiras da região média e interna; e corações, seguindo o protocolo de processamento para couve (Carnelossi, 2000), sem as etapas de corte e centrifugação. Esta última foi substituída por chacoalhamento e vibração em peneira e secagem final com papel toalha sanitizado em fábrica. Cada produto foi processado separadamente, começando pelas nervuras, seguido das folhas e finalmente os corações. Para cada processo foram preparadas novas soluções para sanitização, enxágue e tratamento de ácido ascórbico.

**Tratamento com ácido ascórbico.** O tratamento com ácido ascórbico foi aplicado posteriormente ao enxágue em água potável (3 ppm de cloro ativo), sendo mergulhados os produtos processados em solução contendo 0; 10; 20 e 30 mM de ácido L(+) ascórbico (0,0; 0,176; 0,352 e 0,528 % de AA) por 60 segundos, aproximadamente. O nível 0 mM de AA foi considerado controle, sendo constituído por água potável.

**Embalagem e conservação.** Cada produto foi embalado em sacos de polietileno de alta densidade com  $e=12$   $\mu\text{m}$ , e logo conservados a  $5\pm 0,5$  °C por 8, 15 e 20 dias para nervuras, folhas inteiras e corações, respectivamente. O tempo de conservação foi determinado pela manifestação de alterações na qualidade visual dos produtos, e então avaliadas as características a seguir.

**Escurecimento de nervuras.** O escurecimento do lado abaxial de nervuras das três regiões em estudo foi avaliado no oitavo dia de conservação a 5°C, mediante escala de notas (Figura 1), com sete graus de classificação: 1- sem escurecimento (similar a corte fresco); 3-leve, 5- média, 7- forte escurecimento (manchas coloreadas coalescentes na nervura abaxial). Valores intermediários entre notas consecutivas foram considerados como 2, 4 e 6. O escurecimento no corte da base da nervura foi avaliado com escala similar (Figura 1), embora apenas nas posições média e interna. As escalas foram elaboradas a partir da variação do escurecimento em ambas

as superfícies avaliadas. O experimento foi realizado em DIC com quatro repetições, e cinco a seis nervuras por unidade experimental.



**Figura 1.** Escala de sete notas para o escurecimento da superfície abaxial de nervuras e da superfície cortada da base de nervuras de alface cv Vitória. As notas pares 2, 4 e 6 correspondem a valores intermediários entre as notas ímpares.

**Atividade da polifenoloxidase e peroxidase em nervuras.** A atividade da polifenoloxidase e peroxidase foi determinada “*in vitro*” no final do período de conservação das nervuras da região media e interna. Dessas nervuras, as regiões cortadas durante o processamento e que escureceram durante a conservação foram dissecadas com bisturi a uma profundidade aproximada de 2 mm, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido simultaneamente com amostras do tecido não escurecido restante da dissecação. Ambos os tipos de amostras foram conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até os ensaios enzimáticos da PPO e POD. Esta análise não foi realizada nas nervuras externas devido ao amolecimento avançado das regiões escurecidas, ficando muito variável a definição da profundidade de dissecação do tecido.

Para o ensaio enzimático da PPO e POD foram utilizadas 2,5 g de tecido não escurecido (TNE), e 1,0 g de tecido escurecido (TE), aproximadamente. A solução extratora da POD e da PPO foram adaptadas de Neves (2003) e Gawlik-Dziki *et al.* (2008) respectivamente. A solução extratora para a POD foi composto por tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 6,5 contendo bissulfeto de sódio 0,1% e cloreto de sódio 0,15M, e para a PPO tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 1% polivinilpirrolidona PVP-40T e 10 mM de ácido ascórbico. As enzimas

foram extraídas por maceração das amostras com a solução extratora na relação 1:1,5, em almofariz cerâmico resfriado em banho de gelo. O macerado foi centrifugado a 17.000 g durante 30 minutos a 4°C, e os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático. O ensaio enzimático para ambas as enzimas foi realizado a 25 °C. O meio de reação para a POD foi composta por 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5), 0,5 mL de guaiacol (1,7%), 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,8%) e uma alíquota de extrato enzimático até 0,5 mL. O meio de reação para PPO foi 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0), 0,5 mL de catecol 60 mM e uma alíquota de extrato enzimático até 1,0 mL. A atividade da PPO, POD e proteínas solúveis totais foram medidas em espectrofotômetro a 420, 470 e 595 nm, respectivamente. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em unidades de absorbância por minuto dividido por miligramas de proteína (UA min / mg proteína) conforme Neves (2003). O experimento foi realizado em DIC com quatro repetições e duplicatas por repetição. As unidades experimentais foram amostras compostas provenientes de cinco nervuras por repetição.

**Qualidade visual de folhas inteiras.** A qualidade visual (QV) das folhas foi calculada como  $QV = (\text{Folhas sadias} / \text{Total de folhas por embalagem}) * 100$ , e expresso em porcentagem (%). O **aspecto sadio** foi considerado como a folha túrgida e sem defeitos graves como ser: áreas com podridão, descoloramento ou senescência, independente do número e tamanho da área comprometida pelo defeito. A denominação de “defeito grave” seguiu a descrição contida na “Classificação da alface” do programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros ([www.hortibrasil.org.br/jnw/index.php](http://www.hortibrasil.org.br/jnw/index.php)). A QV das folhas, da região externa, média e interna, foi determinada aos 15 dias de conservação a 5°C, e avaliada em DIC com quatro repetições e quatro folhas por embalagem como unidade experimental para cada região da cabeça.

**Qualidade visual de corações.** A qualidade visual dos corações foi avaliada, aos 15 dias de conservação a 5°C, como a porcentagem de folhas sadias por coração, e seguindo a metodologia aplicada para as folhas inteiras. A característica foi avaliada em DIC com quatro repetições e três corações por embalagem.

**Escurecimento do caule de corações.** A região cortada dos caules dos corações foi medida com colorímetro tri-estímulo (Chromameter-400, Minolta, Osaka, Japam) para avaliar as diferenças de cor associadas ao escurecimento pós-armazenamento. As medições foram realizadas em três pontos aleatórios no raio médio da base do caule e a cor expressa como L, a, b (luminosidade, valor vermelho e valor amarelo, da escala de Hunter). Com os dados CIELab foi calculado o ângulo Hue como:  $\tan^{-1}(b/a)$  quando  $a > 0$  e  $b \leq 0$ , e  $180^\circ + \tan^{-1}(b/a)$  quando  $a < 0$  (Minolta Câmera Manual, 1987), para a estimação do escurecimento. Valores menores do

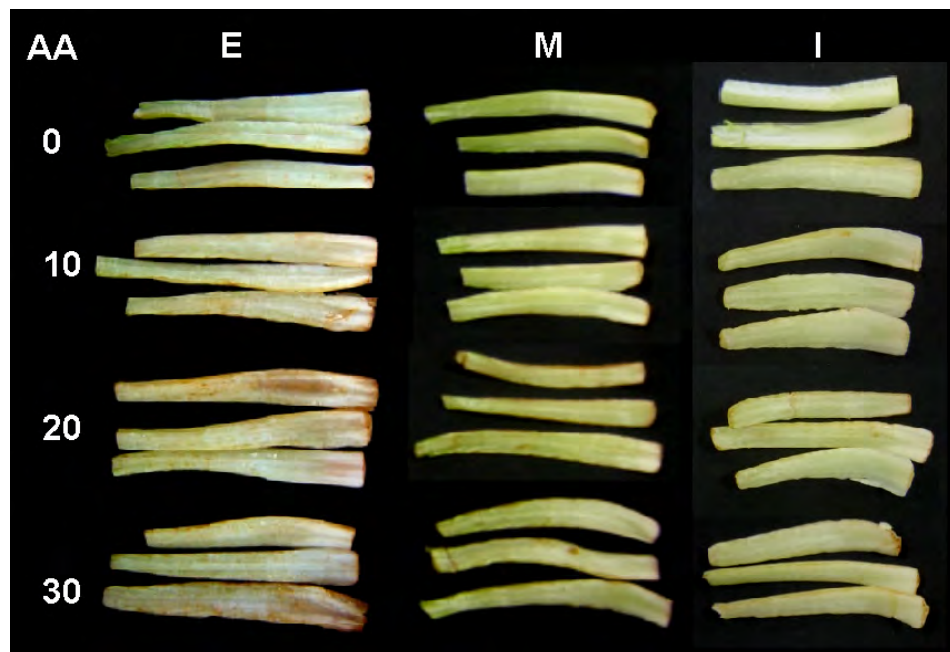
ângulo Hue indicam maior escurecimento. O colorímetro foi calibrado com o azulejo branco padrão ( $L=93,5$ ,  $a=-1,0$ ;  $b=0,8$ ), antes de cada serie de medições.

Os dados foram analisados em função do delineamento de cada experimento pelo teste de F ( $p \leq 0,05$ ) e Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), com o software estatístico SAEG 9.1 da Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Escurecimento de nervuras.** O escurecimento das nervuras foi maior com o aumento das concentrações de ácido ascórbico (AA) em relação ao controle das três regiões (Figura 2 e Tabela 1). Nas nervuras externas houve diferença significativa em todos os teores de AA utilizados, com 30 mM de AA apresentando o maior grau de escurecimento. Nas nervuras médias e internas as diferenças foram detectadas entre o nível 10 mM de AA em relação os níveis 20 e 30 mM que tiveram os maiores escurecimentos e sem diferenças entre si.

Entre nervuras de regiões diferentes da cabeça, as externas tiveram maiores escores de escurecimento em todas as concentrações de AA, em relação às nervuras da região média e interna, e sem diferenças entre os controles das três regiões. O escurecimento entre as nervuras médias e internas nas mesmas concentrações de AA foram similares, exceto na concentração 20 mM de AA, onde o escurecimento da nervura média foi maior que a interna.



**Figura 2.** Escurecimento de nervuras de folhas da região externa (E), média (M) e interna (I) da cabeça de alface cv. Vitória, tratadas com 0 a 30 mM de ácido L-ascórbico (AA), embaladas em sacos de PEAD e conservados a 5 °C por 8 dias.

**Tabela 1.** Escurecimento da superfície abaxial de nervuras de alface Vitória, tratados com ácido L-ascórbico.

Ácido L-ascórbico (mM)	Escore de escurecimento		
	Região da cabeça		
	Externa	Média	Interna
0 (Controle)	1,83 c A	1,58 c C	1,67 c B
10	3,12 d A	2,33 d B	2,04 d C
20	4,39 b A	2,96 b B	2,35 b C
30	5,08 a A	3,26 a B	2,48 a C
Média	3,6±1,46	2,5±0,74	2,1±0,35
CV (%)	26,3	27,5	25,7

Médias com letras minúsculas iguais na coluna e maiúscula nas fileiras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As nervuras foram embaladas em sacos de PEAD, e conservadas a 5°C por 8 dias.

O escurecimento do corte basal das nervuras (CBN) de folhas da região média e interna da cabeça (Tabela 2) aumentou com as doses crescentes de AA, confirmando a tendência observada na superfície abaxial das nervuras (Tabela 1). Entretanto, houve melhor discriminação do escurecimento entre as concentrações no CBN em relação ao escurecimento nas superfícies das nervuras. Isto pode dever-se ao fato que o corte criou uma superfície uniformemente de resposta, a diferença da manifestação aleatória do escurecimento na superfície das nervuras. Embora, ambos os tipos de manifestações, possam também corresponder a tipos diferentes de escurecimento, como descrito por Ilker *et al.* (1977).

**Tabela 2.** Escurecimento do corte basal de nervuras de alface Vitória, tratados com ácido L-ascórbico.

Ácido Ascórbico (mM)	Escore de escurecimento	
	Região da cabeça	
	Média	Interna
0 (Controle)	2,04 c A	1,71 d B
10	3,92 b A	2,46 c B
20	4,83 a A	3,25 b B
30	4,92 a A	4,12 a B
Média	3,93±1,4	2,88±1,1
CV (%)	21,89	21,69

Médias com letras minúsculas iguais na coluna e maiúscula nas fileiras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As nervuras foram embaladas em sacos de PEAD, e conservadas a 5°C por 8 dias.

Os maiores escores de escurecimento das nervuras em folhas externas em relação com as nervuras médias e internas corroboraram a existência de uma gradiente natural de susceptibilidade ao escurecimento, no sentido das nervuras externas, e que esse processo foi intensificado pela aplicação de AA, contrariamente ao efeito esperado da aplicação de AA.

Roura *et al.*,(2003) encontraram elevados valores de escurecimento e menor de qualidade visual em folhas de alface do tipo Cós tratadas com 0,5% de ácido ascórbico, sendo esse fenômeno similar ao do controle constituído por água clorada contendo 1% de hipoclorito de sódio. Todavia, a mistura de 1% de AA mais com 0,1% de cloreto de cálcio não conseguiu manter a qualidade visual de consumos aos 7 dias de conservação.

Em cubos de maçã Fuji minimamente processados, Jeong *et al.*, (2008) encontraram também maior escurecimento após o tratamento com 0,5% de ácido ascórbico, e com escurecimentos semelhantes ao atingidos pelo controle constituído de água destilada, a partir do quarto dia de conservação até o final do período de armazenamento. Houve também aumento contínuo do conteúdo de compostos fenólicos até o final do período de conservação, e aumento transiente da atividade da PPO nos primeiros dias pós-corte. Entretanto, Esparza-Rivera *et al.*, (2006) encontraram aumentos significativos no valor  $a^*$  da escala de Hunter em alfaces tratadas com AA 2,5 mM, indicando avermelhamento dos tecidos, e esse fenômeno foi atribuído à acumulação de compostos derivados da degradação do ácido ascórbico, sendo uma provável via, a formação de furfural.

As superfícies cortadas das bases das nervuras de alface desenvolveram coloração avermelhado-marrom ao longo do período de conservação, e essa coloração tem sido similar também nas superfícies cortadas dos caules (Figura 1).

Castañer *et al.*, (1991), tem indicado a influência do tipo de substrato fenólico na cor final do processo de escurecimento enzimático. Assim, é provável que o caule e nervuras possuam substratos comuns com maior especificidade para alguma das enzimas, visto a semelhança na cor final do escurecimento enzimático.

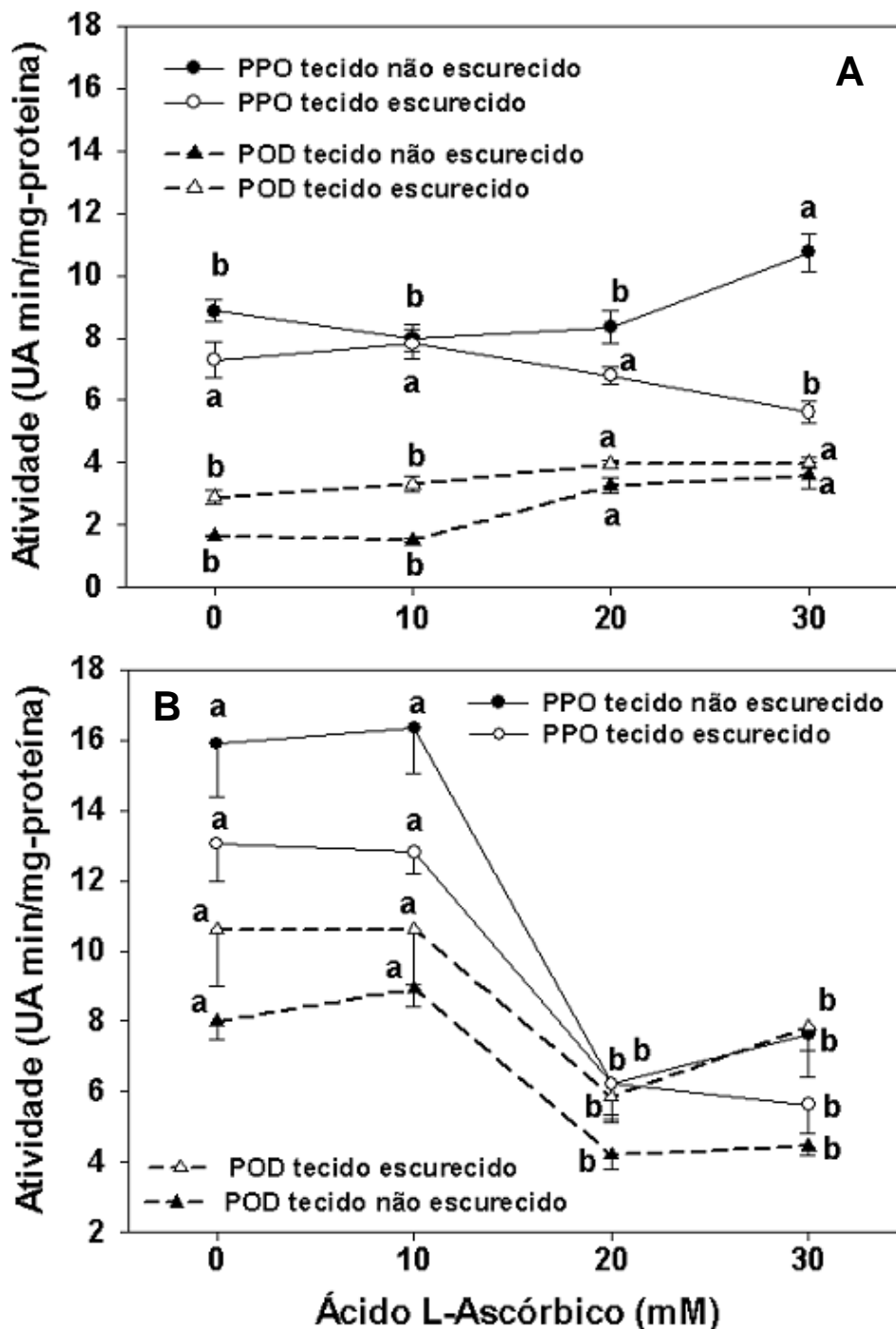
Os resultados obtidos por Roura *et al.*,(2003), Esparza-Rivera *et al.*, (2006), e Jeong *et al.*, (2008) constataram também a baixa eficiência do AA no controle do escurecimento, quando utilizadas soluções de AA entre 0,3 e 0,5%. Entretanto o menor escurecimento atingido com o controle (sem AA) e com 10 mM (0,17%) de AA, obtidos na presente pesquisa, é indicativo de que o ácido ascórbico, de alguma maneira, favoreceu o escurecimento na faixa estudada. Teoricamente, a inibição do escurecimento enzimático pode ser atingida por diminuições do pH abaixo de 2 ou em unidades abaixo do pH ótimo da PPO e da POD (Garcia & Barret, 2002) o

que não parece ter acontecido com alface. A concentração de 10 mM teve pH em torno de 3, e nas concentrações de 20 e 30 mM de AA tiveram pHs de 2,7 e 2,5, respectivamente. Estes dados sugerem que os baixos pHs podem ter inibido parcialmente a PPO e a POD, embora favorecendo a atividade da POD ou a sua interação com a PPO. Os baixos pHs podem ter induzido estresse oxidativo com maior produção de  $H_2O_2$ , o que pode também ter favorecido a atividade da POD visto que esta enzima é menos afetada por baixos pHs e a maior diversidade de isoenzimas e substratos com os quais pode reagir (Scandalios, 1974).

**Atividade da polifenoloxidase e peroxidase.** A atividade específica da PPO e POD *in vitro*, realizada com amostras dos tecidos escurecidos e não das nervuras que escureceram posterior ao tratamento com AA e no oitavo dia de conservação a 5 °C descreveram respostas diferentes em função de serem nervuras da região média ou interna (Figura 3).

Nas nervuras de folhas da região média da cabeça (Figura 3), tratadas com AA durante o processamento mínimo, a atividade da PPO do tecido não escurecido foi similar entre 0 e 20 mM de AA, mas com aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) em tecidos tratados com 30 mM de AA. Na maior concentração de AA, a atividade da PPO no tecido escurecido teve queda significativa (Figura 3a). Mas, não houve diferenças nas concentrações entre 0 e 20 mM de AA. A atividade da POD aumentou significativamente a partir de 20 mM de AA nos tecidos escurecidos e essa tendência foi também similar no tecido não escurecido (Figura 3), evidenciando-se que as concentrações de AA entre 20 e 30 mM de AA aumentaram a atividade da POD em ambos os tipos dos tecidos.

Nas nervuras de folhas da região interna da cabeça (Figura 3), as atividades da POD e PPO foram similares entre 0 e 10 mM de AA ( $p \leq 0,05$ ) nos tecidos com e sem escurecimento. Houve significativa diminuição das atividades enzimáticas a partir de 20 mM de AA em relação a 0 e 10 mM de AA, e entre 20 e 30 mM de AA não houve diferenças. Porém, a redução da atividade da POD foi menor que da PPO em ambos os tipos de tecidos, isto é, com e sem escurecimento. Todavia, observaram-se maiores atividades de ambas as enzimas nos tecidos não escurecidos versus os escurecidos, de maneira similar ao ocorrido com nervuras de folhas médias. Isto significa que independente da nervura ser da região média ou interna, a atividade da PPO é maior que da POD.



**Figura 3.** Atividade da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) de tecido escurecido e não escurecido de nervuras de alface Vitória, da região média (A) e interna (B), tratados com ácido ascórbico, embalados em sacos de PEAD, e conservados a 5°C por 8 dias. Linhas com letras iguais sobre cada curva não diferem por Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). As linhas sobre as médias correspondem ao desvio padrão.

Na Figura 3, pode constatar-se que em ambos os tipos de nervuras (escurecido e não), a atividade da POD foi menos afetada que a atividade da PPO, indicando que a ação do AA teria afetado menos a atividade catalítica da POD, embora em magnitudes diferentes em ambos os

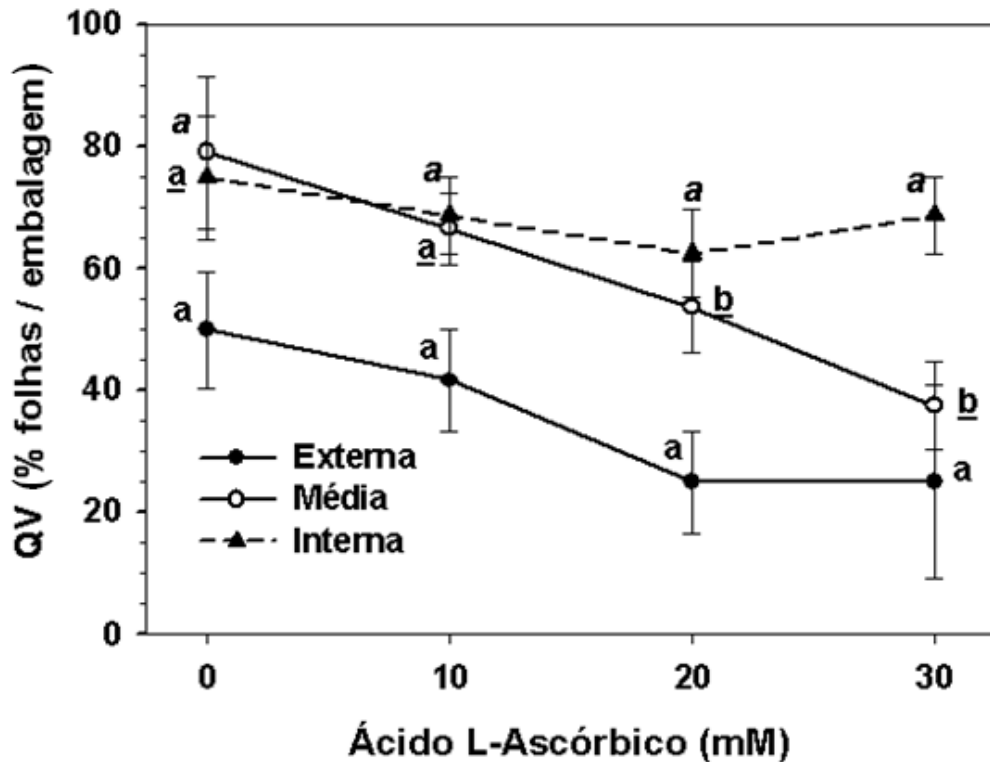
tipos de nervuras. Entretanto, essas diferenças de atividade por si, são insuficientes para explicar totalmente aumento do escurecimento com o aumento das concentrações de AA em todos os tipos de nervuras.

Richard-Forget & Guillard (1997) reportaram a participação da PPO e POD de maneira sinérgica no escurecimento, devido à utilização da POD, como agentes oxidantes ou substratos, aos produtos da oxidação da PPO e quinonas. Ainda a atividade das enzimas e sua interação podem ser dependentes das mudanças no conteúdo e diversidade de compostos fenólicos com a idade foliar conforme Romani, *et al.*, (2002) quanto pela elevada atividade da POD com ácido cafeico e clorogênico, presentes em alface (Bestwick, Brown & Mansfield, 1998; Degl'Innocenti *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008).

Contudo a questão é se existem outros fatores pré ou pós-tratamento com ácido ascórbico, capazes de promover a oxidação de polifenóis ou que afetem a quantidade de formas ativas das enzimas e sua atividade catalítica estádio-específico que favoreçam o escurecimento no tecido foliar de alface. Entretanto, fica evidente o maior escurecimento nas nervuras, independentemente da região de origem perante a cabeça, estimulado por aplicações de AA entre 10 e 30 mM.

**Qualidade visual de folhas inteiras.** Folhas minimamente processada da posição externa, média e interna, apresentaram quedas na qualidade visual (QV), em magnitudes diferentes, em função do aumento das concentrações de AA (Figura 4). Folhas externas tiveram menores QV, seguido das folhas médias e internas.

Nas folhas externas as folhas com QV variaram entre 25 e 50%. O controle teve QV 50%, e 42, 25 e 25% os tratamentos com 10, 20 e 30 mM de AA, respectivamente (Figura 4). Porém, sem diferenças significativas devido à elevada variância ambiental encontrada (CV = 49%). Folhas da posição média da cabeça tiveram maior QV que as encontradas nas folhas externas. Assim, foram registradas QV de 79, 67; 54 e 37% nas concentrações 0, 10, 20 e 30 mM de AA, respectivamente. Entretanto, somente o controle e o tratamento com 10 mM de AA, tiveram QV superior que às concentrações de 20 e 30 mM de AA, evidenciando a influência negativa do AA na conservação de folhas inteiras minimamente processadas. Nas folhas da região interna não houve efeito significativo das concentrações de AA na qualidade visual das folhas. Porém somente entre 62 e 75% das folhas armazenadas tiveram QV para consumo pós-conservação.



**Figura 4.** Qualidade visual (QV) de folhas da região externa, média e interna tratadas com ácido ascórbico, embaladas em PEAD e conservadas por 15 dias a 5°C. As barras em cada ponto correspondem ao desvio padrão.

Das respostas observadas na Figura 4, se evidenciam a perda da QV das folhas das regiões externa e média, mas nenhum efeito nas folhas internas, implicando a interação negativa do AA com o aumento da idade foliar.

Comercialmente, o controle do escurecimento de alfaces cortadas tem utilizado atmosfera modificada na embalagem com concentrações de O<sub>2</sub> maiores que 3% e concentrações de CO<sub>2</sub> acima de 10% (Grzegorzewska, 2007), e combinações com 200 ppm de ácido cítrico para o controle do escurecimento dos bordos cortados, mas sem resultados satisfatórios para o escurecimento na superfície de nervuras e limbos de alface (Artés *et al.*, 2007).

A diminuição da qualidade visual das folhas inteiras minimamente processadas teve manifestação evidente a partir do décimo dia de conservação, iniciando-se com a presença de pequenas áreas descoloridas, necróticas e apodrecidas na superfície das lâminas foliares (Figura 5). Essas áreas apodrecidas progrediram de áreas cloróticas indicando que houve um processo de desintegração do tecido com trans-diferenciação e otimização da morte, permitindo a reciclagem de nutrientes de áreas vizinhas a outras. A degradação da clorofila em folhas de espinafre foi atribuída ser regulada pela via peroxidase - peróxido de hidrogênio, através do qual o anel de porfirina se abre, resultando assim em um composto descolorido (Yamauchi & Watada, 1991). A senescência em folhas destacadas está caracterizada pela diminuição dos

níveis de proteínas e clorofila (Matila citado por Shora, 2003), e essa diminuição, em folhas de *Cucúrbita*, tem tido como causa elevados níveis de  $H_2O_2$  produzidos durante a senescência (Shora, 2003).



**Figura 5.** Aspecto visual de folhas minimamente processadas da cv. Vitória aos 15 dias de conservação em bandejas de PET a 5°C. Folha sem defeito (a), e defeituosas com: (b) descoloramento/amarelecimento, (c) necrosamento, e (d) apodrecimento.

Sintomas similares de apodrecimento e desintegração de áreas na lâmina foliar foram relatados por Wagstaff *et al.*, (2007) em folhas inteiras de alface baby minimamente processadas, embaladas e refrigeradas a 6°C por 10 dias. Esses pesquisadores encontraram ao terceiro dia de conservação sinais de perda de eletrólitos, plasmólise (fragmentos separados entre o citoplasma e o tonoplasto), perda de integridade das membranas e morte, em um

processo semelhante à senescência induzida. É provável que os apodrecimentos localizados encontrados nas folhas inteiras de alface Vitória, possam ter tido origem na soma de eventos indicados por Wagstaff *et al.*, (2007) em interação com a maior suscetibilidade à deterioração de folhas externas em relação das médias e internas, e que esses efeitos negativos foram amplificados pela ação do ácido ascórbico, provavelmente por favorecimento da atividade da POD, como mostrado anteriormente nas nervuras.

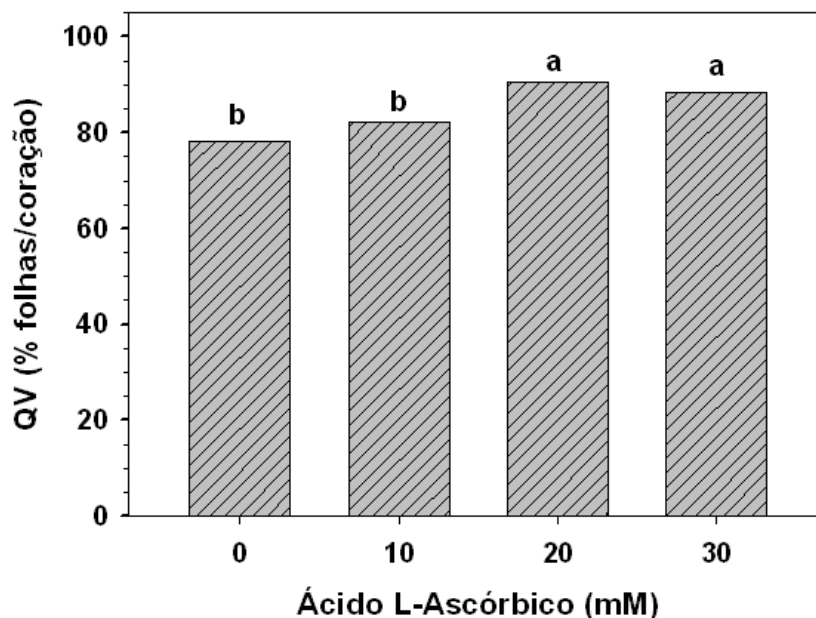
Em estados mais avançados de apodrecimentos, particularmente em folhas externas, foi observado “esfaleramento” da lâmina foliar, com “ilhas” de tecido ainda verdes. Essa manifestação foi localizada particularmente na metade superior da lâmina foliar, região superior onde foram encontradas maiores atividades da POD e PPO em alface Iceberg versus a metade inferior da folha (Heindal. *et al.*, 1994; Martin-Diana *et al.*, 2005). Ainda, folhas destacadas estão sujeitas a uma repentina disrupção na provisão de carboidratos, nutrientes e reguladores de crescimento (Huber, 1987; King *et al.*, 1995), e a senescência em folhas destacadas está caracterizada pela diminuição dos níveis de proteínas e clorofila (Matile *et al.*, 1996), e de fato folhas da posição externa se conservam menos que as internas depois de destacadas. Também foi indicado que o etileno não é sintetizado em folhas imaturas, e folhas intactas possuem baixas taxas respiratórias e de produção de etileno na ordem de 2 e 4 vezes a menos versus as cortadas (Mattos *et al.*, 2008). Embora, o anterior seja uma via para explicar a maior perecibilidade de folhas maduras, se sabe também que em folhas maduras é possível a ação do ácido abscísico e metil jasmonato na iniciação da senescência foliar na ausência de etileno (Nam, 1997; Lim *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007).

Em folhas de arroz destacadas, houve redução da atividade da catalase em 55% aos seis dias de conservação com relação à atividade medida nas folhas recém cortadas, e aumentos expressivos da atividade da PPO e POD (Kar & Mishra, 1976). Todavia esses autores constataram níveis elevados da atividade nas folhas totalmente expandidas e maduras. Assim, as folhas de alface da região externa e média, podem ter tido aumentadas as concentrações de  $H_2O_2$  pela diminuição da atividade da catalase, e como resultado do processo de senescência, resultando em maior disponibilidade de  $H_2O_2$  para a oxidação de substratos fenólicos via POD e PPO, ou mesmo a o  $H_2O_2$  ter participado na peroxidação de lipídios de membrana.

Entretanto, nas concentrações avaliadas de AA não se dispõe de informação que explique o mecanismo de ação do AA na perda de qualidade visual das folhas externas e médias de alface, exceto a citação de Saunder (1972) por Scandalios (1974), de que o ácido ascórbico pode ser utilizado pela POD como doador de hidrogênio para a reação catalítica da POD.

Folhas maduras e próximas à maturidade têm sido indicadas por ter naturalmente maior atividade da POD e produção de  $H_2O_2$  (Passardi *et al.*, 2004). Entretanto, em alface não há relatos prévios de estudos que tivessem considerado o estágio-foliar como fator que possa influenciar no escurecimento ou a diminuição da qualidade visual. Por outro lado, cabe lembrar que na maioria dos casos de controle do escurecimento em frutas e hortaliças, o ácido ascórbico foi utilizado em combinação com ácido cítrico, cisteína, fontes de cálcio e vácuo (Garcia & Barret, 2002), e o sucesso do controle do escurecimento pode ser resultante de mecanismos distintos de ação.

**Qualidade visual dos corações.** O aspecto exterior dos corações tratados e não tratados com ácido ascórbico não apresentou qualquer defeito que afetasse a qualidade visual (Figura 7). Entretanto as diferenças entre os tratamentos foram observadas nas folhas internas do coração (Figura 6), devido às folhas mais internas do coração e cogulho apresentarem pequenas manchas pardas, enegrecidas e **podres** na lâmina foliar (Figura 7). O tratamento com AA evitou essa sintomatologia e manteve uma qualidade visual (QV) satisfatória das folhas mais internas do coração. Os tratamentos a partir das concentrações 20 e 30 mM de AA foram mais eficientes na prevenção de folhas manchadas, em relação ao controle e a 10 mM de AA (Figura 6).



**Figura 6.** Qualidade visual (QV) de corações tratados com ácido L-ascórbico, embalados em sacos de PEAD aos 15 dias de conservação refrigerada a 5°C e no processamento mínimo.

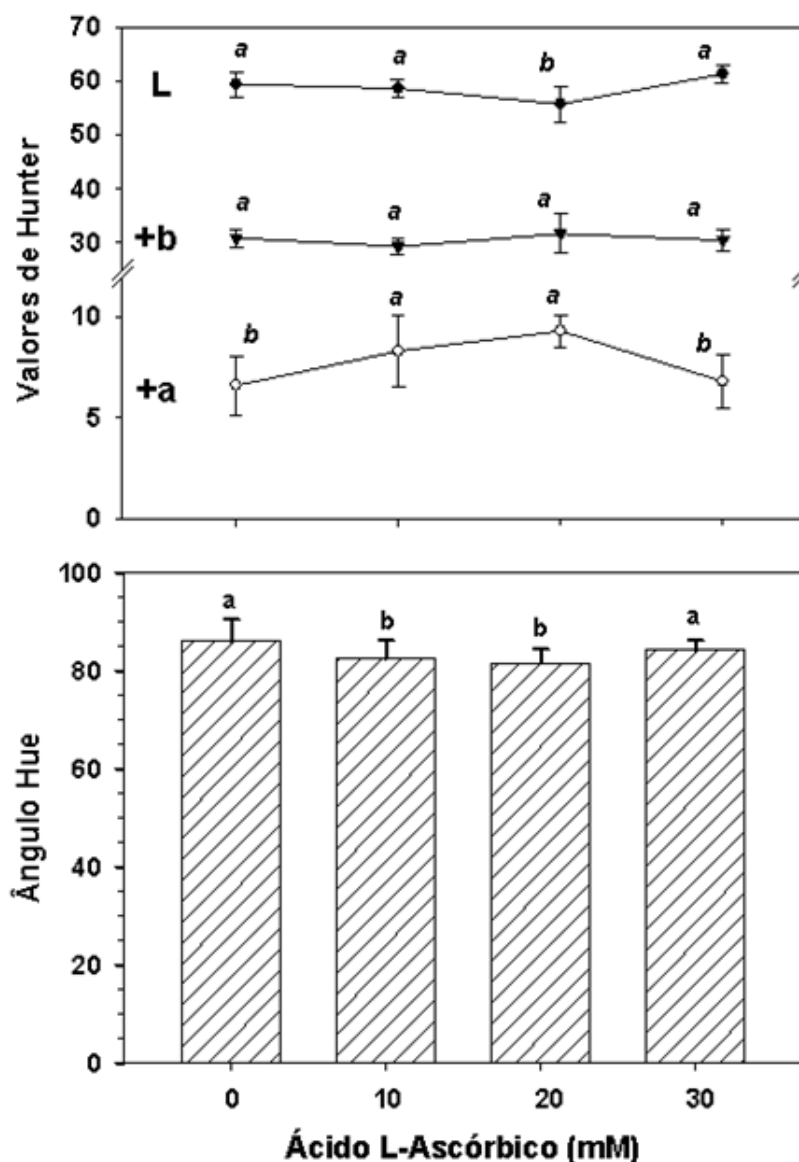
O aparecimento de manchas necróticas nas folhas mais internas do coração pode ter sido originado do estresse metabólico, derivado da supressão da provisão de nutrientes, carboidratos e hormônios, que sustentavam o franco crescimento antes do corte das cabeças, e estabelecendo-se novas relações entre as folhas, com desvantagem para as folhas meristemáticas. Nesse processo é provável que o ácido ascórbico tenha atenuado o estresse oxidativo das folhas mais internas e do cogulho, contribuindo para a conservação das mesmas. De fato uma das funções do AA é a extinção de radicais livres originados de estresses diversos (Smirnoff, 1996; Davey *et al.*, 2000). A aplicação de AA pode ter favorecido a ativação da ascorbato oxidase e ascorbato peroxidase, enzimas que extinguem radicais livres e  $H_2O_2$  com formação de monolignóis e de oxalatos de cálcio no apoplasto (Smirnoff, 1996; Davey *et al.*, 2000), resultando na diminuição dos efeitos nocivos nas membranas pela ação de radicais livres.



**Figura 7.** Aparência visual do coração inteiro e das folhas do coração depois de 15 dias de conservação a 5°C dentro de sacos PEAD e tratados com ácido L-ascórbico no processamento mínimo.

**Escurecimento da base do caule em corações.** Entre os valores de Hunter (L, a, b) avaliados na base do caule somente os valores de L (luminosidade) e +a (vermelho) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8). Os valores de L variaram de 55,7 a 61,3 e somente o valor L do tratamento com 20 mM de AA foi menor dos valores do

controle e os tratamentos 10 e 30 mM de AA. O valor +a apresentou variação entre 6,6 e 9,3 na região do vermelho, e cujo avermelhamento foi evidentemente visível (Figura 7). Os valores de +a dos tratamentos 10 e 20 mM de AA foram significativamente mais vermelhos do que o controle e o tratamento com 30 mM de AA, que atingiram valores similares. O escurecimento da base dos caules, medido pelo ângulo Hue (Figura 8), mostra valores significativamente maiores do tratamento 30 mM e o controle, versus os tratados com 10 e 20 mM, confirmando que houve efeito positivo da maior concentração de AA utilizada, como também observado pela maior retenção da qualidade visual de folhas do coração.



**Figura 8.** Valores do Hunter L, a, b, e ângulo Hue medidos na base dos caules dos corações, tratados com ácido ascórbico, embaladas em PEAD e conservadas por 15 dias a 5°C.

## **CONCLUSÕES**

O ácido ascórbico nas concentrações avaliadas na presente pesquisa influenciou de maneira distinta no escurecimento e na qualidade visual de nervuras, folhas inteiras de regiões distintas da cabeça de alface, folhas dos corações e da superfície cortada do caule dos corações, minimamente processados.

Em quanto que o escurecimento em nervuras e a qualidade visual de folhas inteiras foram afetados negativamente pelo aumento da concentração de AA a partir de 20 mM, houve efeitos positivos na qualidade visual das folhas dos corações e diminuição do escurecimento do corte basal do caule dos corações.

O efeito diferencial do AA pode derivar-se da sua interação com fatores endógenos que variam com a idade foliar, o tipo de tecido e o destacamento ou não das folhas de alface em função do tipo de processamento mínimo empregado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa PEC-PG CAPES pela bolsa de Doutorado, na pessoa de Milton Edgar Pereira Flores.

## REFERÊNCIAS

- ABELES, FB; DUNN, L. J.; MORGENS, P.; CALLAHANS, A.; DINTERMAN, R. E.; SCHMIDT, J. Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. **Plant Physiology**. 1988. 87:609–15
- AGÜERO, M. V.; BARG, M. V.; YOMMI, A.; CAMELO, A.; ROURA, S. I. 2008. Postharvest changes in water status and chlorophyll content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and their relationship with overall visual quality. **Journal of Food Science**. S: Sensory and Food Quality. Vol. 73, Nr. 1.
- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- ALVAREZ, V .H. V.; NOVAIS, R .F.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; LOPES, A. S. “Interpretação dos resultados das análises de solos”. Em Ribeiro et al., (1999). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação**. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais - CFSEMG, Viçosa-MG. 359p.
- AMIOT, M. J.; FLEURIET, A.; CHEYNIER, V.; NICOLAS, J. “Phenolics compounds and oxidative mechanism in fruit and vegetables”. In F.A. Tomas-Barberán and R.J. Robins, eds., *Phytochemistry of fruits and vegetables*, **Proceedings Phytochemical**. Soc. Europe, Clarendon Press, Oxford, 1997, pp. 51-87.
- ARNEZ-ZERDAS, E. R. M. 2009. **Avaliação do uso de surfactantes na remoção de *Salmonella Enteritidis* aderida em superfície foliar da alface (*Lactuca sativa* L.)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- ARTÉS, F. & MARTINEZ J.A. 1996. Influence of packaging treatments on the keeping quality of Salinas lettuce. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 29: 664-668.
- ARTES, F.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. 2007. Physical, Physiological and Microbial Deterioration of Minimally Fresh Processed Fruits and Vegetables. **Food Science and Technology International**. 13; (3) 177 -188.

- ASHIE, I.N.A.; SIMPSON, B.K.; SMITH, J.P. 1996. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 36, 1-30.
- BARRY-RYAN, C.; O'BEIRNE, D. 1999. Ascorbic acid retention in shredded iceberg lettuce as affected by minimal processing. Engineering/Processing. **Journal of Food Science.** Volume 64, No. 3, 498-500.
- BRANDL, M. T.; ADMUNSON, R. 2008. Leaf age as risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology.** 2298-2306.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.
- BESTWICK, C. S., BROWN, I. R., & MANSFIELD, J. W. 1998. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non-host hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, 118, 1067–1078.
- BOLIN, H. R.; STAFFORD, A. E. ; KING, Jr. A.D.; HUXSOLL, C. C. 1977. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. *J. Food. Sci.* 42:1319-1321.
- BURNETTE , F.S. 1977. Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: a review. **J. Food Sci.** 1977. 42:1-6
- CAMPOS-VARGAS, R., NONOGAKI, H., SUSLOW, T., SALTVEIT, M.E., 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. **Physiol. Plant.** 123, 82–91.
- CAMPOS, R.; NONOGAKI, H.; SUSLOW, T.; SALTVEIT E. M. 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. **Physiologia Plantarum** 121: 429–438.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Effect of Wounding on Phenolic Enzymes in Six Minimally Processed Lettuce Cultivars upon Storage. **J. Agric. Food Chem.** 2001, 49, 322330.
- CANTWELL, M.; SUSLOW, T. 2002. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: Kader, A.A. (Ed.), **Postharvest Technology of Horticultural Crops**, vol. 3311, 3rd ed. Univ. California Special Publ., pp. 445–463.
- CARNELOSSI, M. A. G. 2000. **Fisiologia pós-colheita de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) minimamente processada.** 81 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – UFV, Viçosa.
- CASTAÑER, M.; GIL, M. I.; ARTÉS, F. 1997. Organic acids as browning inhibitors on harvested 'Baby' lettuce and endive. **Z Lebensm. Unters Forsch A.** 205: 375–379.
- CASTILLO, L.; ALPEEVA, I. S.; CHUBAR, T. A.; GALAEV, I.; CSOREGI, E.; SAKHAROV, I. 2002. Purification and substrate of peroxidase from sweet potato tubers. **Plant Science.** 2002,163, 1011-1019.

- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. 2007. Processamento mínimo de alface. (301-341). Em Moretti, C. (2007). Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Brasília, Embrapa-Hortaliças/SEBRAE. P.527.
- CHOI, Y.J.; TOMÁS-BARBERÁN, A. F.; SALTVEIT, M. E. 2005. Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to n-alcohols. *Postharvest Biol. Technol.* 37, 47–55.
- CONSTABEL, C.P.; YIP, L.; PATTON, J.J.; CHRISTOPHER, M.E. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology.* (2000) 124:285–295.
- COOK, R. **Trends in the marketing of fresh produce and fresh-cut products.** Agricultural Issues Center. University of California. AgMRC. November 2007. 74p.
- DAVEY, M. W.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80:825±860.
- DEGL'INNOCENTI, E.; GUIDI, L.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F. 2005. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Acephala*). **J. Agric. Food Chem.** 53, 9980–9984.
- DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F.; GUIDI, L. 2007. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. **Food Chemistry** 104. 209–215
- DOĞAN, S.; SALMAN, Ü. Partial characterization of lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase. *Journal of Food Engineering.* 79, 375-382. **Eur Food Res Technol** (2007) 226:93–103.
- EI-SHORA, H. M. 2003. Activities of antioxidative enzymes and senescence in detached cucurbita pepo under cu- and oxidativestress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *BECTH. MOCK. YH-TA. CEP.* 2. *ХИМИЯ.* 2003. Т. 44. № 1. 66-71.
- ESPARZA-RIVERA, R.J.; STONE, B.M.; STUSHNOFF, C.; PILON-SMITS, E.; KENDALL, A.P. Effects of Ascorbic Acid Applied by Two Hydrocooling Methods on Physical and Chemical Properties of Green Leaf Lettuce Stored at 5 °C. **Sensory and Nutritive Qualities of Food.** Vol. 71, Nr. 3, 2006. 270-276.
- FELTON, G.W.; DONATO, K.; DEL VECCHIO, R.J.; DUFFEY, S.S. 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15, 2667-2694.
- FERRER, M. A.; GOMEZ-TENA, M.; PEDREÑO, M. A.; BARCELÓ, A. R. 1996. Effects of ethrel on peroxidase of Iceberg lettuce leaf tissue. **Postharvest Biology and Technology.** 7: 301-307.
- FLURKEY, W.H. 1986. Polyphenoloxidase in higher plants. **Plant Physiology.** Vol. 81, 614-618.

- FONTES, P.C.R. 1999. "Sugestões de adubação para hortaliças: Alface". Em Ribeiro *et al.*, **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação**. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais - CFSEMG, Viçosa-MG. 359p.
- FUKUMOTO, L. R.; TOIVONEN, M. A. P.; DELAQUIS, J. P. 2002. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 50, No. 16, 4503-4511.
- GARCIA, E.; BARRET, M.D. 2002. Preservative treatment for fresh-cut fruits and vegetables. (2002). In Lamikanra, O. **Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology, and market**. CRC Press LLC. USA, 467p.
- GAWLIK-DZIKI, U.; ZŁOTEK, U.; WIECA, M. 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). **Food Chemistry** 107.129–135.
- GRZEGORZEWSKA, M. 2007. The influence of postharvest treatment and short term storage on quality and durability of fresh cut crisp lettuce (*Lactuca sativa* L.var. capitata L.). **Vegetable Crops Research Bulletin** 67. vol. 67, 137-147.
- GUTIÉRREZ, L. M.; BRUNA, L. P. 2008. **El cultivo de lechuga en Aragón**. Ensayos de material vegetal y ciclos de producción. Informaciones técnicas. Dirección General de Desarrollo Rural. Centro de Transferencia Agroalimentaria Núm. 192. 28p.
- HASSENBERG, K.; IDLER, C. H. R. 2005. "Influence of washing method on the quality of prepacked iceberg lettuce". **Agricultural Engineering International: the CIGR E-journal**. Manuscript FP 05 003. Vol VII. Novembro.1-8.
- HEIMDAL, H., LARSEN, L.M. and POLL, L. 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa* L.). **J. Agric. Food. Chem.** Vol. 42, 1428-1433.
- HEIMDAL, H.; KÜHN, B. F.; POLL, L., AND LARSEN, L. M. 1995. Biochemical changes and sensory quality of shredded and MA-packed Iceberg lettuce. **J. Food Sci.**, (1995).60, 1265– 1268.
- HENRIQUES, F.; PARK, R. B. 1976. Development of the photosynthetic unit in lettuce (membrane peptide / freeze-fracture/chloroplast). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. December Vol. 73, No. 12, pp. 4560-4564.
- HILAIRE, K. T.; AHIPO, D.E. EUGÈNE, J.P.K.N.; NIAMKÉ, S.; JUSTIN, K.Y.; MÉRILLON, J.M. Purification and Characterization of Cell Suspensions Peroxidase from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Appl Biochem Biotechnol**. (2008) p18.
- HISAMINATO, H.; MURATA, M.; HOMMA, S. 2001. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 65 (5), 1016-1021.

- HO, K. 1999. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, Aranda 'Christine 130'. **Plant Physiology and Biochemistry**. 37, 841-848.
- HODGES, D. M.; TOIVONEN, M. A. P. 2008. Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress. **Postharvest Biology and Technology**. 48, 155-162
- HUBER, D.J., 1987. Postharvest senescence: an introduction to the symposium. **HortScience** 22, 853-859.
- HUNT, R. 2003. Growth Analysis. Individual Plants. From Thomas, B., Murphy, D.J. and Murray, D. (eds). 2003. **Encyclopaedia of applied plant sciences**, 588-596. Academic Press, London.
- HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. 1978. 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.** 62,31-35.
- INTERNATIONAL FRESH-CUT PRODUCE ASSOCIATION (IFPA) AND PRODUCE MARKETING ASSOCIATION (PMA). 1999. Handling Guidelines for the Fresh-cut Produce Industry, 3<sup>rd</sup> edition, 7 IFPA, Alexandria, VA, pp. 5.
- ILKER, Y.; KADER, A.A.; ILKER, R.; MORRIS, L.L. Anatomy of lettuce tissue affected by three physiological disorders. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 102(4):426-428. 1977.
- KAR, M.; MISHRA, D. 1996. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. **Plant Physiol.** 57, 315-319.
- KARSTEN, J. 2009. **Envolvimento da peroxidase e polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráíso (Strelitzia reginae)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil. 2009. 117p.
- KE, D., SALTVEIT, M.E. 1986. Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in Iceberg lettuce. **HortScience**. 21, 1169-1171.
- KE, D.; SALTVEIT, M. E. 1989a. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in Iceberg lettuce. **Physiologia Plantarum**. 76, 412-418.
- KE, D.; SALTVEIT, M. E. 1989b. Carbon dioxide induced brown stain development as related to phenolic metabolism in Iceberg lettuce. **Journal of American Society of Horticultural Science**. 114, 789-794.
- KING, G.A., DAVIES, K.M., STEWART, R.J., BORST, W.M., 1995. Similarities in gene expression during the postharvest-induced senescence of spears and natural foliar senescence of asparagus. **Plant Physiol.** 108, 125-128.
- HYUN-JIN KIM, H. J.; FONSECA, M. J.; CHOI, J. H.; KUBOTA, CH. 2007. Effect of Methyl Jasmonate on Phenolic Compounds and Carotenoids of Romaine Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **J. Agric. Food Chem.** 55, 10366-10372.

- LAMIKANRA, O. **Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology, and market.** CRC Press LLCC, 2002. 185p.
- LANKER, T., KING, T.G., ARNOLD, S.W. and FLURKEY, W.H. 1987. Active, inactive and in vitro synthesized forms of polyphenoloxidase during leaf development. **Physiol. Plant** 69, 323-329.
- LARCHER, W. 2002. **Ecofisiologia Vegetal.**São Carlos, RiMa. São Paulo. 529p.
- LEPEDUS, H.; GAÇA, V.; CESAR, V. Guaiacol Peroxidases and Photosynthetic Pigments during Maturation of Spruce Needles. **Croatica Chemica Acta.** 78 (3) 355;360 (2005).
- LIEBEREI, R., BIEHL, B. and VOIGT, J. 1981. Serological studies on phenolase from spinach leaves. **Phytochemistry.** 20, 2109-21 16.
- LIM, O. P.; WOO, R.H.; AND NAM, G.H. 2003. Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. **TRENDS in Plant Science** Vol.8 No.6 June.
- LIM, O. P.; KIM, J.H.; NAM, G. H. 2007. Leaf senescence. **Annu. Rev. Plant Biol.** 58:115–136.
- LOAIZA-VELARDE, J. G.; TOMÁS-BARBERÁN-GUZMÁN, F.A.; SALTVEIT, M. E. 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in Iceberg lettuce. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 122, 873–877.
- LOPEZ-GALVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. 1996. The visual quality of minimally processed lettuces stored in air or controlled atmosphere with emphasis on romaine and Iceberg types. **Postharvest Biology and Technology,** 8.179-190.
- LURIE, S. In HODGES, D.M. Postharvest oxidative stress in horticultural crops. **Food Products Press.** New York, U.S.A. 2003. (131-150).
- LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, A. F.; GIL, I. M.; FERRERES, F. 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Analytical Methods. Food Chemistry** 108. 1028–1038
- MARCELIS, L.F.M.; HEUVELINK, E.; GOUDRIAAN, J. 1998. Modelling biomass production and yield of horticultural crops: a review. **Scientia Horticulturae,** Amsterdam, v.74, n.1-2, p.83-111.
- MÁRQUEZ, O.; WALISZEWSKI, K. N.; OLIART, R. M.; PARDIO, V. T. 2008. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **Food Science and Technology.** 41, 1372-1379.
- MARSHALL, M.R.; KIM, J. WEI, CH. 2002. **Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods,** FAO. 71p.
- MARŠIĆ, N. K.; OSVALD, J. 2002. Effects of Different Nitrogen Levels on Lettuce Growth and Nitrate Accumulation in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) Grown Hydroponically under Greenhouse Conditions **Gartenbauwissenschaft,** 67 (4). S. 128–134.

- MARTIN-DIANA, A.B.; RICO, D.; BARRY-RYAN, C. MULCAHY, J.; FRIAS, J.; HENEHAM, G.T.M. 2005. Effect of Heat Shock on Browning-Related Enzymes in Minimally Processed Iceberg Lettuce and Crude Extracts. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 69(9), 1677-1685, 2005.
- MARTINEZ, M.V. and WHITAKER, J.R.. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Sci. Technol.** 6, 195-200.
- MATILE, P.H.; THOMAS, H.; KRUTLER, B. // Plant Physiol. 1996. 112. P. 1403. In, EISHORA, H. M. 2003. Activities of antioxidative enzymes and senescence in detached cucurbita pepo under cu- and oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 2. ХИМИЯ**. 2003. Т. 44. № 1. 66-71.
- MATTOS, M.M.; MORETTI, L.C.; BERG, N.L.F.; CHITARRA, B.A.; CHITARRA, F.M.I. 2003. Permeabilidade da embalagem e temperatura de armazenamento determinam a dinâmica de gases em alface crespa minimamente processada. *Horticultura Brasileira*, v. 21, n. 2, julho, 2003.
- MATTOS, L. M.; MORETTI, C.L.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. 2008. Atividade respiratória e evolução de etileno em alface crespa minimamente processada armazenada sob duas temperaturas. **COMUNICAÇÃO. Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 32, n. 6, p. 1985-1990, nov./dez.
- MATTOS, L.M; MORETTI C.L; CHITARRA A.B; PRADO, M.E.T. 2007. Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem. **Horticultura Brasileira**. 2007, 25: 504-508.
- MAYER, A. M. 1987. Polyphenol oxidase in plants. Recent progress. **Phytochemistry**. 26 (1), 11-20.
- McDONALD R.E., RISSE L.A., BARMORE C.R. 1990. Bagging chopped lettuce in selected permeability films. **HortScience**, 25(6): 671-673.
- McEVILY, A.J., IYENGAR, R. and OTWELL, W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,253-273. Citado por Yoruk, H.; Marshall, R.M. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry** 27 (2003) 361-422.
- MEYER, H.; BIEHL, B. 1980. Activities and multiplicity of phenolase from spinach chloroplasts during leaf ageing. **Phytochemistry**. 19, 2267-2272.
- MINOLTA CAMERA CO. **Chroma Meter CR-200. User's Manual**. Osaka, Japan, 1987.
- MURATA, M.; TANAKA, E.; MINOURA, E.; HOMMA, S. 2004. Quality of Cut Lettuce Treated by Heat Shock: Prevention of Enzymatic Browning, Repression of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity, and Improvement on Sensory Evaluation during Storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (3), 501-507.
- NAM, G.H. 1997. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology*. 8:200-207

- NEVES, L. L. DE M.. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo** [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Tese Doutorado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2003. 72 p
- NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; AMIOT, M.; AUBERT, S.Y. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 34, 109-157.
- NKYA, E.; KOUNO, C.; LI, Y-J.; YANG, C. P.; HAYASHI, N.; FUJITA, S. 2003. Purification and characterization of polyphenoloxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 51,5467-5471.
- NOBILE, M.A.D.; BAIANO, A.; BENEDETTO, A.; MASSIGNAN, L. Respiration rate of minimally processed lettuce as affected by packaging.
- OLIVEIRA, J. E. Z.; CASALI, V. W. D. 1999. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 1, p. 19-26.
- ONSA, G. H.; SAARI, N. SELAMAT, J.; BAKAR, J. 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from Metroxylon sagu. **Food Chemistry.** 85, 365-376.
- PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. 2005. Peroxidases have more functions than as Swiss army knife. **Plant Cell Rep.** 24:255-265.
- PEISER, G.; GALVEZ, G.; CANTWELL, M.; SALTVEIT, M.E. 1998. Phenylalanine ammonium-lyase inhibitors do not prevent russet spotting lesion development in lettuce midribs. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 123, 687-691.
- PEREIRA-FLORES, M.E. 2007. Variabilidade genética de acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) com base na avaliação de fotossíntese, alocação de assimilados e produção. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. 48p.
- PEREYRA, L. ROURA, S.I.; DEL VALLE, C.E. Phenylalanine ammonia lyase activity in minimally processed Romaine lettuce. **Swiss Society of Food Science and Technology**, 38 (2005) 67-72.
- RICHARD-FORGET, F., GAUILLARD, F.A., 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **J. Agric. Food Chem.** 45, 2472-2476
- ROBINSON, D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In **Food Enzymology**; Fox, P. F., Ed.; Elsevier:London. pp 399-426..
- ROMANI, A.; PINELLI, P.; GALARDI, C.; SANI, G.; CIMATO, A.; HEIMLER, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. **Food Chemistry** 79:337-342.
- ROURA, S. I., MOREIRA, M. D. R.; PONCE, A.; DEL VALLE, C. E. 2003. Dip treatments for fresh Romaine lettuce. **Italian Journal of Food Science.** 15(3), 405-415.

- ROVERSI R., MASSON M.L. 2004. Quality of minimally processed crisp head lettuce packaged under modified atmosphere. **Ciencia e Agrotecnologia** 28 (4): 823-830.
- SALA, F.C.; COSTA, C.P. 'Piraroxa': Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p. 158-159, 2005.
- SALTVEIT, M. E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology** 21: 61-69.
- SALTVEIT, E. M.; CHOI, J.Y.; TOMÁS-BARBERÁ, A.F. 2005. Mono-carboxylic acids and their salts inhibit wound-induced phenolic accumulation in excised lettuce (*Lactuca sativa*) leaf tissue. **Physiologia Plantarum**. 125: 454–463.
- SARAIVA, J. A.; NUNES, C. S.; COIMBRA, M. A. 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**. 101, 1571-1579.
- SAUCA I. E.; RUIZ G. J. I. 2007. Selección y mejora genética de las especies tomate y lechuga para su utilización en agricultura ecológica. Informe año 2005-2006. Ekonekazaritza/Neiker. Instituto Vasco Investigación y Desarrollo Agrario. 123p. [http://www.redsemillas.info/wp-content/uploads/2009/05/seleccion\\_mejora\\_2005\\_2006.pdf](http://www.redsemillas.info/wp-content/uploads/2009/05/seleccion_mejora_2005_2006.pdf).
- SAUNDERS, B. C.; SEIDLE, A. G. H.; STARK, B. P. 1964. Peroxidase. London: Butterworth. In Scandalios, G.J. (1974). Isozymes in development and differentiation. **Ann. Rew. Plant Physiol**. 1974. 25:225-58.
- SCANDALIOS, G. J. 1974. Isozymes in development and differentiation. **Ann. Rew. Plant Physiol**. 25:225-58.
- SCHOFIELD, A.R.; DEELL, J, R.; MURR, D.P.; JENNI, S. 2005. Determining the storage potential of Iceberg lettuce with chlorophyll fluorescence. **Postharvest Biology and Technology**, 38. 43–56.
- SEGEL, I. H. 1979. **Bioquímica, teorías e problemas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 527 p.
- SMIRNOFF, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany** 78:661-669.
- SIOMOS, A.S.; PAPADOPOULOU, P.P.; DOGRAS, C.C.; VASILADIS, E.; DOSAS, A.; GEORGIU, N. 2002. Lettuce composition as affected by genotype and leaf position. *Acta Hort.* (ISHS) 579:635-639. [http://www.actahort.org/books/579/579\\_112.htm](http://www.actahort.org/books/579/579_112.htm)
- SOLTIS, D. E.; HAUFLE, C. H.; DARROW, D. C.; GASTONY, G. J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of gridding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, Vienna, v. 73, n. 1, p. 9-27, 1983
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 81:853-876.

- USDA/ERS. Economic Research Service/USDA. **Uslettucestats**. 2008.
- USDA/FAS. Foreign Agricultural Service. **The U.S. and World Situation: Lettuce**. OGA/ISA/SCFB. USDA. June 2007.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 15, 49-127.
- VEITCH, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**. 65, 249–259
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. 2002. **Enzimas**. In: Basso, L. A. (ed.) *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, p. 279 – 349.
- WAGSTAFF, C.; CLARKSON. G.J.J.; ROTHWELL, S.D.; PAGE, A.; TAYLOR, G.; DIXON, M.S. 2007. Characterization of cell death in bagged baby salad leaves. **Postharvest Biology and Technology**. 46. 150–159
- WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; MICHALSKA, K.; KISIEL, W.; CHOJNACKA-WOJCIK, E. 2006. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 107:254-258.
- YAMAUCHI, N.; WATADA, A. E. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 116: 58-62.
- YANG, C. P.; FUJITA, S.; KOHNO, K.; KUSUBAYASHI, A.; ASHAFUZZAMAN, M.; HAYASHI, N. 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 1446-1449.
- YORUK, R.; MAURICE R. MARSHALL, R. M. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry** 27. 361-422.
- SAUCA I. E.; RUIZ G. J. I. 2007. Selección y mejora genética de las especies tomate y lechuga para su utilización en agricultura ecológica. Informe año 2005-2006. Ekonekazaritza/Neiker. Instituto Vasco Investigación y Desarrollo Agrario. 123p.

## ANEXOS

**Tampão do gel.** 15 mM de Tris<sup>a</sup> (Trizma-base Sigma T1503) e 4 mM de ácido cítrico (1,84 g de Tris<sup>a</sup> + 0,69 g ácido cítrico) com pH final de 7,8. **Tampão do eletrodo.** 100 mM NaOH e 300 mM de ácido bórico (4,00 g NaOH+18,55 g ácido bórico) com pH final de 8,6. Os pHs dos tampões devem ser ajustados com HCl ou NaOH.

**Condições padrão da eletroforese.** Gel de amido (12% de amido e 3% sacarose). A corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal com fonte elétrica de EC 3000D (Pharmacia Biotech EPS 300), com pré-corrída de uma hora a 35 mA e depois a 15 mA durante cinco horas. A corrida foi parada quando o marcador Azul de bromofenol (Sulfone Form, Sigma B0126; 0,04% w/v em 95% etanol), atingiu nove centímetros desde o ponto inicial da corrida.

### Soluções corantes das bandas isoenzimáticas no gel de amido (12%)

#### **Polifenol Oxidase (Método 1; Alfenas, 1986).**

Regente	Quantidade
Catecol	15 mg
Ácido sulfanílico	50 mg
Tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8 (q.s.p.)	100 mL

#### **Peroxidase (Método 1; Alfenas, 1986).**

Regente	Quantidade
3-amino-9-ethyl carbazole	50 mg
Dimetilformamida (DMF)	5 mL
Cloreto de Cálcio (1M)	2 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	6 mL
Tampão acetato de sódio 0,01 M pH 7,2 (q.s.p.)	100 mL

**Preparação:** Dissolver o 3-amino-9-ethyl carbazole em DMF e misturar com o tampão fosfato, finalmente adicionar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Teor de proteína solúvel total de extratos enzimáticos utilizados como fonte de PPO e POD na eletroforese.

Posição foliar	Teor de proteína (ug/mL)		
	Aurélia	Vitória	Crespa
6	2,2 ± 0,3 a	1,5 ± 0,4 a	1,2 ± 0,1 a
10	2,1 ± 0,3 a	1,3 ± 0,2 a	1,3 ± 0,1 a
14	2,3 ± 0,1 a	1,3 ± 0,4 a	-----
15	-----	-----	1,2 ± 0,1 a
18	2,4 ± 0,3 a	1,4 ± 0,1 a	-----
20	-----	-----	1,3 ± 0,1 a
22	2,4 ± 0,4 a	1,3 ± 0,2 a	-----
24	-----	-----	1,3 ± 0,1 a
26	2,6 ± 0,3 a	1,8 ± 0,3 a	-----
30	2,7 ± 0,1 a	1,9 ± 0,1 a	-----
Média	2,39±0,21	1,49±0,25	1,26±0,05
CV%	12,1	18,2	5,3

Letras iguais na coluna não diferem por Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).